Identification, caractérisation moléculaire et étude des propriétés fonctionnelles des anticorps neutralisants à large spectre contre le VIH-1

Valérie Lorin

▶ **To cite this version:**

Valérie Lorin. Identification, caractérisation moléculaire et étude des propriétés fonctionnelles des anticorps neutralisants à large spectre contre le VIH-1. Sciences agricoles. Université Paris Cité, 2020. Français. NNT : 2020UNIP7199 . tel-03339927

HAL Id: tel-03339927

https://theses.hal.science/tel-03339927

Submitted on 9 Sep 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Paris
Ecole doctorale Bio Sorbone Paris Cité, ED562

Institut Pasteur
Laboratoire d'Immunologie Humorale, INSERM U1222

Identification, caractérisation moléculaire et étude des propriétés fonctionnelles des anticorps neutralisants à large spectre contre le VIH-1

Par
Valérie LORIN

Thèse de doctorat en Sciences de la Vie / Immunologie

Dirigée par Dr Hugo MOUQUET

Présentée et soutenue publiquement le 27 Novembre 2020

Devant un jury composé de :

Pr. Pierre-Emmanuel CECCALDI, Institut Pasteur, Paris	Président du Jury
Dr. Mireia PELEGRIN, CHU Saint Eloi, Montpellier	Rapporteur
Dr. Laurent REBER, CHU Purpan, Toulouse	Rapporteur
Dr. Sophie SIBERIL, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris	Examinateur
Pr. Francis BARIN, Université de Tours	Examinateur
Pr. Stéphane PAUL, CHU de Saint Etienne	Examinateur
Dr. Hugo MOUQUET, Institut Pasteur, Paris	Directeur de thèse
Pr. Olivier SCHWARTZ, Institut Pasteur, Paris	Invité

Université de Paris
Ecole doctorale Bio Sorbone Paris Cité, ED562

Institut Pasteur
Laboratoire d'Immunologie Humorale, INSERM U1222

Identification, caractérisation moléculaire et étude des propriétés fonctionnelles des anticorps neutralisants à large spectre contre le VIH-1

Par
Valérie LORIN

Thèse de doctorat en Sciences de la Vie / Immunologie

Dirigée par Dr Hugo MOUQUET

Présentée et soutenue publiquement le 27 Novembre 2020

Devant un jury composé de :

Pr. Pierre-Emmanuel CECCALDI, Institut Pasteur, Paris	Président du Jury
Dr. Mireia PELEGRIN, CHU Saint Eloi, Montpellier	Rapporteur
Dr. Laurent REBER, CHU Purpan, Toulouse	Rapporteur
Dr. Sophie SIBERIL, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris	Examinateur
Pr. Francis BARIN, Université de Tours	Examinateur
Pr. Stéphane PAUL, CHU de Saint Etienne	Examinateur
Dr. Hugo MOUQUET, Institut Pasteur, Paris	Directeur de thèse
Pr. Olivier SCHWARTZ, Institut Pasteur, Paris	Invité

Remerciements

Je voudrais commencer par remercier sincèrement les membres du jury Dr Mireia PELEGRIN, Dr Sophie SIBERIL, Dr Laurent REBER, Pr Francis BARIN, Pr Stéphane PAUL, Pr Pierre-Emmanuel CECCALDI et Pr Olivier SCHWARTZ qui me font l'honneur de juger mon travail de thèse.

Hugo, ces quelques lignes ne suffiront pas pour t'exprimer tous mes remerciements et ma gratitude. Tu es arrivé à l'Institut Pasteur en mai 2013 pour monter ton groupe à cinq ans en partant d'un laboratoire complètement vide et en me recrutant comme technicienne supérieure de recherche. Notre collaboration efficace a permis très vite, la mise en place du laboratoire et le démarrage des projets de recherche. En me recrutant, le « deal » était la finalisation de mon parcours d'ingéniorat au CNAM par un stage effectué dans le laboratoire et la soutenance du mémoire d'ingénieur réalisée le 17 septembre 2015. Grâce à toi, ce long parcours de huit années s'est finalisé avec brio vis-à-vis du CNAM mais aussi vis-à-vis de l'Institut Pasteur car mon parcours et mon nouveau diplôme ont été reconnus au sein de l'entreprise en 2016 avec le passage au grade d'ingénieur de recherche confirmé. C'est alors que tu m'apportes ton soutien pour continuer dans cette même dynamique en entamant un doctorat en Immunologie. Au cours de ces quatre années de thèse, tu m'as guidé dans cette thématique particulièrement intéressante mais aussi très compétitive, tu m'as fait confiance et tu as été là dans des périodes difficiles expérimentalement. N'étant pas une doctorante « classique », j'ai combiné mes différentes casquettes dans le laboratoire à mon travail de recherche et aux différents projets collaboratifs. Là encore, tu as su harmoniser l'ensemble pour que tout se passe bien. Que d'évolution depuis notre premier entretien, que de projets intéressants, que de valorisation de nos recherches par des articles scientifiques, que de chemin parcouru... Je te remercie pour tout cela, pour ton soutien, ton optimisme qui parfois me faisait défaut, pour nos discussions scientifiques, pour le temps que tu m'as accordé surtout, dans la période très particulière de la pandémie de Covid-19, et pour ta confiance aussi en m'envoyant au congrès IAS à Mexico City.

Olivier, je voudrais te remercier aussi car ton unité Virus et Immunité a été pour ainsi dire, mon deuxième labo pendant ces années de thèse en plus du P3 dont nous avons la responsabilité commune en tant que responsables scientifiques. Nos deux laboratoires ont beaucoup collaboré avec une belle brochette de publications communes à la clé. Les membres de ton laboratoire m'ont accueilli chaleureusement (Florence, Françoise, Jocelyne, Timothée, Nico, Jérémy, Blandine), m'ont apporté leur aide technique surtout avec le FACS et cela a été un réel plaisir partagé ; merci les amis ! Nos discussions scientifiques ont toujours été enrichissantes et les voyages, un point commun !

Je voudrais remercier sincèrement les collaborateurs qui ont participé à ce projet sans qui nous n'en serions pas arrivés là (Guillemette, Giulia et Oriane pour partie *in vivo*, Ignacio pour les structures, Anne et Timothée pour les analyses de colocalisation).

Je remercie aussi tous les membres actuels et passés de notre G5 Réponse humorale aux pathogènes qui est passé ensuite, laboratoire d'Immunologie humorale, post-doctorants, M2 et stagiaires : Marine, Ayrin, Oxana, Verena, Cyril, Thierry, Maxime, Luis,

Cloé, Cindy et Nizar. De bons souvenirs au laboratoire et parfois, des moments bien arrosés lors des journées départementales d'Immunologie à Morzine ou à Pornic...

Je remercie également le Pr Sylvie Van der Werf qui lorsque je travaillais dans son unité sur les virus respiratoires m'a beaucoup apporté scientifiquement et m'a soutenu pour démarrer le CNAM ainsi que Nicolas Escriou qui m'a inculqué la rigueur scientifique et la connaissance d'une diversité de technologies.

Je remercie aussi Maria-Isabel Thoulouze qui a quitté le campus pasteurien aujourd'hui, pour son soutien lors du passage d'ingénieur en 2016, et qui m'a fait confiance ainsi qu'Etienne Decroly et Sandra Martin-Latil pour la gestion de la restauration des XXe Journées Francophones de Virologie 2018. Cela a généré des interactions positives dans une bonne ambiance et une satisfaction globale des participants au congrès.

En tant que Pasteurienne depuis 1993, je remercie aussi tous mes collègues du campus ainsi que certains commerciaux (Milteyni, Thermo Fisher, GE) pour leur soutien au cours de ces années de formation et pour tous les bons moments passés ensemble sur des pistes de ski, autour d'un verre, lors de spectacles ou lors du tournage du film « Le meilleur reste à venir » sur le campus qui a occasionné de bien belles rencontres en janvier 2019 avec les acteurs, l'équipe du film et le service Presse de l'Institut Pasteur en particulier, Nathalie et Aurélie. Comment imaginer se retrouver figurante et coach scientifique de Fabrice Luchini lors de ce tournage, un évènement unique en son genre sur le campus !! Ce fût pourtant la réalité !! J'ai été très fière de cette contribution, et d'avoir participé modestement à l'image de l'Institut à travers cette belle aventure ! Enfin, la présentation du film aux Pasteuriens au Gaumont Parnasse, et sa projection en avant-première au Grand Rex avec toute l'équipe du film ont été des évènements tout aussi joyeux !

De bons moments encore avec l'équipe des filles aux couleurs de l'Institut Pasteur durant l'édition de la Parisienne 2019, une course féminine de sept kilomètres. Des moments de partage et de soutien avec nos supporters Pasteuriens (Thierry x2) ou amis (Philomène). Merci à Isabelle, Patty et Philippe pour leur organisation. Merci à Philippe aussi pour tes séances d'entrainement durant le déjeuner.

Merci à mes amis pour leur soutien sans faille et pardon pour les refus d'invitation, parfois il y a des priorités... Je n'oublierai pas non plus, celles et ceux qui ont été là pour moi pendant les 62 jours de confinement lié à la pandémie de Covid-19, période que j'ai mis à profit pour démarrer la rédaction du manuscrit de thèse, et qui a été ponctuée par des moments difficiles. Merci Nathalie, Sylvie, Patricia, Laurence, Pasquale, Marine, Patrick, Jean et Philippe !!

Je remercie ma famille pour leurs encouragements durant ces longues années d'études qui touchent bientôt à leur fin !

Liste des principales abréviations

ADCC: *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*

ADCDC: *Antibody-dependent complement-dependent cytotoxicity*

ADCP: *Antibody-dependent cell-mediated phagocytosis*

ADCVI: *Antibody-dependent cell-mediated virus inhibition*

AN: Anticorps neutralisants

AnN: Anticorps non neutralisants

ATI: *Analytical treatment interruption*

BCR: *B cell receptor*

BHE: Barrière hémato-encéphalique

bNAbs: *Broadly neutralizing monoclonal antibodies*

cART: Traitements antirétroviraux combinés

CCR5: *(C-C) chemokine receptor 5*

CD: Cellules dendritiques

CD4bs: Site de fixation au CD4

CDR: *Complementary determining region*

CG: Centre germinatif

CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA: Cellule présentatrice d'antigène

Cryo-EM: Cryo-microscopie électronique

CV: Charge virale

CXCR4: *(C-X-C motif) chemokine receptor 4*

DC-SIGN: *Dendritic cell-Specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin*

Fab: *Antigen-binding fragment*

Fc: *Crystalizable fragment*

FcR: Récepteurs Fc

FcRn: Récepteur néonatal du fragment Fc

FWR: *Framework region*

Gal-Cer: Galactosyl-céramide

GALT: *Gut-associated lymphoid tissue*

HAND: *HIV-associated neurocognitive disorders*

HESN: *Highly exposed and seronegative individuals*

HR1/HR2: *Heptad repeat 1 and 2*

HSPG: Protéoglycanes à héparane sulfate

IC_{50}: *Inhibitory concentration 50 %*

Ig: Immunoglobuline

LB: Lymphocyte B (ou cellule B)

LCR: Liquide céphalo-rachidien

LT: Lymphocyte T

LT CD8+: Lymphocyte T cytotoxique portant le corécepteur CD8+ (CTL)

LT CD4+: Lymphocyte T auxiliaire portant le corécepteur CD4+

MALT: *Mucosa-associated lymphoid tissues*

MPER: *Membrane-proximal external region*

MS: Mutations somatiques

NK cells: *Natural killer cells*

OLS: Organes lymphoïdes secondaires

PBMC: *Peripheral blood mononuclear cells*

PF: Peptide de fusion

pIgR: Récepteur des immunoglobulines polymériques

PNH: Primates non humains

RER: Réticulum endoplasmique rugueux

SIV: *Simian immunodeficiency virus*

SIDA: Syndrome d'immunodéficience acquise

SHIV: *Simian-human immunodeficiency virus*

SNC: Système nerveux central

TCR: *T cell receptor*

T/F: *Transmitted founder virus*

T_{FH}: Lymphocyte T CD4+ folliculaire

UCA: *Unmutated common ancestors*

VIH-1: Virus de l'immunodéficience humaine de type 1

VIH-2: Virus de l'immunodéficience humaine de type 2

Résumé

Identification, caractérisation moléculaire et étude des propriétés fonctionnelles des anticorps neutralisants à large spectre contre le VIH-1

Un vaccin efficace contre le VIH-1 devrait induire des anticorps largement neutralisants (bNAbs), actifs contre la plupart des quasi-espèces de VIH-1 qui circulent chez les individus infectés dans le monde. De tels bNAbs sont produits chez 1-2 % des individus infectés. Leur administration passive a montré leur efficacité dans des études précliniques et cliniques. Dans ce travail, nous avons cherché à comprendre les mécanismes d'action par lesquels les bNAbs IgG et IgA sont capables d'interférer sur la transmission et la propagation du VIH-1. Deux problématiques de recherche ont été investiguées :

Dans un premier temps, nous avons étudié le rôle des anticorps anti-VIH-1 dans la protection de deux barrières tissulaires d'intérêt dans l'infection par le VIH-1 : l'épithélium du tractus génital féminin et l'endothélium de la barrière hémato-encéphalique. En utilisant des systèmes de transmigration virale à travers des monocouches cellulaires couplés à des analyses de microscopie confocale, nous montrons que bien que l'enveloppe virale n'est pas (dans l'épithélium) ou partiellement requise (dans l'endothélium) pour une transcytose virale optimale, aucun des bNAbs et des anticorps non ou faiblement neutralisants testés ne bloquent le passage du virus à travers ces deux barrières cellulaires *in vitro*. Dans les deux cas, les complexes anticorps-VIH-1 traversent les cellules par transcytose. Toutefois, les bNAbs inhibent l'infectivité des virions transcytosés dans les deux modèles (Lorin et al., Mucosal Immunology 2017), (Lorin et al., mBio 2020).

Le développement potentiel de lymphocytes B mémoires IgA^+ de type bNAbs au cours de l'infection à VIH-1 a été très peu exploré. Nous avons donc dans un deuxième temps, caractérisé au niveau moléculaire, structural et fonctionnel *in vitro* et *in vivo*, de nouveaux bNAbs anti-VIH-1 de type IgA, isolés d'un « contrôleur virémique ». Trois lignages lymphocytaires de bNAbs, 7-269 IgA, 7-176 IgG/IgA et 7-155 IgG ont été isolés chez ce contrôleur séropositif. La cartographie épitopique et les analyses structurales montrent que les bNAbs des trois clonotypes ciblent un épitope au niveau des N-glycanes associés au supersite N332 à la base de la boucle V3 du trimère, avec un recouvrement partiel de leurs épitopes respectifs. Leurs propriétés antivirales sont en cours d'évaluation. Enfin, nous avons démontré la capacité neutralisante *in vivo* du bNAb IgA 7-269 dans un modèle de souris humanisées infectées puis traitées par un traitement antirétroviral combiné.

Nos investigations démontrent : (i) qu'un des mécanismes probables par lequel les bNAbs préviennent la transmission de l'infection est qu'ils ne bloquent pas le transport du virus à travers les cellules épithéliales génitales mais qu'ils neutralisent les virions transcytosés ; (ii) le rôle clé de la neutralisation par les anticorps anti-VIH-1 dans la protection contre l'invasion virale du système nerveux central ; (iii) que les bNAbs IgA anti-VIH-1 au même titre que les bNAbs IgG pourraient participer de manière efficace à l'immunité anti-VIH-1.

Mots clés : Virus de l'Immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1), Anticorps largement neutralisants anti-VIH-1 (bNAbs), IgG, IgA, Transcytose, Barrières tissulaires.

Abstract

Identification, molecular characterization and functional properties of broadly neutralizing antibodies against HIV-1

Effective vaccines in preventing HIV-1 infection should induce broadly neutralizing antibodies (bNAbs), active against most of the HIV-1 quasispecies circulating in infected individuals worldwide. Such bNAbs developed in 1-2% of infected individuals. Their passive administration has been shown to be effective in preclinical and clinical settings. In this work, we aimed at understanding the mechanisms by which IgG and IgA bNAbs can interfere with the transmission and propagation of HIV-1. Two research avenues have been investigated:

First, the study of the role of anti-HIV-1 antibodies in the protection of two tissue barriers of importance in HIV-1 infection: the epithelium of the female genital tract and the endothelium of the blood-brain barrier. Using viral transmigration systems based on culture monolayers coupled with confocal microscopy analyses, we show that the HIV-1 envelope (Env) is not (in the epithelium) or partially required (in the endothelium) for an optimal viral transcytosis. Moreover, we find that none of the bNAbs and non- or weakly neutralizing antibodies tested can block the passage of the virus through the two barriers *in vitro*. In both cases, the anti-Env antibodies colocalize with HIV-1 virions, and transcytose across epithelial/endothelial cells. However, we show that bNAbs can inhibit the infectivity of transcytosed virions in both models (Lorin et al., Mucosal Immunology 2017), (Lorin et al., mBio 2020).

Second, the development of bNAbs-like IgA^+ memory B cells in response to HIV-1 infection has been poorly explored. Hence, we have characterized at the molecular, structural and functional level *in vitro* and *in vivo* novel anti-HIV-1 IgA bNAbs isolated from a “viremic controller”. Three lineages of bNAbs, 7-269 IgA, 7-176 IgG/IgA and 7-155 IgG were isolated from the HIV-1 controller. Epitope mapping and structural analyses show that these bNAbs from the three clonotypes target the N332 glycan patch associated with the V3 loop, with a partial overlap of their respective epitopes. Their antiviral properties are under evaluation. Finally, we demonstrate the *in vivo* neutralizing capacity of 7-269 IgA bNAb in a humanized mouse model infected with HIV-1, and then treated with combined antiretroviral therapy.

Our investigations demonstrate: (i) that one of the plausible mechanisms by which bNAbs prevent the transmission and dissemination of HIV-1 is that although they do not block virus transcytosis across genital epithelial cells, they neutralize transcytosed virions; (ii) the crucial role of neutralization by anti-HIV-1 antibodies in the protection against HIV-1 brain invasion despite their inability to inhibit transendothelial viral migration; (iii) that like IgG bNAbs, IgA bNAbs likely contribute actively to the antiviral immunity against HIV-1 and may therefore, play a key role in the protection.

Keywords: Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), Broadly neutralizing antibodies against HIV-1 (bNAbs), IgG, IgA, Transcytosis, Tissue barriers.

Table des matières

Remerciements 2
Liste des principales abréviations 4
Résumé 6
Abstract 7
Table des matières 8
Liste des figures 11
Liste des tableaux 13
INTRODUCTION GENERALE 14
1. Réponse immunitaire aux infections et Anticorps 15
1.1 L'immunité innée 15
1.2 L'immunité adaptative 15
1.2.1 L'immunité adaptative à médiation cellulaire 16
1.2.2 L'immunité adaptative à médiation humorale 16
1.3 Structure des immunoglobulines 21
1.3.1 Structure générale des immunoglobulines 21
1.3.2 Classes et sous-classes d'immunoglobulines et leurs activités biologiques 23
1.3.3 Structure et distribution des IgA 26
1.3.3.1 Structure des IgA 26
1.3.3.2 Distribution des IgA 26
1.4 Interactions antigène-anticorps 28
1.5 Neutralisation et fonctions effectrices des immunoglobulines 29
1.5.1 Neutralisation virale médiée par les anticorps 29
1.5.2 Fonctions effectrices des immunoglobulines 32
1.5.3 Fonctions effectrices des IgA 33
2. Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 37
2.1 Structure et réplication du VIH-1 37
2.1.1 Structure du VIH-1 et génome viral 37
2.1.2 Cycle réplicatif du VIH-1 39
2.2 Les glycoprotéines d'enveloppe et leur rôle dans l'entrée virale 42
2.2.1 Biosynthèse et maturation 42
2.2.2 Structure des glycoprotéines d'enveloppe 44
2.2.2.1 Structure de la gp120 44
2.2.2.2 Structure de la gp41 46
2.2.3 Structure tridimensionnelle de Env et modifications conformationnelles impliquées dans l'entrée virale 47
2.2.3.1 Structure tridimensionnelle de Env 47
2.2.3.2 Modifications conformationnelles impliquées dans l'entrée virale 49
2.2.4 Tropisme cellulaire du VIH-1 51
2.2.5 Diversité génétique des VIH 53
2.2.5.1 Origines des VIH 53

2.2.5.2 Facteurs conduisant à la diversité génétique des VIH-1 56

3. La physiopathologie de l'infection par le VIH-1 58
3.1 Histoire naturelle de l'infection par le VIH-1 58
3.2 Transmission muqueuse du VIH-1 60
3.2.1 Biologie des muqueuses en condition physiologique 60
3.2.2 Induction des IgA 64
3.2.3 Mécanismes d'entrée du VIH-1 et rupture des barrières muqueuses associée au VIH-1 64
3.2.4 Récepteurs alternatifs pour l'entrée du VIH-1 69
3.3 Les atteintes neurologiques au cours de l'infection par le VIH-1 : NeuroSIDA ... 70
3.3.1 Structure et fonctions de la barrière hémato-encéphalique 70
3.3.2 Mécanismes d'entrée de HIV-1 dans le système nerveux central 72
3.3.3 Neuropathogénèse du VIH-1 75
3.3.4 Système nerveux central : compartiment et réservoir pour le VIH-1 78
3.3.4.1 Le système nerveux central comme compartiment pour le VIH-1 78
3.3.4.2 Le système nerveux central comme réservoir du VIH-1 79

4. La réponse humorale contre l'infection à VIH-1 et place des anticorps neutralisants à large spectre 82
4.1 Impact de l'infection par le VIH-1 sur le compartiment lymphocytaire B 82
4.2 Réponses anticorps contre le VIH-1 au niveau périphérique et muqueux 82
4.2.1 Réponses anticorps IgG/IgA contre le VIH-1 au niveau périphérique 82
4.2.2 Réponses anticorps IgA contre le VIH-1 au niveau muqueux 85
4.3 Anticorps neutralisants à large spectre (bNAbs) 87
4.3.1 Isolement des bNAbs 87
4.3.2 Sites majeurs de vulnérabilité 87
4.3.2.1 Site N-Glycanes associés à la boucle V3, « le supersite N332 » 90
4.3.2.2 Site N-Glycanes associés aux boucles V1/V2 94
4.3.2.3 Site de liaison au CD4 96
4.3.2.4 Face « silencieuse » sur la gp120 98
4.3.2.5 Site N-Glycanes associés à l'interface entre la gp120 et la gp41 100
4.3.2.6 Peptide de fusion sur la gp41 105
4.3.2.7 Région externe proximale membranaire sur la gp41 (MPER) 105
4.3.3 Caractéristiques des bNAbs 107
4.3.4 Coévolution entre VIH-1 et cellules B à anticorps neutralisants 111
4.3.5 Activités antivirales additionnelles des bNAbs 115
4.3.5.1 Inhibition de la transmission virale de cellule à cellule 116
4.3.5.2 Fonctions effectrices médiées par le fragment Fc des Ig 116
4.3.5.2.1 ADCC 116
4.3.5.2.2 ADCP 118
4.3.5.2.3 ADCVI 118
4.3.5.2.4 ADCDC 119
4.3.5.3 Inhibition de la transcytose virale 119
4.3.6 Ingénierie des bNAbs anti-VIH-1 120
4.3.6.1 Modulation du fragment Fc pour améliorer les fonctions effectrices et la demi-vie 120
4.3.6.2 Ingénierie des bNAbs pour améliorer l'efficacité thérapeutique 121

4.3.6.3 Ingénierie de lymphocytes B humaines exprimant des bNAbs par édition génique CRISPR-Cas9 121
4.3.7 Efficacité des traitements utilisant des bNAbs 123
4.3.7.1 Immunothérapie à base de bNAbs dans les modèles animaux 123
4.3.7.2 Immunoprophylaxie à base de bNAbs dans les modèles animaux 124
4.3.7.3 Effets vaccinaux induits par les bNAbs 124
4.3.7.4 Essais cliniques chez l'homme 125

OBJECTIFS DE THESE 130

RESULTATS 133

Article 1: Broadly Neutralizing Antibodies Suppress Post-Transcytosis HIV-1 Infectivity 134

Article 2: Antibody Neutralization of HIV-1 Crossing the Blood-Brain Barrier 154

Article 3: N332 Supersite-Targeting Broadly HIV-1 Neutralizing IgA Antibodies from a Viremic Controller 169

DISCUSSION GENERALE 221

CONCLUSION 243

BIBLIOGRAPHIE 246

ANNEXE 271

Publications complémentaires durant la période de la thèse 272

Présentations orales et affichées durant la période de la thèse 273

Article technique: Efficient Generation of Human IgA Monoclonal Antibodies 274

Liste des figures

Figure 1 : Fonctions des lymphocytes T auxilliaires CD4+ 17

Figure 2 : Mécanismes d'action des anticorps pour lutter contre les infections 20

Figure 3 : Structure d'une immunoglobuline 22

Figure 4 : Classes et sous-classes d'immunoglobulines et leurs sites de glycosylation 24

Figure 5 : Modèles structuraux des IgA1 et IgA2 monomériques ainsi que de l'IgA1 sécrétoire 27

Figure 6 : Etapes du cycle de réplication virale potentiellement bloquées par les anticorps neutralisants : Exemple du VIH-1 31

Figure 7 : Fonctions des IgA dimériques et IgA sécrétoires 34

Figure 8 : Structure du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) et organisation génomique de l'ADN proviral du VIH-1 38

Figure 9 : Cycle réplicatif du VIH-1 40

Figure 10 : Biosynthèse et trafic des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 dans la cellule hôte 43

Figure 11 : Structure des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 45

Figure 12 : Structure tridimensionnelle des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 48

Figure 13 : Présentation des différentes conformations des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 au cours de la fixation au récepteur CD4 50

Figure 14 : Interactions des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 avec le récepteur CD4 et le corécepteur CCR5 pour induire la fusion et l'entrée virale 52

Figure 15 : Diversité génétique des différents virus de l'immunodéficience simienne (SIV) et humaine (VIH) 55

Figure 16 : Physiopathologie de l'infection à VIH-1 59

Figure 17 : Biologie des muqueuses 62

Figure 18 : Tissu lymphoïde associé à l'intestin : Exemple du petit intestin 63

Figure 19 : Mécanismes de transmission du VIH-1 à travers les muqueuses 66

Figure 20 : Organisation cellulaire et structurale de la barrière hémato-encéphalique 71

Figure 21 : Neuroinvasion du VIH-1 à travers la barrière hémato-encéphalique 74

Figure 22 : Désordres neurocognitifs associés au VIH-1 : Processus neuropathologique et impact des thérapies antirétrovirales combinées 76

Figure 23 : Evolution de l'infection à VIH-1 dans le sang et le système nerveux central 80

Figure 24 : Cinétique d'apparition des anticorps et évolution de la réponse neutralisante autologue au cours de l'infection à VIH-1 84

Figure 25 : Méthodologie de clonage, d'expression et de purification d'anticorps monoclonaux humains à partir de cellules B uniques 88

Figure 26 : Sites de vulnérabilité à la surface de la spicule d'enveloppe du VIH-1 ciblés par les anticorps largement neutralisants 89

Figure 27 : Site N-Glycanes associés à la boucle V3 : bNAbs de la famille PGT et 10-1074 91

Figure 28 : Site N-Glycanes associés à la boucle V3 : bNAb BG18 et orientation 93

Figure 29 : Site N-Glycanes associés au domaine V1/V2 : bNAbs PG9/PG16 95

Figure 30 : Site de liaison au CD4 : bNAbs VRC01 et N6 97

Figure 31 : Divergence en séquences et convergence en reconnaissance 99

Figure 32 : Site face « silencieuse » sur la gp120 : bNAbs VRC-PG05 et SF12 101

Figure 33 : Site N-Glycanes associés à l'interface entre la gp120 et la gp41 : bNAb 8ANC195 103

Figure 34 : Site N-Glycanes associés à l'interface entre la gp120 et la gp41 : bNAb 35O22 104

Figure 35 : Site peptide de fusion sur la gp41 106

Figure 36 : Site région externe proximale membranaire sur la gp41 (MPER) 108

Figure 37 : Hétéroligation des bNAbs anti-VIH-1 poly-réactifs et relations mutation/poly-réactivité/neutralisation 112

Figure 38 : Coévolution entre VIH-1 et cellules B à anticorps neutralisants : Existence de lignages coopérants et de sous-lignages 114

Figure 39 : Activités antivirales des bNAbs anti-VIH-1 117

Figure 40 : Ingénierie des bNAbs : Exemple de l'anticorps tri-spécifique VRC01/PGDM1400/10E8 122

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques et activités biologiques des classes et sous-classes d'immunoglobulines 23

Tableau 2 : Classification et prévalence des atteintes neurocognitives associées au VIH-1 selon les critères de Frascati 77

Tableau 3 : Résidus conservés parmi les puissants anticorps anti-CD4bs et leurs contacts sur la gp120 98

Tableau 4 : Longueur de la CDRH3 et pourcentage de mutations somatiques des principaux bNAbs ciblant les sept sites de vulnérabilité décrits sur l'enveloppe du VIH-1 109

Tableau 5 : Synthèse des essais cliniques passés, en cours et à venir utilisant des bNAbs anti-VIH-1 126

INTRODUCTION GENERALE

1. Réponse immunitaire aux infections et Anticorps

1.1 L'immunité innée

Une immunité anti-infectieuse efficace doit recourir à des stratégies permettant l'activation rapide de puissantes réponses immunes adaptées à des agents pathogènes divers tels que les virus, les bactéries, les parasites ou les champignons. L'immunité innée, immédiate et non spécifique, est la première ligne de défense contre les pathogènes. Elle inclut les barrières cutanéo-muqueuses, le système du complément [système de défense innée dont l'activation passe par trois cascades protéolytiques (voies classique, alterne et des lectines) ayant pour but la destruction du pathogène et la génération d'une réponse inflammatoire] et des cellules de l'immunité innée telles que les cellules NK (*Natural killer*) activées par les interférons, les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les macrophages. Après invasion microbienne, un processus inflammatoire se déclenche avec la migration vers le site de l'infection de cellules telles que les polynucléaires par chimiotactisme et les macrophages qui vont détruire le micro-organisme opsonisé [l'opsonisation est le recouvrement d'un microorganisme par des opsonines qui peuvent être le composant C3b du complément ou des anticorps] par phagocytose (Roitt et al., 1985).

1.2 L'immunité adaptative

Dans un second temps se met en place l'immunité adaptative faisant intervenir les lymphocytes T (LT) et les lymphoctes B (LB), responsables de l'immunité cellulaire et humorale, respectivement. L'immunité adaptative est plus tardive, spécifique du pathogène et est capable de mémoire. Une interaction étroite existe entre immunité innée et immunité adaptative.

Lors de l'initiation d'une infection virale, les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) telles que les cellules dendritiques (CD) et les LB sont activées après fixation de l'antigène viral sur leur récepteur (PRR, *Pattern recognition receptor* ou BCR, *B cell receptor*, respectivement) puis, vont traiter l'antigène viral en peptides antigéniques afin de permettre leur présentation aux LT. Ces peptides sont ancrés à la surface de protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) impliquées dans la reconnaissance immune. Les molécules du CMH I ou II (CMH-I ou -II) sont exprimées respectivement, par toutes les cellules nucléées ou les CPA. Après migration dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS) [ganglions lymphatiques, rate, amygdales ou tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT, *Mucosa-associated lymphoid tissues*)], les CPA ainsi chargées rencontrent les LT naïfs porteurs à leur surface d'un récepteur (TCR, *T cell receptor*) et d'un corécepteur spécifique du CMH. C'est l'association peptide antigénique/molécule du CMH

qui est reconnue par le TCR. Les lymphocytes T cytotoxiques portant le corécepteur CD8+ (LT CD8+) répondent aux antigènes endogènes portés par les molécules du CMH-I tandis que les lymphocytes T auxiliaires portant le corécepteur CD4+ (LT CD4+) répondent aux antigènes exogènes présentés par les molécules du CMH-II (Zajac and Harrington, 2008). Ce sont la reconnaissance des antigènes et l'activation des LT et LB qui déclenchent la réponse adaptative. Les LT CD4+ sont au carrefour de l'immunité adaptative à médiation humorale et cellulaire.

1.2.1 L'immunité adaptative à médiation cellulaire

Les LT CD4+ activés se polarisent en fonction du contexte cytokinique puis se différencient en cellules effectrices Th1 (*T helper 1*), Th2, Th17, T régulateurs (Treg) pour migrer dans les tissus infectés (Zhu and Paul, 2008). Au début d'une infection virale, les LT CD4+ exposés à l'interleukine (IL)-12, l'interféron (IFN)-α/β et IFN-γ, présentent principalement le phénotype Th1. Cependant, les populations cellulaires Th17, Th2 et T régulateurs sont aussi générées à différents degrés dans certaines infections virales (Swain et al., 2012). Puis, plus tardivement, les LT CD4+ facilitent le développement d'une part, de LT CD8+ effecteurs avec l'activation des CPA *via* les interactions CD40 ligand-CD40 (membre de la famille du TNF, *Tumor Necrosis Factor*) et la libération d'IL-2 puis d'autre part, de LT CD8+ mémoires fonctionnelles. De part leurs activités, les LT CD8+ effecteurs induisent la destruction des cellules infectées par apoptose par les voies dépendantes des perforine-granzymes ou de Fas/Fas ligand (Swain et al., 2012) (**Figure 1 A**).

Bien que les réponses cellulaires T soient hautement efficaces dans la résolution des infections virales aigües, il s'avère qu'elles sont de moindres amplitudes (qualitatives et quantitatives) dans les infections chroniques. En effet, une augmentation de la fréquence de stimulation antigénique et/ou une diminution de l'aide des LT CD4+ conduisent à un épuisement immunitaire progressif dans lequel les LT présentent d'importantes pertes de fonctions effectrices et de capacité proliférative, pouvant aller jusqu'à leur délétion (Wherry and Ahmed, 2004) (Khaitan and Unutmaz, 2011).

1.2.2 L'immunité adaptative à médiation humorale

Dans le sang d'individus sains, des anticorps naturels non spécifiques et poly-réactifs (capacité d'un anticorps à se fixer sur différents ligands structurellement différents avec une faible affinité) circulent et constituent la première ligne de défense contre les pathogènes (Mouquet and Nussenzweig, 2012). Il a été montré que les anticorps sont capables de neutraliser directement les virus, d'activer le complément par la formation de complexes

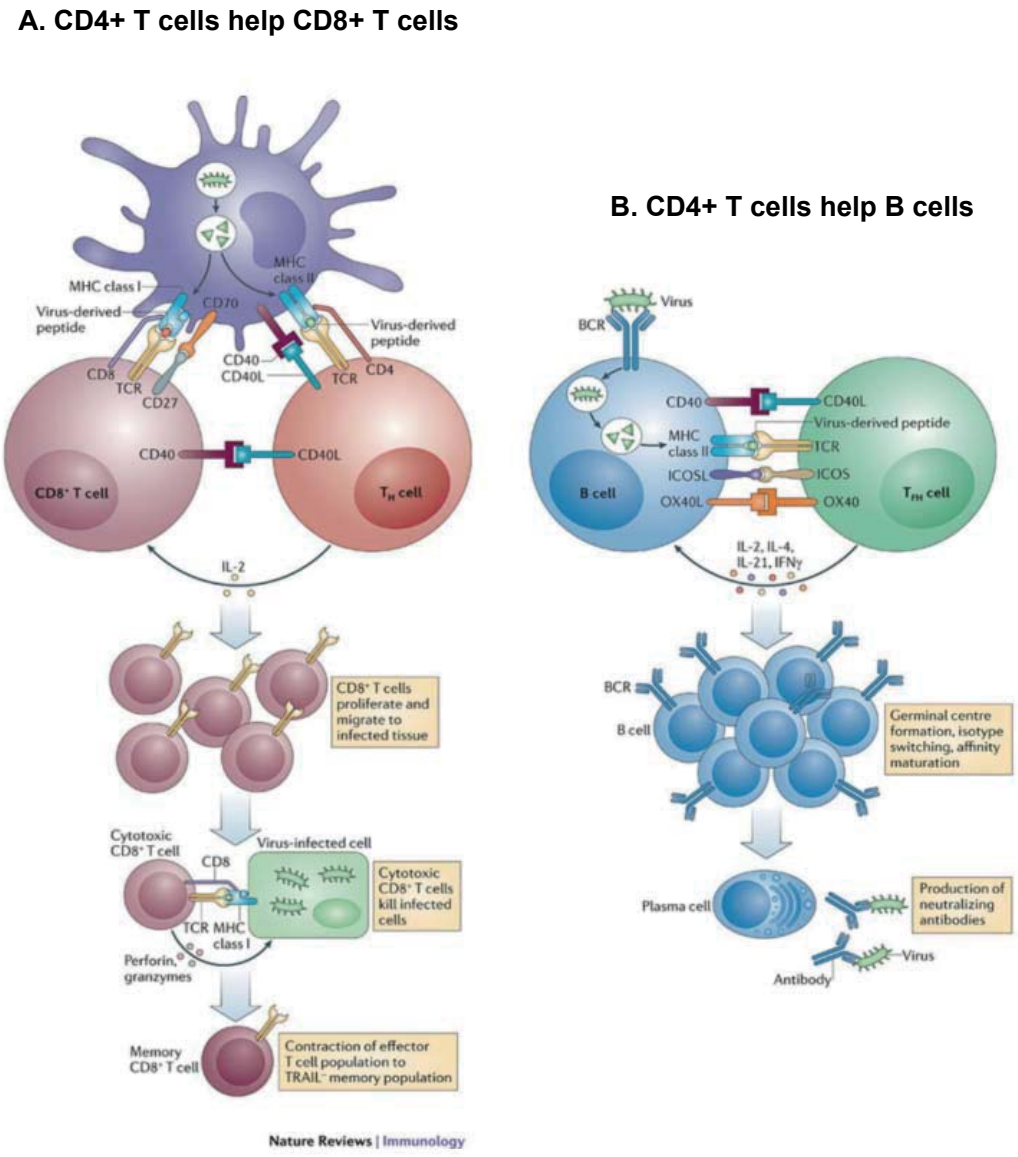


Figure 1 : Fonctions des lymphocytes T auxilliaires CD4+

A. Les lymphocytes T CD4+ (LT CD4+) facilitent le développement d'une part, de lymphocytes T cytotoxiques CD8+ (LT CD8+) effecteurs avec l'activation des cellules présentatrices d'antigène *via* les interactions CD40L-CD40 et la libération d'IL-2 puis d'autre part, de LT CD8+ mémoires fonctionnels. De part leurs activités, les LT CD8+ effecteurs vont induire la destruction des cellules infectées *via* la voie dépendante des perforine-granzymes. De plus, lors de la primo-exposition, les LT CD8+ aidés par les LT CD4+ et qui persistent après la phase de contraction pour devenir des cellules mémoires, régulent faiblement l'expression de TRAIL [TRAIL$^-$]. Elles deviennent plus résistantes à l'apoptose, ce qui leur permet de répondre fortement à une seconde exposition au même antigène. **B.** Le sous-groupe de LT CD4+ folliculaires (T_{FH}) coopère avec les lymphocytes B (LB) dans la formation des centres germinatifs où des plasmocytes producteurs d'anticorps neutralisants spécifiques et des LB mémoires sont générés avec libération de cytokines IL-2, IL-4, IL-21 et IFN-γ. L'activation des LB et la production d'anticorps nécessitent les interactions entre le TCR et l'association peptides viraux endocytés/protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de type II ainsi que celles entre le ligand co-stimulateur CD40L et le récepteur CD40 exprimés respectivement, par les T_{FH} et les LB, tous deux activés. Ces interactions CD40L-CD40 et ICOSL-ICOS sont cruciales pour développer des réponses humorales optimales dirigées contre différents virus tels que le virus grippal. BCR, *B-cell receptor* ; ICOS, *Inducible T cell co-stimulator* ; ICOSL, ICOS Ligand ; OX40L, OX40 Ligand ; TCR, *T-cell receptor* ; MHC, *Major histocompatibility complex* ; T_H, Lymphocyte T helper ; TRAIL, *TNF-related apoptosis inducing ligand*. Adapté de (Swain et al., 2012).

immuns et d'amorcer la réponse adaptative par le recrutement d'antigènes viraux dans les organes lymphoïdes secondaires (Hangartner et al., 2006) (Dunkelberger and Song, 2010).

Quelques jours après le début de l'infection virale, la réponse humorale T-dépendante se met en place et nécessite des contacts directs entre les LB et les LT CD4+ folliculaires (T_{FH}) activés, qui représentent un sous-groupe distinct des LT auxiliaires spécialisés dans l'aide aux LB (Mitchison, 2004) (Crotty, 2011). Cette coopération cellulaire T_{FH}-B permettant la libération de cytokines telles que l'IL-2, IL-4, IL-21 et l'IFN-γ, facilite la formation des centres germinatifs (CG) [structures micro-anatomiques émergeantes dans les follicules des OLS en réponse à une infection ou à une vaccination par un antigène T dépendant] avec la génération rapide de plasmocytes à courte durée de vie sécréteurs d'anticorps spécifiques de faible affinité dans les OLS (Swain et al., 2012; Tarlinton and Good-Jacobson, 2013). Plusieurs ligands co-stimulateurs exprimés par les T_{FH} contribuent à l'activation des LB et à la production d'anticorps. Par exemple, l'interaction du CD40 ligand avec le CD40 exprimés sur les T_{FH} et sur les LB respectivement, est cruciale dans le développement de réponses humorales optimales dirigées contre plusieurs virus tels que les virus influenza ou le virus de l'herpès simplex. Enfin, les réactions dans les CG conduisent à la sélection de plasmocytes producteurs d'anticorps de haute affinité et de cellules B mémoires à longue durée de vie (Kurosaki et al., 2010; Swain et al., 2012) (**Figure 1 B**).

Les CG sont le lieu de : (i) la sélection de LB ayant une forte affinité pour l'antigène afin de les engager vers la survie, prolifération et différenciation en plasmocytes ou en cellules B mémoires ; (ii) l'élimination des LB de faible affinité pour l'antigène ; (iii) la commutation de classe ; (iv) la maturation d'affinité (Allen et al., 2007). Le phénomène de maturation d'affinité dans les CG est une succession de cycles de prolifération clonale/mutation somatique/sélection entrainant une augmentation de l'affinité moyenne de la population de LB spécifiques d'un antigène au cours du temps. Elle est médiée par deux processus indépendants : la commutation de classe et les hyper-mutations somatiques (Chaudhuri and Alt, 2004). La commutation de classe est une réaction de recombinaison irréversible avec une délétion intra-chromosomique permettant le changement d'isotype IgM vers IgG, IgA ou IgE (Xiong et al., 2012). Elle est à l'origine de changements de fonctions effectrices, ce qui augmente la diversité fonctionnelle du répertoire des anticorps (Chaudhuri and Alt, 2004). Les hyper-mutations somatiques correspondent à l'introduction de mutations somatiques (MS) afin d'augmenter l'affinité globale pour l'antigène et contribue à la diversification du répertoire anticorps secondaire (Odegard and Schatz, 2006).

Les CG sont constitués de deux compartiments anatomiques, la zone sombre et la zone claire. Des centroblastes (LB), des LT et des macrophages peuplent la zone sombre tandis que des centrocytes (LB), des CD folliculaires porteuses de grande quantité

d'antigène natif sous forme de complexes immuns, des macrophages et des T_{FH} activés sont dans la zone claire (Allen et al., 2007) (Victora and Nussenzweig, 2012). La zone sombre est le site de la division cellulaire, des hyper-mutations somatiques, de la commutation de classe alors que la zone claire est le site de la sélection des LB et de l'initiation de la différenciation des centrocytes en plasmocytes ou en cellules B mémoires (Victora and Nussenzweig, 2012).

Quelle est la dynamique des réactions dans les CG ? Seuls les LB de haute affinité pour l'antigène entrent dans le CG et sont sélectionnés dans la zone sombre pour devenir des centroblastes. Ces derniers prolifèrent, subissent l'introduction de MS et/ou la commutation de classe initiées par l'enzyme cytidine désaminase (AID, *Activation-induced cytidine deaminase*) (Muramatsu et al., 2000). Après un ou plusieurs cycles de divisions/mutations, les centroblastes migrent vers la zone claire et se différencient en centrocytes. Seuls les centrocytes ayant capturés l'antigène natif exposé à la surface des CD folliculaires, coopèrent avec les T_{FH}, les autres meurent par apoptose. Les centrocytes ayant interagit avec les T_{FH} ont alors, trois devenirs possibles : (i) recyclage et réentrée dans la zone sombre sous le contrôle des T_{FH} pour y subir des cycles supplémentaires de prolifération/mutation ; (ii) sortie du CG pour se différencier en plasmocytes ; (iii) sortie du CG pour se différencier en cellules B mémoires (Victora and Nussenzweig, 2012). Les T_{FH} jouent donc, un rôle particulièrement important dans la formation et la maintenance des CG ainsi que dans la sélection basée sur l'affinité des centrocytes (Victora and Nussenzweig, 2012). Enfin, les cellules mémoires (LB ou LT) ont la capacité à reconnaître des antigènes spécifiques précédemment rencontrés, et à leur répondre de manière plus rapide et plus efficace (titres et affinité augmentés des anticorps induits) en cas de réexposition. La vaccination est à la base de ce phénomène (Slifka, 2004).

D'une part, la dissémination virale est freinée par des anticorps neutralisants (AN) qui bloquent l'entrée virale en interférant directement avec la fixation du virus sur son récepteur et ses potentiels corécepteurs ou sur les mécanismes de fusion membranaire virus/cellule (Hangartner et al., 2006) (**§ 1.5.1**, **Figure 2 A**). La cinétique d'apparition des AN varie selon que les infections sont causées par des virus cytopathiques tels que le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) provoquant des altérations métaboliques et morphologiques des cellules infectées ou par des virus non cytopathiques comme le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV). Ainsi, chez la souris, le VSV induit de forts titres d'AN de type IgM puis IgG 4-6 jours post-infection tandis que le LCMV déclenche de faibles titres d'AN après 50-80 jours. Ces faibles réponses peuvent résulter entre autres, d'une faible fréquence des LB capables d'activité neutralisante ou d'une profonde altération du répertoire des cellules B (Hangartner et al., 2006).

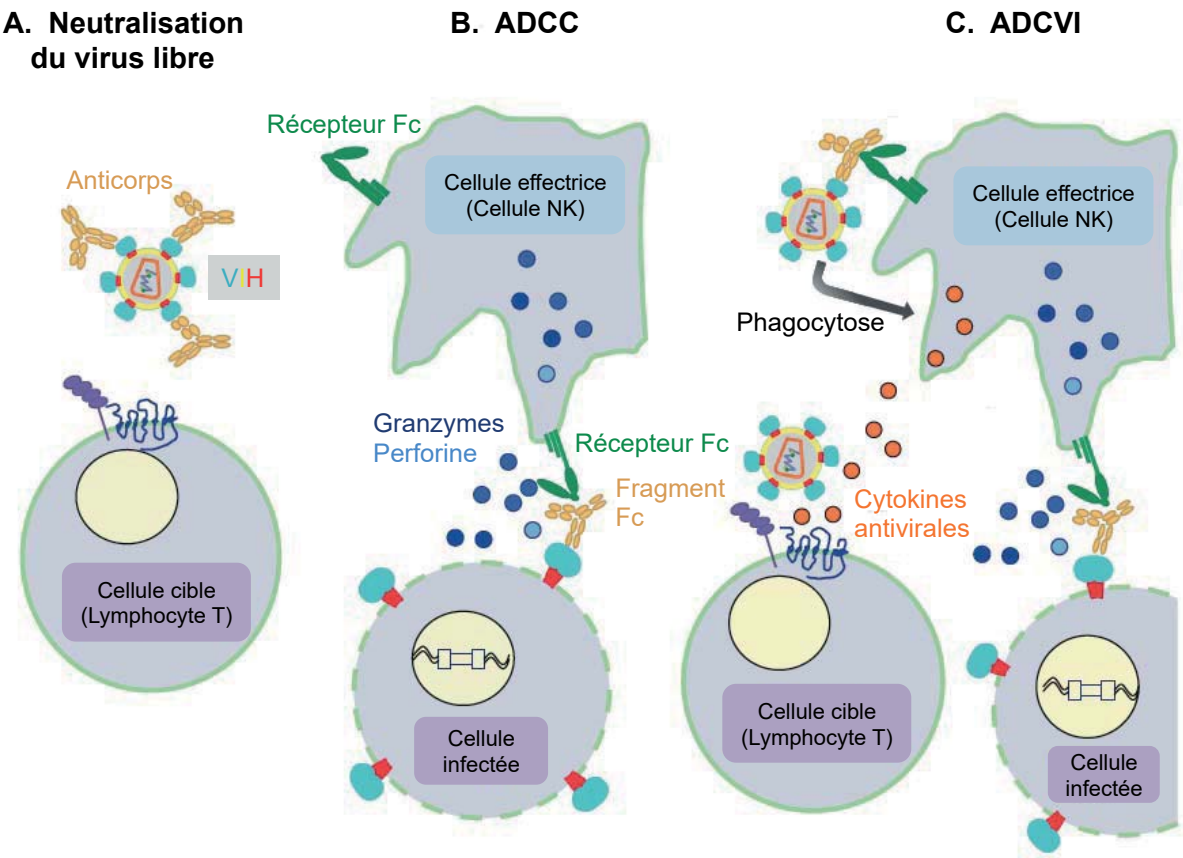


Figure 2 : Mécanismes d'action des anticorps pour lutter contre les infections

Les anticorps peuvent lutter contre les infections soit par neutralisation, soit par la mise en œuvre de fonctions effectrices comme l'ADCC (*Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) ou l'ADCVI (*Antibody-dependent cell-mediated virus Inhibition*). **A.** Neutralisation du virus libre. Les fragments Fab (*antigen-binding Fragment*) des anticorps neutralisants se fixent à la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1 empêchant ainsi, les interactions avec le récepteur CD4 et le corécepteur CCR5 (*(C-C) chemokine receptor 5*) ou CXCR4 (*(C-X-C motif) chemokine receptor 4*), nécessaires à l'entrée du virus dans la cellule cible. **B.** La réponse cellulaire cytotoxique dépendante des anticorps (ADCC) mesure la destruction des cellules infectées et est le résultat de la formation d'un complexe de trois éléments : le fragment Fab de l'anticorps avec la protéine virale présente à la surface d'une cellule infectée et le fragment Fc (*crystalizable Fragment*) de l'anticorps avec le récepteur Fc (FcR) présent à la surface d'une cellule effectrice telle qu'une cellule NK (*Natural Killer*). L'interaction entre cellule effectrice activée et cellule infectée par l'intermédiaire de l'anticorps, libère des granules cytotoxiques de perforine-granzymes entrainant la cytolyse ou l'apoptose de la cellule infectée. **C.** L'inhibition de la propagation virale de cellule en cellule dépendante des anticorps (ADCVI) mesure la diminution de la production virale. L'ADCVI est un effet de la mort cellulaire médié par l'ADCC, de l'inhibition virale *via* la libération de cytokines antivirales par la cellule effectrice ou de la phagocytose du virus. Adapté de (Overbaugh and Morris, 2012).

D'autre part, la diminution de la propagation virale est aussi causée par des anticorps non neutralisants (AnN) spécifiques qui comme les AN, peuvent activer le système du complément ou déclencher l'ADCC (*Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*), l'ADCP (*Antibody-dependent cell-mediated phagocytosis*) ou l'ADCVI (*Antibody-dependent cell-mediated virus inhibition*) (Dunkelberger and Song, 2010) (Overbaugh and Morris, 2012) (**Figure 2 B** et **C**).

1.3 Structure des immunoglobulines

1.3.1 Structure générale des immunoglobulines

Les immunoglobulines (Ig) ou anticorps sont des glycoprotéines composées de quatre chaînes polypeptidiques homologues deux à deux : deux chaînes lourdes (H) et deux chaînes légères (L) reliées par des ponts disulfures et des liaisons non covalentes de type liaisons ioniques et hydrogène (**Figure 3 A**). Il existe cinq types de chaînes H : γ, μ, α, δ et ε qui définissent respectivement, les classes d'Ig ou isotypes : IgG, IgM, IgA, IgD et IgE (**Figure 4**) et deux types de chaînes L, κ ou λ. Une molécule d'Ig est composée d'un seul type de chaînes L, deux κ ou deux λ identiques. Chez les sujets sains, le rapport κ/λ est d'environ 60/40 % (Perez-Andres et al., 2010). Des domaines d'Ig d'environ 110-130 acides aminés stabilisés par des ponts disulfures composent les chaînes H et L. Chaque domaine est constitué d'un « sandwich » de deux feuillets plissés β antiparallèles connectés par des boucles de longueurs variables (**Figure 3 B**). Les chaînes H possèdent quatre (IgG, IgA, IgD) ou cinq (IgM, IgE) domaines alors que les chaînes L n'en possèdent que deux (**Figure 4**). Les domaines d'Ig sont retrouvés dans d'autres protéines du système immunitaire telles que par exemple, le TCR, le récepteur des immunoglobulines polymériques (pIgR) ou les molécules du CMH-I et -II, qui constituent la superfamille des Ig (Kindt et al., 2007). Les séquences N-terminales des chaînes H et L constituent des domaines variables (V) (VH et VL, respectivement) alors que celles des autres domaines sont relativement constantes (C) (C_H1, C_H2, C_H3 voire C_H4 et C_L, respectivement). Il est à noter que les domaines VH-VL et C_H1-C_L des chaînes H et L respectivement, sont appariés. La région charnière reliant les domaines C_H1 et C_H2 des chaînes H, confère une flexibilité aux IgG, IgA et IgD alors qu'elle est absente dans les IgM et IgE où elle est remplacée par le domaine additionnel C_H2 plus rigide (Schroeder and Cavacini, 2010) (**Figures 3 A** et **4**). Des protéases telles que la papaïne et la pepsine dont les sites de clivage se trouvent dans la région charnière, ont été utilisées pour disséquer la structure des Ig. Ainsi, la papaïne clive une IgG en deux fragments Fab (*Antigen-binding fragment*) correspondant à l'association des domaines VH/C_H1 et VL/C_L des chaînes H et L, respectivement, et un fragment cristallisable Fc (*Crystalizable fragment*) composé des domaines C_H2 et C_H3 des chaînes H. La pepsine

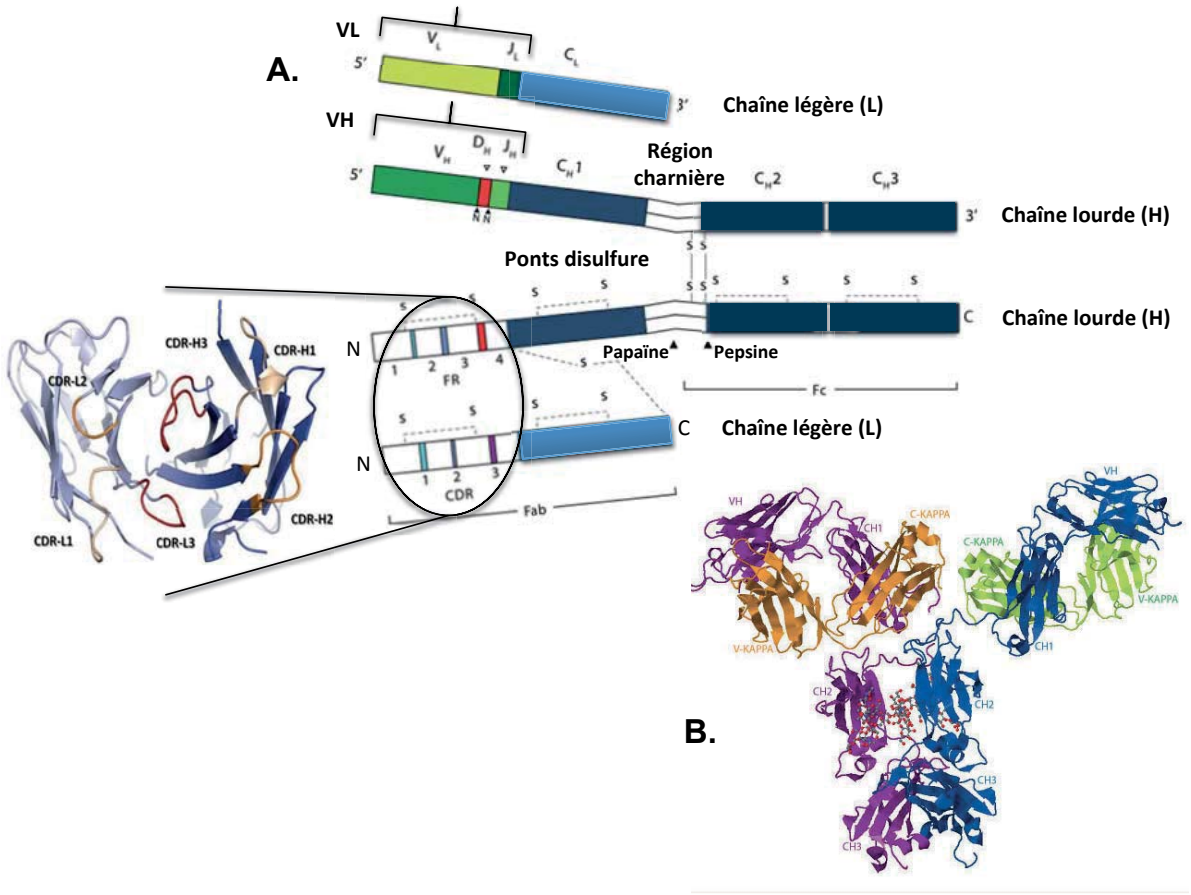


Figure 3 : Structure d'une immunoglobuline

A. Représentation schématique de la structure d'une immunoglobuline (Ig, ici une IgG) qui est constituée de quatre chaînes polypeptidiques homologues deux à deux : deux chaînes lourdes (H) et deux chaînes légères (L) reliées par des ponts disulfures et des liaisons non covalentes. Les chaînes en haut sont délimitées par les extrémités 5' et 3' de la séquence nucléotidique de l'anticorps. Les régions variables (V) en vert VH/VL (segments géniques V_H, D_H, J_H ou V_L, J_L ainsi que les insertions aléatoires des nucléotides N en rouge) et les régions constantes (C) en bleu (C_H1, C_H2, C_H3 ou C_L) pour les chaînes H et L, respectivement sont montrées. Les deux chaînes en bas sont délimitées par les extrémités N- et C-terminales de la séquence protéique de l'Ig. Les régions V [trois régions hypervariables déterminant la complémentarité (CDR, *Complementary determining region*, CDRH1, -H2, -H3 dans la chaîne H, CDRL1, -L2, -L3 dans la chaîne L) et quatre régions « charpente » plus conservées (FWR, *Framework region*, FWR1, 2, 3, 4 dans les chaînes H et L)] ainsi que les régions C (domaines C_H1, C_H2, C_H3 ou C_L pour les chaînes H et L) sont indiquées. La région charnière permet de relier les domaines C_H1 et C_H2 des chaînes H. Le fragment Fab (*Antigen-binding Fragment*) est l'association des domaines VH/C_H1 et VL/C_L des chaînes H et L, respectivement tandis que le fragment Fc (*Crystalizable Fragment*) est composé des domaines C_H2 et C_H3 des chaînes H. Les sites de clivage de la papaïne et de la pepsine sont indiqués. Adapté de (Schroeder and Cavacini, 2010a)(Schroeder and Cavacini, 2010b) et d'après (Finlay and Almagro, 2012). **B.** Représentation de la structure tridimensionnelle de l'anticorps neutralisant humain b12 anti-VIH-1 (IgG1) obtenu par diffraction aux rayons X. Les chaînes H et L sont constituées de quatre (bleu et violet) et de deux domaines (orange et vert), respectivement. Chaque domaine d'Ig est composé de deux feuillets plissés β antiparallèles connectés par des boucles. Les N-Glycanes sont représentés par des boules et bâtons. Numéro d'accession 1hzh dans la *Protein Data Bank*.

coupe une IgG en un fragment Fab dimérique $F(ab')_2$ et un fragment Fc (Schroeder and Cavacini, 2010) (**Figure 3 A**). Enfin, les glycanes (polymères de monosaccharides reliés entre eux par une liaison glycosidique) sont présents à la fois dans la région charnière (O-glycanes) et dans les fragments Fab et Fc (N-glycanes) (**Figure 4**). Ils contribuent à la fois au maintien de la structure quaternaire et à la stabilité des Ig leur permettant de moduler les fonctions effectrices médiées par le Fc (**§ 1.5.2**). Par exemple, la glycosylation des fragments Fc est requise pour une fixation optimale du Fc sur ses récepteurs (FcR). Ils fournissent aussi des épitopes de reconnaissance pour la fixation de lectines comme les lectines liant le mannose (MBL, *Mannose-binding lectin*) impliquées dans l'une des voies d'activation du complément (Arnold et al., 2007). La glycosylation des chaînes H représente 2-3 % du poids moléculaire d'une IgG (150 kDa) mais peut atteindre 6-10 % pour les IgA et 12-14 % pour les IgM, IgD et IgE alors que les chaînes L ne contiennent pas de sites conservés de glycosylation (Arnold et al., 2007) (Woof and Kerr, 2006).

1.3.2 Classes et sous-classes d'immunoglobulines et leurs activités biologiques

Il existe cinq classes d'Ig ou isotypes : IgG, IgM, IgA, IgD et IgE. Deux de ces classes sont divisées en sous-classes : les IgG (IgG1 à IgG4) et les IgA (IgA1 et IgA2) (**Figure 4**, **Tableau 1**).

	% sérum	PM (kDa)	Chaîne H (PM en kDa)	Structure quater-naire	Chaine J	Activa-tion du C	Traver-sée du placenta	Transport à travers les muqueuses	Opsoni-sation	Fixation aux masto-cytes/baso-philes
IgG	75	146	γ (53)*	monomère	non	+	+	-	++	-
IgG1	67 % IgG	146	γ1	monomère		++	+++	-	+	
IgG2	22 % IgG	146	γ2	monomère		+	+	-	-	
IgG3	7 % IgG	165	γ3	monomère		+++	++	-	+	
IgG4	4 % IgG	146	γ4	monomère		-	±	-	-	
IgM	10	950	μ (65)	pentamère	oui	++++	-	+	+	-
IgA	15	160 360	α (55)	monomère ou dimère	oui	-	-	++	-	-
IgA1		160 360	α1	monomère ou dimère		-	-	++	-	
IgA2		160 360	α2	monomère ou dimère		-	-	++	-	
IgD	<0,5	184	δ (70)	monomère	non	-	-	-	-	-
IgE	<0,01	188	ε (73)	monomère	non	-	-	-	-	+++

Tableau 1 : Caractéristiques et activités biologiques des classes et sous-classes d'immunoglobulines. (*) Le poids moléculaire d'une chaîne L d'une IgG est de 25 kDa. C, système du complément ; PM, Poids moléculaire. Adapté de (Murphy et al., 2012) (Schroeder and Cavacini, 2010).

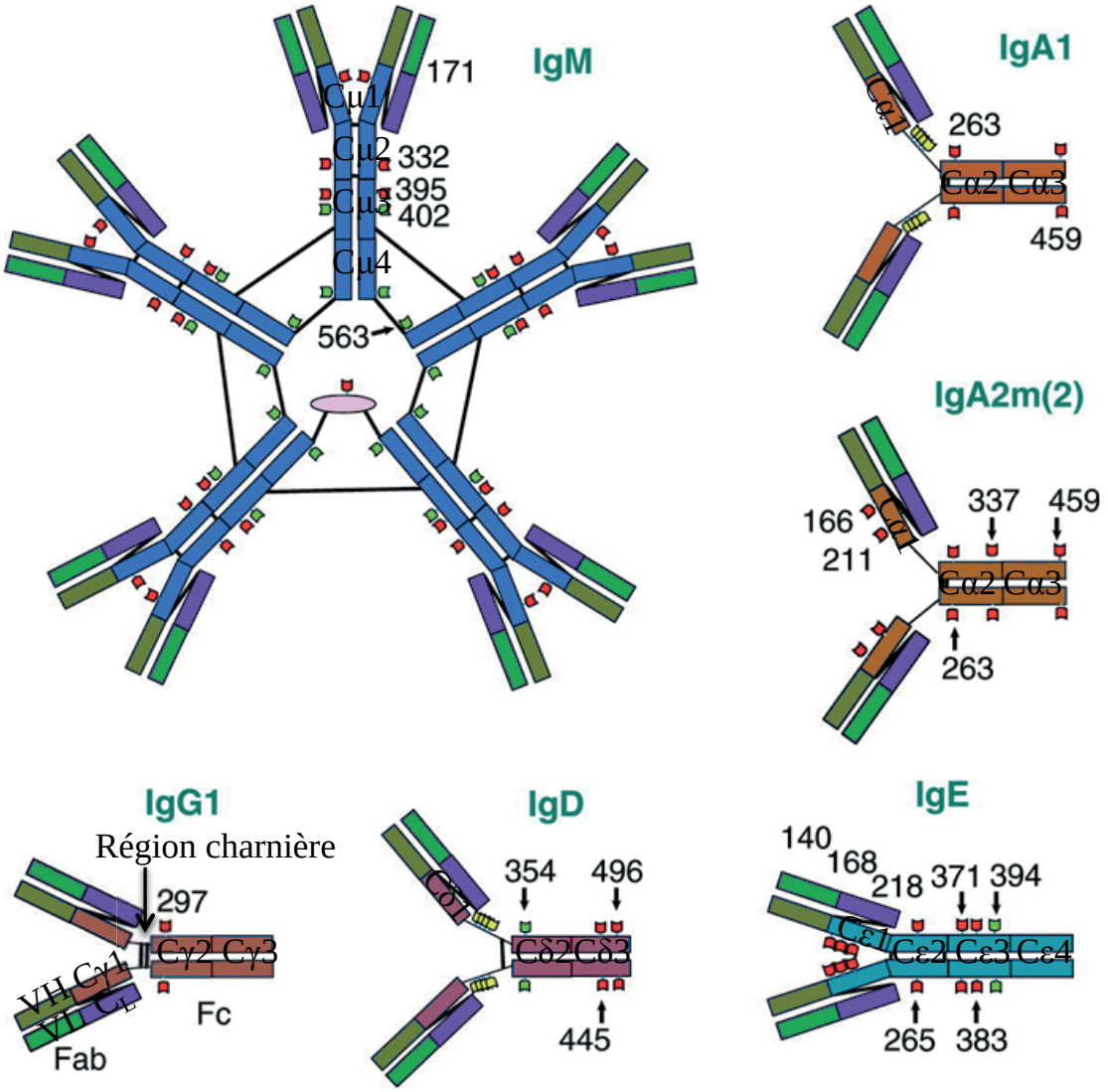


Figure 4 : Classes et sous-classes d'immunoglobulines et leurs sites de glycosylation

Les IgM sont des pentamères composés de cinq monomères dont deux sont liés par la chaîne J (*Joining*) (en rose) au moyen d'un pont disulfure. IgM, IgD et IgE n'ont pas de sous-classe. Les IgG comportent quatre sous-classes (IgG1 à IgG4) parmi lesquelles l'IgG1 est représenté. Les domaines VH/C_γ1 et VL/C_L des chaînes H et L, respectivement définissent le fragment Fab (*Antigen-binding Fragment*) et la région constante des chaînes H définit le fragment Fc (*Crystalizable Fragment*). Il y a deux sous-classes d'IgA, IgA1 et IgA2 montrées ici sous forme monomérique, l'IgA2m(2) correspondant à l'un des allotypes d'IgA2. Ces deux isotypes se différencient par leur composition en acides aminés de la chaîne H et par la présence dans la région charnière des IgA1, de groupes O-glycanes (en jaune présents aussi dans les IgD) et d'une insertion de 16 résidus, ce qui les rend plus sensibles à la protéolyse par des enzymes bactériennes spécifiques. Les chaînes H des IgG, IgD et IgA contiennent quatre domaines d'immunoglobulines et une région charnière tandis que les chaînes H des IgM et IgE contiennent cinq domaines d'immunoglobulines sans région charnière. Les sites de N-glycosylation (glycanes complexes en rouge et oligomannoses en vert) ainsi que leur position sur la séquence protéique sont indiqués pour chaque Ig. Enfin, les ponts disulfures apparaissent en traits noirs. Adapté de (Arnold et al., 2007).

Les IgG sont les plus abondantes dans le sang et sont majoritairement impliquées dans la réponse adaptative de type secondaire. Des différences structurales entre les sous-classes d'IgG (région charnière, nombre et position des ponts disulfure intra-chaînes H) expliquent leurs variations d'activités biologiques. Par exemple, tandis que les IgG4 et les IgG2 ne fixent pas ou peu le complément, les IgG1 et IgG3 l'activent pour permettre l'élimination des pathogènes opsonisés (**Tableau 1**). Par ailleurs, certaines sous-classes d'IgG sont impliquées dans des pathologies auto-immunes telles que le pemphigus vulgaire (dermatose bulleuse) dans lequel les auto-anticorps pathogènes anti-desmogléine 1 et 3 (la desmogléine intervient dans l'adhésion des cellules épithéliales entre elles) sont majoritairement des IgG4 (Ding et al., 1999).

Les IgM monomériques constituent les BCR initialement co-exprimés avec les IgD à la surface des LB. Elles sont dépourvues de MS, ce qui les rend faiblement affines. Par contre, les IgM sécrétées par les plasmocytes sont pentamériques avec dix sites de fixation antigénique (multivalents), générant une forte avidité (**§ 1.4**). La nature pentamérique de l'IgM la rend plus efficace dans l'opsonisation de pathogènes exprimant des antigènes répétitifs et la fixation au complément (**Tableau 1**). Les anticorps naturels non spécifiques sont principalement de type IgM (Ochsenbein and Zinkernagel, 2000). Cette classe est associée à la réponse adaptative dite primaire puisque les premiers AN qui apparaissent sont de type IgM (Hangartner et al., 2006).

La structure et les fonctions des IgA seront abordées dans les chapitres **1.3.3** et **1.5.3**, respectivement.

Concernant les IgD, des différences structurales et de glycosylation du domaine Cδ3 et de la région charnière ont des implications fonctionnelles qui s'exercent à la fois en périphérie et au niveau des muqueuses. L'IgD transmembranaire est co-exprimée avec une IgM à la surface des LB matures naïfs avant contact avec l'antigène et la commutation de classe. Ainsi, elle pourrait moduler la fonction transmembranaire de l'IgM alors que le duo IgD-IgM exprimé pourrait optimiser la reconnaissance de l'antigène à différentes concentrations. Les IgD sécrétées quant à elles, sont d'importants immuno-modulateurs qui orchestrent un système de surveillance à l'interface entre immunité et inflammation (Chen and Cerutti, 2010).

Enfin, les IgE jouent un rôle important dans l'immunité contre les helminthes mais aussi dans les réactions d'hypersensibilité de type I responsables de réactions allergiques ou de chocs anaphylactiques. Les IgE possèdent deux récepteurs cellulaires : (i) FcεRI de forte affinité à la surface des polynucléaires basophiles sanguins et mastocytes tissulaires ; (ii) FcεRII de faible affinité sur des LB activés, macrophages et polynucléaires éosinophiles (Karagiannis et al., 2013).

1.3.3 Structure et distribution des IgA

1.3.3.1 Structure des IgA

La structure monomérique de l'IgA est identique à la structure générale d'une Ig (**§ 1.3.1, Figure 3**). Chez l'homme, il existe deux gènes Cα qui codent pour les deux sous-classes, IgA1 et IgA2 générées après commutation de classe directe (μ -> α1/α2) ou séquentielle dans les CG du MALT (Cerutti, 2008). La commutation de classe est une réaction de recombinaison irréversible avec délétion intra-chromosomique qui permet le changement d'isotype IgM vers IgG, IgA ou IgE. La particularité structurale de l'IgA1 est l'insertion de 16 résidus comprenant une répétition riche en proline, sérine, thréonine et arborant 3 à 5 O-glycanes dans la région charnière qui relie les régions V et C. En conséquence, les IgA1 sont plus sensibles à l'action de protéases bactériennes que les IgA2 qui n'ont pas cette insertion (Arnold et al., 2007) (Plaut et al., 1974) (Woof and Russell, 2011) (**Figure 5 A**). Les IgA sont polymorphes car elles existent sous forme de monomères (mIgA), dimères (dIgA), polymères (pIgA) et d'IgA sécrétoires (S-IgA, **Figure 5 B**). Pour les dIgA et pIgA, les régions Fc C-terminales de monomères d'IgA se lient de manière covalente par la chaîne J (*Joining*). La chaîne J est un polypeptide très conservé de 15 kDa contenant huit résidus cystéine et une seule de cette molécule est nécessaire à la polymérisation des IgA (dIgA, pIgA) mais aussi des IgM pentamériques (**Figures 4** et **5 B)**. Les S-IgA sont des dIgA auxquelles s'ajoute la partie extracellulaire du pIgR qui après clivage constitue le composant sécrétoire (**Figure 5 B**). Le pIgR est un récepteur composé de cinq domaines d'Ig extracellulaires (D1 à D5), d'une région transmembranaire de 23 résidus et d'une queue cytoplasmique de 103 acides aminés. Ainsi, les domaines D1 et D5 interagissent avec les régions Fc des dIgA de manière non covalente et covalente, respectivement puis, une interaction directe non covalente entre la chaîne J et le domaine D1 du composant sécrétoire est requise (Brandtzaeg, 2013) (Woof and Russell, 2011). Enfin, les IgA et S-IgA sont hautement glycosylées comparées aux IgG. Ainsi, des O-glycanes sont présents dans les IgA1 et des N-glycanes contribuent à 6-7 % de la masse molaire des IgA1 et à 8-10 % de celle des IgA2 (Arnold et al., 2007; Woof and Kerr, 2006) (**Figures 4** et **5**).

1.3.3.2 Distribution des IgA

L'IgA est de loin la classe d'anticorps la plus produite dans l'organisme humain (75 mg/Kg/jour). La plupart des IgA est présent dans les muqueuses sous forme de dIgA. Il a été calculé que la production intestinale des S-IgA est approximativement de 3 g/adulte/jour (Conley and Delacroix, 1987). Les IgA représentent aussi le second isotype le plus abondant

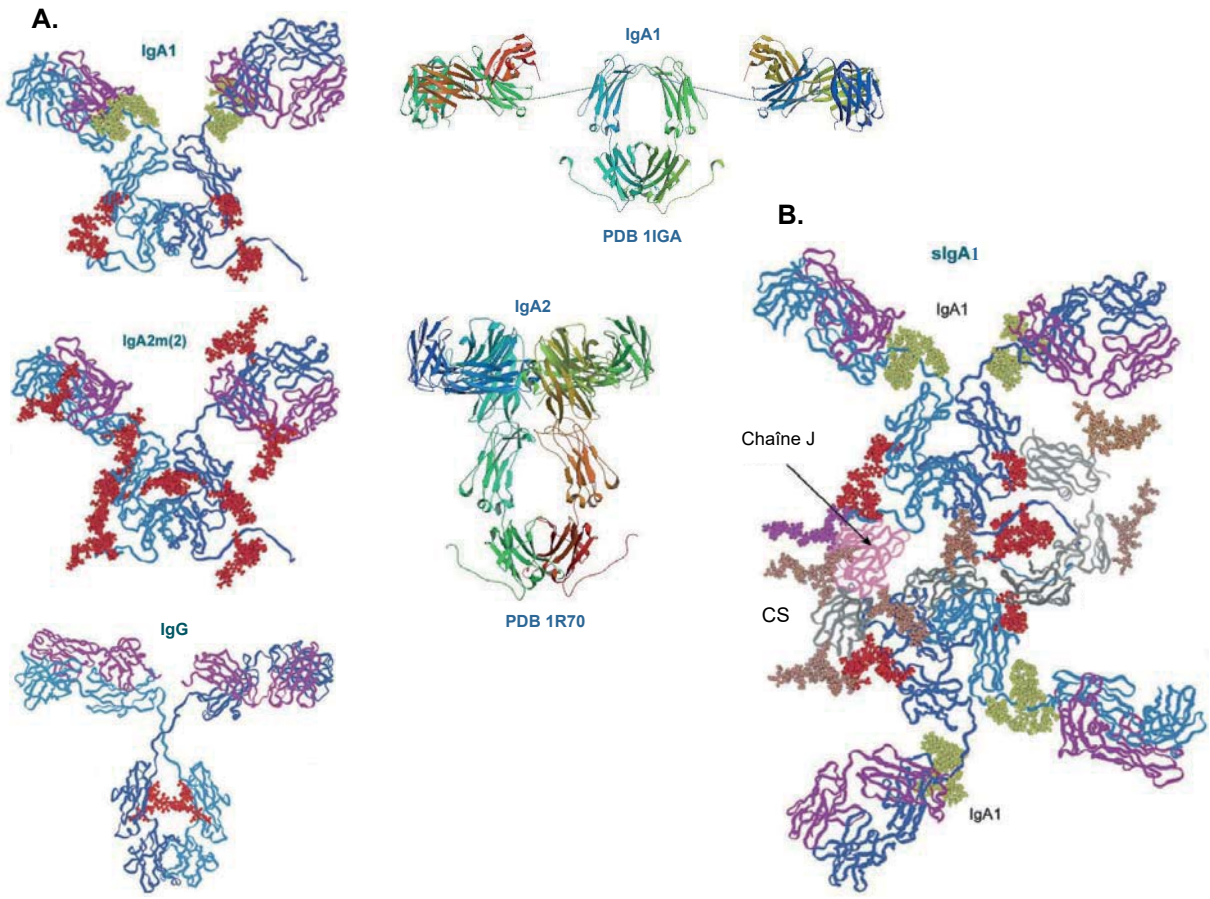


Figure 5 : Modèles structuraux des IgA1 et IgA2 monomériques ainsi que de l'IgA1 sécrétoire

A. Représentation des modèles moléculaires monomériques des IgA1 (en haut) dont la région charnière a été contrainte, IgA2 (au centre) comparés à l'IgG (en bas). L'IgA2m(2) est l'un des deux allotypes d'IgA2. Les IgA apparaissent très glycosylées par rapport aux IgG. Les sites de glycosylation sont indiqués suivant le code couleur décrit ci-dessous. L'IgA1 possède dans sa région charnière, une insertion de 16 acides aminés décorés par des O-glycanes (en jaune-vert), qui n'est pas présente dans l'IgA2. Pour montrer clairement cette différence, des structures non contraintes d'IgA1 (numéro d'accession 1IGA) et d'IgA2 (numéro d'accession 1R70) issues de la *Protein data bank* sont montrées en parallèle. **B.** L'IgA1 sécrétoire (S-IgA1) est composée d'un dimère d'IgA1 dans lequel les régions Fc C-terminales de deux monomères sont liées à la chaîne J (*Joining*) par l'intermédiaire de ponts disulfures et d'un composant sécrétoire (CS) issu de la partie extracellulaire du récepteur d'Ig polymérique. Les sites de glycosylation et les complexes de glycanes sont indiqués selon le code couleur suivant : N-glycanes en rouge, O-glycanes en jaune-vert, complexe de glycanes attaché à la chaîne J en violet et complexes de glycanes attachés au CS en beige. Chaînes H en bleu, chaînes L en violet, chaîne J en rose, CS en gris. Adapté de (Arnold et al., 2007).

dans le sérum (1-3 mg/ml) (Hansen et al., 2019). Les mIgA1 sont majoritaires dans le sérum (90% IgA1 et 10% IgA2) alors que les S-IgA principalement dimériques sont prédominantes dans le lait, le colostrum, les larmes, la salive et les sécrétions externes qui baignent les surfaces des tractus respiratoires, gastro-intestinaux et uro-génitaux (Kaetzel, 2007) (Tomasi and Bienenstock, 1968). La proportion des deux sous-classes varie en fonction du site muqueux : 80-90 % IgA1 dans les sécrétions nasales et génitales de l'homme, 64 % IgA1 dans la salive, 60 % IgA2 dans le colon et les sécrétions génitales de la femme (Brandtzaeg and Johansen, 2005) (Woof and Russell, 2011).

1.4 Interactions antigène-anticorps

L'épitope (ou déterminant antigénique) représente la partie d'un antigène ou d'un immunogène (substance capable d'induire une réponse immunitaire spécifique) qui est reconnue par un TCR ou par un anticorps. Le paratope (ou site de liaison) est la zone de l'anticorps qui interagit avec l'épitope. Les anticorps se trouvent sous deux formes : une forme membranaire à la surface de la cellule B et une forme soluble sécrétée par les plasmocytes. Chaque domaine variable d'un anticorps est divisé en trois régions hypervariables déterminant la complémentarité (CDR, *Complementary determining region*) : CDRH1, H2, H3 dans la chaîne lourde (IgH) et CDRL1, L2, L3 dans la chaîne légère (IgL) et en quatre régions dites « charpente » plus conservées (FWR, *Framework region*). Les trois CDR de l'IgH vont de pair avec les trois CDR de l'IgL pour former le site de liaison à l'antigène même si, tous leurs résidus ne se fixent pas obligatoirement à ce dernier (Finlay and Almagro, 2012) (Schroeder and Cavacini, 2010) (Van Regenmortel, 2014) (**Figure 3 A**). Outre le fait que la CDRH3 joue un rôle majeur dans la reconnaissance de l'épitope (Barrios et al., 2004), il est désormais bien établi que certains résidus des autres CDR mais aussi dans certains cas des FWR, peuvent aussi être impliqués de manière directe ou indirecte dans cette fixation (Sela-Culang et al., 2013). La conception de l'anticorps constitué par deux régions indépendantes V [spécificité (capacité d'un anticorps à reconnaître un épitope spécifique) et affinité de l'anticorps] et C [isotype, sous-classe et fonctions effectrices des Ig (**§ 1-5**)] est aujourd'hui remise en cause par plusieurs études. En effet, la région C des chaînes H pourrait affecter la structure de la région V par un mécanisme encore inconnu, se traduisant par des différences d'affinité et/ou de spécificité (Torres and Casadevall, 2008). Ainsi, il a été mis en évidence le rôle du domaine constant C_H1 dans la modulation de l'affinité et de la spécificité ainsi que dans des différences d'activités antivirales observées entre deux isotypes IgG1 et mIgA2 de l'anticorps 2F5 anti-VIH-1 mais de mêmes régions VL, CL et VH (Tudor et al., 2012).

La fixation antigène-anticorps s'effectue selon un mécanisme « clé-serrure » réversible et induit des changements conformationnels de l'anticorps (plasticité du paratope avec la déformation des boucles des CDR ou la modification de l'orientation relative des domaines V), de l'antigène ou des deux. De très nombreuses liaisons non covalentes de faible énergie (liaisons hydrogène, ioniques, interactions hydrophobiques et forces de Van der Waals) participent aux interactions intramoléculaires entre l'antigène et l'anticorps, qui finalement présentent une énergie de liaison globale très élevée. L'affinité représente la force de liaison entre un paratope et un épitope monovalent alors que l'avidité correspond à la somme totale des forces de liaison entre un anticorps et un antigène multivalent contenant plusieurs épitopes (Sela-Culang et al., 2013).

De manière intéressante, des anticorps dénués de chaînes L et de domaines C_H1 qui ont été découverts dans les années 1990 chez les camélidés (Hamers-Casterman et al., 1993) et chez certaines espèces de requins (Greenberg et al., 1995), se lient à leurs cibles par leur unique domaine V de la chaîne H appelés VHH et V-NAR (*Variable-new antigen receptor*), respectivement (Finlay and Almagro, 2012). Ces mono-domaines variables pourraient trouver des applications thérapeutiques et diagnostiques chez l'homme (Muyldermans, 2013).

1.5 Neutralisation et fonctions effectrices des immunoglobulines

1.5.1 Neutralisation virale médiée par les anticorps

La neutralisation médiée par les anticorps est définie comme leur capacité à réduire ou à inhiber l'infectivité d'une particule virale en interférant avec l'une des différentes étapes du cycle de réplication virale, étape précédant la transcription ou la traduction des protéines virales (Zolla-Pazner, 2004) (Klasse, 2014) (**Figure 2 A**). Les AN sont les meilleurs corrélats de protection après une infection virale ou après vaccination (Klasse, 2014) (VanBlargan et al., 2016). L'activité neutralisante des anticorps peut être évaluée par un test de neutralisation *in vitro.* Par exemple, pour le VIH-1, un test standardisé utilise des virus pseudotypés présentant à leur surface les glycoprotéines d'enveloppe de virus assez sensibles (tier-1) ou plus résistants (tier-3), les anticorps en dilutions limites et des cellules cibles telles que les TZM-bl très permissives au VIH-1 exprimant le récepteur CD4 et les corécepteurs CCR5/CXCR4 (Montefiori, 2009) (Seaman et al., 2010).

Comment les anticorps bloquent-ils l'infection virale ? Les anticorps peuvent potentiellement interférer avec la réplication du virus en agissant à différentes étapes du cycle viral. Dans le cas du VIH-1 qui nous intéresse, ces étapes sont : (i) l'interaction virus -

cellule cible *via* son récepteur ; (ii) les interactions du virus post-attachement avec ses corécepteurs ; (iii) la fusion des membranes virale et cellulaire ; (iv) la décapsidation virale après l'entrée ; (v) l'assemblage viral et la maturation de la particule virale ; (vi) le bourgeonnement et la libération des particules virales néosynthétisées. Enfin, la virolyse induite par le complément et l'agrégation de virions infectieux sont d'autres mécanismes de neutralisation médiés par les anticorps (Zolla-Pazner, 2004) (Klasse, 2014) (**Figure 6**).

Combien d'anticorps sont requis pour neutraliser un virus ? Deux modèles sont débattus : le modèle « single-hit » qui suggère que la fixation d'un seul anticorps sur son épitope viral est suffisante pour inactiver le virion ou le modèle « multiple-hit » qui propose que la neutralisation d'une particule virale implique l'engagement de nombreuses molécules d'anticorps avec leur cible selon un processus réversible (VanBlargan et al., 2016). Cependant, dans certains cas, la fixation de l'anticorps rend le virion non infectieux de manière irréversible même après leur dissociation (Ruprecht et al., 2011). Au-moins deux facteurs déterminent le nombre d'anticorps fixés sur un virion à une concentration donnée d'anticorps pour qu'il y ait neutralisation. D'une part, l'affinité de l'anticorps définit la fraction d'épitopes viraux fixés par anticorps dans des conditions d'équilibre. Des anticorps de haute affinité fixent une fraction d'épitopes viraux plus large que ne le font des anticorps de faible affinité. D'autre part, le nombre d'épitopes accessibles sur un virion infectieux intact gouverne le nombre de molécules d'anticorps capables de se fixer sur ce dernier à saturation (VanBlargan et al., 2016).

Tandis que les fragments Fab d'AN peuvent bloquer l'infection, la région Fc des anticorps joue aussi un rôle dans la neutralisation. Il a été montré que la neutralisation *in vivo* du virus de la grippe impliquait non seulement la reconnaissance d'épitopes viraux spécifiques par les fragments Fab d'AN à large spectre de classe IgG mais aussi, des interactions entre leurs fragments Fc (contenant la région C) et les récepteurs FcγR (DiLillo et al., 2014). Ainsi, l'activité neutralisante des anticorps implique la contribution de la molécule complète d'Ig qui a le potentiel non seulement, d'influencer le nombre de molécules d'anticorps fixées au virion mais aussi, d'influencer l'accessibilité aux épitopes environnants pouvant avoir un impact sur les conditions qui supportent la neutralisation (VanBlargan et al., 2016).

Comment le virus échappe à la neutralisation médiée par les anticorps ? Le VIH-1 qui nous intéresse plus particulièrement utilise différentes stratégies pour limiter ou bloquer l'accès des AN aux épitopes conservés. Ainsi, l'introduction de modifications (mutations, insertions, délétions) dans les gènes codant pour la glycoprotéine d'enveloppe Env, la présence d'une armure de glycanes issus de l'hôte qui protège le virus de sa reconnaissance par les anticorps, l'exposition transitoire d'épitope, le masquage conformationnel d'épitopes conservés tel que le site de liaison au CD4, l'encombrement

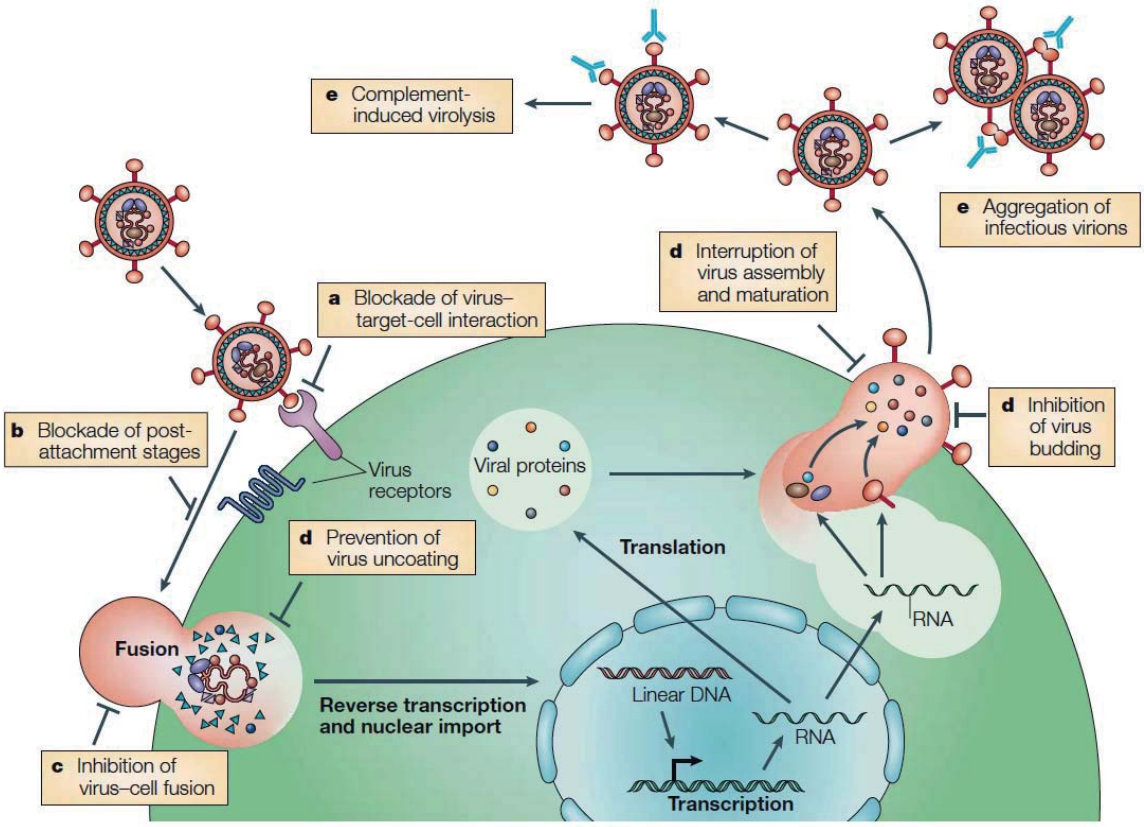


Figure 6 : Etapes du cycle de réplication virale potentiellement bloquées par les anticorps neutralisants : Exemple du VIH-1

Les anticorps neutralisants peuvent bloquer différentes étapes du cycle viral du VIH-1 : (a) l'interaction virus - cellule cible *via* son récepteur, (b) les interactions du virus post-attachement avec ses corécepteurs, (c) la fusion des membranes virale et cellulaire, (d) à des stades plus tardifs du cycle viral, les anticorps peuvent être impliqués dans la décapsidation virale après l'entrée, dans l'assemblage viral et la maturation de la particule virale, dans le bourgeonnement puis la libération des particules virales néo-synthétisées. (e) La virolyse induite par le complément et l'agrégation de virions infectieux sont d'autres mécanismes de neutralisation médiés par les anticorps. D'après (Zolla-Pazner, 2004).

stérique dû à la grande taille de l'Ig ou la faible densité de spicules de Env à la surface du VIH-1 (≈ 14) (**§ 2.1.1**) sont les mécanismes de défense dépendants de l'enveloppe du VIH-1 (Mouquet, 2014) (VanBlargan et al., 2016) (Ward and Wilson, 2017).

1.5.2 Fonctions effectrices des immunoglobulines

Les fonctions effectrices « classiques » médiées par le fragment Fab des Ig sont : (i) l'inhibition de l'adhésion bactérienne aux surfaces cellulaires où les anticorps dirigés contre des protéines d'adhésion (adhésines) inhibent l'adhésion de bactéries et préviennent ainsi l'infection ; (ii) la neutralisation des toxines par des AN appelés antitoxines ; (iii) la neutralisation des virus où les anticorps bloquent l'infection des cellules cibles.

Les fonctions effectrices « classiques » médiées par le fragment Fc des Ig comprennent : (i) la cytotoxicité dépendante du complément médiée par les anticorps (ADCDC, *Antibody-dependant complement-dependent cytotoxocity*) ; (ii) la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) ; (iii) la phagocytose cellulaire médiée par les anticorps (ADCP, *Antibody-dependant cellular phagocytosis*) avec la dégradation des pathogènes opsonisés (Ackerman et al., 2012) (Overbaugh and Morris, 2012) ; (iv) le transport d'IgG à travers le placenta *via* les récepteurs néonataux du fragment Fc (FcRn) (Casadevall and Pirofski, 2011) (Rojas and Apodaca, 2002) (**Tableau 1**). Ces trois premières fonctions, initiées par l'interaction du fragment Fc des Ig avec les récepteurs Fc (FcR) exprimés à la surface des cellules de l'immunité innée telles que les cellules NK (*Natural killer*, cellules lymphocytaires à activité d'immuno-surveillance), polynucléaires neutrophiles, CD ou monocytes/macrophages, visent à éliminer physiquement les pathogènes et les cellules infectées. Chez l'homme, six FcγR ont été identifiés : FcγRI (CD64), FcγRIIa, b, c (CD32) et FcγRIIIa, b (CD16) (Lu et al., 2018) (**Figure 2 B** et **C**). Ces fonctions effectrices dépendent de : (i) l'anticorps avec son isotype, sa sous-classe et son degré de glycosylation ; (ii) du FcR avec son action (activation ou inhibition) et son niveau d'expression cellulaire ; (iii) des cellules effectrices avec leur type cellulaire et leur localisation tissulaire (Lu et al., 2018) (Tay et al., 2019).

Quant au FcRn, c'est un hétérodimère appartenant à la famille des protéines du CMH-I. Il est exprimé dans une variété de tissus et de cellules comme les cellules épithéliales de la muqueuse génitale ou les syncytiotrophoblastes du placenta. Une caractéristique du FcRn est sa capacité à fixer la région Fc des IgG à pH acide (< 6,5) et à les libérer à pH neutre (7,0-7,5) *via* des vésicules d'endocytose. Ceci permet le transport d'IgG ou de complexes immuns IgG intactes majoritairement du pôle apical vers le pôle basal des cellules (Gupta et al., 2013). Outre ses fonctions dans l'acquisition d'une immunité

humorale chez le nouveau-né, le transport des IgG *via* le FcRn permet une surveillance immune et la protection de la muqueuse génitale contre l'infection par divers pathogènes (Li et al., 2011).

De nouvelles fonctions effectrices médiées par les Ig ont été découvertes plus récemment (Casadevall and Pirofski, 2011). En effet, les anticorps peuvent fonctionner comme des molécules effectrices « directes » contre les bactéries (Connolly et al., 2004), les parasites et les champignons (Brena et al., 2011). Par exemple, un anticorps qui se fixe à la surface protéique de *Candida albicans* déclenche trois activités antifongiques telles que la mort directe du champignon, l'inhibition de la filamentation et l'inhibition de l'adhésion tissulaire (Brena et al., 2011). Un autre mode d'action des anticorps est le déclenchement de cascades de transduction du signal par l'engagement des FcR qui déclenche par exemple, la mort intracellulaire de *Toxoplasma gondii* (Vouldoukis et al., 2011). Enfin, la fixation d'anticorps à des capsules microbiennes peut moduler l'expression de gènes impliqués dans la physiologie, la biologie et la communication microbienne comme le *quorum sensing* (système de communication entre les bactéries par la diffusion de molécules auto-inductrices) (Yano et al., 2011).

1.5.3 Fonctions effectrices des IgA

Les IgA jouent un rôle majeur dans la protection des tissus muqueux. De nombreux virus à tropisme muqueux tels que par exemple, le VIH-1, le virus Epstein-Barr, le rotavirus, le virus de herpès (HSV, *Herpes simplex virus*), le cytomégalovirus humain, le virus de la grippe, le virus de la rougeole pénètrent les muqueuses selon divers mécanismes avec ou sans infection des cellules épithéliales (Bomsel and Alfsen, 2003). Par l'intermédiaire du pIgR, les dIgA et S-IgA des muqueuses exercent leurs fonctions d'agents neutralisants à trois niveaux : (i) dans la lumière de la cavité de l'organe, elles préviennent l'adhésion sur des récepteurs cellulaires et l'invasion de bactéries, virus, parasites et neutralisent les toxines bactériennes, par agglutination et immobilisation ; (ii) dans l'épithélium, les dIgA ont aussi la capacité de neutralisation intracellulaire de virus tels que le virus de Sendaï, du rotavirus et du VIH-1 ; (iii) dans la *lamina propria*, les dIgA peuvent aider à l'excrétion d'antigènes et de microorganismes (exclusion bactérienne) vers la lumière de la cavité où ils seront éliminés (Kaetzel, 2007; Rojas and Apodaca, 2002) (**Figure 7**). Le pIgR exprimé au pôle basal des cellules épithéliales des muqueuses est responsable du transport des Ig polymériques (IgA et IgM) par transcytose (mécanisme de transport transcellulaire de molécules) du pôle basal au pôle apical (Rojas and Apodaca, 2002). L'internalisation du ligand au pôle basal par endocytose et le clivage protéolytique du pIgR uniquement à la

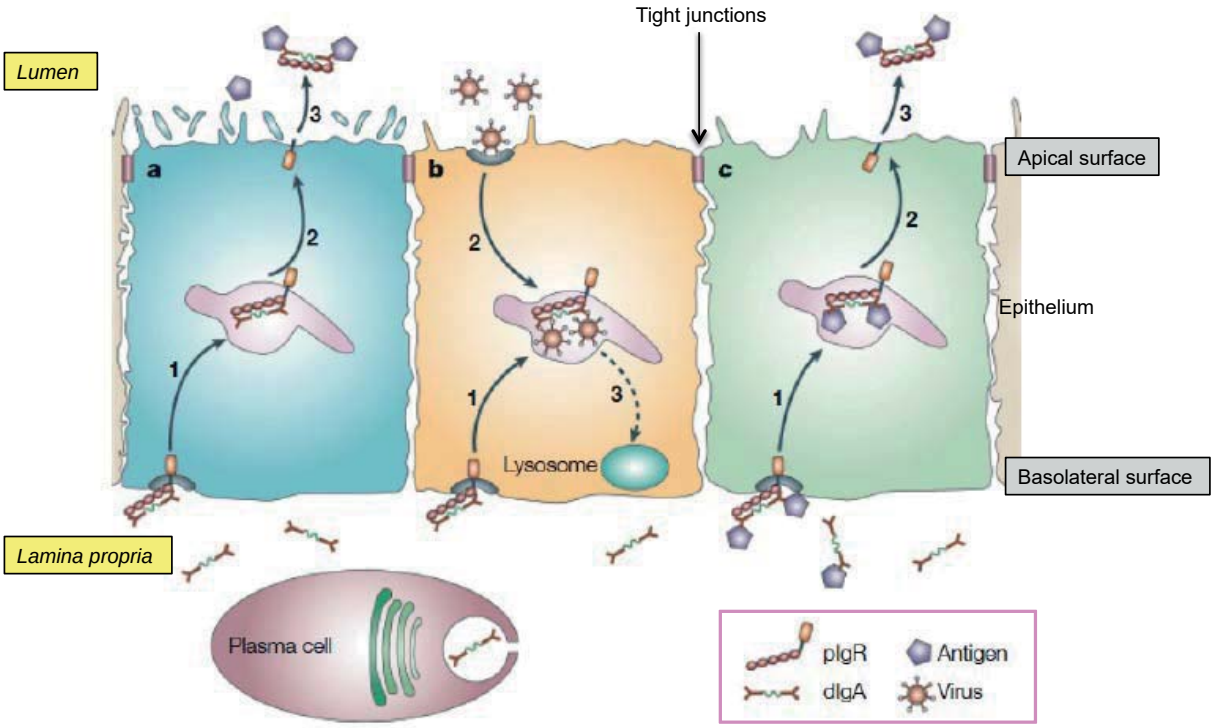


Figure 7 : Fonctions des IgA dimériques et IgA sécrétoires

L'épithélium est composé de cellules épithéliales polarisées avec un pôle apical et un pôle basal tournés respectivement, vers la lumière de la cavité de l'organe et la *lamina propria*, liées entre elles par des jonctions serrées. Les fonctions des IgA dimériques (dIgA) et des IgA sécrétoires (S-IgA) s'exercent à trois niveaux : **(a)** dans la lumière de la cavité de l'organe avec la prévention de l'attachement de pathogène/bactérie commensale. Après sécrétion par les plasmocytes, les dIgA sont fixées au récepteur d'Ig polymérique (pIgR) exprimé au pôle basal des cellules épithéliales. Le complexe dIgA-pIgR est internalisé et transporté vers le pôle apical par transcytose à travers une série de compartiments endosomaux (1). La transcytose est un mécanisme de transport de molécules à travers des cellules épithéliales polarisées. A la surface apicale, le pIgR est clivé (2) et la partie extracellulaire du pIgR constituant le composant sécrétoire (CS) se fixe au dIgA qui devient ainsi une S-IgA. Les S-IgA luminaux interagissent avec des antigènes ou des pathogènes pour prévenir leur adhésion et invasion (3). **(b)** dans l'épithélium avec la neutralisation intracellulaire de virus. Les complexes dIgA-pIgR sont délivrés dans les compartiments endosomaux (1) où ils rencontrent les virus internalisés ou des protéines virales nouvellement synthétisées (2). Cette interaction dIgA-pIgR-virus inhibe l'assemblage/désassemblage viral et la sortie cellulaire par l'action de lysosomes où ils seront dégradés (3). **(c)** dans la *lamina propria* avec l'excrétion d'antigènes. Des antigènes ayant pénétrés l'épithélium sont neutralisés par les dIgA puis les dIgA se fixent au pIgR. L'ensemble est internalisé (1), transporté jusqu'à la surface apicale (2) et libéré dans la lumière où les antigènes seront éliminés (3). Adapté de (Rojas and Apodaca, 2002).

surface apicale peuvent expliquer l'orientation unidirectionnelle de ce transport (**Figure 7**). Un ligand internalisé au pôle basal a donc trois devenirs possibles : (i) transcytose à la surface apicale ; (ii) recyclage à la surface basale ; (iii) dégradation (Breitfeld et al., 1989).

Un autre médiateur clé des fonctions effectrices des IgA est le récepteur Fc des IgA (FcαRI) exprimé par les monocytes, les CD et les polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et plusieurs sous-groupes de macrophages tels que les cellules de Kupffer. Le FcαRI (ou CD89) est le récepteur aux IgA le mieux caractérisé mais d'autres récepteurs fixant les IgA ont été décrits tels que le récepteur de la transferrine (CD71), Dectine-1 ou le récepteur DC-SIGN (*Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecular 3-grabbing non-integrin*). Le FcαRI consiste en deux domaines extracellulaires (EC1 et EC2), d'une région transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique (Heineke and van Egmond, 2017). Des études cristallographiques ont montré que deux molécules de FcαRI se fixent à un dimère de Fc d'IgA à l'interface entre chaque domaine Cα2-Cα3 (Herr et al., 2003). Une étude a montré que les dIgA1 présentent une meilleure affinité pour le FcαRI et les dIgA2 pour le récepteur DC-SIGN (Gayet et al., 2020). Les complexes immuns formés par les IgA se fixent avec une forte avidité aux FcαRI tandis que les mIgA et dIgA seules se fixent avec une très faible affinité à leur récepteur CD89 (Heineke and van Egmond, 2017) (Hansen et al., 2019) (Gayet et al., 2020). La phagocytose de pathogènes opsonisés, la modulation de la production de cytokines et de chimiokines (réponses inflammatoires ou immunosuppressives), l'ADCC et la dégranulation sont des processus déclenchés par les interactions entre le Fc des IgA recouvrant sa cible et les FcαRI (Woof and Russell, 2011). Par exemple, pour contrecarrer l'action protectrice des IgA, certaines bactéries ont développé des mécanismes d'échappement. Ainsi, la toxine SSL7 (*Staphylococcal superantigen-like protein 7*) exprimée par *Staphylococcus aureus* se fixe sur le fragment Fc des IgA, et empêche par compétition la liaison IgA-FcαRI (Wines et al., 2006).

Toutes les formes des IgA contribuent à l'homéostasie et à l'immunité en interagissant avec les agents pathogènes et les cellules hôtes (Heineke and van Egmond, 2017). En effet, outre leurs fonctions neutralisantes, les IgA jouent aussi des rôles anti- ou pro-inflammatoires en fonction des circonstances. Il a été montré qu'en conditions d'homéostasie, les dIgA1 entrainent une exacerbation de la réponse anti-inflammatoire induite par les mIgA1. Au contraire, durant l'infection, une forte réponse pro-inflammatoire est induite par les CD dérivées de monocytes activées avec les dIgA2. De manière intéressante, ces deux processus conduisent à l'activation de LT CD8+ (Gayet et al., 2020).

Finalement, les nombreux glycanes des IgA peuvent interagir avec les *pili* (structures protéiques présentes à la surface de la paroi de certaines bactéries), empêchant ainsi l'attachement des bactéries aux surfaces des muqueuses (Wines et al., 2006). Enfin, il a été décrit un mécanisme appelé la « croissance enchaînée » où les bactéries filles immédiatement après leur division restent agglutinées par des IgA de haute affinité. Les IgA peuvent ainsi, désarmer ou éliminer des espèces bactériennes potentiellement invasives de la lumière intestinale sans nécessiter de hautes densités de bactéries, d'inflammation et de mort bactérienne (Moor et al., 2017).

2. Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1

Il y a presque 40 ans que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) a été découvert et identifié comme l'agent causal du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) (Barre-Sinoussi et al., 1983) (Gallo et al., 1984). Depuis le début de la pandémie jusqu'à nos jours, il est estimé que 75 millions de personnes ont été infectées par le VIH et que le VIH/SIDA a causé la mort d'environ 32 millions de personnes. Le VIH continue de représenter un problème majeur de santé publique dans le monde. En effet, en 2018 au niveau mondial, 770 000 personnes sont décédées des causes liées au VIH. Fin 2018, environ 37,9 millions de personnes vivaient avec le VIH dans le monde dont 1,7 millions d'enfants (< 15 ans). Au niveau mondial, 24,5 millions de personnes vivant avec le VIH ont reçu un traitement antirétroviral (Juin 2019), ce qui représente un taux de couverture de 62 % pour les adultes et de 54 % pour les enfants. Enfin, entre 2000 et 2018, le nombre de nouvelles infections a chuté de 37 % et celui des décès liés au VIH a baissé de 45 % avec 13,6 millions de vies sauvées grâce aux traitements antirétroviraux sur la même période (Organisation Mondiale de la Santé, 15 Novembre 2019).

2.1 Structure et réplication du VIH-1

Le VIH appartient à la famille des *Retroviridae*, à la sous-famille des *Orthoretrovirinae* et au genre *Lentivirus* qui contient entre autres, deux espèces, le VIH-1 responsable de la pandémie de SIDA et le VIH-2 qui a peu diffusé en dehors de l'Afrique occidentale.

2.1.1 Structure du VIH-1 et génome viral

Le VIH-1 est un virus enveloppé de 110 ± 8 nm de diamètre dont l'enveloppe issue de la bicouche lipidique de la membrane plasmique de la cellule infectée, arbore entre 4 à 35 spicules de glycoprotéine d'enveloppe espacées d'environ 15 nm (≈ 14/virion) (Zhu et al., 2006) (Klein and Bjorkman, 2010) (**Figure 8 A**). La protéine d'enveloppe Env (gp160) est composée d'un trimère de glycoprotéine de surface gp120 (SU) responsable de l'attachement viral et d'un trimère de glycoprotéine transmembranaire gp41 (TM) qui médie la fusion virale. Les sous-unités gp120 et gp41 sont liées de manière non covalente. La matrice du virus composée d'un réseau de protéine de matrice (MA ou p17) interagit avec Env *via* la queue intra-cytoplasmique de la gp41, et la trimérisation de MA facilite l'incorporation des glycoprotéines Env. La matrice associée à la protéase virale (PR ou p11) entoure la capside. La capside de forme conique est composée de 1000 à 1500 monomères

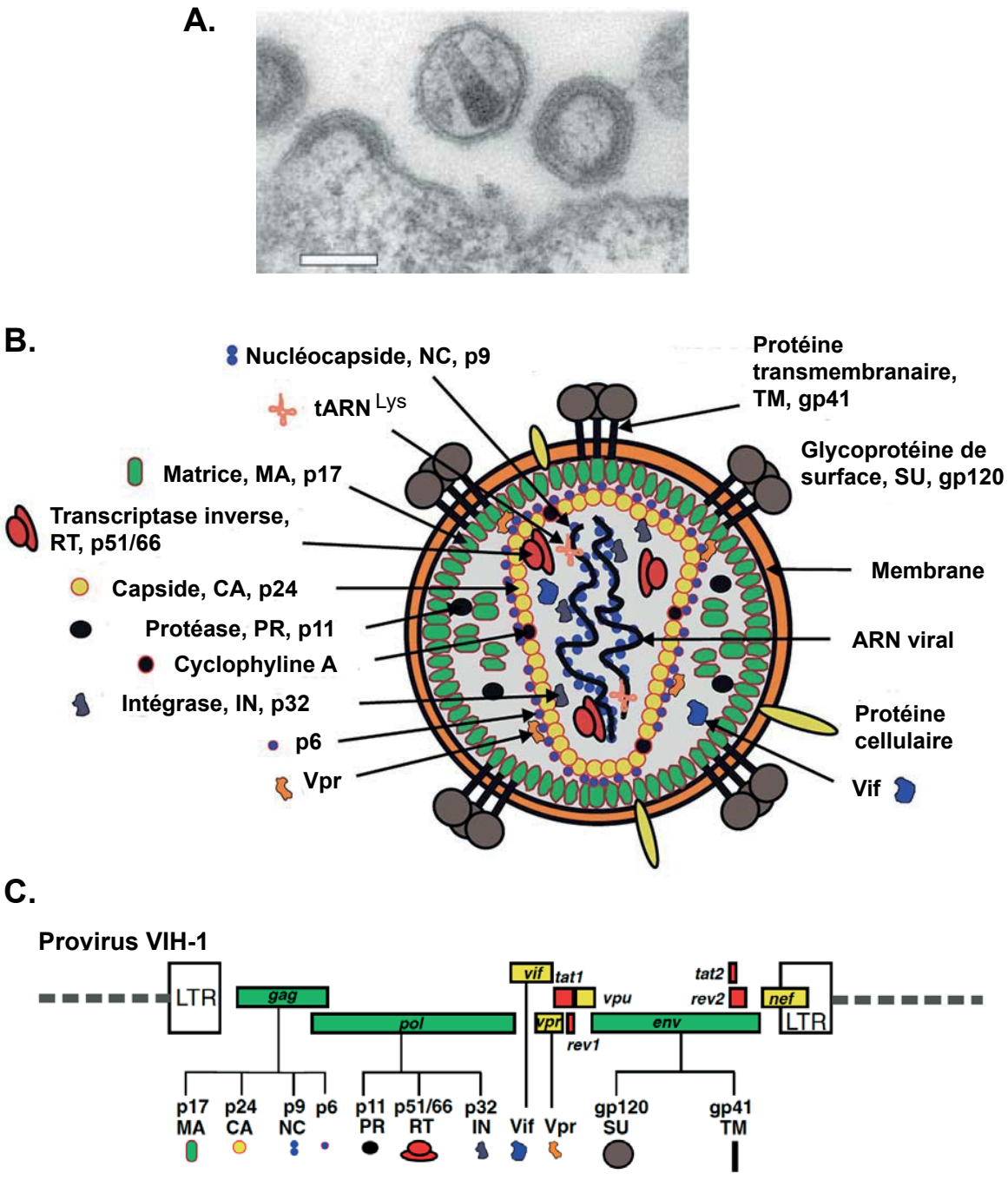


Figure 8 : Structure du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) et organisation génomique de l'ADN proviral du VIH-1

A. Photo de microscopie électronique représentant des particules virales du VIH-1 à différents stades de maturation. D'après http://www.klinikum.uni-heidelberg.de/Mueller.6550.0.html. **B.** Schéma d'une particule virale infectieuse. De l'extérieur vers l'intérieur se trouvent l'enveloppe virale exposant les glycoprotéines de surface (SU) et transmembranaire (TM), la matrice (MA) et la capside (CA) contenant deux copies d'ARN génomique associé à des protéines de nucléocapside (NC) et les enzymes de réplication telles que la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN). Adapté de (Kirchhoff, 2013). **C.** La région codante est encadrée en 5' et en 3' par les LTR (*Long terminal repeat*). Elle comprend trois cadres ouverts de lecture principaux *gag*, *pol* et *env* (en vert). Ils codent les précurseurs Gag, Pol, Env qui seront clivés en protéines individuelles par la protéase virale (PR). Les six autres cadres de lecture codent pour des protéines accessoires Tat, Rev (en rouge), Vif, Vpr, Vpu et Nef (en jaune). Adapté de (Kirchhoff, 2013).

de protéine de capside (CA ou p24) étroitement associés aux protéines de nucléocapside (NC ou p9) ainsi qu'à des enzymes de réplication virale : la transcriptase inverse (RT ou p51/66) et l'intégrase (IN ou p32). La capside renferme le génome viral (Kirchhoff, 2013) (**Figure 8 B**).

Le génome du VIH-1 est constitué de deux molécules d'ARN simple brin linéaire de polarité positive d'une longueur de près de 10 kb. Sous sa forme intégrée à l'ADN de la cellule infectée, il est encadré à chacune de ses extrémités 5' et 3' par des séquences répétées inversées (LTR, *Long terminal repeat*) permettant la régulation de la transcription. Le génome comprend neuf cadres ouverts de lecture se chevauchant partiellement. Ils codent pour les trois polyprotéines Gag, Pol, Env sous la forme de précurseurs qui seront clivés en protéines individuelles (protéines de structure, d'enzymes virales et d'enveloppe, respectivement) ainsi que pour six protéines régulatrices ou auxiliaires : Tat, Rev, Vif, Vpr, Vpu et Nef. Ces dernières sont impliquées dans la régulation de la réplication et l'échappement aux mécanismes de l'immunité innée ou spécifique. Les enzymes virales : protéase (PR), transcriptase inverse (RT) et intégrase (IN) sont issues du précurseur Pol. La RT permet la rétro-transcription du génome ARN en ADN double brin (Kirchhoff, 2013) (**Figure 8 C**). Enfin, les glycoprotéines d'enveloppe codées par *env* dérivent d'un précurseur, gp160 clivé en gp120 et gp41 par une endoprotéase cellulaire, la furine (Hallenberger et al., 1992) (Caffrey, 2011) (**Figure 11 A**).

2.1.2 Cycle réplicatif du VIH-1

Le cycle réplicatif viral commence par l'attachement du VIH-1 à la surface de la cellule cible. Cet attachement est médié soit par la protéine Env, soit par des protéines membranaires cellulaires incorporées dans le virion, qui s'associent à des facteurs d'attachement cellulaires. Ces liaisons peuvent être relativement « non spécifiques » comme celles entre Env et des protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG, *Heparan sulfate proteoglycans*) ou plus spécifiques comme les interactions entre Env et des lectines C (DC-SIGN). Cet attachement VIH-1-cellule hôte induit un rapprochement étroit entre Env et son récepteur viral, la molécule CD4 (*Cluster of differentiation 4*) augmentant ainsi l'efficacité d'infection. Le CD4 est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la superfamille des Ig. La fixation de Env et plus particulièrement du site de liaison au CD4 de la gp120 (CD4bs, *CD4 binding site*), sur le récepteur CD4 cellulaire entraine des remaniements conformationnels de la gp120 qui sont à l'origine de l'exposition du site de liaison aux corécepteurs, le CD4 induit. Ce site est reconnu par les corécepteurs CCR5 (*(C-C) chemokine receptor 5*) ou CXCR4 (*(C-X-C motif) chemokine receptor 4*) présents à la surface cellulaire. La fixation à son corécepteur conduit au déploiement et à la pénétration du

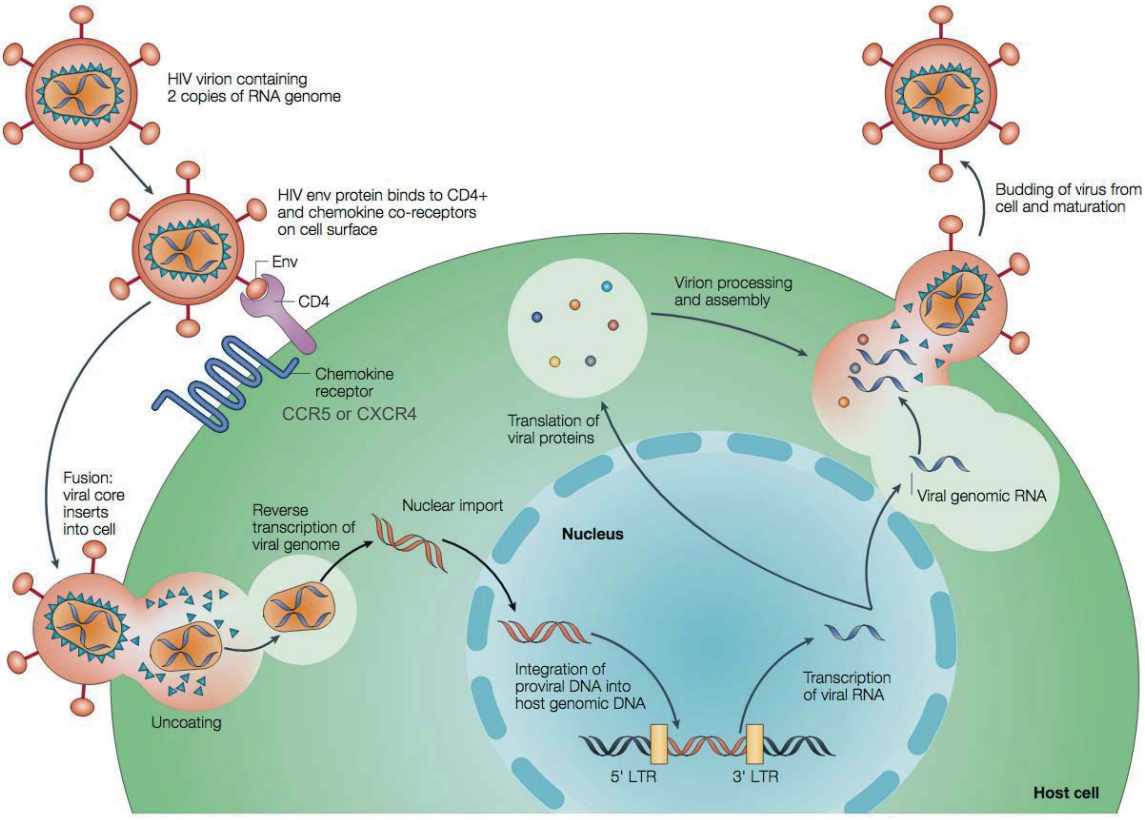


Figure 9 : Cycle réplicatif du VIH-1

L'entrée du VIH-1 nécessite l'attachement de la protéine gp120 à son récepteur CD4 et à son corécepteur CCR5 ou CXCR4 et la fusion membranaire de la cellule hôte (en vert). Après décapsidation, l'ARN est libéré dans le cytoplasme. L'ARN est alors rétro-transcrit en ADN grâce à la transcriptase inverse puis l'ADN est transporté dans le noyau. Le génome viral s'intègre dans l'ADN de la cellule hôte sous forme d'un ADN proviral. Après transcription, export nucléaire et traduction, l'assemblage des protéines virales et du génome a lieu au niveau de la membrane plasmique. Les particules virales y bourgeonnent puis sont libérées sous forme de virions matures infectieux. CCR5, *(C-C) chemokine receptor 5* ; CXCR4, *(C-X-C motif) chemokine receptor 4*. Adapté de (Rambaut et al., 2004).

peptide de fusion (PF) hydrophobe de la gp41 dans la membrane cellulaire. Enfin, le repliement de chaque gp41 du trimère permet le rapprochement et la fusion des membranes virale et cellulaire (Wilen et al., 2012). Des études structurales du complexe gp120-CD4-CCR5 suggèrent que la fixation au corécepteur n'induirait pas de changements conformationnels majeurs de la gp120 et que le rôle du CCR5 serait de stabiliser la conformation de Env liée au CD4, et d'amener ce complexe à proximité de la membrane cellulaire (Shaik et al., 2019). Ensuite, le noyau viral est libéré dans le cytoplasme de la cellule infectée où se produit la décapsidation et la libération du complexe de transcription inverse composé de molécules d'ARN virales, de la RT et de l'IN. La RT rétrotranscrit l'ARN viral en ADN double brin. Les protéines virales CA, MA, IN, NC et Vpr restent associées à l'ADN viral formant le complexe de pré-intégration qui pénètre dans le noyau *via* le complexe de pore nucléaire. L'ADN viral est ensuite intégré dans le chromosome de la cellule infectée par l'action de l'IN (Campbell and Hope, 2015). Après intégration, l'ADN proviral s'exprime comme tout autre gène cellulaire. La transcription catalysée par l'ARN polymérase II commence au niveau de la région R du LTR en 5' jouant le rôle de promoteur et se termine après la région R du LTR en 3' par un signal de polyadénylation et de terminaison. Les ARN messagers (ARNm) multi-épissés codant pour les protéines régulatrices Tat et Rev sont exportés dans le cytoplasme où ils sont traduits en protéines. Les ARN non épissés (ARN génomique et ARNm codant pour *Gag* et *Gag-Pol*) ou mono-épissés (ARNm codant pour *Env*) plus longs sont transportés dans le cytoplasme grâce à Rev. La traduction cytosolique des ARNm codant pour *Gag* et *Gag-Pol* permet la synthèse des précurseurs poly-protéiques Gag (55 kDa) et Gag-Pol (160 kDa). Le précurseur Env est traduit au niveau du réticulum endoplasmique où il est glycosylé et clivé par la furine pour générer les trimères d'hétérodimères gp120/gp41. L'assemblage des virions est initié par l'ancrage des précurseurs Gag dans des radeaux lipidiques de la membrane plasmique. Chaque domaine de Gag (MA, CA, NC et p6, **Figure 8 C**) joue un rôle dans le processus d'assemblage : MA permet l'interaction avec la membrane plasmique, CA et NC participent à la multimérisation de Gag, NC intervient aussi dans l'empaquetage des deux copies d'ARN génomique et p6 est impliqué dans le bourgeonnement et la libération des virions. Finalement, les particules virales libérées dans le milieu extracellulaire subissent un processus de maturation par le clivage protéolytique des poly-protéines Gag et Gag-Pol par la protéase virale (Freed, 2015) (**Figure 9**).

2.2 Les glycoprotéines d'enveloppe et leur rôle dans l'entrée virale

2.2.1 Biosynthèse et maturation

La synthèse des glycoprotéines d'enveloppe commence par la production du précurseur gp160 au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (RER) après traduction. De manière concomitante à celle-ci, il y subit des modifications post-traductionnelles conduisant à une conformation correcte de la protéine, à la formation de ponts disulfures entre des résidus cystéine et à sa glycosylation ; majoritairement des N-glycosylations mais aussi à moindre mesure, des O-glycosylations. Les sites d'attachement covalents sont des résidus Asparagine (N) répondant au motif consensus N-X-S/T où X est n'importe quel acide aminé sauf une proline. Ces résidus N sont des sites potentiels de glycosylation. Chaque monomère de Env contient 30 ± 3 sites de N-glycosylation. Les glycosylations de la gp160 représentent environ 50 % de la masse totale de la protéine (Seabright et al., 2019). La N-glycosylation débute dans le RER et se poursuit dans l'appareil de Golgi pour former des N-glycanes soit riches en mannose (*high mannose*), soit complexes ou encore hybrides (Murakami, 2012) (**Figure 11 B**). Outre leur rôle dans la conformation et le trafic des glycoprotéines virales dans la cellule hôte, les glycanes peuvent aussi : (i) entraver ou faciliter la propagation virale ; (ii) jouer un rôle dans l'échappement viral à la réponse immune (bouclier) ; (iii) être la cible d'AN à large spectre (bNAbs, *Broadly neutralizing antibodies*) ; (iv) servir de facteurs d'attachement pour augmenter/faciliter l'infection de cellules immunitaires (Watanabe et al., 2019) (Seabright et al., 2019) (**Figure 12 C**).

Avant que les poly-protéines Env ne transitent à la surface, elles doivent être assemblées en structures oligomériques sous forme de trimères, trois sous-unités de gp120 et de gp41 liées de manière non covalente. La région de la poly-protéine Env impliquée dans l'assemblage d'oligomères semble entièrement contenue dans la région TM. Bien que les protéines Env soient aptes à interagir avec leur récepteur CD4 après oligomérisation, elles ne deviennent fusogéniques qu'après clivage entre SU et TM par la furine. La coupure se fait immédiatement après le motif polybasique K/R-X-K/R-R, et a lieu dans l'appareil de Golgi. Les hétérotrimères gp120/gp41 sont sécrétés dans des vésicules jusqu'à la membrane plasmique et incorporés sous forme de spicules à la surface des particules virales. La densité d'oligomères gp120/gp41 à la surface des virions est relativement faible (≈ 14/virion), ce qui rend difficile la fixation bivalente des anticorps et l'apoptose des cellules infectées médiée par Env (Zhu et al., 2006). Les protéines Env peuvent aussi être internalisées par endocytose, soit jusqu'à leur dégradation dans les lysosomes, soit jusqu'à leur recyclage dans des endosomes de recyclage avant de retourner à la membrane plasmique (Murakami, 2012) (**Figure 10**). Plusieurs modèles d'incorporation de la glycoprotéine Env dans les

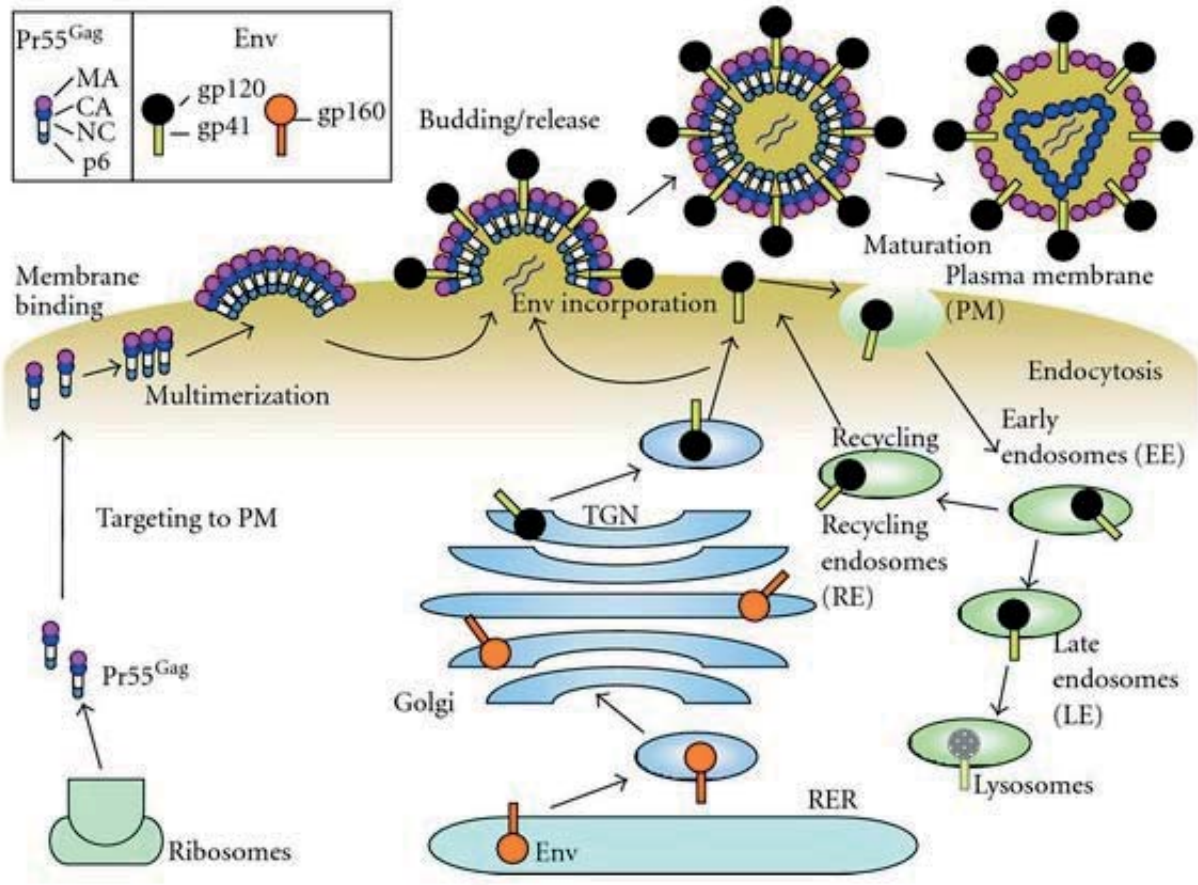


Figure 10 : Biosynthèse et trafic des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 dans la cellule hôte

La synthèse des glycoprotéines d'enveloppe est initiée par la production du précurseur gp160 au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (RER, *Rough endoplasmic reticulum*). Après glycosylation, les poly-protéines Env s'oligomérisent en trimères et sont transportées vers l'appareil de Golgi et le réseau trans-golgien (TGN, *Trans-Golgi network*)) où elles sont clivées par la furine en sous-unités gp120 et gp41. Le précurseur Gag ($Pr55^{Gag}$) synthétisé dans le cytoplasme circule vers la membrane plasmique (PM) où il se multimérise. Ensuite, les hétérotrimères gp120/gp41 sont sécrétés dans des vésicules jusqu'à la membrane plasmique et sont incorporés sous forme de spicules à la surface des particules virales. Les protéines Env peuvent aussi être internalisées par endocytose dans des endosomes précoces (EE, *Early endosomes*), maturées dans des endosomes tardifs (LE, *Late endosomes*) et enfin, dégradées dans des lysozomes ou être recyclées dans des endosomes de recyclage avant de retourner à la PM. D'après (Murakami, 2012).

virions ont été proposés car le mécanisme précis n'est pas totalement élucidé : (i) incorporation passive dans les particules virales ; (ii) association préférentielle de Gag-Env dans des radeaux lipidiques membranaires servant de plateformes pour l'assemblage et le bourgeonnement des virions ; (iii) incorporation régulée à travers des interactions protéiques directes de la queue cytoplasmique de la gp41 et du domaine MA de Gag ; (iv) incorporation régulée à travers des interactions indirectes entre Env et Gag par certains facteurs cellulaires servant de pont protéique pour lier les deux protéines (Freed, 2015).

2.2.2 Structure des glycoprotéines d'enveloppe

La glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1 (Env, gp160) est un hétérotrimère composé de trois sous-unités de la glycoprotéine de surface (SU, gp120) liées de manière non covalente à trois sous-unités de la glycoprotéine transmembranaire (TM, gp41). L'Env viral constitue le seul antigène à la surface du VIH-1. Cependant, il est à noter que différentes formes de trimères d'Env coexistent à la surface de la particule virale. Ainsi, les trimères fonctionnels sont ciblés par les AN. Les trimères non fonctionnels (trimères d'Env ayant perdu une gp120 et trimères de gp41) mais aussi les monomères de gp120 sont eux, les cibles d'anticorps non neutralisants (AnN) dont la fixation n'inhibe pas l'infectivité des virions (Burton and Mascola, 2015). Ces formes non fonctionnelles représentent des leurres pour les anticorps.

2.2.2.1 Structure de la gp120

La glycoprotéine gp120 forme une structure globulaire hautement glycosylée de 120 kDa composée de cinq régions conservées (C1 à C5) et de cinq régions hautement variables (V1 à V5) (**Figure 11 A**). La gp120 est structurellement définie en trois domaines : un domaine interne orienté vers le centre du trimère, un domaine externe orienté vers la périphérie et un feuillet β de pontage qui relie les deux domaines précédents (**Figure 12 A**). Neuf ponts disulfures contribuent à sa structure et permettent de constituer la base des boucles variables V1 à V4 exposées (Checkley et al., 2011) (**Figure 11 B**).

Le domaine V1/V2 (≈ 50-90 résidus) est constitué de quatre feuillets β anti-parallèles dans lesquels les brins A et B sont connectés par la boucle V1 et les brins C et D par la boucle V2, toutes deux flexibles. Les boucles V1/V2 sont impliquées dans la formation d'épitopes quaternaires et sont la cible de bNAbs tels que par exemple, PG9/PG16 (Walker et al., 2009) ou PGT141-145 (Walker et al., 2011). La région V1/V2 n'est pas essentielle à l'infectivité mais varie en séquence, en longueur et en N-glycosylation. Cependant, la délétion de la région V1/V2 rend le virus hautement sensible à la neutralisation (Cao et al.,

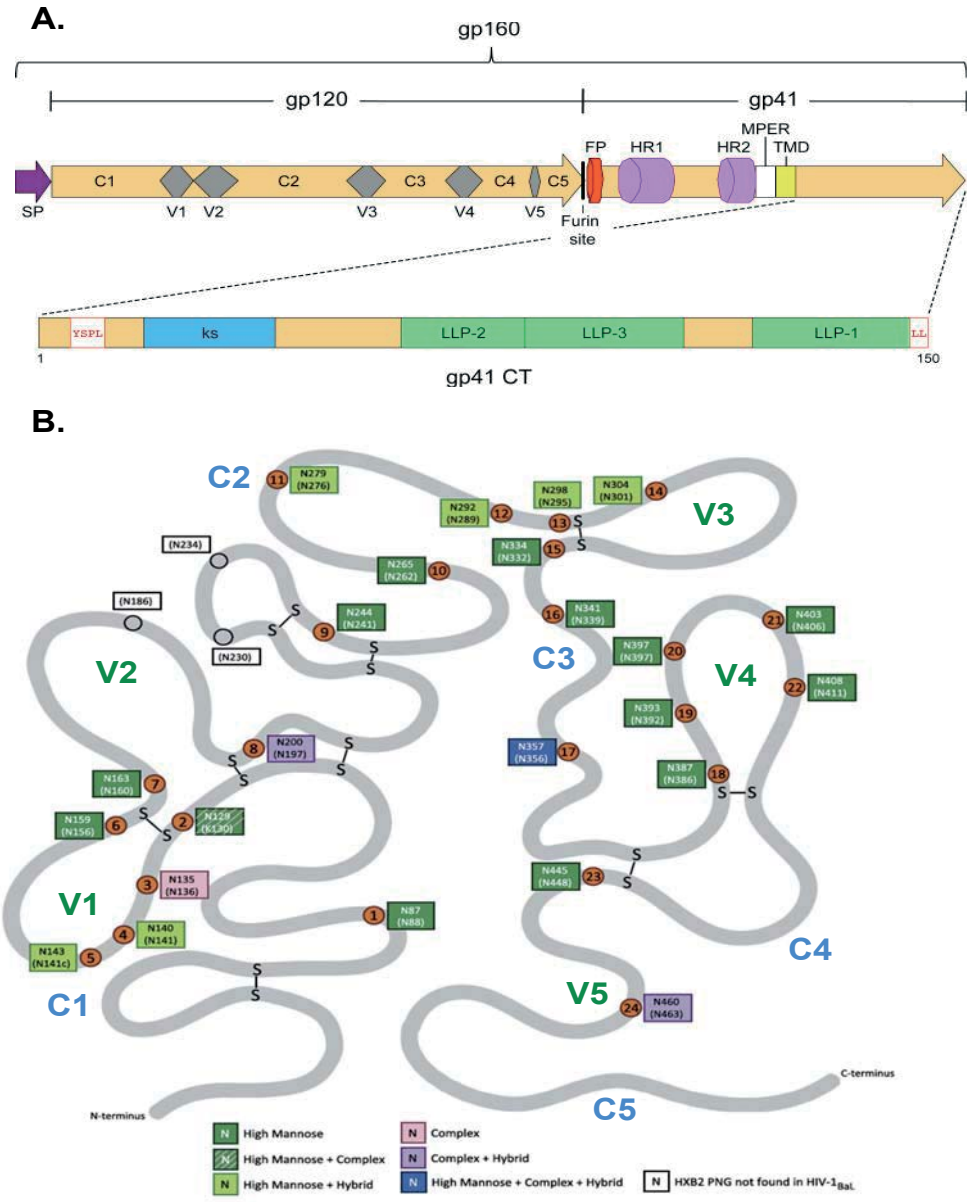


Figure 11 : Structure des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1

A. Initialement exprimé sous forme d'un précurseur poly-protéique, gp160 dont le peptide signal (SP) est clivé pendant la traduction, la protéine Env est clivée par des protéases cellulaires de type furine, en deux sous-unités : la glycoprotéine de surface, gp120 et la glycoprotéine transmembranaire, gp41. La gp120 contient cinq épitopes variables (V1 à V5 en gris) ainsi que cinq régions conservées (C1 à C5 en saumon). La gp41 comprend un domaine extracellulaire contenant le peptide fusion (FP, *Fusion peptide* en rouge), des heptades répétées (HR1 et HR2 en violet), la région externe proximale membranaire (MPER en blanc), un domaine transmembranaire (TMD, *Transmembrane domain* en jaune) et une queue cytoplasmique (CT, *Cytoplasmic tail*) dont les motifs sont détaillés en-dessous. La CT de la gp41 contient un signal d'internalisation (YSPL), la séquence Kennedy (ks en bleu), trois motifs LLP (*Lentivirus lytic peptides* en vert) et un motif dileucine en C-terminal (LL). D'après (Checkley et al., 2011). **B.** Représentation de la structure secondaire de la gp120 (souche virale VIH-1 BaL). Les sites N-glycanes sont positionnés selon la numérotation de la séquence BaL et en respectant la numérotation de la séquence de référence HXB2 entre parenthèses. Les sites uniques sont indiqués de 1 à 24 dans des cercles orange. Les trois sites consensus de HXB2CG non présents ici sont indiqués avec les cercles vides. Les boucles variables V1 à V5 (en vert) et les régions conservées C1 à C5 (en bleu) sont indiquées. Les différents types de glycosylation (*high mannose*, complexe, hybride) observés à chaque site est indiqué selon le code couleur en-dessous de la figure. Enfin, les ponts disulfures impliqués dans la structure des boucles sont montrés. Adapté de (Panico et al., 2016).

1997) (McLellan et al., 2011). La boucle V2 joue un rôle dans la fixation au CD4, contribue à la formation du trimère Env, est impliquée dans la liaison de la gp120 au récepteur intégrine α4β7 des LT CD4+ de l'intestin, et fait partie de la région fixant le corécepteur (McLellan et al., 2011) (Rao et al., 2013) **(§ 4.3.2.2)**.

Le domaine V3 (34-35 résidus) forme une boucle possédant deux cystéines à sa base. Il est fonctionnellement essentiel dans l'infectivité virale car il interagit avec le corécepteur cellulaire CCR5 ou CXCR4. La boucle V3 est aussi impliquée dans le tropisme cellulaire (**§ 2.2.4**) et la fusion membranaire. Enfin, la boucle V3 est la cible de nombreux bNAbs tels que par exemple, PGT135-PGT137 (Walker et al., 2011), PGT121/10-1074-*like* (Mouquet et al., 2012) ou BG18 (Freund et al., 2017) (Rao et al., 2013) **(§ 4.3.2.1)**.

La boucle V4 est la cible des premiers AN autologues. Enfin, la région V5 fait partie de la surface du CD4bs de la gp120 et est la seule région variable qui ne forme pas une boucle liée par un pont disulfure (Rao et al., 2013) (**Figure 11**).

Les régions C1 et C5 interagissent directement avec le site de liaison de la gp41, la région C1 jouant un rôle important dans le traitement du site de reconnaissance de la furine qui est situé dans le domaine C5 (Wang et al., 2008). Les régions C2, C3 et C4 forment le « core » de la gp120. Des données suggèrent une relation structure/fonction entre les régions variables et constantes de la gp120 mais suggèrent aussi que le rôle des régions constantes pourrait être de fournir le core structural et de compenser les variations dans les boucles variables qui contiennent les sites de fixation au récepteur (Rao et al., 2013) (**Figure 11**).

2.2.2.2 Structure de la gp41

La glycoprotéine transmembranaire gp41 d'environ 345 acides aminés comporte trois domaines majeurs : un domaine extracellulaire (ectodomaine), un domaine d'ancrage transmembranaire et une queue cytoplasmique en C-terminale (Checkley et al., 2011) (**Figure 11 A**). La gp41 a pour rôles, l'ancrage de Env à la membrane plasmique, la fusion des membranes cellulaire et virale dans le processus d'entrée et l'incorporation de Env dans les particules virales (Freed, 2015).

L'ectodomaine (172 résidus) est impliqué dans le processus de fusion et comporte cinq domaines. Le PF permet l'ancrage de Env dans la membrane plasmique. De manière surprenante, la portion hydrophobe N-terminale du PF peut être exposée et être la cible d'AN tel que l'anticorps N123-VRC34.01 (VRC, *Vaccine Research Center*) qui bloque l'entrée virale en inhibant les changements conformationnels des sous-unités gp120 et gp41 de l'Env (Kong et al., 2016). Les domaines HR1 et HR2 (*Heptad repeat 1 and 2*) en s'enroulant, forment une super hélice α qui permet le rapprochement des membranes cellulaire et virale.

La région immuno-dominante, très immunogène, relie les domaines HR1 et HR2 entre eux. La région externe proche de la membrane virale (MPER, *Membrane-proximal external region*) est fortement conservée et est, elle aussi, la cible d'AN tels que 2F5 (Muster et al., 1993), 4E10 (Cardoso et al., 2005) et 10E8 (Huang et al., 2012).

Le domaine transmembranaire (≈ 25 acides aminés) hautement conservé, permet l'ancrage de Env dans la bicouche lipidique (Checkley et al., 2011).

La queue cytoplasmique (≈ 150 acides aminés) est composée de domaines structuraux et fonctionnels : (i) un signal d'internalisation (YxxL) par endocytose de l'Env dans la membrane plasmique ; (ii) trois motifs LLP (*Lentivirus lytic peptides*, LLP-1, LLP-2, LLP-3) hautement conservés parmi les lentivirus et impliqués dans la fusogénicité, la stabilité de la protéine, la multimérisation, l'expression à la surface cellulaire, et l'incorporation de l'Env ; (iii) la distribution intracellulaire de l'Env est régulée par le motif dileucine (LL) (Checkley et al., 2011) (**Figure 11 A**).

2.2.3 Structure tridimensionnelle de Env et modifications conformationnelles impliquées dans l'entrée virale

2.2.3.1 Structure tridimensionnelle de Env

Depuis la résolution de la première structure de la gp120 monomérique (Wyatt et al., 1998), de nombreux obstacles aux analyses structurales (plasticité, variabilité génétique, et N-glycanes de Env) ont été levés par des modifications de séquences pour stabiliser le trimère, par des associations de Env en complexe avec des bNAbs, et grâce aux technologies comme la cristallographie aux rayons X ou la cryo-microscopie électronique (cryo-EM). La révolution dans ce domaine a été l'ingénierie d'une version soluble du trimère Env et stabilisée par l'incorporation d'un pont disulfure entre gp120 et gp41 (SOS) et d'une mutation Isoleucine559Proline dans l'HR1 de gp41 (IP) permettant la non dissociation des gp120/gp41 et sa trimérisation. L'une des protéines SOSIP la plus utilisée, BG505 de clade A est dépourvue du résidu N664 (BG505 SOSIP.664 gp140) (Ward and Wilson, 2017). Ainsi, utilisant cette stratégie, de nombreuses structures tridimensionnelles s'approchant au plus près de la forme native de Env ont été décrites telles que celles du trimère de gp160 soluble clivé (Julien et al., 2013a), du trimère au stade pré-fusion (Pancera et al., 2014) ou plus récemment, de la gp120 en complexe avec le CD4 et le CCR5 (Shaik et al., 2019). Ces données structurales sont à la base de la conception rationnelle de vaccins basés sur des AN contre l'Env.

Un monomère de gp120 est constitué d'un domaine interne et d'un domaine externe reliés par un feuillet β de pontage (*Bridging sheet*) (**Figure 12 A**). Le domaine interne comprend les régions conservées C1 et C5 et *via* sa partie N-terminale, il interagit avec la

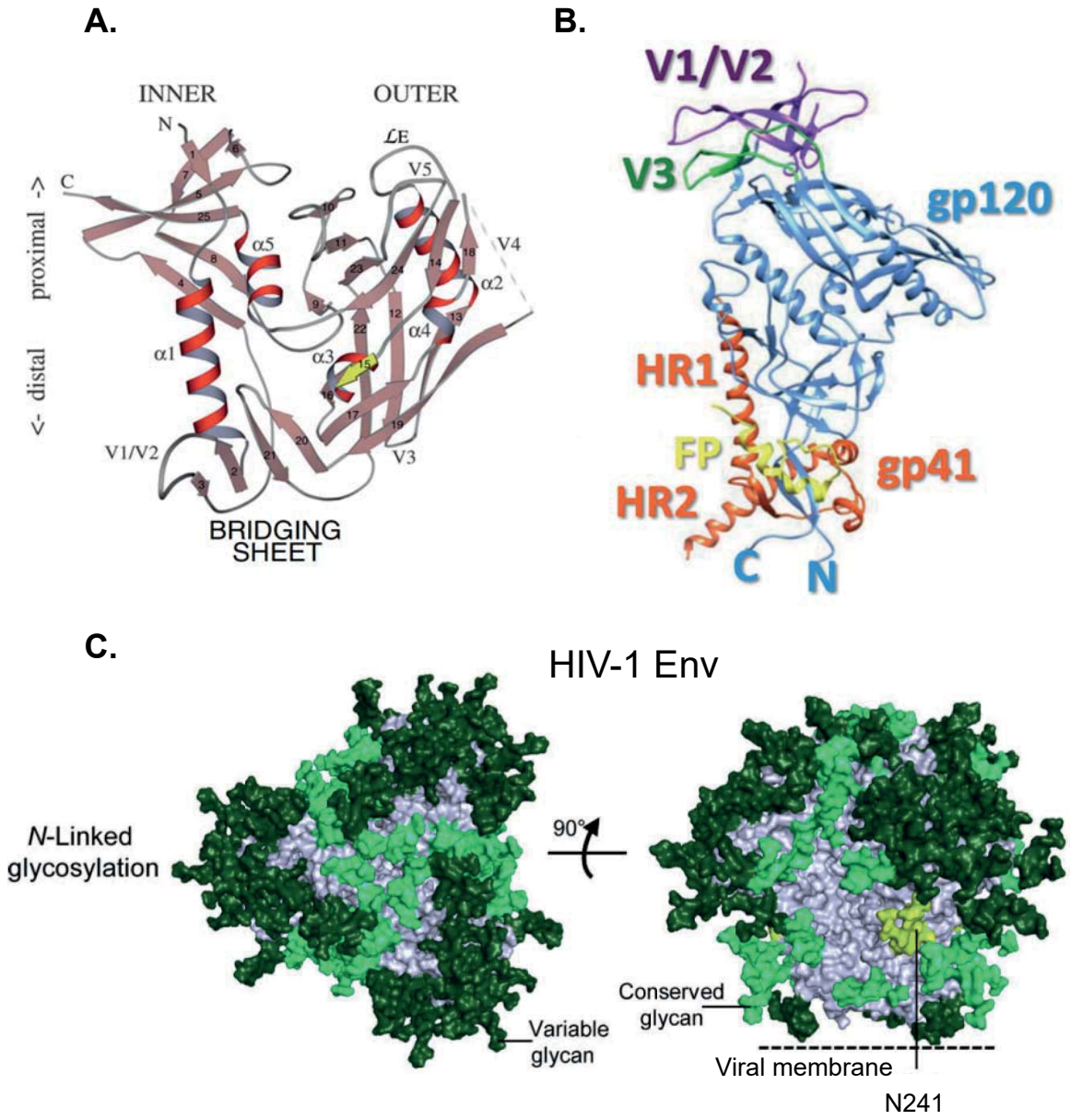


Figure 12 : Structure tridimensionnelle des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1

A. Structure en ruban montrant l'organisation tripartite de la gp120 avec le domaine interne (*Inner* à gauche) et le domaine externe (*Outer* à droite) reliés par le feuillet de pontage (*Bridging sheet*) composé de quatre feuillets β antiparallèles. Les hélices α sont indiquées en rouge et les feuillets β en saumon. Les boucles (V1-V5) et les extrémités N- et C-terminales sont indiquées. L'orientation de la gp120 est telle que la membrane virale est vers le haut et la membrane cellulaire se trouve vers le bas. D'après (Kwong et al., 1998). **B.** Protomère gp120/gp41 de la BG505 SOSIP.664 soluble. Les heptades répétées (HR1/HR2, *Heptad repeat regions* en rouge) de la gp41 sont positionnées à la base du trimère, le peptide fusion (FP, *Fusion peptide* en jaune) à l'interface de la gp120 et les boucles V1/V2 et V3 sont à l'apex du trimère. Les extrémités N- et C-terminales de la gp120 forment d'importantes interactions avec la gp41. D'après (Ward and Wilson, 2015). **C.** Bouclier de glycanes recouvrant l'enveloppe de VIH-1 BG505. Les glycanes conservés (> 90% de conservation) apparaissent en vert clair et les glycanes variables (< 90% de conservation) sont montrés en vert foncé. Le N-glycane N241 non présent dans la séquence BG505 est indiqué en jaune-vert. D'après (Pancera et al., 2014).

gp41. Il contient aussi les boucles V1/V2 qui sont exposées à l'apex du trimère. Le domaine externe contient les boucles variables V3, V4 et V5. La boucle V3 est située au sommet du trimère mais se trouve enfouie par la V1/V2 et le bouclier de glycanes (**Figure 12 B** et **C**). Enfin, le feuillet β inter-domaines n'est formé qu'après interactions entre la gp120 et le CD4 (Kwong et al., 1998) (Wang et al., 2018a).

2.2.3.2 Modifications conformationnelles impliquées dans l'entrée virale

Le CD4 est fixé dans une dépression formée à l'interface du domaine externe avec le domaine interne et le feuillet β de pontage de la gp120 (Kwong et al., 1998). Le CD4 est en contact direct avec 26 résidus de la gp120 (Checkley et al., 2011). La liaison au CD4 s'accompagne d'un haut degré de réarrangements conformationnels de la gp120. Il a été montrée que les boucles V1/V2 à l'apex du trimère sont juxtaposées avec la région sous-jacente du site de liaison au corécepteur sur la V3 dans les conformations fermées de Env et pré-fusion de Env sur le CD4. Toutefois, dans un état intermédiaire précoce de ces formes, une rotation des sous-unités de gp120 est observée par rapport à l'axe du trimère, cette rotation semblant être requise pour le déplacement des boucles V1/V2 (Wang et al., 2018a). L'ouverture de Env en l'absence de déplacement des boucles V1/V2 (un état qui peut exister à l'équilibre avec l'Env en architecture fermée) déclenche des réarrangements dans la gp41. Cela se traduit prémièrement, par la formation des hélices α compactes et étendues de l'extrémité C-terminale de HR1 de la gp41 avec les extensions de la partie N-terminale de HR1. Une deuxième étape, dépendante de la fixation de Env sur le CD4, implique le déplacement de 40 Å des boucles V1/V2 sur les faces latérales du trimère pour exposer la V3 (ouverture du trimère), la formation du feuillet β de pontage et la formation de l'hélice α0. La formation du feuillet β de pontage est probablement nécessaire au déplacement de V1/V2 et à l'exposition du site de fixation au corécepteur sur la V3 (Wang et al., 2018a) (**Figure 13**).

La liaison de la gp120 au CD4 est nécessaire mais insuffisante pour conduire à l'entrée du VIH-1 dans la cellule cible. Cela implique la liaison à un corécepteur, le CCR5 ou le CXCR4 identifiés en 1996 (Berger et al., 1999). Les corécepteurs CCR5 et CXCR4 sont des récepteurs de chimiokines appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ils sont composés d'un segment extracellulaire N-terminal, de trois boucles extracellulaires et intracellulaires et d'une queue cytoplasmique C-terminale. Le segment N-terminal du corecepteur forme un site de reconnaissance chimiokine 1 (*Chemokine recognition site 1*, CRS1) interagissant avec le domaine globulaire core de la chimiokine. L'ensemble des sept domaines transmembranaires (7TM) forme lui, une poche de fixation (*Chemokine recognition site 2,* CRS2) qui accueille la partie N-terminale de la chimiokine. La résolution de la structure du complexe gp120-CD4-CCR5 par cryo-EM montre qu'il se forme

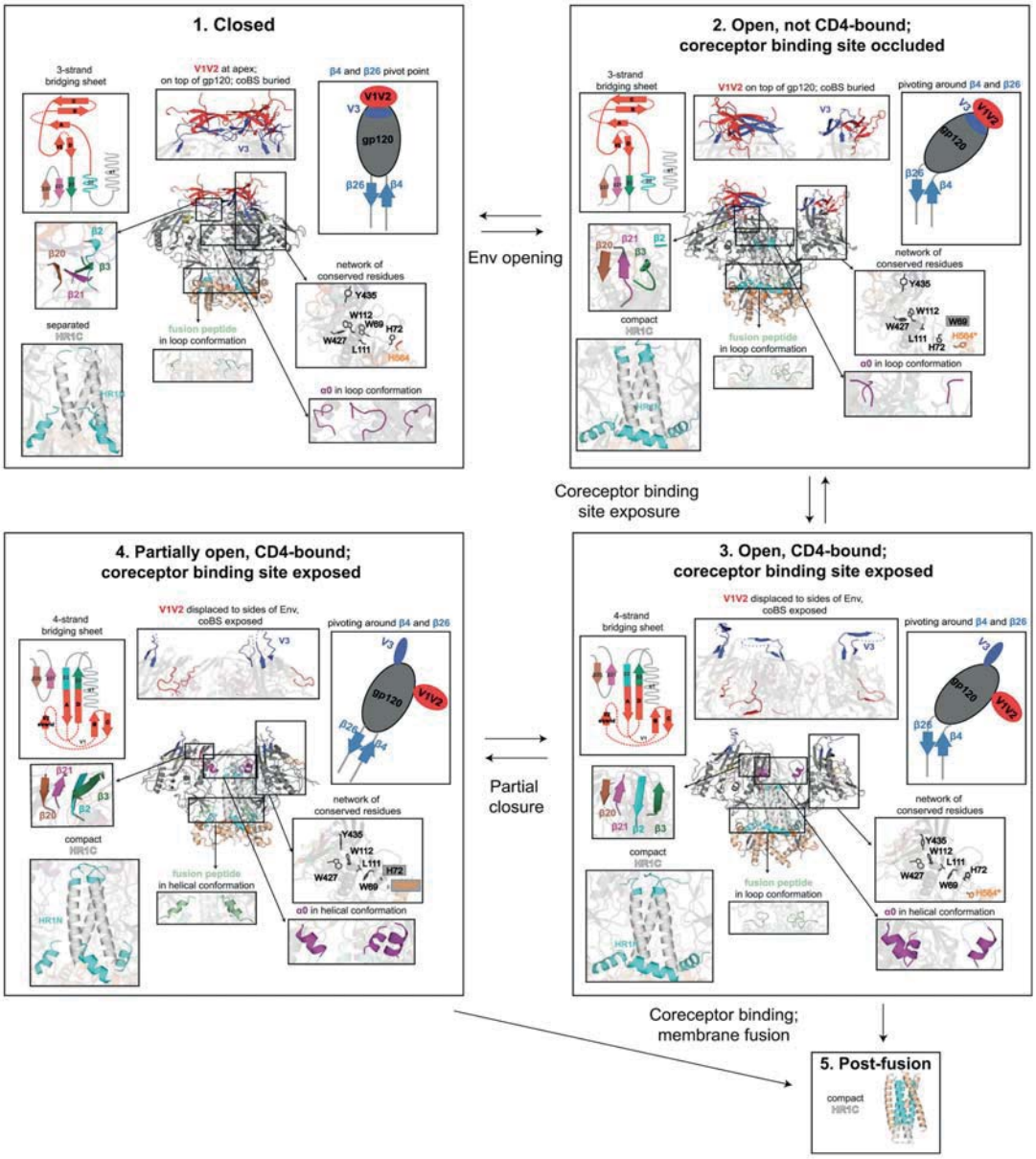


Figure 13 : Présentation des différentes conformations des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 au cours de la fixation au récepteur CD4

1. L'Env dans sa conformation fermée. **2.** L'Env dans sa conformation ouverte mais non fixée au récepteur CD4 et le site de fixation au corécepteur non exposé. **3.** L'Env dans sa conformation ouverte et fixée au CD4 ; le site de fixation au corécepteur exposé. **4.** L'Env dans sa conformation partiellement ouverte et fixée au CD4 ; le site de fixation au corécepteur exposé. **5.** gp41 post-fusion. D'après (Wang et al., 2018).

	Etat Gp120	V1V2	Bridging sheet	HR1C gp41	Hélice α0	Peptide Fusion (PF)
1.	Fermé	Sommet gp120 + V3	Incomplet 3 feuillets	Séparé	Boucle	Boucle
2.	Ouvert	Sommet gp120 + V3	Incomplet 3 feuillets	Compact	Boucle	Boucle
3.	Ouvert	Déplacée	Complet 4 feuillets	Compact	Hélice	Boucle
4.	Partiellement ouvert	Déplacée	Complet 4 feuillets	Compact	Hélice	Hélice
5.	?	?	?	Compact	?	Hélice

deux interfaces majeures entre la gp120 et le CCR5 après la fixation du CD4 : (i) la boucle V3 de la gp120 s'insère dans le CRS2 du CCR5 et interagit avec toutes les hélices 7TM ; (ii) le segment N-terminal du CCR5 adopte une conformation étendue avec plusieurs tours serrés et établit des contacts avec la surface du feuillet β de pontage de la gp120. L'aspect le plus inattendu de la structure gp120-CD4-CCR5 obtenue récemment est l'absence de changements allostériques évidents se propageant à la gp41 suite à la liaison du CCR5 à la gp120 (Shaik et al., 2019) (**Figure 14 A**).

Lors de l'interaction de la gp120 avec son corécepteur, des contraintes stériques sont libérées par l'ouverture du trimère et il se produit des réarrangements structuraux de la gp41 pour l'amener dans sa conformation post-fusion. La gp41 post-fusion est un faisceau très stable de six hélices composées de 3 HR1 N-terminale et 3 HR2 C-terminale. Récemment, des conformations pré-fusion (Pancera et al., 2014) et intermédiaires pré-fusion (Schroeder et al., 2018) de la gp41 ont été publiées. La comparaison des structures pré- et post-fusion a révélé des changements conformationnels importants de la gp41 lors du compactage antiparallèle des HR1 et HR2 dans la fusion membranaire (**Figure 14 B**). Pour que la fusion des membranes virale et cellulaire se produise, la gp41 doit se fixer *via* son PF à la membrane cellulaire, tout en restant ancrée dans la membrane virale par son domaine transmembranaire. Le PF est donc, directement impliqué dans la transition de l'état pré-fusion aux états intermédiaires et post-fusion de la gp41. Le processus se termine par le PF dans sa forme d'hélice étendue qui s'insère dans la membrane cellulaire et créé un pore de fusion (**Figure 14 C**).

2.2.4 Tropisme cellulaire du VIH-1

La capacité du VIH-1 à infecter différents types cellulaires est appelée tropisme viral. Les cellules cibles du VIH-1 sont les LT CD4+, monocytes/macrophages, CD ainsi que les macrophages périvasculaires, cellules microgliales et astrocytes dans le système nerveux central (SNC).

Les virus infectant principalement des LT CD4+ sont désignés comme « T-tropiques » et les souches virales infectant prioritairement des macrophages sont appelées « M-tropiques ». Les corécepteurs CCR5 et CXCR4 jouent un rôle clé dans la détermination de ce tropisme. Le CCR5 est exprimé par les LT CD4+ activés, LT CD4+ mémoires, macrophages, CD et cellules de la microglie. Le CXCR4 est exprimé par les LT CD4+ naïfs. Les virus à tropisme R5 utilisent le corécepteur CCR5 et ils peuvent être T- et M-tropiques. En effet, durant la phase tardive de la maladie, les virus du SNC sont à tropisme R5 macrophagique (Arrildt et al., 2012). Les souches virales à tropisme X4 utilisent le corécepteur CXCR4 et sont T-tropiques. Il existe aussi une quatrième population virale

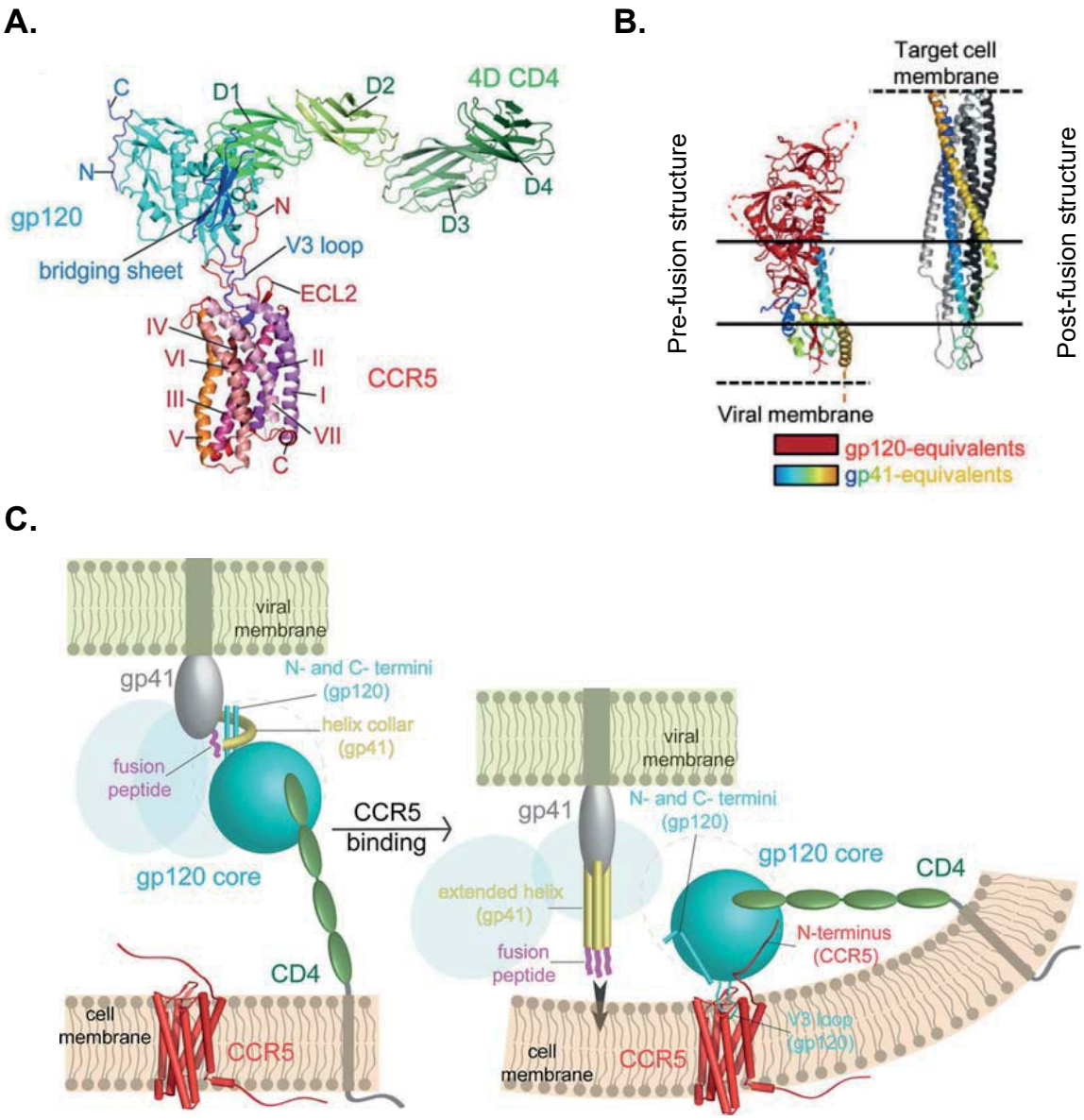


Figure 14 : Interactions des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 avec le récepteur CD4 et le corécepteur CCR5 pour induire la fusion et l'entrée virale

A. Structure du complexe contenant la gp120 (bleu), le récepteur CD4 (D1-D4 vert) et le corécepteur CCR5 (rouge) obtenu par cryo-microscopie électronique. D'après (Shaik et al., 2019). **B.** Structure de la gp41 en conformation pré-fusion (gauche) et post-fusion (droite). L'état pré-fusion montre un protomère en ruban avec la gp120 en rouge et la gp41 en couleur arc en ciel. L'état post-fusion montre un trimère avec une sous-unité indiquée en bleu et orange, les deux autres sous-unités sont représentées en gris et noir. D'après (Pancera et al., 2014). **C.** Modèle de fusion et d'entrée virale. A gauche, le virus se fixe à la cellule cible par la liaison de la gp120 (bleu) au CD4 (vert). Un collier hélicoïdal de la gp41 saisit les extrémités N- et C-terminales de la gp120. A droite, la liaison à CCR5 (rouge) empêche la dissociation rapide entre gp120 et CD4, stabilise les changements de conformation du trimère Env induits par le CD4 et rapproche également le trimère à proximité de la membrane cellulaire. La liaison simultanée de la gp120 à la fois au CD4 et au CCR5 peut nécessiter une flexion dans la membrane cellulaire. Le peptide de fusion (rose) et les hélices HR1/HR2 (jaune) de la gp41 s'allongent en raison de la dynamique de conformation intrinsèque, permettant le recul des extrémités N- et C-terminales de la gp120, ce qui empêche le peptide de fusion de reprendre sa position d'origine dans le trimère. Les mouvements du peptide de fusion et des terminaisons de la gp120 affaiblissent efficacement l'association non covalente entre les deux sous-unités et peuvent conduire à une dissociation partielle ou complète de la gp120 ainsi qu'à une série de repliements dans la gp41. Enfin, les peptides de fusion étendus s'insèrent dans la membrane cellulaire pour créer un pore de fusion. D'après (Shaik et al., 2019).

capable de se fixer indifféremment sur CCR5 ou CXCR4 et qui est appelée R5X4 (*dual-tropic*) (Deeks et al., 2015) (Wilen et al., 2012).

Les virus à tropisme R5 prédominent durant la primo-infection (Keele et al., 2008). Cependant, le tropisme peut changer durant l'infection et en fonction du sous-type viral. En effet, chez environ 50 % des personnes infectées par le VIH-1, leur population virale à tropisme R5 transmise initialement évolue vers des virus plus pathogènes à tropisme X4 coïncidant avec les signes précoces de la progression de la maladie (Connor et al., 1997) (**Figure 23**). Cette conversion phénotypique n'est pas requise pour une progression vers le stade SIDA.

Plusieurs travaux ont montré que la boucle V3 est impliquée dans la fixation aux corécepteurs (Shaik et al., 2019) et qu'elle est responsable du tropisme (Hwang et al., 1991). Il est connu que les résidus en position 11 et 25 à la surface de la V3 influencent l'utilisation du corécepteur tandis que la charge de ces résidus permet de prédire le tropisme viral. Des analyses de séquences ont en effet, montré que si un résidu en position 11, 24 ou 25 (nouvelle règle 11/24/25) est chargé positivement, le virus serait de tropisme X4, tandis que s'il est chargé négativement ou neutre, la souche virale serait de tropisme R5 (Cardozo et al., 2007).

Enfin, le feuillet β de pontage (*Bridging sheet*) reliant les domaines interne et externe (Shaik et al., 2019), la boucle V1/V2 (Ross and Cullen, 1998) et le domaine C4 semble impliquer dans l'interaction avec le corécepteur et le choix du corécepteur (Hoffman and Doms, 1999). De même, la glycosylation de la boucle V3 peut jouer un rôle dans le choix du corécepteur. Par exemple, le site de glycosylation N300 sur la boucle V3 de la souche HXB2 est présent dans 100, 36 et 64 % des isolats R5, X4 et R5X4, respectivement (Zhang et al., 2004).

2.2.5 Diversité génétique des VIH

2.2.5.1 Origines des VIH

Le VIH fait partie de la famille des rétrovirus qui sont très répandus dans le monde animal. Les VIH-1 et VIH-2 découverts en 1983 (Barre-Sinoussi et al., 1983) et 1986 (Barin et al., 1985) (Clavel et al., 1986), respectivement, sont les agents pathogènes responsables du SIDA chez l'homme et sont apparentés à des virus simiens (SIV, *Simian immunodeficiency virus*). Outre, des phénomènes fréquents de transmission et de recombinaison du SIV entre différentes espèces de primates non humains (PNH) africains, le VIH-1 est apparu suite à quatre évènements indépendants de transmission inter-espèces de SIV à l'homme. Il est important de souligner que les SIV n'entrainent pas de SIDA chez leur

hôte naturel, ce qui suggère une adaptation évolutive au cours du temps (Peeters et al., 2008) (Sharp and Hahn, 2011).

Les VIH-1 sont classés en quatre groupes : M (*Major*, responsable de la pandémie), O (*Outlier*), N (*New*) et P. Le SIVcpzPtt qui infecte le chimpanzé (*Pan troglodytes troglodytes*) est à l'origine du VIH-1 (groupes M et N), et est toujours présent dans les populations de singes d'Afrique Centrale de l'Ouest. Le gorille de l'Ouest (*Gorilla gorilla gorilla*) est infecté par le SIVgor, proche du VIH-1 de groupe O (Peeters et al., 2008) (**Figure 15 A**). Bien que l'ancêtre du VIH-1 de groupe M a été identifié au Cameroun, le berceau de l'épidémie du VIH-1 M se situe à Kinshasa en République Démocratique du Congo. Globalement, l'essor économique des villes, les transports, les changements sociaux et de mœurs ont facilité la dissémination précoce et l'adaptation des VIH (Sharp and Hahn, 2011). La datation de l'origine de l'ancêtre commun des virus M est estimée à 1930 (Korber et al., 2000) et à 1920 pour le VIH-1 de groupe O (Lemey et al., 2004).

Le groupe M est subdivisé en dix sous-types (A, B, C, D, F, G, H, J, K, L) et six sous-sous-types (A1-A4, F1 et F2). La recombinaison fréquente entre sous-types de VIH-1 a produit de nombreuses formes recombinantes circulantes (CRF, *Circulating recombinant forms*) et formes recombinantes uniques (URF, *Unique recombinant forms*). La répartition géographique des quasi-espèces virales du VIH-1 diffère selon l'origine de l'épidémie dans le pays et les migrations de populations. En Amérique du Nord, Europe, Australie, le sous-type B est majoritaire. Les sous-types prédominants sont les sous-types C en Afrique du Sud et en Asie, les sous-types A et D en Afrique de l'Est et les CRF02_AG en Afrique de l'Ouest. En Afrique centrale, les virus de groupes M, N, O, l'ensemble des sous-types M et la plupart des formes recombinantes du VIH-1 circulent (Peeters et al., 2010) (Bbosa et al., 2019) (**Figure 15 B**). Au niveau mondial, au-moins 90 % des virus circulants sont des VIH-1 de sous-type non-B. En France par exemple, bien que le sous-type B soit prédominant, la prévalence du VIH-1 non-B augmente progressivement chez les patients nouvellement infectés (Chaix et al., 2009). Parmi la grande diversité des souches de VIH-1 circulantes non B, une prédominance des virus de la quasi-espèce CRF02_AG a été observée (Chaix et al., 2013).

Le virus SIVsmm chez le mangabey enfumé (*Cercocebus atys*) d'Afrique de l'Ouest, a été identifié comme à l'origine du VIH-2 (**Figure 15 A**). Les VIH-2 moins infectieux que les VIH-1, sont classés en neuf groupes de A à I. Seuls les groupes A et B jouent un rôle dans l'épidémie de VIH-2 qui est restée localisée au Cameroun, Gabon, Nigéria, Guinée Equatoriale et Côte d'Ivoire (Peeters et al., 2008) (Sharp and Hahn, 2011). L'émergence des VIH-2 groupes A et B a été datée de 1940 et 1945, respectivement (Lemey et al., 2003). Enfin, les travaux de Li et collaborateurs ont montré que la diversité nucléotidique des génomes du VIH était de 48,3 % entre VIH-1 et VIH-2, de 37,5 % entre les groupes du VIH-

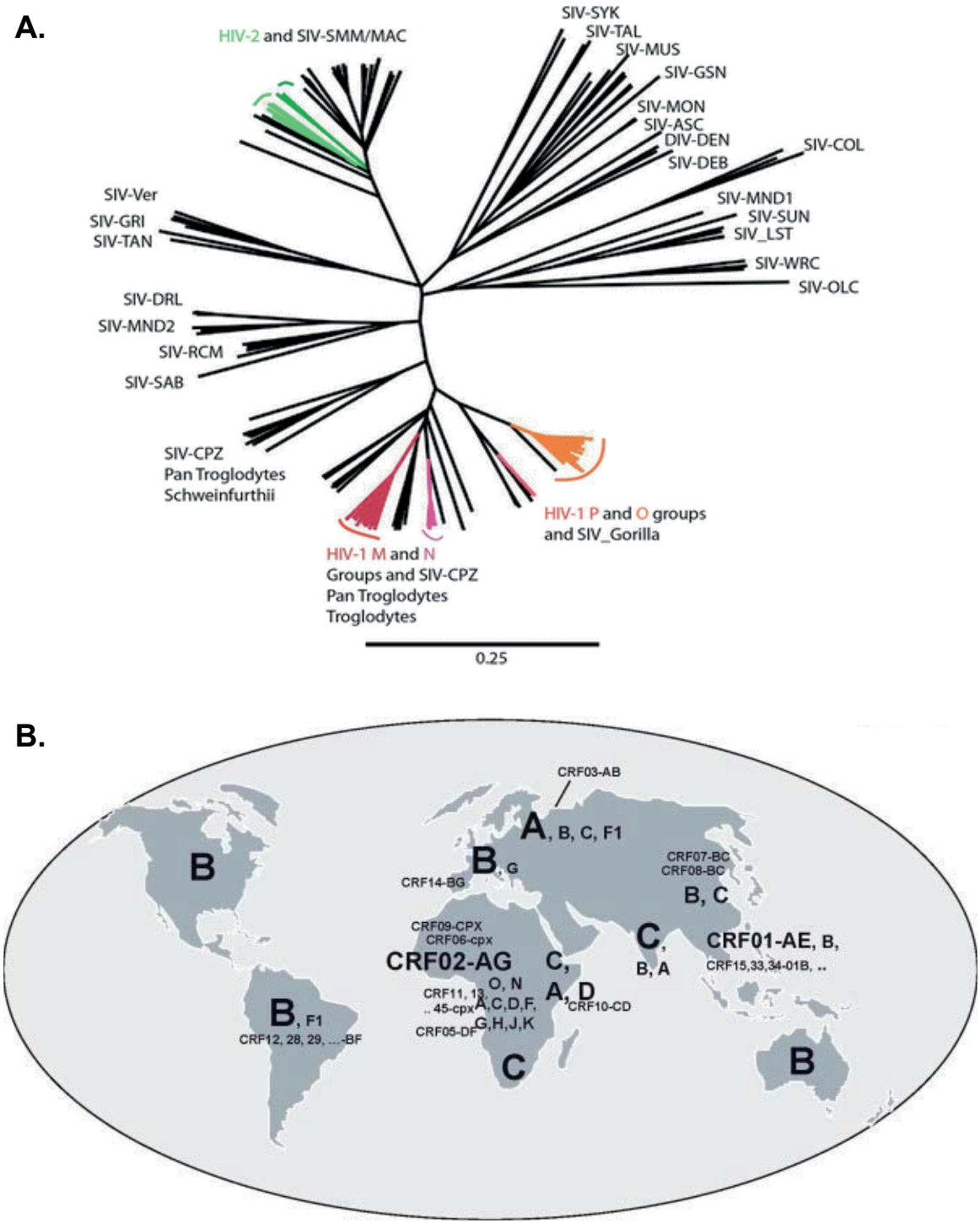


Figure 15 : Diversité génétique des différents virus de l'immunodéficience simienne (SIV) et humaine (VIH)

A. Arbre phylogénétique des différents virus simiens (SIV, *Simian immunodeficiency virus* en noir) et humains (VIH-1 et VIH-2). Le SIVcpz infectant le chimpanzé est à l'origine des groupes M et N de VIH-1 (en rose) tandis que le SIVgor infectant les gorilles serait à l'origine des groupes O et P de VIH-1 (en orange). Les SIVsmm/mac infectant le singe Mangabey et le *Macacus Rhesus* sont les ancêtres des groupes de VIH-2 (en vert). La barre indique 25 % de divergence. D'après (Foley and 2017). **B.** Répartition géographique des différents sous-types et formes recombinantes circulantes (CRF, *Circulating recombinant forms*) des VIH-1 des groupes M, N et O. D'après (Peeters et al., 2010).

1, de 14,7 % entre les sous-types de VIH-1, de 8,2 % à l'intérieur d'un même sous-type et de 0,6 % au sein d'un individu infecté par VIH-1 (Li et al., 2015).

2.2.5.2 Facteurs de diversité génétique des VIH-1

Les facteurs responsables de la vaste diversité/variabilité génétique des VIH-1 sont : (i) un taux élevé de mutations ; (ii) une vitesse de réplication virale importante ; (iii) des phénomènes de recombinaison fréquents. Cela pose un défi majeur pour l'action à long terme des traitements antirétroviraux et le développement de vaccins protecteurs efficaces (Sampathkumar et al., 2012).

Premièrement, la RT est une enzyme peu fidèle car elle est dépourvue d'activité de relecture 3'-5' exonucléase. Le taux de mutation estimé de la RT est de 2,2 - 5,4.10^{-5} par paire de base et par cycle de réplication, soit égal à la substitution de 0,1 à 1 nucléotide par génome et par génération. Par ailleurs, il a été décrit que les protéines de la famille APOBEC3G (facteurs de restriction de l'hôte) introduisent des hyper-mutations dans le produit de la transcription inverse, ce qui diminue l'infectivité virale (Sampathkumar et al., 2012). Deuxièmement, le taux élevé de réplication du VIH-1 est estimé à approximativement 10^{9}-10^{11} nouveaux virions par jour chez un individu infecté. Il est important de noter que l'entrée d'une seule particule virale cause 80 % des infections hétérosexuelles (Fischer et al., 2010). Ces deux facteurs introduisent la notion de quasi-espèces correspondant à cette large population virale étroitement apparentée mais génétiquement très hétérogène (Yu et al., 2018). A titre de comparaison, la diversité des séquences du virus grippal dans le monde au cours d'une année donnée semble être à peu près comparable à la diversité des séquences du VIH-1 trouvées chez un même individu infecté à un moment donné (Korber et al., 2001). Troisièmement, les phénomènes de recombinaison entre génomes de deux ou plusieurs virions co-infectant la même cellule sont fréquents. *In vivo*, il est estimé que le virus recombinerait en moyenne 5 à 14 fois par génome et par cycle de réplication (Cromer et al., 2016). Ces évènements entrainent la génération accrue de variants mono- ou multi-résistants. De plus, les recombinaisons peuvent introduire des mutations pouvant compenser la perte de capacité infectieuse (« fitness ») ou une moindre capacité réplicative.

Certains facteurs génétiques de l'hôte, en exerçant des pressions sur le VIH-1, influencent de manière substantielle la progression de la maladie et affectent l'évolution virale. Ainsi, les patients porteurs des allèles protecteurs HLA (*Human leukocyte antigen*)-B*27 et HLA-B*57 progressent plus lentement vers le stade SIDA par rapport à ceux porteurs de HLA-B*35 (Tomiyama et al., 1997) (Migueles et al., 2000) (Sampathkumar et al., 2012). De plus, les KIR (*Killer-cell immunoglobulin-like receptors*) qui contrôlent l'activation

ou l'inhibition des cellules NK en utilisant les molécules HLA comme ligand, peuvent impacter l'issue de la maladie. Enfin, les facteurs de restriction de l'hôte aux propriétés antivirales tels que TRIM5α ou APOBEC3G réduisent l'infectivité virale (Sampathkumar et al., 2012).

Le VIH-1 développe des mécanismes d'échappement capables de contrecarrer les pressions antivirales exercées par : (i) les LT CD8+ cytotoxiques (CTL) ; (ii) les AN ciblant différents épitopes des glycoprotéines d'enveloppe ; (iii) les traitements antirétroviraux combinés (cART). En effet, le VIH-1 échappe aux réponses CTL en induisant (i) l'épuisement ou la mort de ces cellules ; (ii) en interférant avec la synthèse ou le trafic intracellulaire des molécules du CMH-I ; (iii) en mutant les épitopes viraux reconnus par les CTL. L'impact des variants viraux d'échappement aux réponses CTL sur la progression de la maladie n'est pas bien établi (Ganusov et al., 2011). Aussi, une permanente adaptation/évolution virale face à aux pressions de sélection exercées par les AN ou les traitements cART entraine l'émergence de quasi-espèces résistantes à la neutralisation (Bunnik et al., 2010) ou aux traitements cART avec la sélection de mutations de résistance dans le génome viral (Sampathkumar et al., 2012) (Villabona-Arenas et al., 2016).

3. La physiopathologie de l'infection par le VIH-1

3.1 Histoire naturelle de l'infection par le VIH-1

Il s'agit d'une infection virale lentement évolutive transmissible par le sexe (sperme, fluides vaginaux), par le sang (transfusion sanguine, usage de drogue) ou de la mère séropositive à l'enfant pendant la grossesse, l'accouchement ou l'allaitement *via* le lait maternel. Le taux de transmission sexuelle, sanguine et de la mère à l'enfant, aux Etats-Unis et en Europe Centrale et de l'Ouest est de 77, 11 et moins de 1 %, respectivement (UNAIDS, 2019).

Après l'événement de transmission sexuelle, le VIH-1 pénètre à travers la muqueuse urogénitale ou anale et infecte localement les premières cellules cibles (cellules de Langerhans qui expriment le corécepteur CCR5, LT CD4+, CD tissulaires) en 2 à 6 h. Il se propage ensuite dans les ganglions lymphatiques, en 3 à 6 jours, puis une dissémination systémique dans tout l'organisme se produit par l'intermédiaire des cellules infectées dans les semaines suivantes (cerveau, GALT (*Gut-associated lymphoid tissue)*, poumons, rate, ganglions lymphatiques). Le temps entre l'infection des muqueuses et la virémie initiale détectée dans le sang est estimé entre quatre et onze jours (Kahn and Walker, 1998) (Cohen et al., 2011).

Lorsque la contamination se produit, l'infection à VIH-1 passe par plusieurs phases : (i) la phase aigüe (ou primo-infection) qui dure plusieurs semaines avec des symptômes non spécifiques ; (ii) la phase chronique peut durer de nombreuses années avec une latence clinique puis devenir symptomatique avec des infections mineures de plus en plus fréquentes et longues. Durant cette phase, l'immunodéficience et l'inflammation chronique s'installent ; (iii) la phase SIDA (taux de LT CD4+ < 200/mm^3) correspond à un état d'immunodépression avancé caractérisé par des manifestations cliniques sévères (lymphomes, sarcome de Kaposi, infections opportunistes virales, bactériennes, fongiques ou parasitaires, atteintes neurologiques). L'évolution en absence de traitement ira vers l'aggravation et le décès (**Figure 16**). Au niveau biologique, les différentes phases cliniques sont corrélées au taux de LT CD4+ (taux de CD4) et à la virémie ou charge virale (CV). En effet, le nombre des CD4 diminue de façon continue durant les différentes phases. Durant la primo-infection, la CV augmente rapidement avant d'être partiellement contrôlée par le système immunitaire grâce à la réponse CTL. La virémie restée stable pendant plusieurs années (phase chronique), commence à augmenter lorsque le taux de CD4 inférieur au seuil de 200/mm^3, ne contrôle plus la multiplication virale (phase SIDA). La CV est corrélée à la probabilité d'évolution de la maladie (Deeks et al., 2015) (**Figure 16**). Bien que les

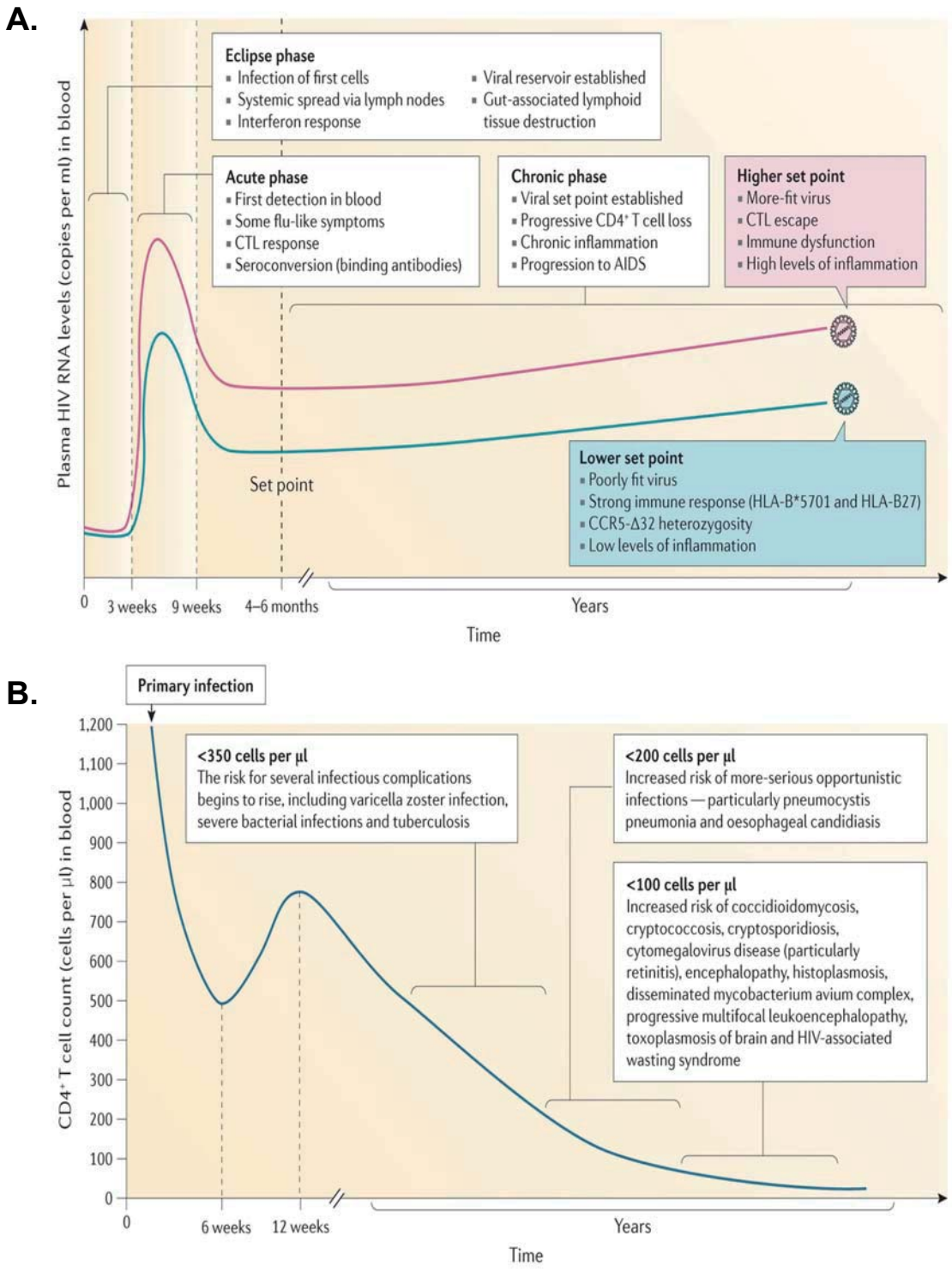


Figure 16 : Physiopathologie de l'infection à VIH-1

A. Après la contamination, le VIH-1 traverse le tissu muqueux et infecte localement les cellules cibles qu'il rencontre. En quelques jours, il se propage dans les ganglions lymphatiques (phase d'éclipse) puis passe dans le sang et se dissémine dans tout l'organisme dans les semaines suivantes. Cette phase de primo-infection est caractérisée par un pic de virémie et une chute du taux de LT CD4+. En quelques semaines, la tendance s'inverse à cause du contrôle partiel de l'infection par la réponse T cytotoxique (CTL). Durant la phase chronique qui peut durer plusieurs années, la charge virale se stabilise tandis que l'immunodéficience et l'inflammation chronique s'installent. **B.** Le taux de CD4 décline continuellement dans la phase chronique. Quand il passe en-dessous du seuil de 200 cellules/µl (Stade SIDA) à cause d'un effondrement global des fonctions immunes, des manifestations cliniques sévères surviennent avec des infections opportunistes, sarcome de Kaposi et certains lymphomes. D'après (Deeks et al., 2015).

personnes infectées sans traitement évoluent vers la mort en environ 10 ans, certaines progressent plus rapidement ou plus lentement vers le stade SIDA et une faible proportion ne progressent jamais. Ces derniers sont, soit des *elite controllers* (< 1 %) avec une virémie indétectable (< 50 copies d'ARN viral/ml), soit des *viremic controllers* (7 %) avec une CV < 2000 copies d'ARN viral/ml plasma (Walker and Yu, 2013) (Deeks et al., 2015).

Les traitements cART ciblant les enzymes virales PR, RT ou IN ont fait évoluer l'infection par le VIH-1 en une maladie chronique et sont hautement efficaces : (i) suppression complète ou quasi complète de la réplication virale ; (ii) restauration partielle des fonctions immunitaires ; (iii) risque réduit d'atteindre le stade SIDA ; (iv) amélioration de la qualité de vie ; (v) diminution du risque de transmission. Cependant, outre la toxicité directe des molécules, les patients infectés et traités présentent une inflammation chronique à l'origine de nombreuses comorbidités (maladies cardiovasculaires, rénales, hépatiques, neurocognitives qui se réfèrent à des manifestations sérieuses non-SIDA) (Deeks et al., 2013). Ces traitements cART n'étant pas curatifs, sont administrés à vie et leur arrêt entraine généralement un rebond viral dans les semaines suivantes. Le temps optimal pour le démarrage d'une telle thérapie a longtemps été débattu, mais il est maintenant admis qu'une initiation précoce (taux de CD4 > 350/mm^3) réduit la taille des réservoirs viraux et permet de mieux préserver l'immunité (Group et al., 2015). Sous traitement efficace, la virémie baisse tandis que le taux de CD4 augmente.

3.2 La transmission muqueuse du VIH-1

3.2.1 Biologie des muqueuses en condition physiologique

Bien que les muqueuses représentent, avec la peau, les premières lignes de défense à la fois physique et immunologique contre les agents infectieux, il n'en demeure pas moins qu'elles constituent leurs principales portes d'entrée. Une muqueuse est une mince couche de tissu épithélial - composé de cellules épithéliales jointives et de tissu conjonctif sous-jacent appelé *lamina propria* - qui tapisse les surfaces des tractus respiratoires, gastro-intestinaux et uro-génitaux. Ces muqueuses sont des barrières à la fois anatomiques (épithéliums mono- ou pluristratifiés avec des jonctions serrées et adhérentes) et biologiques (cellules de l'immunité innée, mucus et facteurs antimicrobiens) qui limitent ou bloquent la pénétration de divers pathogènes.

Un épithélium multistratifié squameux, plus ou moins kératinisé compose l'épithélium oropharyngé, l'anus, le vagin et l'exocol du tractus génital bas féminin et la face externe du prépuce pénien dans le tractus génital masculin. Un épithélium monostratifié simple cylindrique compose lui, l'intestin, le rectum, l'urètre pénien du tractus génital masculin et

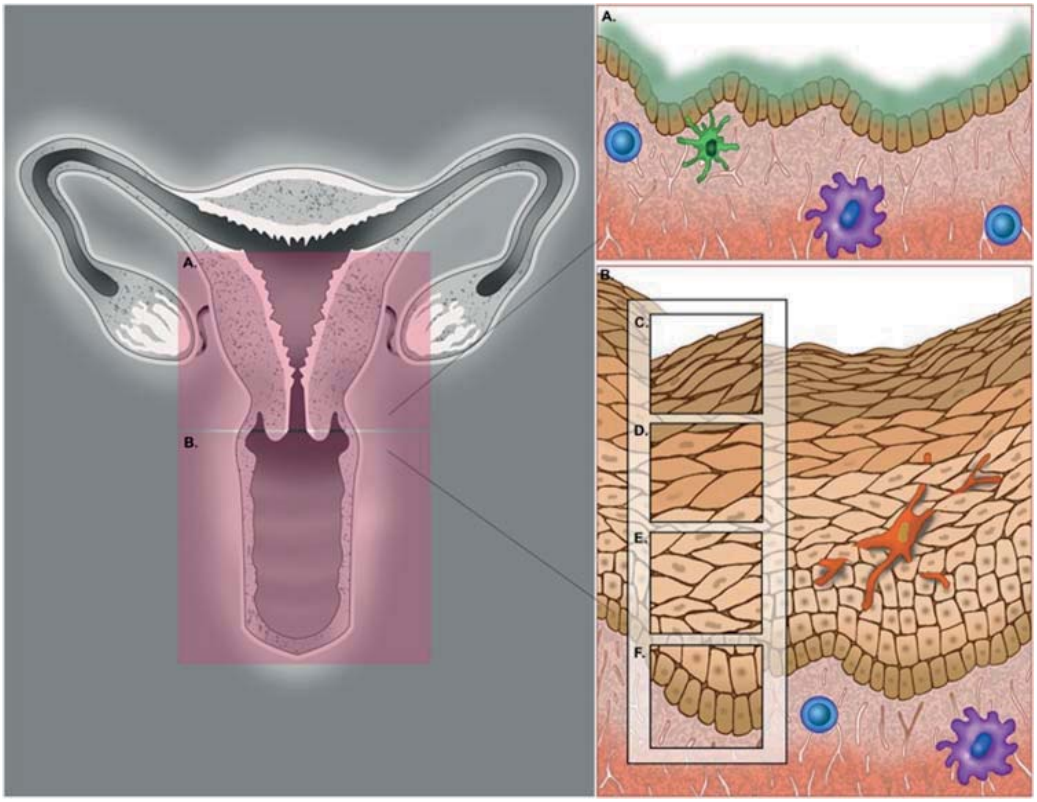
l'endocol, l'endomètre ainsi que l'utérus du tractus génital haut féminin. De plus, la présence de mucus dans les tractus génitaux constitue une barrière supplémentaire contre l'invasion de pathogènes (Hladik and McElrath, 2008) (Cohen et al., 2011) (Carias et al., 2013) (Tugizov, 2016) (**Figure 17 A**).

Des jonctions intercellulaires multiples telles que les jonctions serrées et adhérentes sont importantes pour maintenir les caractéristiques morphologiques et physiologiques de barrière physique des muqueuses. Les jonctions serrées comprennent des protéines transmembranaires (Occludine, Claudines, JAM, *Junctional adhesion molecules*) associées avec des protéines adaptatrices cytoplasmiques (*Zonula occludens*, ZO), elles-mêmes liées au cytosquelette d'actine. Ces interactions permettent de sceller l'espace paracellulaire entre les cellules épithéliales. Les protéines JAM sont impliquées dans la régulation de l'intégrité jonctionnelle et la perméabilité paracellulaire. De plus, les jonctions d'ancrage (ou adhérentes) forment des ponts intercellulaires reliant les α et β caténines, les protéines transmembranaires E-cadhérines (pour les épithéliums) et les microfilaments d'actine (**Figure 17 B**). Ces jonctions serrées et d'ancrage jouent un rôle critique dans l'organisation polarisée apicale/basale des épithéliums muqueux (Niessen, 2007) (Tugizov, 2016).

Le système immunitaire des muqueuses est organisé en sous-compartiments anatomiques et fonctionnels distincts, les sites inducteurs et les sites effecteurs (*Lamina propria* de diverses muqueuses et épithéliums de surface). Les sites inducteurs de réponses immunes sont des tissus lymphoïdes hautement organisés des muqueuses (MALT, *Mucosa-associated lymphoid tissue*) ressemblant à des ganglions lymphatiques dépourvus de vaisseaux lymphatiques afférents. Les MALT sont eux-mêmes répartis dans différentes régions anatomiques de l'organisme telles que les bronches (BALT, *Bronchus-associated lymphoid tissue*), le nasopharynx (NALT, *Nasopharynx-associated lymphoid tissue*) et l'intestin (GALT qui comprend principalement, les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes isolés) (Brandtzaeg et al., 2008) (Brandtzaeg, 2009) (**Figure 18**).

Organe immunologique le plus large de l'organisme, le GALT abrite 60 % des lymphocytes totaux et est maintenu dans un état d'inflammation physiologique à cause de l'exposition continue à des antigènes microbiens ou alimentaires. Les LT et LB naïfs après avoir rencontré l'antigène exogène dans le compartiment inducteur, sortent dans la circulation périphérique où ils subissent une maturation et une différenciation. Dès lors, les cellules T mémoires effectrices rejoignent les sites effecteurs pour exécuter leurs fonctions effectrices (Mehandru, 2007). Chez l'adulte sain, les tissus effecteurs contiennent 70-90 % de plasmocytes sécréteurs d'IgA qui expriment des niveaux importants de chaîne J cytoplasmique. Les dIgA ainsi constituées représentent les molécules effectrices solubles (Brandtzaeg and Johansen, 2005) (**§ 1.3.3** et **1.5.3**). Tandis que les S-IgA sont largement majoritaires par rapport aux IgG dans le tractus intestinal, les IgG prédominent par rapport

A.



B.

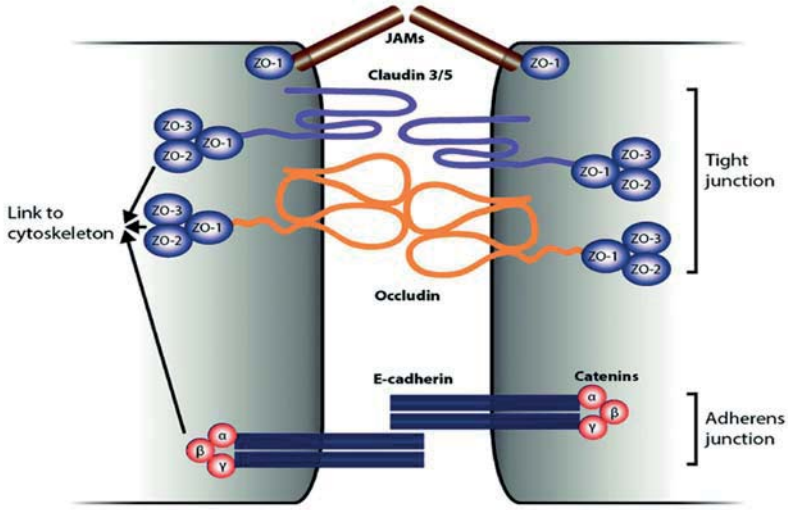


Figure 17 : Biologie des muqueuses

A. Représentation macroscopique (gauche) et microscopique (droite) du tractus génital féminin. (A) Le tractus génital haut (endocol et utérus) est composé d'un épithélium monostratifié simple cylindrique recouvert de mucus. Les cellules dendritiques (vert), LT (bleu) et macrophages (violet) sont les cellules cibles de la *lamina propria*. (B) Le tractus génital bas (exocol, vagin) est constitué d'un épithélium multistratifié squameux. Les différentes couches épithéliales sont de l'extérieur vers l'intérieur : (C) *Stratum corneum*, (D) *Stratum granulosum*, (E) *Stratum spinosum* et (F) *Stratum basale.* Les cellules de Langerhans (rouge) sont des cellules cibles intraépithéliales. Les LT (bleu) et les macrophages (violet) sont les cellules cibles de la *lamina propria*. D'après (Carias et al., 2013). **B.** Représentation simplifiée des jonctions serrées et *adherens* dans un épithélium. Les jonctions serrées comprennent des protéines transmembranaires (*Occludin*, *Claudins*, JAM, *Junctional adhesion molecules*) associées avec des protéines cytoplasmiques (*Zonula occludens*, ZO-1, ZO-2, ZO-3), elles-mêmes liées au cytosquelette d'actine. Les jonctions *adherens* forment des ponts intercellulaires reliant les caténines, les E-cadhérines et les microfilaments d'actine. Adapté de (Dickens et al., 2016)

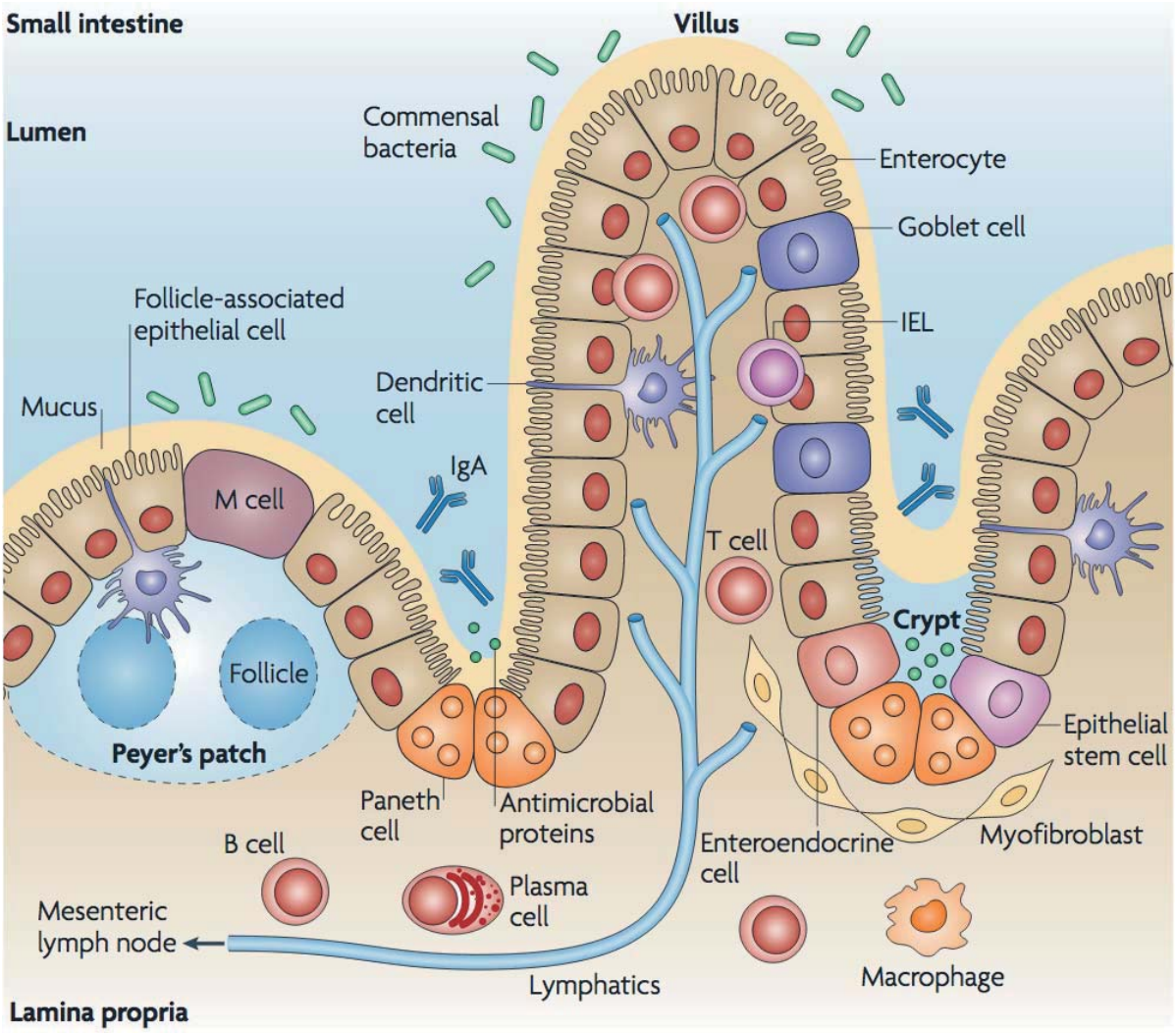


Figure 18 : Tissu lymphoïde associé à l'intestin : Exemple du petit intestin

Le tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT, *Gut-associated lymphoid tissue*) comprend des sites inducteurs (Plaque de Peyer, follicules lymphoïdes isolés) et des sites effecteurs (*Lamina propria*). L'épithélium intestinal est composé d'entérocytes, de cellules M, de lymphocytes intraépithéliaux (IEL, *Intraepithelial lymphocyte*), de macrophages, de CD et de cellules en gobelet sécrétrices de mucus, de protéines antimicrobiennes, de chimiokines et de cytokines démontrant des fonctions dans l'immunité innée. Il est protégé en surface par du mucus, des défensives bactériennes, des IgA et des polynucléaires neutrophiles. La *lamina propria* renferme une population cellulaire hétérogène comprenant des LB et LT, des plasmocytes sécréteurs d'IgA, des macrophages et des CD. Les ganglions lymphatiques mésentériques non inclus dans le GALT reçoivent de la lymphe provenant de la *lamina propria*, des plaques de Peyer et des follicules lymphoïdes isolés. D'après (Abreu, 2010).

aux IgA dans les tractus génitaux féminin et masculin (Mestecky, 2007). L'immunité humorale au niveau des muqueuses est structurellement et fonctionnellement distincte du système immunitaire périphérique (Macpherson et al., 2008). Pour maintenir l'homéostasie, le système immunitaire des muqueuses a développé au cours de son évolution, deux niveaux de défense adaptative : (i) l'exclusion immune médiée par les S-IgA ou une réponse pro-inflammatoire avec le recrutement de cellules immunes (polynucléaires neutrophiles) pour limiter la colonisation épithéliale de pathogènes ; (ii) des mécanismes immunosuppresseurs induisant le phénomène de « tolérance orale » dans l'intestin envers le microbiote et des protéines alimentaires dans lequel les LT régulateurs jouent un rôle important (Brandtzaeg, 2009) (Gayet et al., 2020).

3.2.2 Induction des IgA

Les LB des muqueuses sont activés à la fois par des mécanismes T-dépendants impliquant TGFβR (*Transforming growth factor β receptor*)/TGF-β1, CD40/CD40L représentant respectivement, l'association récepteur/ligand) et T-indépendants impliquant TGFβR/TGF-β1, TLR (*Toll-like receptor*)/produits microbiens, TACI/APRIL (*Transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor /A proliferation-inducing ligand*). Ces mécanismes nécessitent un environnement de facteurs cytokiniques qui induisent l'expression de l'enzyme AID et orientent la commutation de classe vers l'isotype IgA. Les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes isolés sont des sites d'une active commutation de classe vers l'IgA (Cerutti, 2008) (Pabst, 2012). De plus, les cellules épithéliales intestinales sont capables d'orienter le changement IgM vers la sous-classe IgA2 à travers un mécanisme T-indépendant impliquant la molécule APRIL. Le rôle de ces cellules est central dans des zones de l'intestin peuplées d'un microbiote particulièrement dense telles que le colon car les IgA2 sont plus résistantes aux protéases bactériennes que les IgA1 (He et al., 2007) (**§ 1.3.3.1**) Enfin, le répertoire IgA intestinal serait composé d'IgA de forte affinité issues de réponses T-dépendantes dirigées contre des pathogènes et d'IgA de plus faible affinité issues de réponses T-indépendantes dirigées contre des antigènes du microbiote intestinal (Benckert et al., 2011) (Pabst, 2012).

3.2.3 Mécanismes d'entrée du VIH-1 et rupture des barrières muqueuses associée au VIH-1

Plusieurs mécanismes de pénétration du VIH-1 à travers des épithéliums mono- ou multistratifiés ont été proposés (Frouard et al., 2018) (Gonzalez et al., 2019) (**Figures 17** et **19**). Les cellules infectées par le VIH-1 dans les tractus génitaux sont les cellules de Langerhans intraépithéliales et les LT ainsi que les macrophages dans la *lamina propria* d'un

épithélium multistratifié squameux, auxquelles s'ajoutent les CD dans un épithélium monostratifié simple (Carias et al., 2013).

Le premier mécanisme est la diffusion passive de particules virales libres ou bourgeonnantes à la surface de cellules infectées suite à des brèches de l'épithélium (Carias et al., 2013). Ces microlésions sont provoquées au cours d'actes sexuels répétés ou suite à une maladie sexuellement transmissible comme celle causée par le virus de l'herpès de type 2 (HSV-2, *Herpes simplex virus type 2*). Ainsi, l'infection à HSV-2 augmente de trois fois le risque de contracter le VIH-1 chez les hommes et les femmes dans la population générale (Freeman et al., 2006).

Le second mécanisme dit « du cheval de Troie » correspond à la transmigration (passage para-/extracellulaire) de cellules infectées (LT, CD et macrophages) présentes dans les fluides génitaux tels que le sperme, à travers la muqueuse génitale de la femme par diapédèse mais sans rupture de la barrière muqueuse. C'est un mode de transmission actif qui libère des particules virales capables d'infecter les cellules cibles sous-muqueuses (Gonzalez et al., 2019). Ce mode de transmission a été reproduit expérimentalement. En effet, une seule exposition de muqueuses saines du vagin et de l'exocol de macaques femelles à des cellules infectées par SIVmac251 entraine une dissémination rapide du SIV dans les tissus lymphoïdes et dans le sang (Salle et al., 2010).

Le troisième mécanisme d'entrée du VIH-1 passe par la capture de virions libres depuis la surface muqueuse, par les dendrites des cellules de Langerhans ou des CD intra- et/ou sub-épithéliales. Après passage du VIH-1 dans la *lamina propria*, sa dissémination ultérieure à des LT CD4+ par exemple, se produit par des contacts cellule à cellule *via* des synapses virologiques (Gonzalez et al., 2019). Ce mécanisme a aussi été décrit récemment avec les fibroblastes stromaux (Neidleman et al., 2017). La migration des CD, la capture du VIH-1 par les CD, l'entrée du VIH-1 par les espaces inter-épithéliaux sans altération des jonctions serrées et la transmission efficace du virus des CD aux cellules cibles ont été montrées *in vitro* et *ex vivo* à travers un épithélium intestinal (Cavarelli et al., 2013).

La transcytose est le passage trans-/intracellulaire de VIH-1 libres à travers des cellules épithéliales polarisées du pôle apical vers le pôle basal conduisant à l'internalisation par endocytose des virions dans des compartiments multi-vésiculaires sans induire d'infection (Bomsel, 1997) (Frouard et al., 2018) (Gonzalez et al., 2019). Ce mode de transmission est d'une efficacité faible, moins de 0,02 % de l'inoculum initial, supportant la notion que la muqueuse génitale féminine est une barrière efficace contre l'infection à VIH-1 (Bobardt et al., 2007). De plus, les cellules épithéliales génitales étant dépourvues de

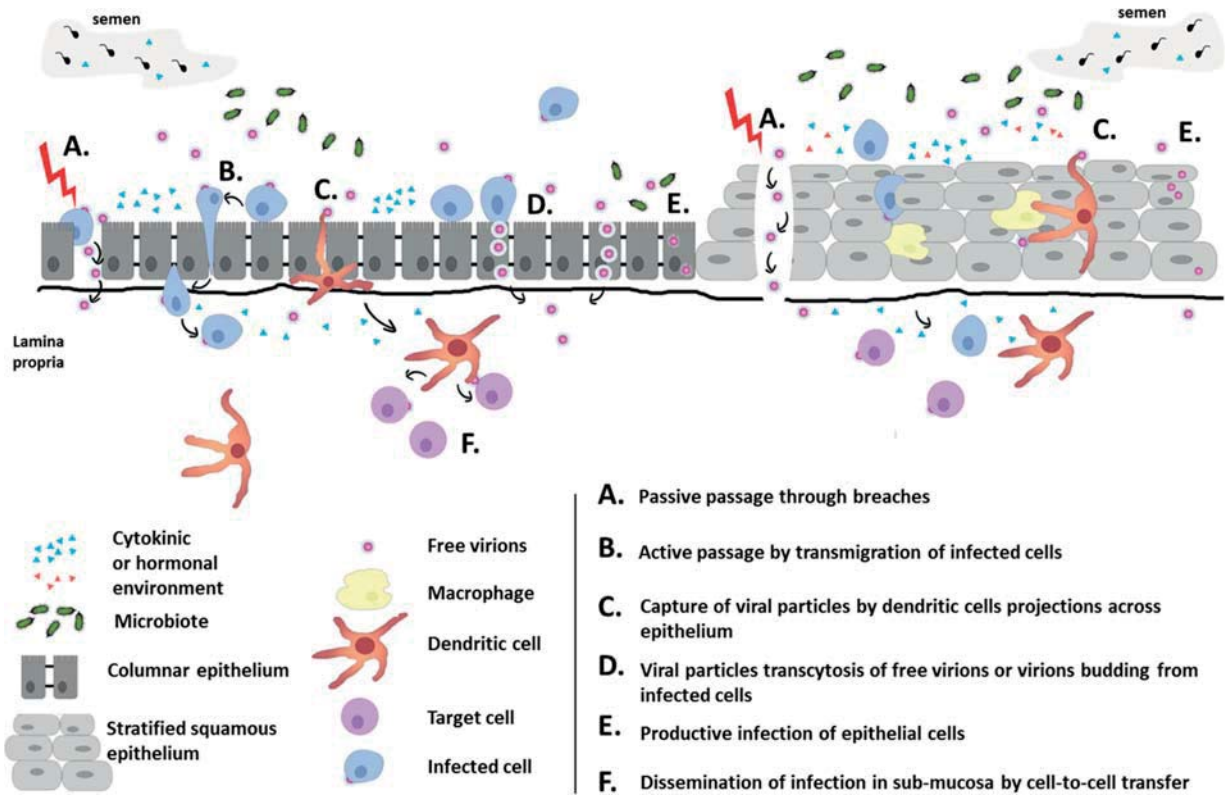


Figure 19 : Mécanismes de transmission du VIH-1 à travers les muqueuses

Représentation des mécanismes de pénétration du VIH-1 à travers un épithélium monostratifié cylindrique (gauche) et un épithélium multistratifié squameux (droite). L'environnement cytokinique, hormonal et bactérien du tractus génital est aussi montré. **A.** Diffusion passive des virions libres ou associés aux cellules à travers des brèches de l'épithélium. **B.** Transmigration active de cellules infectées par diapédèse sans rupture de la barrière pour infecter des cellules cibles présentes dans la *lamina propria*. **C.** Capture du VIH-1 depuis la surface muqueuse par les dendrites des cellules de Langerhans ou des CD soit intégrées dans l'épithélium multistratifié, soit subépithéliales dans l'épithélium monostratifié. **D.** Transcytose de virions libres ou de virions bourgeonnants à la surface de cellules infectées à travers les cellules épithéliales polarisées *via* des vésicules d'endocytose. **E.** Infection productive de cellules épithéliales par le VIH-1. **F.** Dissémination du VIH-1 par contacts cellule à cellule, par exemple une CD ayant capturée des particules virales avec un LT CD4+ dans la *lamina propria.* D'après (Frouard et al., 2018).

récepteur CD4, l'attachement du VIH-1 aux cellules et son entrée passe par des récepteurs alternatifs que nous détaillerons dans le chapitre **3.2.4**. Par ailleurs, il a été montré que les virus transcytosés au niveau basal sont encore infectieux et que les virions associés aux cellules sont transcytosés plus efficacement que les virus libres, probablement par la formation de synapses virologiques entre les cellules infectées et les cellules épithéliales (Bomsel, 1997) (Bobardt et al., 2007).

Enfin, le dernier mécanisme passerait par l'infection productive de cellules épithéliales par le VIH-1, hypothèse plutôt controversée. Une étude a exploré l'infection par le VIH-1, de cellules épithéliales intestinales et du tractus génital féminin, toutes CD4 négatives. Leurs résultats indiquent que les cellules génitales testées seraient plus sensibles (1,3 – 3,1 %) à l'infection que les cellules intestinales (0,3 – 0,6 %) (Zheng et al., 2006). Au contraire, un autre travail a montré que les cellules endométriales humaines HEC-1A CD4 négatives sont résistantes à l'infection par des virus à tropisme X4 ou R5 (Saidi et al., 2007).

Les interactions des protéines virales gp120 et Tat (*Transcriptional activator*) avec des corécepteurs des cellules épithéliales et l'activation de processus inflammatoires dans la muqueuse associée à l'expression accrue de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, *Tumor necrosis factor α* qui contracte le cytosquelette d'actine et internalise les protéines des jonctions serrées) peuvent conduire à la déstabilisation ou à la rupture des jonctions épithéliales (Gonzalez et al., 2019). Ces dommages cellulaires facilitent la pénétration initiale et/ou la dissémination du VIH-1 mais aussi, d'autres virus tels que le HSV, le papillomavirus ou le virus de l'hépatite C dans des stades plus avancés de la maladie VIH/SIDA. L'intégrité de ces jonctions épithéliales est donc critique pour la prévention de la transmission du VIH-1 (Tugizov, 2016).

Pour expliciter la rupture des barrières muqueuses associée à l'infection par le VIH-1, deux exemples ont été choisis : (i) le GALT et (ii) le tractus génital.

(i) Le GALT représente une porte d'entrée importante pour le VIH-1 lors de rapports sexuels anaux et lors de la transmission mère-enfant par l'ingestion de fluides infectés. Durant toutes les phases de l'infection à VIH-1 et plus particulièrement, durant la primo-infection, il est observé une profonde déplétion des LT CD4+ intestinaux (cellules T mémoires qui expriment CCR5, cellules Th17) dans les jours qui suivent la transmission ; déplétion plus importante que celle des LT CD4+ périphériques. Cette déplétion est complexe et multifactorielle avec la combinaison d'effets directs (perturbation des jonctions serrées des cellules épithéliales intestinales permettant l'entrée du VIH-1 et l'infection subséquente des LT CD4+ intestinaux) et indirects de l'infection virale, apoptose cellulaire et réponses cellulaires cytotoxiques de l'hôte. Le GALT sert aussi de réservoir au VIH-1 (**§**

3.3.4.2) et est en partie responsable de l'activation immunitaire et de la progression de la maladie. Il est proposé que la rupture de la barrière intestinale conduit à une translocation microbienne et à une pénétration de leurs produits entrainant une inflammation chronique et une progression de la maladie. De plus, l'infection du GALT par le VIH-1 contribue à un délai de la réponse anticorps avec un dysfonctionnement important des LB (Karris and Smith, 2011) (**§ 4.1** et **Figure 18**). Enfin, il a été observé une disparité dans la reconstitution de l'immunité du tractus gastro-intestinal par les traitements cART. En effet, les sites inducteurs sembleraient mieux reconstitués que les sites effecteurs (Mehandru, 2007).

(ii) Une étude très convaincante de Carias et collaborateurs donne des éclairages sur les mécanismes de pénétration du VIH-1 à travers les deux types d'épithéliums (multistratifié et cylindrique) du tractus génital féminin (**Figure 17 A**). Le VIH-1 peut pénétrer à la fois les deux types d'épithéliums dans des profondeurs entre 2 et 10 µm où il peut rencontrer de potentielles cellules cibles. Le taux de pénétration virale est supérieur dans l'épithélium multistratifié (tractus bas) à cause de sa surface plus large, d'une diffusion passive du VIH-1 à travers des espaces interstitiels et d'une meilleure opportunité du virus à rencontrer les cellules de Langerhans suprabasales malgré les multiples couches cellulaires. Au contraire, le taux de pénétration du VIH-1 dans l'épithélium cylindrique (tractus haut) est moindre à cause de l'effet protecteur du mucus cervical et de part la structure anatomique. Globalement, le taux de pénétration du VIH-1 est dépendant de la concentration de virus, de l'efficacité de la fonction barrière et de la présence/intégrité des jonctions cellulaires. Finalement, les auteurs proposent un modèle d'interaction du VIH-1 avec l'épithélium multistratifié squameux du tractus génital bas. Dans la majorité des expositions, les virions infectieux pénétrant cet épithélium intact ne rentrent pas en contact avec les zones où résident les cellules cibles et agit donc, comme une barrière efficace. Cependant, dans des zones où l'intégrité de l'épithélium est compromise avec des jonctions cellulaires absentes ou dégradées, les virions peuvent pénétrer dans le vagin et l'exocol.

Globalement, l'abrasion physique ou un traumatisme de la muqueuse durant les relations sexuelles, l'altération de l'intégrité épithéliale, le recrutement de cellules cibles activées couplé à une sur-régulation de cytokines pro-inflammatoires et immuno-modulatrices, l'ulcération durant des co-infections VIH-1 et d'autres maladies sexuellement transmissibles et le statut hormonal pourraient expliquer l'efficacité de transmission du VIH-1 (Carias et al., 2013) (**Figure 19**). Par ailleurs, le tractus génital favorise la transmission ultérieure du VIH-1 en servant de réservoir chez les personnes sous cART (sécrétion intermittente du VIH-1 dans le sperme et dans les sécrétions cervico-vaginales) et en fournissant des constituants du sperme qui optimisent les interactions avec les cellules cibles

et induisent une immuno-modulation favorable (TGF-β, *Transforming growth factor*-β, cytokine jouant un rôle dans la régulation des réponses immunitaires,) (Karris and Smith, 2011).

3.2.4 Récepteurs alternatifs pour l'entrée du VIH-1

Le VIH-1 utilise majoritairement son récepteur conventionnel, le CD4 pour entrer dans divers types cellulaires. Cependant, d'autres récepteurs alternatifs d'attachement/d'entrée sont utilisés par le VIH-1 libre pour pénétrer des cellules CD4 négatives telles que les cellules épithéliales génitales (Bomsel and Alfsen, 2003) ou les cellules endothéliales (Moses et al., 1993). Parmi eux, nous pouvons citer :

Deux glycosphingolipides sont exprimés par les cellules épithéliales du vagin (lacto-céramide sulfaté) et par les cellules épithéliales de l'exocol (Galactosyl-céramide, Gal-Cer). L'interaction de la boucle V3 de la gp120 ou de la gp41 *via* l'épitope conservé ELDKWA (Alfsen et al., 2001) avec les Gal-Cer peut initier des phénomènes de transcytose virale selon un mécanisme d'endocytose médiée par la cavéoline et par des radeaux lipidiques (Yasen et al., 2018).

Les HSPG sont des glycoprotéines portant une ou plusieurs chaînes d'héparane sulfate (HS), et sont utilisés par de nombreux virus tels que l'HSV pour s'attacher/entrer dans les cellules épithéliales (Bomsel and Alfsen, 2003) ou les cellules endothéliales. La fixation de la boucle V3 de la gp120 (bien que d'autres domaines de fixation sur la gp120 aux HS ont été identifiés) aux HSPG par des interactions électrostatiques conduit à l'endocytose associée à la clathrine et à la transcytose virale (Bobardt et al., 2007) (Connell and Lortat-Jacob, 2013) (Kinlock et al., 2014) (Yasen et al., 2018). Il a été montré que les cellules endométriales HEC-1A qui expriment des hauts niveaux de HSPG à leur surface apicale, constituent un réservoir de VIH-1 à tropisme X4, les gp120 de virus à tropisme R5 ayant une plus faible affinité pour les HSPG (Saidi et al., 2007).

Des molécules d'adhésion telles que ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule 1*) ou LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen 1*) pourraient aussi servir de récepteurs viraux à la surface des cellules épithéliales (Bomsel and Alfsen, 2003).

La protéine membranaire gp340 est exprimée par les cellules épithéliales orales, génitales ou pulmonaires. Elle est dérivée de l'agglutinine salivaire (SAG) sécrétée par les glandes salivaires et qui exerce une activité anti-VIH-1. Le récepteur gp340 fixe la protéine gp120 du VIH-1 avec une forte affinité *via* des interactions protéine-protéine. Il a été montré que cette capacité accrue des cellules génitales à fixer les virions par la gp340 augmente la transmission du VIH-1 en permettant l'infection subséquente de cellules cibles telles que les LT CD4+ (Stoddard et al., 2007).

Enfin, le VIH-1 est capable de se fixer sur des récepteurs de surface des CD tels que le récepteur DC-SIGN ou les récepteurs mannose qui font partie des récepteurs aux lectines C. Le récepteur DC-SIGN principalement exprimé par les macrophages et certaines CD, peut fixer la protéine gp120 du VIH-1 et séquestrer les virions. Les virus infectieux capturés par les CD sont (i) endocytés dans des corps multivésiculaires ou (ii) liés en surface pour être efficacement transmis aux LT CD4+ selon un mécanisme de trans-infection sans que les CD soient infectées ou (iii) stockés sous forme d'un provirus intégré, ce qui conduit à l'infection productive des CD (Hladik and McElrath, 2008). Le récepteur DC-SIGN serait impliqué dans la transmission du VIH-1 de la mère à l'enfant (da Silva et al., 2011). Les récepteurs au mannose sont exprimés à la surface des CD et des macrophages. Ces récepteurs sont capables de lier les particules virales du VIH-1 par les résidus mannose de la protéine gp120 et faciliter la transmission du virus aux LT CD4+ mais permettent aussi, la dégradation des particules virales par la voie lysosomale après internalisation. Une étude a montré que la fixation de la gp120 du VIH-1 aux récepteurs mannose exprimés par les cellules épithéliales vaginales induit la production de métalloprotéinases matricielles. Ces dernières entrainent la dégradation des protéines des jonctions serrées et de matrice extracellulaire fragilisant ainsi, la barrière épithéliale et facilitant le transport du VIH-1 à travers l'épithélium vaginal (Fanibunda et al., 2011).

3.3 Les atteintes neurologiques au cours de l'infection par le VIH-1 : NeuroSIDA

3.3.1 Structure et fonctions de la barrière hémato-encéphalique

Localisée à l'interface entre la circulation sanguine et le SNC, la barrière hémato-encéphalique (BHE) est une couche cellulaire continue sélectivement perméable plutôt qu'imperméable. Elle est constituée de cellules microvasculaires endothéliales liées entre elles par des jonctions serrées et adhérentes, de péricytes/macrophages périvasculaires en contact étroit avec les cellules endothéliales, de cellules microgliales, d'astrocytes, de neurones et d'une lame basale (*Basal lamina*). Collectivement, l'ensemble de ces cellules ainsi que la lame basale compose l'unité neurovasculaire (**Figure 20 A** et **B**). Les péricytes sont présents dans tous les capillaires de l'organisme tandis que les macrophages périvasculaires sont spécifiques des capillaires cérébraux. L'organisation des jonctions serrées et d'ancrage reliant les cellules endothéliales cérébrales est similaire à celle liant les cellules épithéliales (**§ 3.2.1**). A la différence que les jonctions adhérentes endothéliales relient les caténines, les VE (*Vascular Endothelial*)-cadhérines et les microfilaments d'actine (Weiss et al., 2009) (**Figure 20 C**).

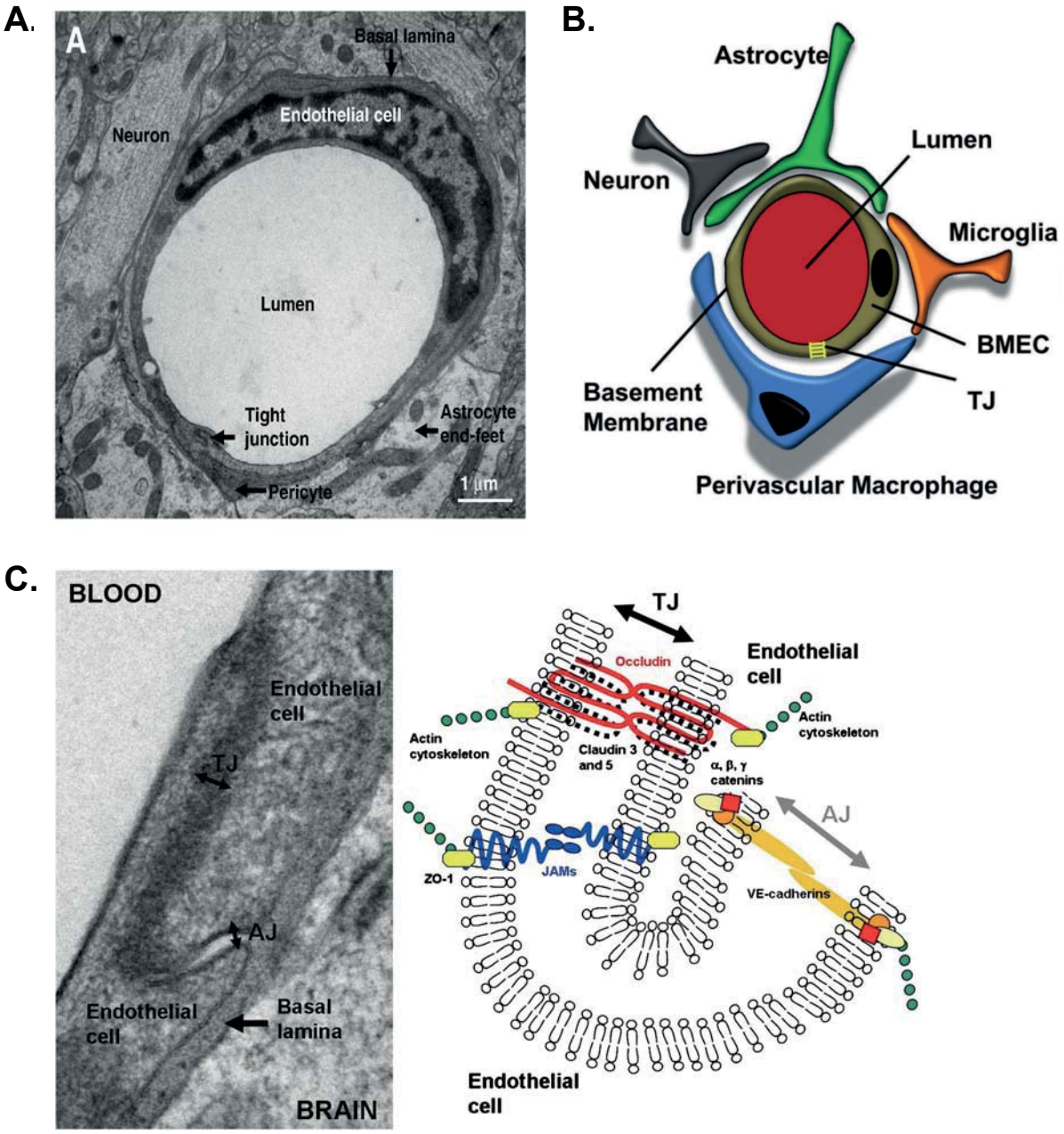


Figure 20 : Organisation cellulaire et structurale de la barrière hémato-encéphalique

A. Microscopie électronique d'une unité neurovasculaire. D'après (Weiss et al., 2009). **B.** Représentation schématique de l'unité neurovasculaire dans un capillaire cérébral constituée de cellules endothéliales microvasculaires (BMEC, *Brain microvascular endothelial cells*), de macrophages périvasculaires, de cellules microgliales, d'astrocytes avec leurs pieds astrocytaires, de neurones et d'une lame basale. Les astrocytes et les cellules microgliales sont des cellules gliales. Les BMEC sont reliées entre elles par des jonctions serrées (TJ, *Tight junction*). D'après (Ivey et al., 2009). **C.** Jonctions serrées (TJ) et *adherens* (AJ) sur la barrière hémato-encéphalique. Microscopie électronique d'une coupe de cerveau de rat montrant ces jonctions entre deux BMEC (gauche). Vue schématique des jonctions cérébrales (droite). Des contacts étroits inter-cellules endothéliales sont dus à la présence d'une part, de jonctions serrées qui comprennent des protéines transmembranaires (*Occludin*, *Claudins*, JAM, *Junctional adhesion molecules*) associées avec des protéines adaptatrices (*Zonula occludens*, ZO), elles-mêmes liées au cytosquelette d'actine et d'autre part, de jonctions *adherens* formant des ponts intercellulaires, reliant les α, β, γ caténines, les protéines transmembranaires *Vascular endothelial* (VE)-cadhérines et les microfilaments d'actine. D'après (Weiss et al., 2009).

En conditions physiologiques, la BHE contrôle strictement les échanges entre les compartiments sanguin et cérébral, (i) en empêchant la diffusion paracellulaire de solutés hydrophiles ; (ii) en assurant le transport actif de nutriments vers le cerveau ; (iii) en rejetant des molécules et des médicaments hydrophobes du cerveau vers le sang ; (iv) en régulant la migration trans-endothéliale de cellules sanguines circulantes et de pathogènes (Weiss et al., 2009). Les cellules endothéliales régulent le trafic des cellules et des éléments nutritifs de la circulation sanguine jusqu'au cerveau. Les macrophages périvasculaires et les cellules de la microglie sont des cellules immunocompétentes résidentes du cerveau et leur passage hautement régulé à travers la BHE se fait dans un contexte d'immuno-surveillance. Les péricytes sont activement impliqués dans la maintenance de l'intégrité du vaisseau, dans la modification du diamètre des vaisseaux sanguins en réponse à l'activité neuronale et dans la perméabilité restreinte de la BHE. Les astrocytes jouent un rôle dans la régulation de la morphologie et dans la perméabilité de la BHE. Les projections des neurones qui sont en contacts étroits avec ces différentes cellules, permettent aux médiateurs neuronaux de réguler le flux sanguin cérébral et la dynamique des vaisseaux. Enfin, la lame basale de constitution matricielle, agit comme une barrière contre le passage dans le cerveau, de cellules ou de macromolécules indésirables comme les toxines (Ivey et al., 2009) (Weiss et al., 2009).

3.3.2 Mécanismes d'entrée du VIH-1 dans le système nerveux central

Il est décrit que l'entrée du VIH-1 dans le SNC (qui inclus le cerveau, la moelle épinière et les méninges) a lieu très tôt après l'infection systémique. En effet, des études sur des individus infectés, évalués durant la phase aigüe de la maladie, ont montré que le VIH-1 est retrouvé dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) dans les huit jours suivant la primo-infection (Davis et al., 1992) (Valcour et al., 2012). Les virions libres ou associés aux cellules peuvent traverser la BHE et entrer dans le SNC par divers mécanismes (Hong and Banks, 2015).

Le premier passerait par un processus dit « du cheval de Troie ». Dans ce scénario de transmigration, des monocytes ou LT CD4+ infectés agissent comme des « véhicules » de transport du VIH-1 du sang vers le SNC en traversant la BHE intacte par diapédèse grâce à l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales (par exemple, E- ou P-sélectines, V-CAM, I-CAM (*Vascular-* et *Intercellular-Cell adhesion molecule*) (Nottet et al., 1996) (Veenstra et al., 2017).

Le second mécanisme est l'infection directe de cellules de la BHE. Bien que les astrocytes, les macrophages périvasculaires/péricytes (Bertrand et al., 2019) et les cellules

microgliales (Cenker et al., 2017) soient sensibles au VIH-1 une fois la barrière endothéliale franchie, seuls les deux derniers types cellulaires sont capables d'une infection productive (Gonzalez-Scarano and Martin-Garcia, 2005) (Nakagawa et al., 2012). Cependant, il a été montré qu'une petite population de cellules endothéliales et d'astrocytes pourraient être infectées par le VIH-1 (Eugenin and Berman, 2007) (Ivey et al., 2009). Bien que faiblement productive, l'infection de ces cellules peut avoir des effets collatéraux significatifs comme (i) la réduction de l'expression de protéines des jonctions serrées ou d'autres protéines clés de la BHE augmentant ainsi, le passage de cellules infectées ou non infectées du sang vers le cerveau ; (ii) l'induction de la production de chimiokines qui recrutent macrophages périvasculaires/cellules microgliales au site de l'infection, qui elles-mêmes propagent l'infection à d'autres cellules dans lesquelles le virus se réplique efficacement ; et/ou (iii) l'induction de l'apoptose des cellules endothéliales et astrocytaires contribuant à la rupture de la BHE et à une déficience neuronale (Eugenin and Berman, 2012). Enfin, la présence de cellules géantes multi-nucléées ou *syncytia*, résultat de la fusion de cellules infectées et non infectées, dans les tissus cérébraux de malades séropositifs sont des marqueurs de l'encéphalite à VIH-1 (HIVE, *HIV-encephalitis*). Ces *syncytia* produisent elles aussi, du virus dans le parenchyme cérébral (Gonzalez-Scarano and Martin-Garcia, 2005) (**Figure 21**).

Le troisième mécanisme d'entrée du VIH-1 est lié à l'altération de la fonction barrière de la BHE. L'exposition de la BHE à des monocytes infectés ou à des protéines spécifiques du VIH-1 (gp120 et Tat) peut altérer l'expression des protéines de jonctions serrées et adhérentes puis favoriser le passage paracellulaire de monocytes infectés (Kanmogne et al., 2005) (Atluri et al., 2015) (McRae, 2016). Par exemple, l'effet neurotoxique de la protéine Tat induit une redistribution et une expression diminuée de plusieurs protéines des jonctions serrées telles que les claudines 1/5 et ZO-2 (Toborek et al., 2012) (Atluri et al., 2015) (McRae, 2016). De plus, le VIH-1 et ses protéines gp120 ou Tat peuvent atténuer les capacités anti-oxydantes (stress oxydatif) et moduler le statut redox des cellules endothéliales, ce qui génère des réponses inflammatoires dans l'endothélium vasculaire (Toborek et al., 2012).

Enfin, le quatrième mécanisme d'entrée se fait par endocytose adsorptive (ou transcytose) de virions libres à travers les cellules endothéliales selon une route trans-/intracellulaire non spécifique qui implique des radeaux lipidiques et/ou des HSPG à la surface des cellules endothéliales (Banks et al., 1998) (Banks et al., 2001). En effet, les cellules endothéliales sont dépourvues des récepteurs CD4 et Gal-Cer (Moses et al., 1993), mais expriment les corécepteurs CCR5 et CXCR4 (Edinger et al., 1997) (Weksler et al., 2005) et le FcRn à faible niveau (Urich et al., 2012). A l'inverse, les cellules microgliales

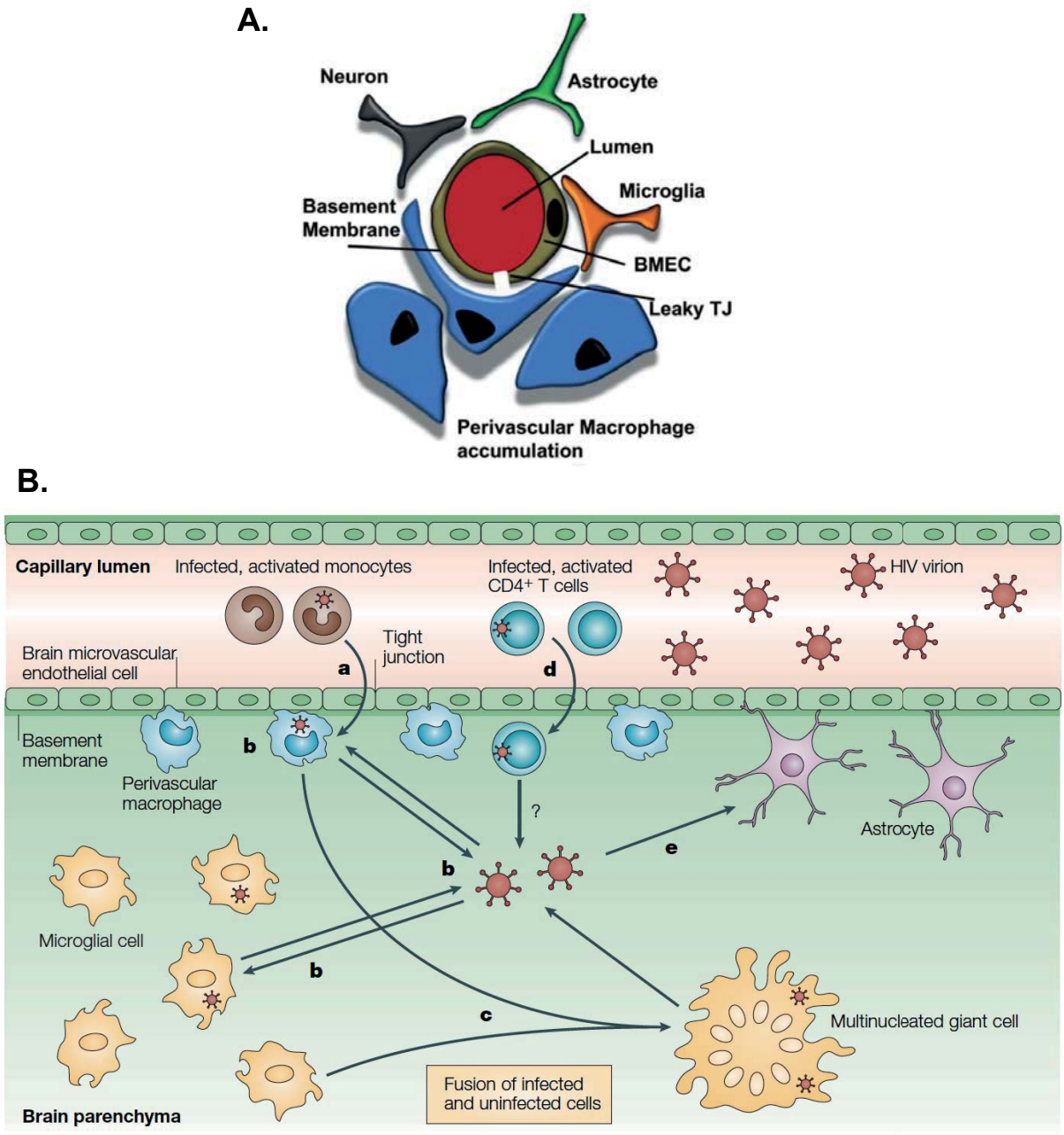


Figure 21 : Neuroinvasion du VIH-1 à travers la barrière hémato-encéphalique

A. Représentation schématique de l'unité neurovasculaire dans un capillaire cérébral après neuroinvasion par le VIH-1. Il se produit une accumulation de macrophages périvasculaires qui est associée à une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) liée à l'altération ou la rupture des jonctions serrées. D'après (Ivey et al., 2009). **B.** L'entrée du VIH-1 dans le système nerveux central (SNC) implique la traversée de la BHE. Plusieurs mécanismes ont été décrits comme l'hypothèse du « cheval de Troie » où le virus pénètre la BHE par l'intermédiaire de monocytes (**a**) ou de LT CD4+ (**d**) activés et infectés. Les monocytes entrants vont se différencier en macrophages eux-mêmes infectés (**b**). Le VIH-1 produit dans le parenchyme cérébral peut alors, infecter les cellules microgliales (**b**). Le pool viral du SNC provient de l'infection productive des macrophages périvasculaires et des cellules de la microglie (**b**). La fusion cellule à cellule après l'interaction des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 présentes à la surface des cellules infectées, avec les récepteurs (CD4) et corécepteurs (CCR5/CXCR4) exprimés à la surface des cellules non infectées, entraine la formation de cellules géantes multi-nucléées (ou *syncytia*) qui produisent elles-mêmes des virions (**c**). Bien que les astrocytes soient sensibles au VIH-1, leur infection n'est pas ou peu productive (**e**). D'après (Gonzalez-Scarano and Martin-Garcia, 2005).

expriment le récepteur CD4 et l'utilisent pour l'entrée virale *in vitro* (Jordan et al., 1991). Il a été aussi décrit que le VIH-1 pourrait utiliser le récepteur mannose-6-phosphate exprimé à la surface des cellules endothéliales, pour son internalisation par endocytose (Dohgu et al., 2012).

Par ces divers mécanismes, la réponse neuroinflammatoire induite par le VIH-1 (Hong and Banks, 2015) associée à l'entrée précoce du virus et à sa persistance dans le SNC, sont des contributeurs majeurs aux changements cognitifs et comportementaux observés au cours de l'infection par le VIH-1.

3.3.3 Neuropathogénèse du VIH-1

Au cours de l'infection par le VIH-1, le cerveau est le lieu de différentes manifestations pathologiques liées aux infections opportunistes, à des lymphomes de type lymphome cérébral primitif ou au virus lui-même. Toutes ces manifestations sont englobées sous le terme de complications neurologiques du SIDA ou NeuroSIDA (Clifford and Ances, 2013). La toxoplasmose cérébrale, la cryptococcose, la leuco-encéphalopathie multifocale progressive due au Papovavirus JC, l'encéphalite à Cytomégalovirus sont des infections opportunistes parasitaires et virales. L'immunosuppression liée à la maladie favorise le développement de surinfections opportunistes et de lymphomes. Des traitements antibiotiques ou des traitements de l'immunosuppression du VIH-1 (cART) permettent de les guérir ou de prévenir leur apparition. Les manifestations liées au virus lui-même sont appelées des désordres neurocognitifs associés au VIH-1 (HAND, *HIV-associated neurocognitive disorders*). Les HAND incluent un spectre de dysfonctionnements neurocognitifs de gravité croissante : des déficits neurocognitifs asymptomatiques (ANI, *asymptomatic neurocognitive impairment*), des troubles neurocognitifs légers (MND, *mild neurocognitive disorder*) et la démence associée au VIH (HAD, *HIV-associated dementia*) (Antinori et al., 2007). Les HAND sont classés selon les critères de Frascati utilisant des tests neuropsychologiques et des évaluations sur leur interférence avec les activités de la vie quotidienne (Antinori et al., 2007) (Clifford and Ances, 2013) (Saylor et al., 2016) (**Tableau 2**). Il est estimé que 15 à 55 % des individus vivant avec le VIH-1 sous cART développent des manifestations neurologiques. Ces dernières pourraient être le résultat de processus neuropathologiques impliquant la réplication virale et l'activation immune dans le SNC avec la neuroinflammation qui en découle, la neurotoxicité des protéines virales et des traitements cART, associés à des facteurs de risque tels que des maladies vasculaires, l'âge avancé ou la toxicomanie (**Figure 22 A**). Cependant, les traitements cART ont eu un effet plutôt bénéfique que délétère car ils ont très largement contribué à réduire la sévérité des HAND

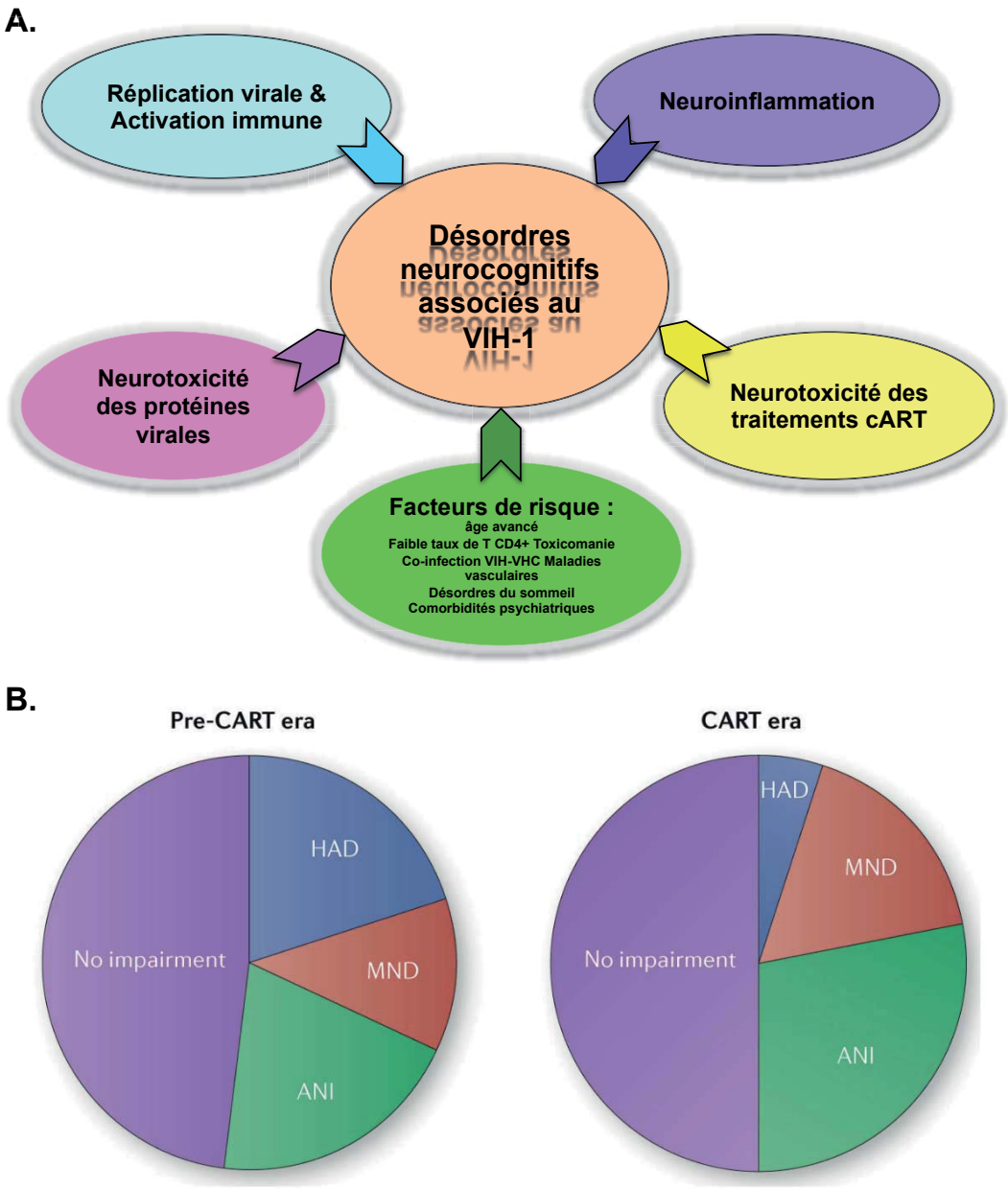


Figure 22 : Désordres neurocognitifs associés au VIH-1 : Processus neuropathologique et impact des thérapies antirétrovirales combinées

A. Le processus neuropathologique à l'origine des désordres neurocognitifs associés au VIH-1 est multifactoriel. Il combine (i) la réplication virale et l'activation immune dans le système nerveux central qui sont à l'origine de (ii) la neuroinflammation ; (iii) la neurotoxicité des protéines virales et (iv) des molécules antirétrovirales ; (v) des facteurs de risque. Adapté de (Saylor et al., 2016). **B.** Depuis l'entrée dans l'ère des traitements antirétroviraux combinés (*cART, Combination antiretroviral therapy*), la proportion d'individus infectés et traités ne présentant pas de symptôme ou avec des symptômes neurocognitifs modérés (ANI, *asymptomatic neurocognitive impairment* et MND, *mild neurocognitive disorder*) est restée dans l'ensemble inchangée. Cependant, la prévalence de la forme la plus sévère HAD (*HIV-associated demencia*) a diminué très fortement. D'après (Saylor et al., 2016).

en réduisant fortement la prévalence de la forme la plus sévère (HAD) (Saylor et al., 2016) (**Tableau 2** et **Figure 22 B**).

Désordres neurocognitifs associées au VIH-1 (HAND)	Prévalence chez les patients infectés sous cART	Tests neuropsychologiques	Interférence avec les activités de la vie quotidienne
Déficits neurocognitifs asymptomatiques (ANI)	30 %	Diminution d'un écart-type dans au moins 2 domaines cognitifs	Pas d'interférence
Troubles neurocognitifs légers (MND)	20-30 %	Diminution d'un écart-type dans au moins 2 domaines cognitifs	Interférence faible à modéré
Démence associée au VIH-1 (HAD)	2-8 %	Diminution de 2 écarts-types dans au moins 2 domaines cognitifs	Interférence marquée

Tableau 2 : Classification et prévalence des atteintes neurocognitives associées au VIH-1 selon les critères de Frascati. cART, thérapies antirétrovirales combinées ; HAND, *HIV-associated neurocognitive disorders ; ANI, asymptomatic neurocognitive impairment ; MND, mild neurocognitive disorder ; HAD, HIV-associated dementia.* Adapté de (Antinori et al., 2007) (Clifford and Ances, 2013) (Saylor et al., 2016).

L'atteinte du SNC peut survenir durant la primo-infection (Davis et al., 1992) et les désordres neurocognitifs évoluent progressivement durant la phase chronique. La forme sévère HAD semble plus fréquente au stade SIDA (Price et al., 1988). Elle se caractérise par une démence subcorticale avec une perte d'attention et de concentration, un ralentissement moteur, des troubles du comportement et évolue vers la mort en moins d'un an sans traitement (Clifford and Ances, 2013).

Malgré l'augmentation croissante des connaissances sur les HAND, la découverte de biomarqueurs dans le LCR pour identifier la phase préclinique de HAND ou prédire l'aggravation cognitive, pourrait ouvrir des possibilités de traitement à un stade bien plus précoce. Le LCR accessible chez les malades est une meilleure référence de la biologie du SNC que le sang. La charge virale dans le LCR (ou virorachie) est 100 et 10 fois plus faible par rapport à la virémie, durant les phases aigüe et chronique de la maladie, respectivement (Price et al., 2014). Par ailleurs, la néoptérine (marqueur inflammatoire) et les chaînes légères de neurofilaments (marqueur de dommages des neurones) semblent avoir un intérêt clinique. De plus, les progrès grandissants en imagerie cérébrale sont d'une grande utilité dans le diagnostic des HAND (Clifford and Ances, 2013) (Price et al., 2014).

3.3.4 Système nerveux central : compartiment et réservoir pour le VIH-1

Durant la pathogénèse du VIH-1, certains organes sont considérés comme compartiments viraux distincts (tractus génitaux féminin et masculin, SNC), comme réservoirs (tractus génitaux féminin et masculin, SNC, GALT) ou comme sanctuaires permettant ainsi au virus de persister malgré la prise de traitement cART qui rend le virus indétectable dans le sang (Stefic and Barin, 2019).

3.3.4.1 Le système nerveux central comme compartiment pour le VIH-1

Les compartiments sont des sites anatomiques qui restreignent le flux génétique viral entre différentes cellules, tissus ou organes. La compartimentation force ainsi l'évolution et la divergence du virus mais aussi, peut affecter la pathogénèse associée au VIH-1 et le développement de résistance médicamenteuse (Karris and Smith, 2011) (Chaillon et al., 2014) (Stefic and Barin, 2019). Nous avons vu que les taux élevés de mutation et de réplication du VIH-1 entrainaient le développement de quasi-espèces génétiquement hétérogènes au sein d'un individu infecté (**§ 2.2.5.2**). Une fois que l'infection est établie dans le SNC, l'inflammation limite le trafic cellulaire et le flux génétique viral entre le SNC et le sang, ce qui permet l'émergence de variants viraux divergents (Bednar et al., 2015). En effet, l'analyse phylogénétique de séquences du gène *env* de quasi-espèces isolées dans différents tissus (cerveau, LCR, foie, poumon, rate, rein, ganglions lymphatiques) et de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC, *Peripheral blood mononuclear cells*) de sujets infectés a montré que les variants viraux isolés du compartiment cérébral (cerveau/LCR) sont plus proches entre eux que ceux isolés d'autres compartiments. Ceci suggère une évolution virale indépendante et un phénomène de compartimentation (van't Wout et al., 1998). Aussi, une étude portant sur la dynamique de migration du VIH-1 entre le sang et le LCR a montré que les populations virales du LCR sont sujettes à des variations au cours du temps et que des migrations bidirectionnelles de cellules infectées et de virus (sang-LCR et LCR-sang) sont possibles (Chaillon et al., 2014). De plus, une étude ayant analysé les propriétés génétiques et les activités neutralisantes de populations virales présentes dans le plasma et le LCR de patients présentant des désordres neurocognitifs, suggère que la pression de sélection exercée par les AN autologues ne joue pas un rôle majeur dans la compartimentation du VIH-1. Les auteurs ont aussi observé que les variants viraux du LCR peuvent être plus résistants à la neutralisation que leurs homologues sanguins, par différents bNAbs de seconde génération. Ainsi, le SNC pourrait servir de réservoir pour des variants résistants à de futures immunothérapies à base de bNAbs (Stefic et al., 2017).

Enfin, durant la phase tardive de l'infection par le VIH-1, les virus neurotropes arborent un tropisme R5 macrophagique car ils sont capables d'infecter plus efficacement les monocytes/macrophages qui expriment le corécepteur CCR5 et plus faiblement le récepteur CD4. Or, durant l'infection aigüe, les virus R5 T-tropiques prédominent dans le sang puis infiltrent le SNC. Au cours du temps, il est possible que la faible fréquence d'infection des macrophages par ces virus R5 T-tropiques soit le point de départ de l'évolution vers les virus R5 M-tropiques (Price et al., 2014) (Bednar et al., 2015) (**Figures 21 B** et **23**).

3.3.4.2 Le système nerveux central comme réservoir du VIH-1

Les réservoirs sont des cellules ou des tissus où il existe une restriction de la réplication virale (la cinétique virale y est plus lente que celle dans le sang périphérique) et où le génome viral peut persister très longtemps (Karris and Smith, 2011) (Stefic and Barin, 2019). En effet, les macrophages périvasculaires et les cellules microgliales qui sont infectées de manière productive par le VIH-1 sont des cellules à longue durée de vie et servent donc, de réservoirs viraux dans le SNC (Cenker et al., 2017).

Sur un plan clinique, il a été rapporté certains cas de patients sous cART présentant des troubles neurocognitifs associés à une virémie indétectable et à une virorachie élevée. Cette discordance entre virorachie et virémie est dénommée « échappement du VIH dans le LCR » ou « effet sanctuaire viral du SNC » (Peluso et al., 2012). La notion de sanctuaire est définie par une restriction du flux d'antiviraux (Stefic and Barin, 2019). Cette discordance suggère une réplication autonome du VIH-1 dans le SNC ainsi que, certaines molécules antirétrovirales pénètrent mal à travers la BHE et dans le SNC, conduisant à une suppression virale sous-optimale. Chaque molécule antirétrovirale possède un score d'efficacité de pénétration cérébrale (CPE, *CNS penetration-effectiveness*) qui mesure la pharmacocinétique et son efficacité estimée sur la virorachie (Letendre et al., 2008). Un score CPE élevé est généralement associé à une meilleure inhibition de la réplication virale, à une virorachie basse et à une amélioration des fonctions cognitives. Ainsi, il est possible d'adapter les traitements cART pour une pénétration cérébrale optimale (Peluso et al., 2012).

Collectivement, le SNC pourrait donc, avoir un impact négatif sur l'efficacité thérapeutique avec la sélection de variants viraux ayant acquis des mutations de résistance contre les molécules antirétrovirales et avec le « réensemencement » de l'organisme par ces variants. Enfin, l'existence de compartiments hébergeant des virus génétiquement et fonctionnellement distincts ainsi que de réservoirs hébergeant des cellules infectées de manière latente (des provirus intégrés dans le génome de cellules cibles et

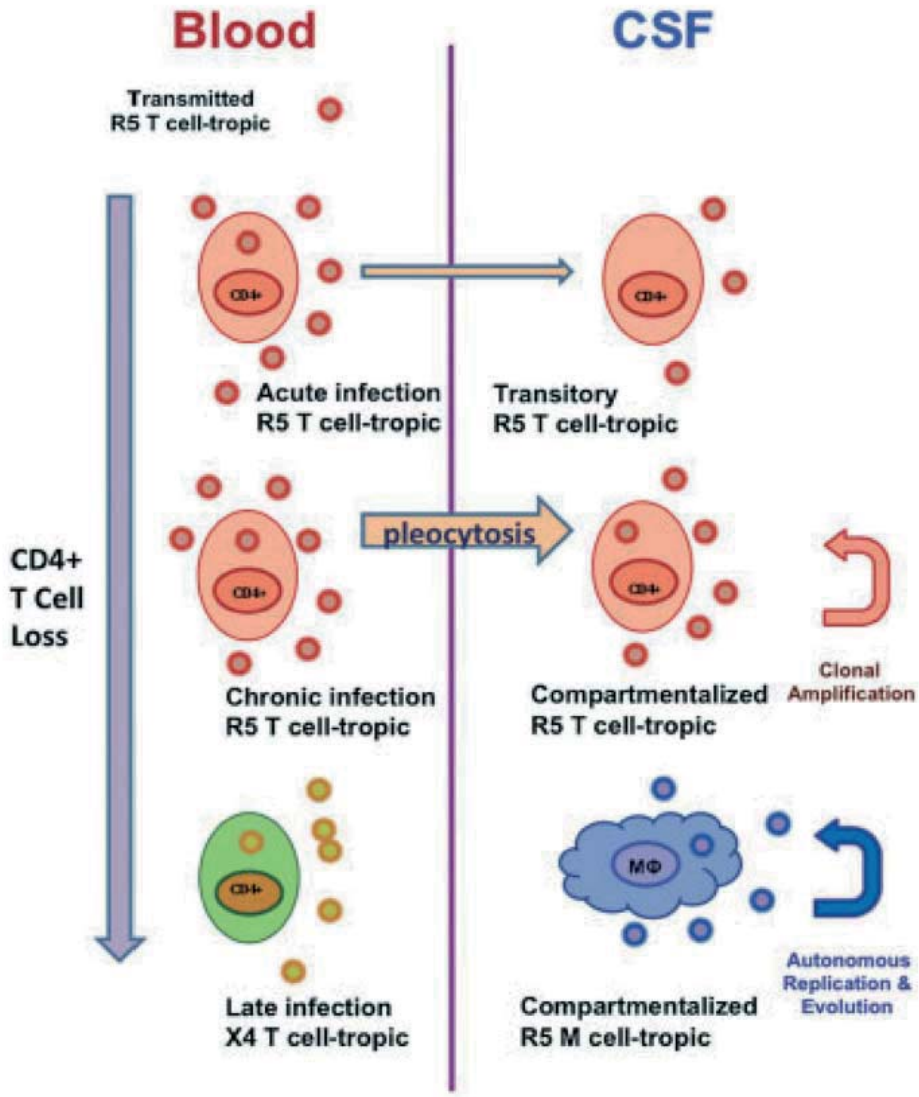


Figure 23 : Evolution de l'infection à VIH-1 dans le sang et le système nerveux central

L'infection à VIH-1 dans le sang est montrée à gauche et dans le système nerveux central (SNC) *via* le liquide céphalo-rachidien (LCR) à droite. Au niveau périphérique, les virus R5 T-tropiques prédominent durant les phases aigüe et chronique et évoluent chez certains patients vers des virus plus pathogènes à tropisme X4 T-tropiques coïncidant avec les signes précoces de la progression de la maladie. Les LT CD4+ expriment fortement le récepteur CD4 et une déplétion importante de ces cellules est observée tout au long de l'infection à VIH-1. Au niveau cérébral, durant les phases aigüe et chronique de l'infection, des virus R5 T-tropiques périphériques infiltrent le SNC avec une amplification locale limitée. La pléocytose est associée à la réplication de virus R5 T-tropiques qui ont infiltré le SNC et à la présence de leucocytes dans le LCR. Cela contraste avec les populations de virus R5 M-tropiques qui ne nécessitent pas un haut niveau de CD4 pour se répliquer efficacement dans le SNC durant la phase tardive de l'infection. La compartimentation du SNC favorise l'évolution et la divergence avec des variants viraux distincts. D'après (Price et al., 2014).

transcriptionnellement silencieux) qui échappent au système immunitaire, constitue un obstacle majeur à la guérison du SIDA.

4. La réponse humorale contre l'infection à VIH-1 et place des anticorps neutralisants à large spectre

4.1 Impact de l'infection par le VIH-1 sur le compartiment lymphocytaire B

Durant la phase aigüe de l'infection, la forte virémie, la rapide déplétion des LT CD4+ et la « tempête » de cytokines pro-inflammatoires (IL-15, IFN-α, TNF, IL-10) conduisent à une hyperactivité des LB (activation polyclonale, renouvellement cellulaire, différenciation des LB en plasmoblastes et perte des CG associée à l'apoptose des LB) dans différents tissus en commençant par les muqueuses intestinales puis les OLS. Ces dérégulations associées à la forte capacité de mutation du virus et à ses multiples stratégies d'échappement contribuent probablement à l'inefficacité et au décalage temporel des réponses humorales permettant l'apparition des AN (McMichael et al., 2010) (Mouquet, 2014) (Moir and Fauci, 2017).

Durant la phase chronique de l'infection, il se produit une hyperplasie folliculaire dans les OLS qui reflète l'élévation de l'activation et de la différenciation des LB dans les CG. L'expansion périphérique de plusieurs sous-populations de LB telles que des LB matures activés, LB transitionnels, LB « épuisés » ressemblant à des LB mémoires tissulaires et des plasmoblastes à courte durée de vie traduit l'épuisement fonctionnel des LB. Les plasmocytes à longue durée de vie dans la moelle sont aussi expandus (Moir and Fauci, 2017).

Enfin, dans la phase avancée de l'infection, les tissus lymphoïdes secondaires deviennent fibreux par l'augmentation des dépôts de collagène. Ces changements sont associés à une perte de l'homéostasie (lymphopénie CD4+ et des T_{FH}) et aux effets de non activation sur les LB qui aboutissent finalement, à une perte généralisée des fonctions immunes telles que la diminution des réponses aux antigènes, la pauvreté des IgA anti-VIH-1 dans les muqueuses liée à une commutation de classe réduite par la protéine Nef et l'appauvrissement des LB mémoires à longue durée de vie (Bhardwaj et al., 2012) (Moir and Fauci, 2017) (Lopez et al., 2018).

4.2 Réponses anticorps au VIH-1 au niveau périphérique et muqueux

4.2.1 Réponses anticorps IgG/IgA contre le VIH-1 au niveau périphérique

Des réponses IgG et IgA anti-VIH-1 sériques, bien que plus faibles pour les IgA (32 fois plus IgG *versus* IgA anti-VIH-1), se développent chez les individus chroniquement

infectés (Mestecky, 2007) (Nabi et al., 2017). La réponse humorale B contre le VIH-1 commence trois à quatre semaines suivant la transmission par l'apparition d'anticorps non neutralisants (AnN) anti-gp41 puis anti-gp120 (**Figure 24 A**). Il est probable que ces AnN puissent agir contre le virus par le biais d'activités effectrices médiées par leur fragment Fc telles que l'ADCC ou l'ADCP (Burton and Mascola, 2015) comme cela a été démontré *in vivo* dans un modèle souris (Horwitz et al., 2017). Tel est le cas aussi, des anticorps induits par le vaccin dans l'essai clinique RV144. L'efficacité de protection modérée de 31 % a été corrélée à la présence d'AnN ciblant la région V1/V2 de la gp120 (Rerks-Ngarm et al., 2009). Ces derniers réduisent le risque d'infection chez les vaccinés selon un mécanisme de type ADCC (Haynes et al., 2012).

Il faut attendre plusieurs mois après la séroconversion pour observer les premiers AN autologues anti-gp120 spécifiques du virus initialement transmis (Euler and Schuitemaker, 2012). Cette réponse anticorps bien que très limitée, est tout de même capable d'exercer une pression de sélection sur le virus qui va acquérir des mutations d'échappement. Il s'en suit alors, un processus successif d'échappement viral et d'évolution des AN autologues qui ne neutralisent que les variants plasmatiques de la quasi-espèce virale antérieure mais pas ou peu celle qui émerge. Globalement, la réponse neutralisante autologue exerce une pression de sélection importante sur l'évolution de la quasi-espèce virale au début et tout au long de l'infection (Bunnik et al., 2008) (Burton and Mascola, 2015) (Moore, 2018) (**Figure 24 A** et **B**). Les mécanismes de co-évolution seront abordés dans le **§ 4.3.4**.

Après deux à quatre ans d'infection, des AN hétérologues (*Cross-reactive neutralizing monoclonal antibodies*) anti-gp120 et anti-gp41 capables de neutraliser divers isolats viraux, apparaissent chez 20-30 % des individus chroniquement infectés (Doria-Rose et al., 2010) (Gray et al., 2011) (Hraber et al., 2014). Parmi eux, 1 à 2 % des sujets infectés appelés « *Elite neutralizers* » développent des AN à large spectre (bNAbs) anti-gp120 et anti-gp41 ayant un pouvoir neutralisant puissant envers un large spectre de virus de différents sous-types (Simek et al., 2009) (Landais et al., 2016) (Landais and Moore, 2018) (Moore, 2018) (**Figure 24 A**). Il n'est pas encore clair si le développement naturel des bNAbs *in vivo* chez ces patients, pourrait avoir un bénéfice clinique en contrôlant l'infection en l'absence de traitement (Euler et al., 2010). Des nourrissons infectés peuvent aussi développer des bNAbs durant les deux premières années de vie (Goo et al., 2014) (Simonich et al., 2016) (Moore, 2018). Il est à noter que tous les bNAbs isolés de patients chroniquement infectés sont de classe IgG jusqu'à très récemment où des bNAbs IgA ont été décrits (Jia et al., 2020). Un certain nombre de facteurs peuvent influencer le développement des bNAbs dans l'infection naturelle. Parmi eux, nous pouvons citer : (i) des

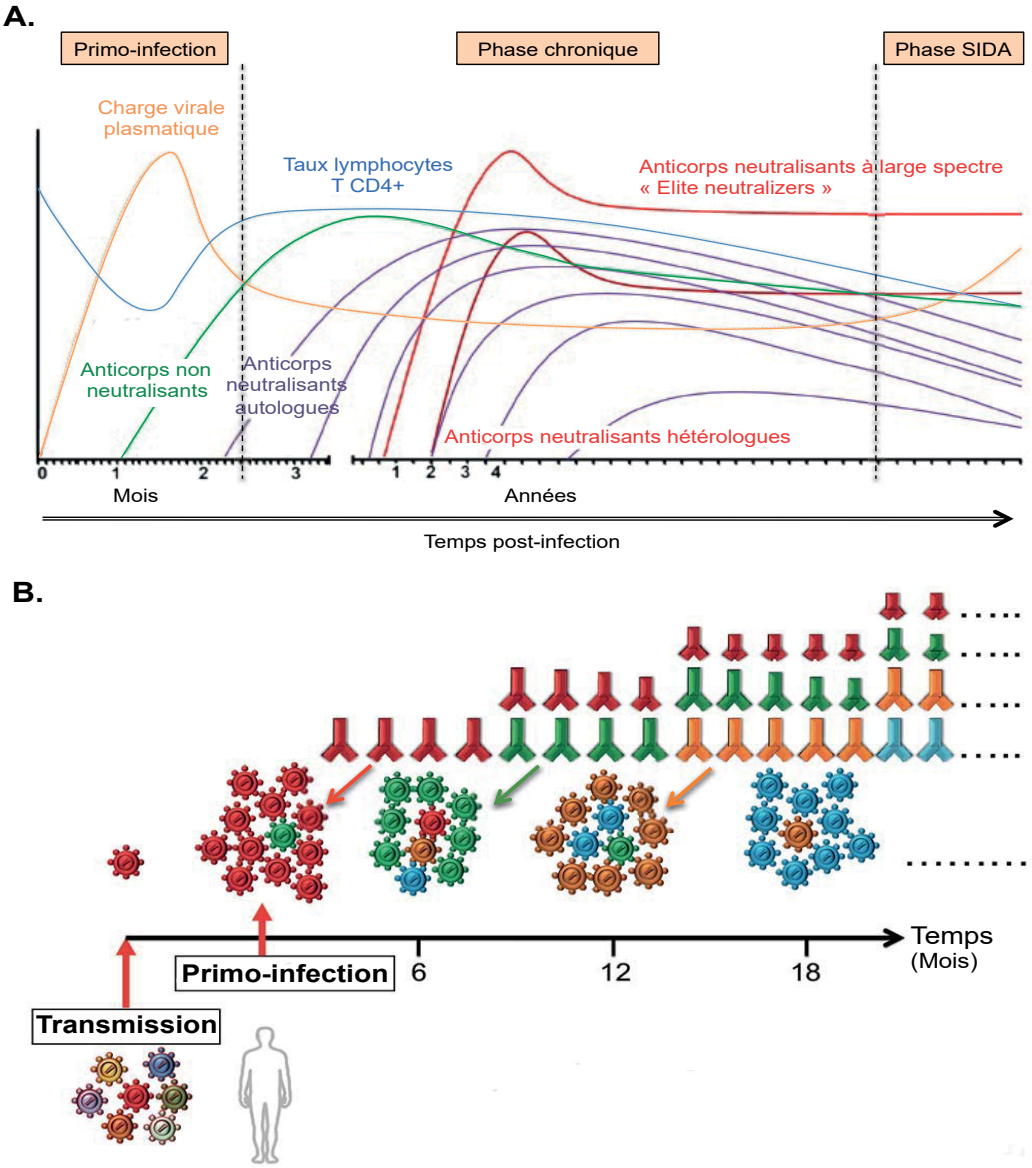


Figure 24 : Cinétique d'apparition des anticorps et évolution de la réponse neutralisante autologue au cours de l'infection à VIH-1

A. L'infection à VIH-1 se décompose en trois phases : (**1**) Durant la primo-infection, les anticorps non neutralisants (en vert) anti-gp41 puis anti-gp120 sont les premiers à apparaître dans les semaines après la contamination. (**2**) Durant la phase chronique, les anticorps neutralisants (AN) autologues (en violet) anti-gp120 spécifiques du « virus fondateur transmis » apparaissent dans les mois après la séroconversion. Il s'en suit un processus d'échappement viral et d'évolution des AN par vagues successives. Après 2 à 4 ans d'infection, des AN hétérologues (en rouge) anti-gp120 et anti-gp41 capables de neutraliser plusieurs isolats viraux apparaissent chez les patients chroniquement infectés. Parmi eux, 1 à 2 % d'individus appelés « *Elite neutralizers* » développent des AN à large spectre de neutralisation (en rouge). (**3**) Enfin, la phase SIDA est marquée par un effondrement global des fonctions immunes. Adapté de (Euler and Schuitemaker, 2012). **B.** Evolution de la réponse neutralisante autologue au cours de l'infection à VIH-1. A partir d'une population virale diverse, seule une particule virale est transmise sexuellement (T/F, *Transmitted/Founder virus*) et se réplique (en rouge). Une réponse neutralisante autologue contre ce VIH-1 fondateur se monte (en rouge) et exerce une pression de sélection. Alors, un variant viral d'échappement prédomine (en vert), ce qui induit à son tour des AN autologues spécifiques (en vert) et cela se reproduit continuellement au début et tout au long de l'infection. L'activité neutralisante des anticorps autologues s'exerce principalement contre les variants de la quasi-espèce virale présente antérieurement (flèche). Adapté de (Stefic et al., 2019).

facteurs liés à l'hôte tels que l'identité ethnique, l'âge, le sexe, le sous-type HLA, le mode de transmission viral ; (ii) des facteurs liés à l'antigène comme la CV, la diversité de Env, des signatures de Env qui vont orienter le développement de bNAb, la durée de l'exposition à l'antigène ; (iii) l'environnement immunitaire tel que la fréquence et la fonctionnalité des cellules immunitaires, l'isotype et la sous-classe de l'Ig, les fonctions effectrices de l'anticorps, une immunité pré-existante (Abela et al., 2019).

Dans un contexte vaccinal de l'essai clinique RV144, il a été proposé que des IgA plasmatiques spécifiques de la région conservée C1 de la gp120 augmentent le risque d'infection chez les vaccinés (Haynes et al., 2012). Par ailleurs, il a été montré que ces IgA anti-VIH-1 peuvent inhiber la fixation sur l'Env et bloquer l'activité effectrice des IgG plasmatiques induits par le vaccin (Tomaras et al., 2013). Cependant, une analyse plus précise a indiqué que les IgA circulantes induites par le vaccin RV144 étaient hors de cause et pouvaient être le reflet, d'autres mécanismes intervenant dans la modulation de l'efficacité vaccinale (Chung et al., 2015).

4.2.2 Réponses anticorps IgG/IgA contre le VIH-1 au niveau muqueux

Etant donné que l'infection par le VIH-1 est principalement acquise à travers les muqueuses, la présence des IgA dans ces tissus est de première importance. Il est toutefois à noter que chez des individus infectés par le VIH-1, les IgG anti-VIH-1 prédominent par rapport aux IgA anti-VIH-1 dans des lavages cervico-vaginaux (45 fois plus IgG *versus* IgA), dans le sperme (42 fois plus) ou dans des lavages rectaux (4 fois plus) (Mestecky, 2007).

Plusieurs études ont suggéré que la présence d'IgA anti-VIH-1 dans les sécrétions génitales de sujets hautement exposés au VIH-1 mais qui demeurent séronégatifs (HESN, *Highly exposed and seronegative individuals*) pourrait être associée à leur protection contre l'infection (Devito et al., 2000). Ainsi, il a été montré que des Fab IgA anti-gp41 dérivés de LB des muqueuses vaginales issues de femmes HESN sont capables à la fois, de bloquer *in vitro* la transcytose du virus à travers les cellules épithéliales et de neutraliser l'infection de LT CD4+ par le VIH-1 à tropisme R5 (Tudor et al., 2009). Néanmoins, outre l'immunité humorale muqueuse spécifique du VIH-1 (réponses IgA), des facteurs de l'immunité cellulaire (LT CD4+, CD8+, chimiokines), de l'immunité innée (cellules NK, APOBEC3G, IL-22) et des caractéristiques génétiques des HESN favoriseraient leur avantage immunologique face au VIH-1 (Mazzoli et al., 1997) (Miyazawa et al., 2009).

Il est important de préciser que les deux sous-classes d'IgA (IgA1 et IgA2) pourraient être impliquées dans la protection. Ainsi, chez des macaques Rhésus infectés par voie intra-rectale avec le virus chimérique SHIV (*Simian-human immunodeficiency virus*)-1157ipEL-p,

l'administration par la même voie, de trois versions de l'anticorps HGN194 (dIgA1, dIgA2 et IgG1) présentant la même capacité neutralisante, a montré que les dIgA1 induisaient la meilleure protection *in vivo*. Celle-ci est liée à une inhibition de la transcytose du virus libre et à une activité de capture virale *in vitro* (Watkins et al., 2013). Il a été proposé que le dIgA1 pourrait capturer quatre virions alors que le dIgA2 ne pourrait en fixer que deux sur la base de leur distance inter-Fab qui est de 16 ± 3 nm et de 10 ± 2 nm, respectivement en corrélation avec la distance inter-spicule du VIH-1 de 15 nm (Zhu et al., 2006) (Watkins et al., 2013).

Enfin, la présence d'IgA dans les muqueuses peut activer localement des mécanismes immunitaires différents de ceux induits par les IgG comme l'exclusion de pathogènes dépendante du pIgR, l'agrégation des S-IgA ou des mécanismes d'ADCC faisant intervenir des récepteurs et des cellules effectrices différent(e)s. En effet, les IgA se fixent sur les récepteurs FcαRI exprimés par les polynucléaires neutrophiles et les monocytes tandis que les IgG utilisent les récepteurs FcγR exprimés entre autres par les cellules NK (Peressin et al., 2014) (**Tableau 1**, **§ 1.5.2** et **1.5.3**). Les IgA seraient donc porteuses de fonctions effectrices spécifiques qui s'ajouteraient à celles des IgG pour participer à la protection des muqueuses contre le VIH-1.

Afin de compléter ces observations à la fois au niveau périphérique et muqueux, deux études ont comparé la capacité protectrice des AN et des AnN mais capables d'ADCC, d'isotypes IgG1 *versus* IgA2, dans des modèles d'infection du VIH-1 *in vitro*, *ex-vivo* sur des explants humains et *in vivo* sur des PNH après challenge intra-rectal avec le SHIV. Les AN confèrent clairement une meilleure protection muqueuse contre le VIH-1 par rapport aux AnN même lorsqu'ils sont testés en combinaison. De plus, les AN IgG1 sont plus protecteurs que les IgA2. En conséquence, la fonction de l'anticorps la plus essentielle pour la protection contre le VIH-1 est sa capacité de neutralisation (Astronomo et al., 2016) (Cheeseman et al., 2017). Toutefois, il est probable qu'une protection *in vivo* plus efficace nécessiterait des anticorps anti-VIH-1 multifonctionnels avec divers activités antivirales et fonctions effectrices (Bournazos et al., 2014) (Pegu et al., 2017) (**§ 4.3.5**). Ainsi, les AnN semblent incapables de bloquer l'entrée du VIH-1 dans les cellules, mais sont doués de fonctions effectrices médiées par le Fc capables d'aboutir à l'élimination des cellules infectées. Ces activités antivirales permettent d'atténuer la virémie, et de ralentir la réplication virale mais ne sont pas suffisantes pour empêcher une éventuelle infection. A l'inverse, les AN bloquent l'entrée virale *via* leur capacité neutralisante, et assurent aussi des fonctions effectrices dépendantes du Fc capables d'induire la destruction des cellules infectées, empêchant ainsi l'établissement de l'infection (Pegu et al., 2017).

4.3 Anticorps neutralisants à large spectre (bNAbs)

4.3.1 Isolement des bNAbs

Dans les années 1990, plusieurs équipes ont isolé des bNAbs dits « de première génération » en utilisant des techniques comme le *phage display* ou l'immortalisation des LB par le virus Epstein-Barr. Bien qu'ils puissent neutraliser divers isolats primaires, la « puissance » et la couverture de neutralisation de ces bNAbs étaient limitées. La puissance correspond à la concentration d'anticorps qui neutralise 50 % du virus (IC_{50}). Leur caractérisation a toutefois, permis d'identifier des épitopes plus ou moins conservés faiblement immunogènes appelés épitopes neutralisants ou sites de vulnérabilité, tels que le site de fixation du CD4 sur la gp120 (CD4bs, bNAb b12 (Burton et al., 1994)), la région externe proximale membranaire sur la gp41 (MPER, bNAbs 2F5 (Purtscher et al., 1994), 4E10 (Stiegler et al., 2001)) ou des mannoses sur le domaine externe de la gp120 (bNAb 2G12 (Trkola et al., 1996)).

Depuis 2009, la combinaison (i) de grandes cohortes de patients chroniquement infectés dont les sérums ont été criblés par des tests de neutralisation à haut débit en présence d'un large panel de virus Env-pseudotypés (Simek et al., 2009) (Seaman et al., 2010) ; (ii) de la sélection méticuleuse des meilleurs donneurs potentiellement porteurs de bNAbs ; (iii) de techniques de culture de LB uniques et de criblage fonctionnel direct ; (iv) de nouvelles approches de capture des LB spécifiques de la gp160 par différents « appâts » (Kwong et al., 1998) (Wu et al., 2010) ; (v) de techniques de clonage d'anticorps humains à partir de LB uniques (Wardemann et al., 2003) (Tiller et al., 2008) (Scheid et al., 2009) (**Figure 25**), a permis l'isolement de bNAbs dits « de seconde génération ». Ces bNAbs montrent une puissance (*Potency*) dix à cent fois supérieure et une amélioration de la couverture de neutralisation (*Coverage*) de plus de deux fois par rapport aux bNAbs de première génération.

4.3.2 Sites majeurs de vulnérabilité

Les bNAbs IgG reconnaissent sept sites majeurs de vulnérabilité assez conservés sur l'Env du VIH-1. Le CD4bs sur la gp120 et MPER sur la gp41 sont des sites peu ou pas dépendants des N-glycanes, respectivement tandis que les boucles V1/V2 et V3 impliquent notamment les sites N-glycanes N156/N160 et N332, respectivement (Kwong and Mascola, 2012). La face « silencieuse » sur la gp120 (Zhou et al., 2018) (Schoofs et al., 2019), l'interface entre la gp120 et la gp41 (Huang et al., 2014) et le PF sur la gp41 (Falkowska et al., 2014) (Kong et al., 2016) sont des sites de découverte plus récente (**Figure 26**).

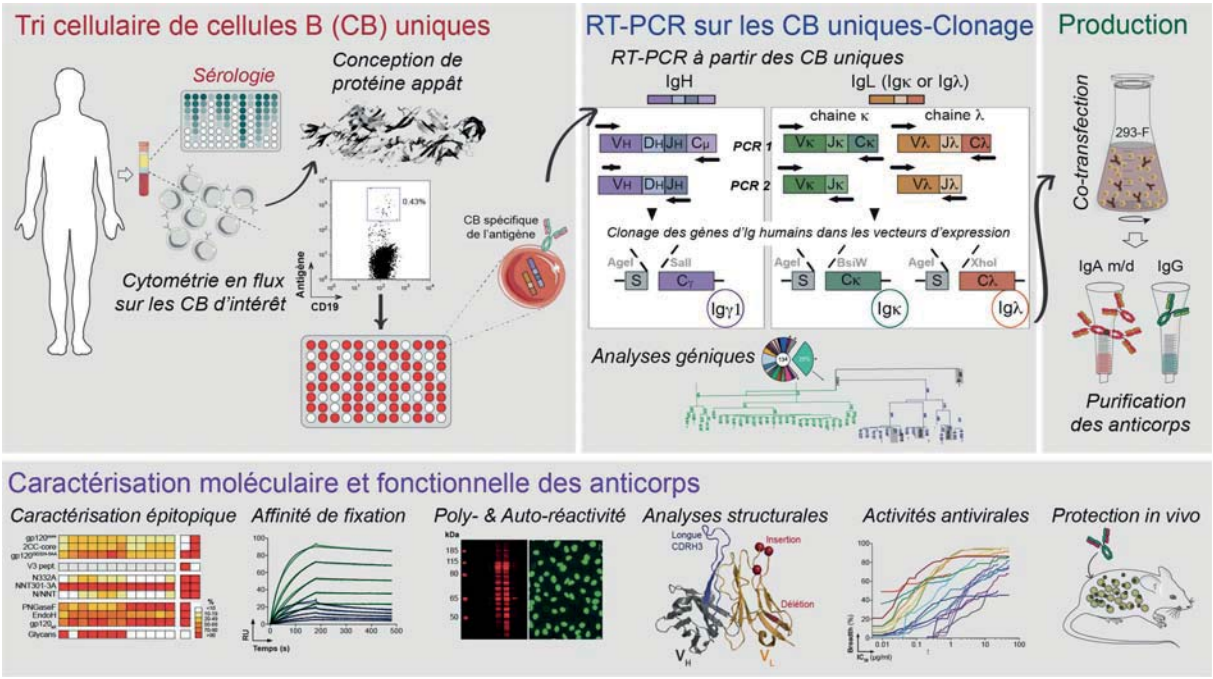


Figure 25 : Méthodologie de clonage, d'expression et de purification d'anticorps monoclonaux humains à partir de cellules B uniques

En utilisant des cellules sanguines mononucléées périphériques (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells)* de donneurs infectés, les cellules B (CB) d'intérêt sont enrichies, marquées et triées par cytométrie en flux de telle manière à obtenir une cellule par puits. Les gènes des régions variables des IgG ou IgA, IgK et IgL sont amplifiés à l'aide d'une collection d'amorces spécifiques par réaction de polymérisation en chaîne après transcription inverse (RT-PCR, *Reverse transcription-polymerase chain reaction*). Après séquençage, les produits PCR sont double-digérés et clonés dans des vecteurs d'expression humains. Chaque anticorps est ensuite, produit par co-transfection de sa chaîne lourde et de sa chaîne légère en cellules de mammifères 293-F puis les anticorps sont purifiés par chromatographie d'affinité. Enfin, les anticorps sont caractérisés au niveau moléculaire, structural et fonctionnel.

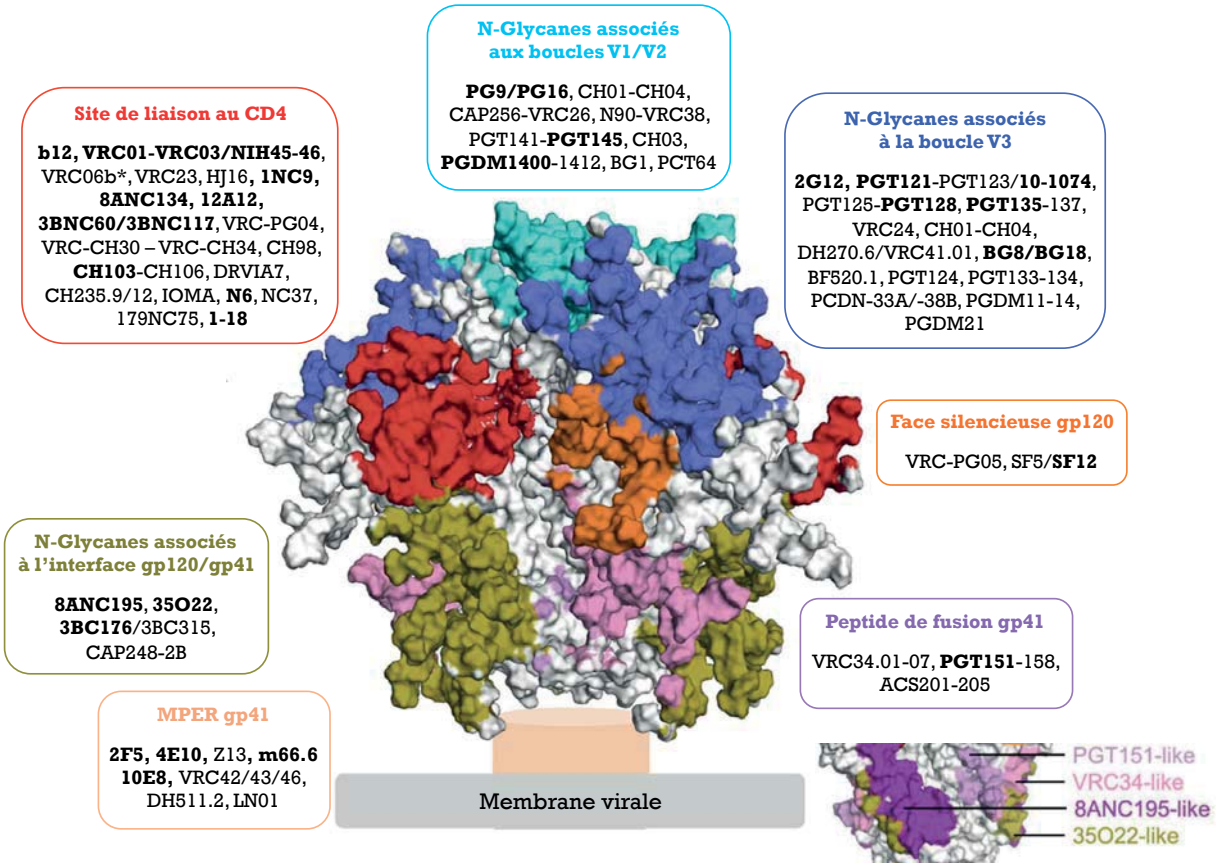


Figure 26 : Sites de vulnérabilité à la surface de la spicule d'enveloppe du VIH-1 ciblés par les anticorps largement neutralisants

Représentation du trimère de BG505 SOSIP sur lequel sont localisés les sept sites de vulnérabilité identifiés à ce jour et ciblés par les anticorps neutralisants à large spectre (bNAbs, *Broadly neutralizing monoclonal antibodies*) dits de première (B12, 2G12, 2F5 et 4E10) et de seconde générations. Le site de liaison au CD4 (en rouge) sur la gp120 et la région externe proximale membranaire (MPER en saumon) sur la gp41 sont des sites peu ou pas dépendants des N-glycanes. Les boucles V1/V2 (V2 apex en bleu clair) et V3 (ou supersite N332 en bleu foncé) sont des sites impliquant les glycanes N156/N160 et N332, respectivement. Plus récemment, les sites situés à l'interface entre la gp120 et la gp41 (en asperge) et au niveau du peptide de fusion de la gp41 (en rose) ont été identifiés. Une localisation plus précise des épitopes interface gp120-gp41 ciblée par 8ANC195 et 35O22 ainsi que du peptide de fusion ciblé par VRC34 et PGT151 est indiquée en bas à droite. Enfin, en 2018/2019, le septième site de vulnérabilité situé sur la face « silencieuse » de l'Env (en orange) est découvert. Les principaux bNAbs de chaque site de vulnérabilité sont indiqués. Adapté de (Zhou and Xu, 2018) (Zhou et al., 2018).

Les premiers bNAbs IgA anti-VIH-1 ont été décrits cette année. En effet, deux lignages de bNAbs comprenant à la fois des IgG et IgA ont été identifiés chez deux donneurs infectés. Les représentants IgA ciblent deux épitopes différents sur Env, un sur la boucle V3 non dépendant des glycanes (M4008_N1) et l'autre de la boucle V2 à la boucle V5 avec des contacts sur les N-glycanes N197 et N386 (M1214_N1). Ils présentent un spectre de neutralisation de 42 et 65 %, respectivement. Ainsi, les bNAbs IgA sont naturellement produits au cours de l'infection par le VIH-1 et contriburaient à l'activité neutralisante plasmatique globale (Jia et al., 2020).

4.3.2.1 Site N-Glycanes associés à la boucle V3, « le supersite N332 »

Une région riche en mannose centrée autour des glycanes en position N332 à la base de la boucle V3 sur le domaine externe de la gp120 (patch oligomannose ou V3/N332) a été décrite comme un supersite de vulnérabilité due à la diversité des bNAbs capables de s'y fixer (Daniels and Saunders, 2019). Trois catégories d'anticorps ciblant cette région V3/N332 ont été décrites : (i) bNAbs qui interagissent avec les glycanes N332 (*V3-glycan bNAbs*) ; (ii) bNAb qui fixe exclusivement des glycanes mannose et qui présente une structure d'échange de domaines VH (*VH domain-exchanged bNAbs*, 2G12) ; (iii) AN dont le paratope possède une cavité profonde dans laquelle s'insert le mannose (*mannose-cavity neutralizing antibodies*, DH501) que nous n'aborderons pas ici (Daniels and Saunders, 2019). Ces bNAbs ciblent les glycanes en position N332 mais utilisent différents angles d'approche et différentes combinaisons de glycanes environnants pour leurs interactions (Pejchal et al., 2011) (Mouquet et al., 2012) (Kong et al., 2013) (Daniels and Saunders, 2019) (Seabright et al., 2019) (**Figures 26, 27** et **28**).

Le bNAb 2G12 dit de première génération, neutralise 32 % d'un large panel d'isolats viraux avec une IC_{50} inférieure à 50 µg/ml. Seul représentant de sa catégorie, il reconnaît un épitope impliquant uniquement des N-glycanes N295, N332, N339 et N392 sur le domaine externe de la gp120 (Trkola et al., 1996) (Scanlan et al., 2002) (Daniels and Saunders, 2019).

Trois lignages (ou familles clonales) de bNAbs PGT121-123, PGT125-131 et PGT135-137 interagissant avec le glycane N332 ont été isolées à partir de trois donneurs. Tous présentent une activité cross-neutralisante contre plusieurs sous-types viraux (ou clades) (Walker et al., 2011) (**Figure 27 A** et **B**). Selon les séquences protéiques d'Ig, l'affinité de liaison, l'activité neutralisante ainsi que la reconnaissance des sucres et de la boucle V3, il s'avère que les anticorps PGT121 se séparent en deux groupes : les bNAbs *PGT121-like* (famille PGT121-123) et les bNAbs *10-1074-like* dont l'un des membres le plus

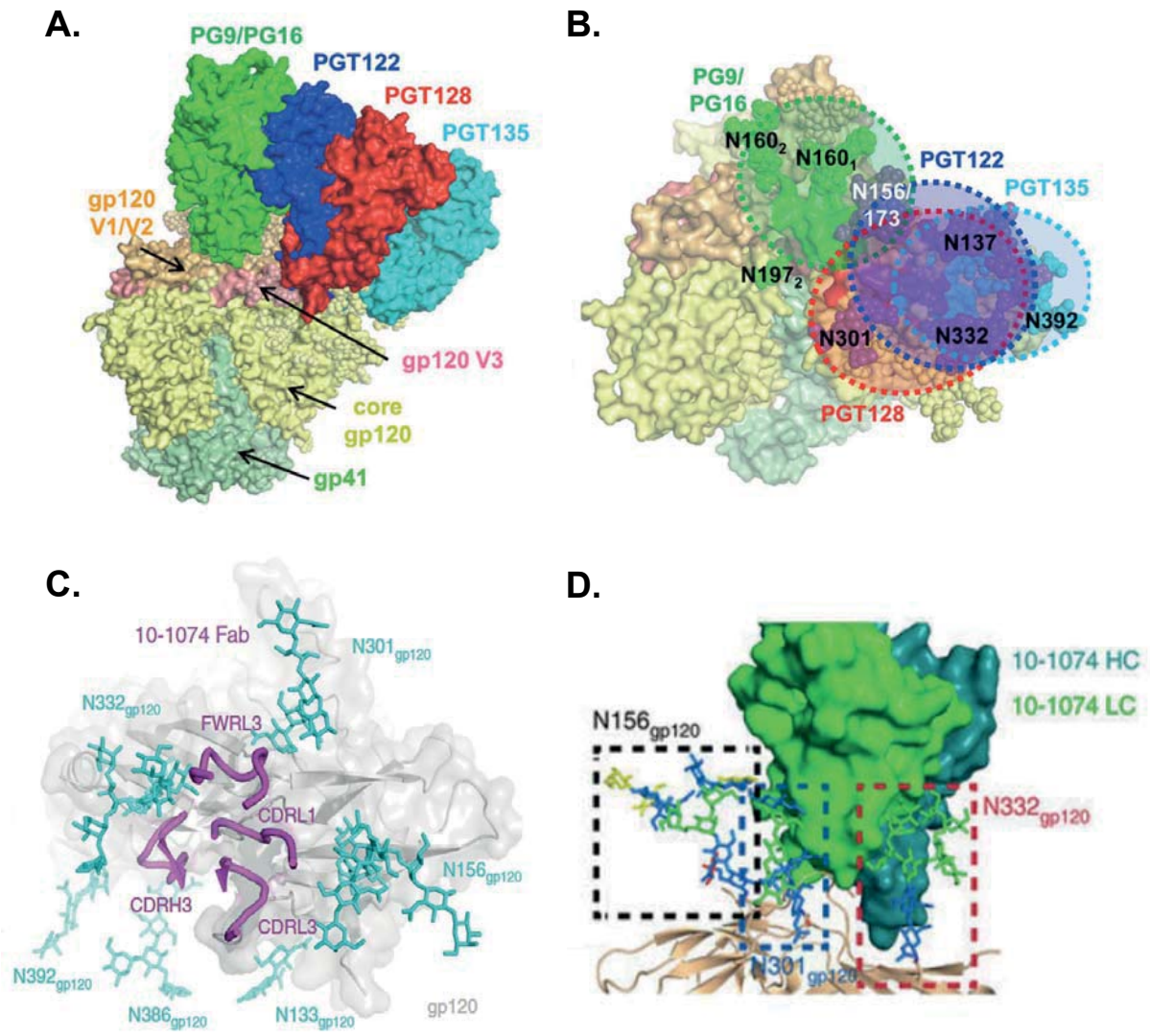


Figure 27 : Site N-Glycanes associés à la boucle V3 : bNAbs de la famille PGT et 10-1074

A. La superposition des structures cristallographiques des bNAbs PG16 (en vert), PGT122 (en bleu foncé), PGT128 (en rouge) et PGT135 (en bleu clair) sur le trimère d'enveloppe du VIH-1 révèle le chevauchement des épitopes ciblant les N-glycanes associés aux boucles V1/V2 (en orange) et à la boucle V3 (en rose). **B.** La même superposition qu'en A mais ne montrant ici que les N-glycanes dont dépendent les épitopes selon le même code couleur. Les bNAbs de la famille PGT ont tous en commun le site de glycosylation N332 à la base de la boucle V3. PGT122 implique les N-glycanes en position 137, 156 à la base des boucles V1/V2 et 301. PGT128 est dépendant des glycanes N301, N295, N137 et N156. Enfin, PGT135 se lie aux glycanes N392 et N386 de la boucle V4. D'après (Julien et al., 2013). **C.** Interactions du bNAb 10-1074 en version Fab avec l'Env trimérique BG505 SOSIP.664 glycosylée. 10-1074 interagit principalement avec le glycane N332. D'après (Barnes et al., 2018). **D.** Une autre structure de 10-1074 Fab lié à l'Env trimérique BG505 SOSIP glycosylée montre les interactions secondaires (N301) ou minimales (N156) avec des N-glycanes de type complexes. D'après (Gristick et al., 2016).

puissant est 10-1074 (Mouquet et al., 2012). Les épitopes des deux groupes impliquent principalement le glycane N332 et la base de la V3. Les membres *PGT121-like* se fixent sur des N-glycanes de type complexes alors que les anticorps *10-1074-like* se fixent majoritairement sur des N-glycanes hautement mannosylés (Mouquet et al., 2012). De plus, la structure récente de 10-1074 lié au trimère BG505 SOSIP.664 glycosylé montre que le bNAb entre en contact avec le peptide GDIR (G324-D325-I326-R327) à la base de la V3 et qu'il établit aussi des interactions secondaires ou minimales avec des N-glycanes de type complexes, N301 et N156, respectivement (Gristick et al., 2016) (**Figure 27 C** et **D**). Pour les membres de la famille PGT121/10-1074, il a été montré que le mécanisme de neutralisation fait intervenir le verrouillage des molécules Env fonctionnelles dans une conformation qui empêche l'engagement productif du récepteur CD4, mécanisme qui implique le glycane N332 à la base de la boucle V3 (élément crucial) et d'autres N-glycanes environnants des boucles V1/V2 (Julien et al., 2013b). L'épitope du bNAb PGT122 implique lui, quatre N-glycanes en position N137, N156/173, N332 et N301 (Julien et al., 2013a) (**Figure 27 B**). Enfin, le bNAb 10-1074 a une couverture de neutralisation de 57 % alors que le bNAb PGT121 neutralise 64 % des isolats circulants avec une IC_{50} inférieure à 50 µg/ml et des niveaux relativement modestes de MS (Mouquet et al., 2012) (Walker et al., 2011).

PGT128 de la famille PGT125-131 interagit avec le motif GDIR à la base de la boucle V3 (comme d'ailleurs PGT122) et est dépendant des glycanes N332/N295, N301, N137 et N156/173 (Pejchal et al., 2011) (Julien et al., 2013a) (Lee et al., 2015a) (**Figure 27 B**). De plus, il a été montré que PGT128 en complexe avec la protéine BG505 SOSIP.664 se fixe indirectement sur le N-glycane N262 par un effet « domino » dans lequel PGT128 se fixe sur le N-glycane N301, qui à son tour va interagir avec N262, illustrant ainsi, le rôle important des N-glycanes voisins sur la conformation de l'épitope et sur la stabilité (Kong et al., 2015).

PGT135 de la famille PGT135-137 interagit avec le supersite N332 et les glycanes N392 et N386 de la boucle V4 en utilisant les longues régions hypervariables déterminant la complémentarité CDRH1 et CDRH3 pour pénétrer en profondeur le bouclier de glycanes (Julien et al., 2013a) (Kong et al., 2013) (**Figure 27 B**). Testés sur un panel de 162 virus, PGT128 et PGT135 ont un spectre de neutralisation de 72 % et 33 % des isolats viraux avec une IC_{50} < 50 µg/ml, respectivement (Kong et al., 2013).

Chez un même *elite controller* infecté avec un VIH-1 de clade B, trois bNAbs ont été isolés dont le plus efficace, BG18 présente une couverture de neutralisation de 64 % (Freund et al., 2017). La courte CDRH3 de BG18 interagit avec le peptide GDIR, les glycanes portés par le N332 et secondairement, avec ceux branchés aux N392, N386 et N156 (**Figure 28 A**). BG18 combine les propriétés de fixation et de neutralisation des bNAbs *PGT121-like* et *PGT135-like* et il présente une orientation de fixation à l'enveloppe du VIH-1 différente comparée aux autres bNAbs de cette classe (Barnes et al., 2018) (**Figure 28 B**).

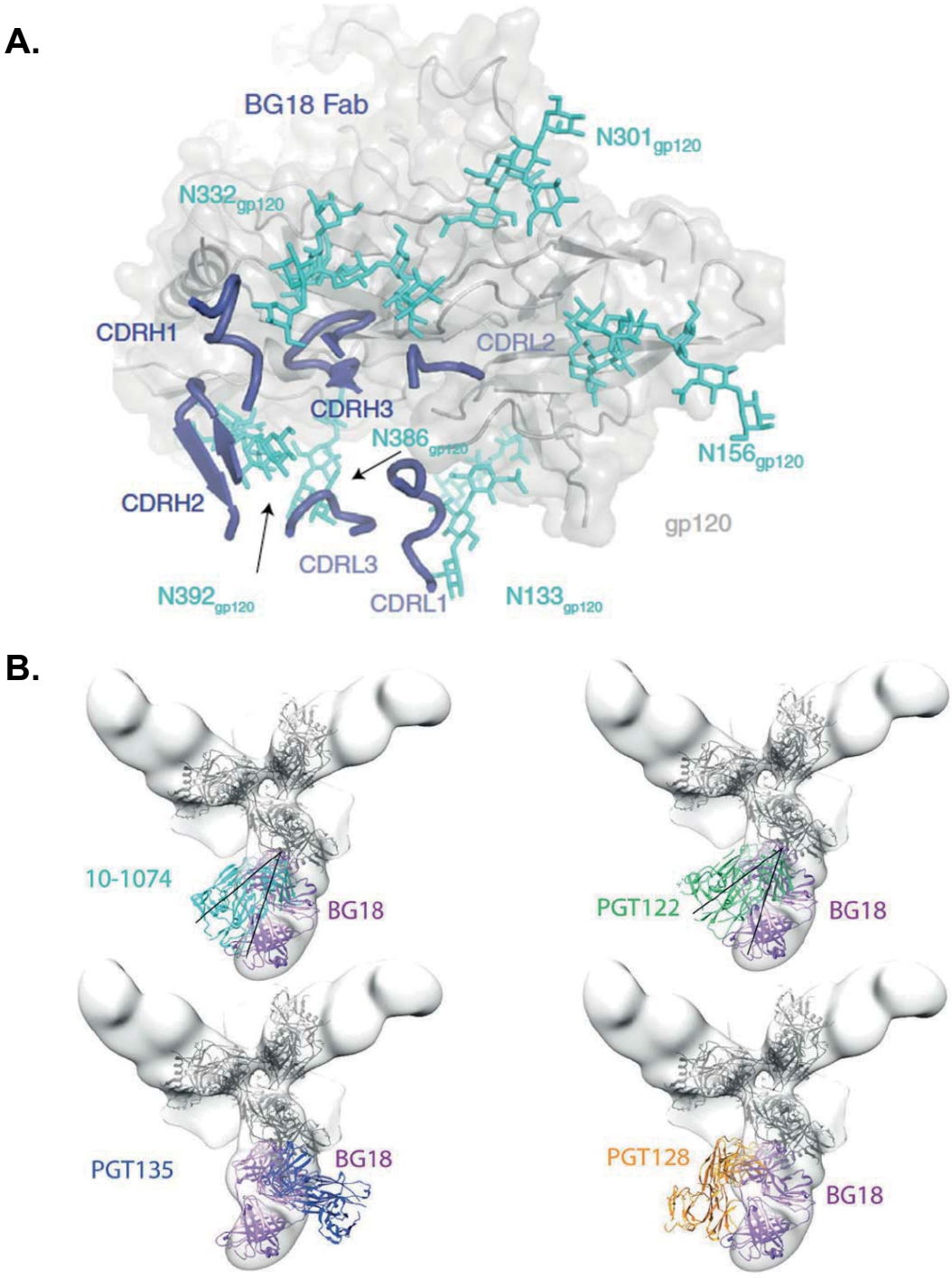


Figure 28 : Site N-Glycanes associés à la boucle V3 : bNAb BG18 et orientation

A. Structure du bNAb BG18 en version Fab lié à l'Env trimérique BG505 SOSIP.664 glycosylée. BG18 interagit principalement avec les glycanes portés par le N332 et secondairement avec ceux branchés aux N392, N386 et N156. Adapté de (Barnes et al., 2018). **B.** Comparaison des angles de fixation à l'Env BG505 SOSIP adoptés par BG18 Fab (en violet) *versus* 10-1074 Fab (en turquoise), PGT122 Fab (en vert), PGT128 Fab (en jaune) et PGT135 (en bleu foncé). Par exemple, BG18 interagit avec l'Env sous un angle différent qui est décalé de 34° à 41° par rapport à PGT122 et 10-1074, respectivement. D'après (Freund et al., 2017).

Enfin, une étude a montré que les bNAbs V3/N332 peuvent neutraliser des virus dans lesquels, soit le site N332 est déplacé en position N334 (PGT130), soit les sites N332 et N334 sont absents. Cela suggère que ces anticorps possèdent la capacité d'interagir avec des N-glycanes alternatifs voisins en absence de N332, comme N295 ou des N-glycanes complexes des boucles V1/V2 (N136), pour conserver leur activité neutralisante. Il est à noter que la combinaison de plusieurs familles de bNAbs ciblant le supersite V3/N332 pourrait neutraliser une gamme bien plus large de virus que ne le ferait un bNAb seul (famille PGT121-133 entraine 99 % de neutralisation), ce qui est à considérer dans le développement de vaccins et d'anticorps thérapeutiques anti-VIH-1 (Sok et al., 2014a).

4.3.2.2 Site N-Glycanes associés aux boucles V1/V2

Ce site de vulnérabilité est situé à l'apex du trimère Env où convergent les régions conservées des boucles variables V1/V2 et V3. Les interactions entre le domaine V1/V2 de différentes sous-unités de gp120 aident à stabiliser l'apex du trimère et donc, l'ensemble du trimère. Les interactions supplémentaires avec la boucle V3 stabilisent la conformation fermée du trimère, dans laquelle la boucle V3 est séquestrée sous les boucles V1/V2 (de Taeye et al., 2019) (**Figure 13**). Plusieurs bNAbs ciblent cet épitope particulièrement flexible centré sur le domaine V2 à l'apex du trimère Env et reconnaissent un ou deux N-glycanes branchés sur les résidus, N160 et N156 (Seabright et al., 2019) (**Figure 26**). L'accès à cet épitope conformationnel dit quaternaire (car préférentiellement exprimée sur une Env trimérique dans sa conformation fermée) se fait par la CDRH3 étendue et anionique du bNAb qui pénètre le bouclier de glycanes pour former des interactions intermoléculaires avec les résidus cationiques du domaine V1/V2 du trimère Env (McLellan et al., 2011).

Plusieurs bNAbs ciblant les domaines V1/V2 et les glycanes associés à la boucle V3 ont été identifiés tels que PG9 et PG16 (Walker et al., 2009) (McLellan et al., 2011), CH01-04 (Bonsignori et al., 2011), PGT141-145 (Walker et al., 2011), PGDM1400-1412 qui sont des variants somatiques de PGT145 isolés du même donneur infecté (Sok et al., 2014b) et CAP256-VRC26.01-12 (Doria-Rose et al., 2014). Ils ciblent tous un épitope quaternaire, ce qui peut refléter une adaptation fonctionnelle du virus, et partagent le même mode de pénétration ainsi que la spécificité de fixation sur N160 avec certaines variations (Doria-Rose et al., 2012) (**Figure 29 A**). Pour PG9, le N-glycane N160 est critique et N156/173 est important pour la reconnaissance de l'épitope (**Figure 29 A**). PG9 et PG16 peuvent interagir avec deux N-glycanes N160 à travers deux protomères de gp120 à l'apex du trimère. De plus, PG16 semble plus V3-dépendant que PG9 car ses CDRH1 et FWRH3 se lient au N-glycane N197 de la boucle V3 (Julien et al., 2013a) (**Figure 29 B**). Il a aussi été montré qu'une augmentation de la longueur des boucles V1/V2 et/ou du nombre de sites de

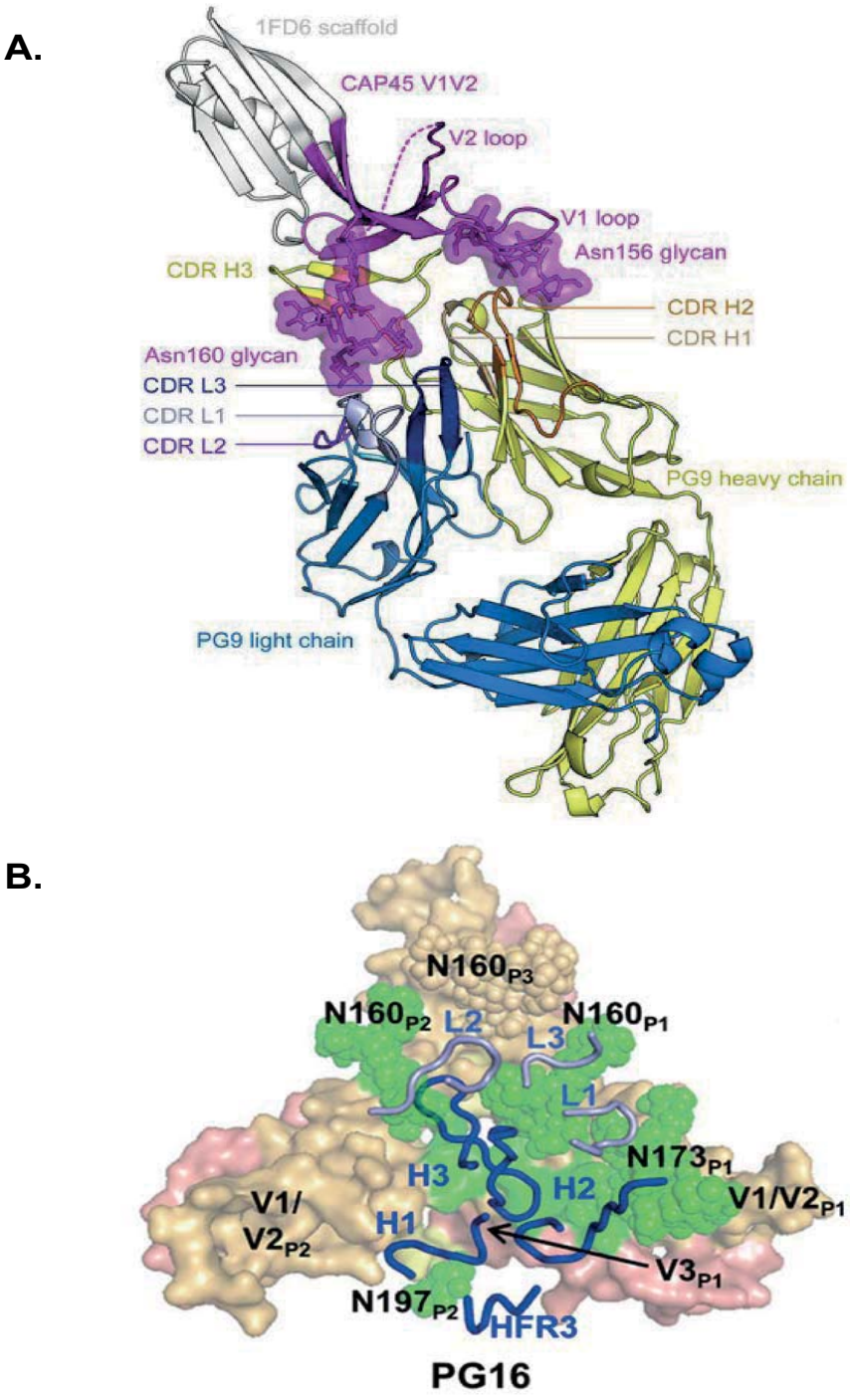


Figure 29 : Site N-Glycanes associés au domaine V1/V2 : bNAbs PG9/PG16

A. Structure du domaine V1/V2 de l'Env en complexe avec le bNAb PG9. Les boucles V1/V2 de la souche virale CAP45 sont montrées en rose en liaison avec le Fab PG9 dont les chaînes lourdes et légères sont indiquées en jaune et en bleu, respectivement. La longue CDRH3 de PG9 est capable de pénétrer le bouclier de N-glycanes qui protège le domaine V1/V2 situé à l'apex du trimère tandis que les résidus des chaînes lourdes et légères de PG9 reconnaissent les N-glycanes N160 et N156. La région désordonnée de la boucle V2 est indiquée en pointillé. D'après (McLellan et al., 2011). **B.** Epitope quaternaire de l'anticorps PG16 sur l'Env. Comme tous les membres de cette classe, la longue CDRH3 de PG16 interagit avec le N-glycane N160. PG16 tout comme PG9 peut se lier à deux N160 à travers deux protomères de gp120 à l'apex du trimère. De plus, PG16 semble plus dépendant de la boucle V3 que ne l'est PG9 car ses CDRH1 et FWRH3 en bleu se lient au N-glycane N197 de la boucle V3. Les protomères sont notés P1, P2 et P3. D'après (Julien et al., 2013).

glycosylation pourraient être directement impliqués dans la protection du VIH-1 contre des AN spécifiques (van Gils et al., 2011). Brièvement, la couverture de neutralisation est de 73 et 78 % pour PG9 et PG16, respectivement, 38-49 % pour CH01-04, 40-80 % pour PGT141-145 (McLellan et al., 2011) et 83 % pour PGDM1400 (Sok et al., 2014b). Enfin, les bNAbs de la classe V1/V2 peuvent apparaître relativement tôt après le début de l'infection par le VIH-1 et s'accompagnent d'une maturation d'affinité modeste (longue CDRH3 et faible pourcentage de MS) et d'une amélioration de la couverture de neutralisation, comme le montre l'étude des variants somatiques du lignage CAP256-VRC26 (Doria-Rose et al., 2014).

4.3.2.3 Site de fixation au CD4

De nombreux bNAbs ciblant le site de fixation au CD4 (CD4bs) ont été identifiés tels que, parmi les principaux, l'anticorps b12 (Roben et al., 1994), HJ16 dont l'épitope est complètement distinct de celui reconnu par b12 (Corti et al., 2010), la série des VRC01-VRC02-VRC03 (Wu et al., 2010) (Zhou et al., 2010), la famille *VRC01-like* (VRC-PG04, VRC-CH30-34) (Wu et al., 2011), NIH45-46, un variant de VRC01 et le clonotype (famille clonale d'anticorps qui reconnaissent un seul épitope sur l'antigène) des *3BNC-like* (3BNC117, 3BNC60, 3BNC55) (Scheid et al., 2011), IOMA (Gristick et al., 2016), N6 (Huang et al., 2016a) et 1-18 découvert très récemment (Schommers et al., 2020) (**Figure 26**). La couverture de neutralisation est de 41 % pour b12, 91 % pour VRC01-02, 57 % pour VRC03 sur un panel de 190 virus IC_{50} < 50 µg/ml (Wu et al., 2010), de 36 % pour HJ16 (Corti et al., 2010), 86 % pour NIH45-46, 92 % et 64 % pour 3BNC117 et 3BNC55, respectivement (Scheid et al., 2011), 98 % pour N6 (Huang et al., 2016a) et 97 % pour 1-18 sur un panel de 119 virus multi-clades (Schommers et al., 2020). Une neutralisation quasi-totale des virus est observée avec les bNAbs N6 et 1-18.

Les bNAbs ciblant le CD4bs empêchent les interactions entre le récepteur CD4 cellulaire et la gp120. Il a été montré que les anticorps anti-CD4bs les plus puissants (couverture de neutralisation > 75 %, VRC01, NIH45-46, *VRC01-like*, *3BNC-like*, N6) présentent sur leur séquence, des points de contact communs avec les boucles liant le CD4, D et V5 de la gp120 qui miment les interactions de fixation du récepteur CD4 à la gp120. En effet, la région VH du bNAb est largement responsable de ces interactions et du mimétisme du CD4 comme par exemple, le résidu Arg71 qui mime l'acide aminé Arg59 du CD4 dans l'interaction avec l'Asp368 de la gp120 (Zhou et al., 2010) (West et al., 2012) (**Tableau 3**, **Figure 30 A** et **D**). De plus, la courte CDRL3 de cinq résidus, commune à la majorité de ces bNAbs et qui ne représente qu'environ 1 % des domaines VL des anticorps humains, empêche les collisions stériques entre les boucles D et V5 de la gp120 (West et al., 2012) (**Figure 30 B** et **E**). A l'inverse, d'autres anticorps de cette classe tels que IOMA, présentent

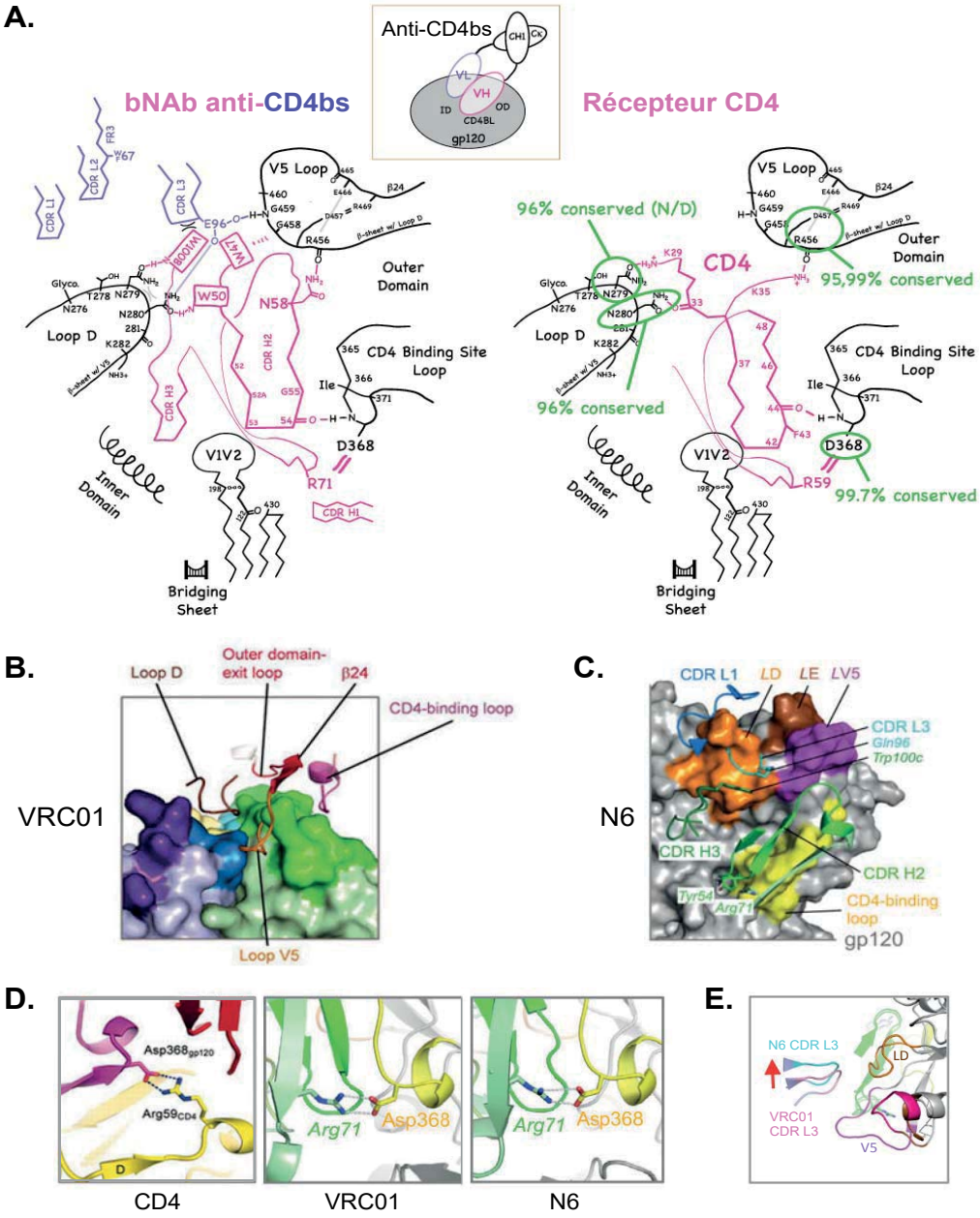


Figure 30 : Site de liaison au CD4 : bNAbs VRC01 et N6

A. Points de contact communs entre les classes de bNAbs largement neutralisants ciblant le CD4bs (Chaînes H en rose et L en violet) avec la gp120 (en noir) à gauche et entre le récepteur CD4 (en rose) avec la gp120 (en noir) à droite. Le degré de conservation des résidus critiques sur la gp120 parmi les souches de VIH-1 est indiqué en vert. La courte CDRL3 empêche les chocs stériques avec les boucles D et V5 de la gp120. Pour NIH45-46, les résidus 91 et 96 de la CDRL3 entrent en contact avec le W100B de la chaîne H pour stabiliser l'interface VH-VL de l'anticorps et avec G456 de la boucle V5 tandis que la pointe de la CDRL3 interagit avec les résidus N279 et N280 de la boucle D de la gp120. Adapté de (West et al., 2012). **B.** Structure cristallographique du bNAb VRC01 montrant l'intérêt de la courte CDRL3 (bleu) pour s'accommoder des boucles D (marron) et V5 (orange). D'après (Zhou et al., 2010). **C.** Interactions entre la gp120 du VIH-1 et les CDR du bNAb N6. Les résidus importants sur les chaînes H (Arg71, Tyr54 CDRH2) et L (Gln96 CDRL3) sont indiqués. D'après (Huang et al., 2016). **D.** La chaîne H du bNAb est responsable du mimétisme du récepteur CD4 sur la gp120. L'Arg71 (vert) des bNAbs VRC01 et N6 mime l'Arg59 (jaune) du CD4 sur l'Asp368 (jaune/violet) de la gp120. Adapté de (Huang et al., 2016). **E.** Changements de positionnement des CDRL3 de N6 (turquoise) par rapport à VRC01 (rose) pour éviter les collisions stériques avec les boucles D (LD) et V5 de la gp120. D'après (Huang et al., 2016).

une CDRL3 « classique » de neuf résidus qui pénètre le sillon entre les boucles V5 et D de la gp120 (Gristick et al., 2016).

Caractéristiques communes aux puissants anticorps anti-CD4bs	Interactions sur la gp120
Trp50 CH	Liaison H avec Asn280 boucle D
Asn58 CH	Liaison H avec Arg456 boucle V5
Arg71 CH	Liaison H avec Asp368 boucle CD4
Trp100B CH	Liaison H avec Asn/Asp279 D
Glu96 CL	Liaisons H avec Gly459/Asn280 D
Trp67 CL/Phe67 CL	Interaction avec glycane Asn276 D
CDRL3 courte à 5 résidus Résidus 91 CL & 96 CL	Prévient les encombrements stériques avec les boucles D et V5

Tableau 3 : Résidus conservés parmi les puissants anticorps anti-CD4bs et leurs contacts sur la gp120. CH, Chaîne lourde ; CL, Chaîne légère. Adapté de (West et al., 2012).

Un autre point de contact au CD4bs se fait par le résidu hydrophobe Trp54 (VRC03) ou Tyr54 (N6) de la région VH qui mime l'interaction du résidu Phe43 du CD4 mais d'autres membres de cette classe possèdent un résidu Gly54 à cette position (VRC01, NIH45-46). Enfin, des analyses structurales ont révélé que le pan-bNAb N6 bien qu'ayant les caractéristiques décrites ci-dessus, possède des propriétés structurales uniques pour se lier en surface sur la boucle D et pour tolérer des changements à proximité de la boucle V5 en évitant les chocs stériques, contribuant ainsi à son spectre quasi total de neutralisation (Huang et al., 2016a) (**Figure 30 C**). Globalement, les différences au niveau des chaînes H et L peuvent entrainer une complémentation fonctionnelle au sein de cette classe d'anticorps. Les forts pourcentages d'identité des séquences parmi les anticorps de la classe *VRC01-like* issus de différents donneurs et la convergence dans la reconnaissance structurale d'épitopes similaires au niveau du CD4bs suggérent des similitudes dans les processus de maturation d'affinité de ces bNAbs (Wu et al., 2011) (**Figure 31**).

4.3.2.4 Face « silencieuse » sur la gp120

Une des régions les plus glycosylées de la glycoprotéine Env est située sur le domaine externe de la gp120 et est appelée la face silencieuse, car elle est très peu antigénique (**Figure 26**). Toutefois, très récemment, des bNAbs ciblant cette région ont été identifiés.

L'anticorps VRC-PG05 a une couverture de neutralisation de 27 %. VRC-PG05 en complexe avec le trimère BG505 SOSIP.664 montre en effet, un épitope au centre de la face silencieuse où les N-glycanes représentent 87 % de son épitope avec les N262, N295 et

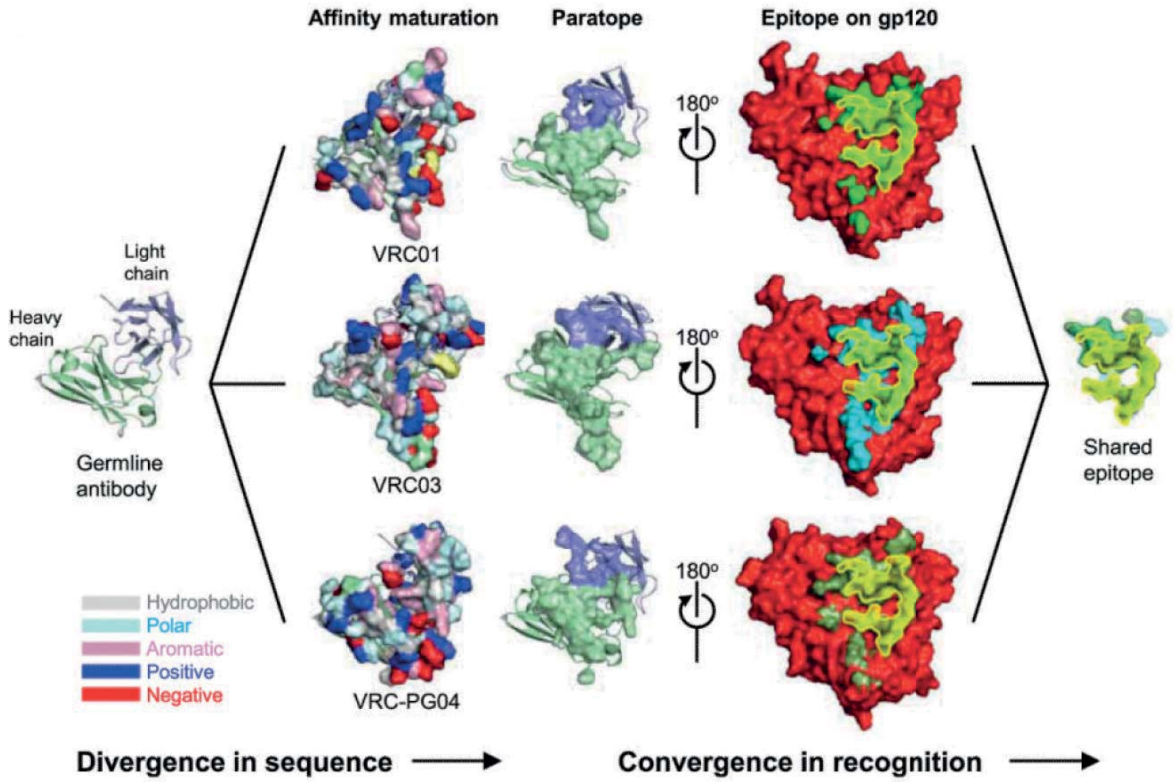


Figure 31 : Divergence en séquences et convergence en reconnaissance

A partir d'un anticorps en configuration germinale, l'introduction de mutations somatiques lors du processus de maturation d'affinité conduit à une divergence dans l'identité des séquences parmi les anticorps de la classe *VRC01-like* et la convergence dans la reconnaissance structurale d'épitopes similaires au niveau du site de liaison du CD4 (CD4bs). La superposition des surfaces d'épitopes (extrême droite) reconnues par VRC01, VRC03 et VRC-PG04 révèle une similitude notable avec le CD4bs. La principale divergence de cette superposition avec le CD4bs supposé se produit dans la région de la gp120 reconnue par la chaîne L des anticorps *VRC01-like* (en violet). D'après (Wu et al., 2011).

N448 qui fournissent 34, 14 et 39 % de la surface de fixation, respectivement. De plus, les CDRH3 (17 résidus) et CDRL1 de VRC-PG05 établissent des interactions protéiques avec les résidus 293, 446, 447 de la gp120, ce qui représente 12 % de l'épitope (**Figure 32 A**). La fixation de VRC-PG05 sur Env interfère avec les changements conformationnels que doit adopter Env pour se lier au CD4; le glycane N262 y jouant un rôle fonctionnel critique (Zhou et al., 2018).

Plus récemment, les bNAbs SF5 et SF12 ont été décrits. Comme VRC-PG05, la structure de SF12 en complexe avec l'Env nativement glycosylée révèle des contacts étendus avec les N-glycanes N262, N295 et N448 sur la gp120 qui constituent environ 75 % de la surface de l'épitope (**Figure 32 B**). N295 indispensable à la neutralisation, et N262 ainsi que N448 hautement conservés, sont des contacts obligatoires. En effet, SF12 se lie principalement à N448 par sa CDRH3 qui pénètre le bouclier de glycanes et par des contacts additionnels avec ses CDRL1 et CDRL3. SF12 établit aussi des interactions avec la protéine Env sur les résidus en position 293, 444 et 446 *via* les boucles CDRH1 et CDRH2. De plus, la longue CDRH3 de SF12 (23 résidus) et son angle d'approche différent sur la face silencieuse de celui de VRC-PG05, lui permet de former d'autres liaisons avec Env en position 59, 214 et 252, ce qui expliquent probablement ses propriétés de neutralisation supérieures par rapport à VRC-PG05 (**Figure 32 C** et **D**). En effet, SF5 et SF12 présentent une couverture de neutralisation de 58 et 62 %, respectivement. La résistance à la neutralisation de SF12/SF5 est associée principalement par des mutations au niveau des sites de glycosylation plutôt que sur des résidus protéiques de Env comme cela est observé avec VRC-PG05 (Schoofs et al., 2019).

4.3.2.5 Site N-Glycanes associés à l'interface entre la gp120 et la gp41

Trois anticorps ont été décrits ciblant ce site de vulnérabilité à l'interface entre les deux sous-unités de l'enveloppe du VIH-1 et plus ou moins dépendant de N-glycanes : 8ANC195 (Scheid et al., 2011) (Scharf et al., 2014), 35O22 (Huang et al., 2014), 3BC176/3BC315 (Lee et al., 2015b) et CAP248-2B (Wibmer et al., 2017) (**Figure 26**).

Les structures de 8ANC195 en complexe avec la gp120 monomérique et la gp140 trimérique BG505 SOSIP.664 révèlent l'insertion de l'anticorps à travers un trou dans le bouclier de glycanes pour établir des contacts avec des N-glycanes et des résidus protéiques de la gp120 et de la gp41. Le bNAb 8ANC195 cible un large épitope où il interagit avec les N-glycanes en position 234 et 276, des régions du domaine interne, des boucles D et V5 et une petite zone du domaine externe de la gp120 par l'intermédiaire de sa région VH ainsi qu'avec une portion de la gp41 *via* sa région VL (**Figure 33 A**). Les sites de

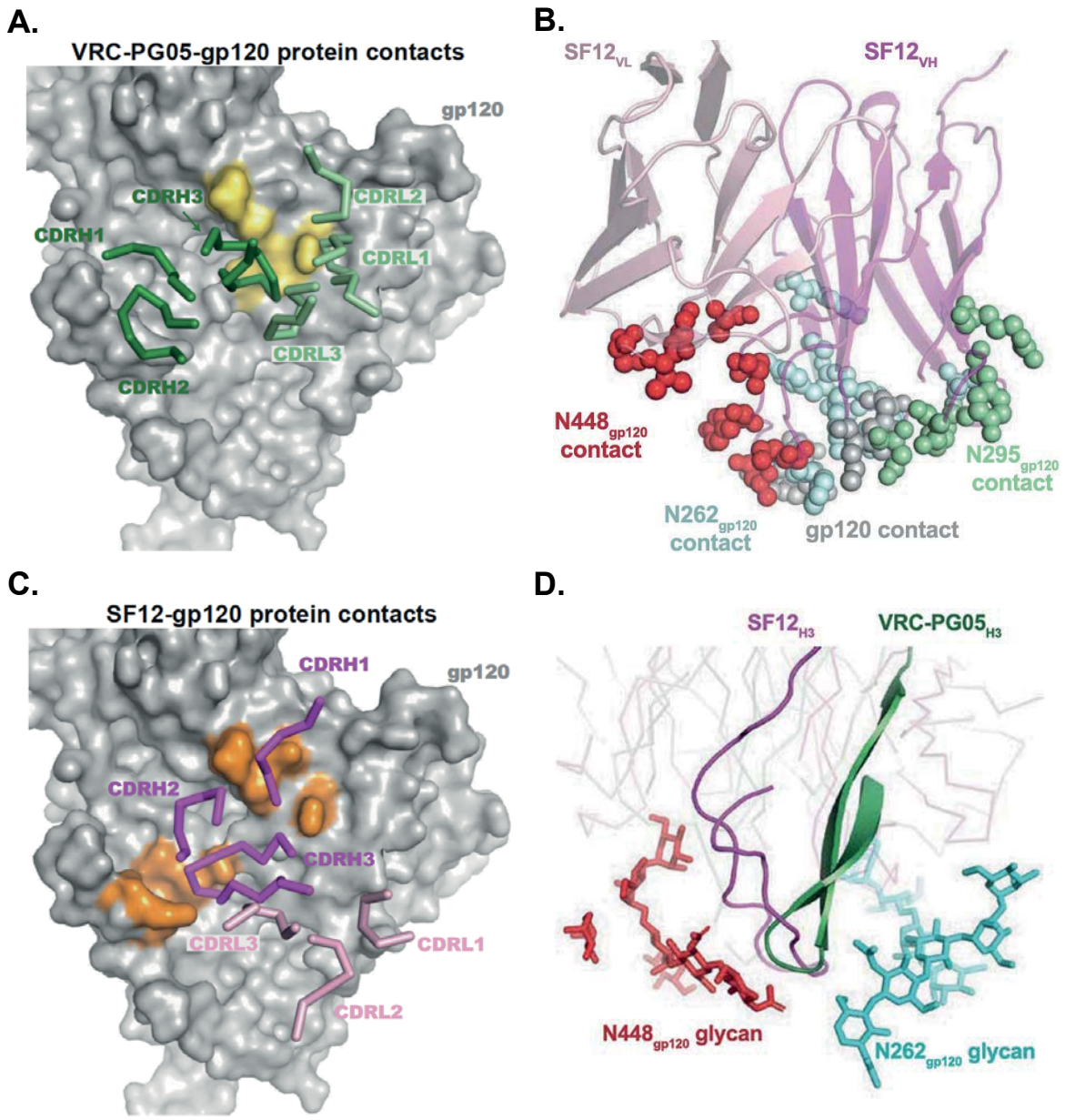


Figure 32 : Site face « silencieuse » sur la gp120 : bNAbs VRC-PG05 et SF12

A. L'épitope ciblé par l'anticorps VRC-PG05 à la surface de la gp120 est montré en jaune. L'orientation des CDR en ruban sur la gp120 (en gris) est indiquée avec les trois boucles CDRH (en vert foncé) et les trois boucles CDRL (en vert clair). **B.** Interactions de l'anticorps SF12 avec les N-glycanes N262 (bleu), N295 (vert) et N448 (rouge) en forme de boules sur la gp120. **C.** L'épitope ciblé par l'anticorps SF12 à la surface de la gp120 est montré ici en orange. Les CDR en ruban sont montrées avec les trois boucles CDRH (en violet) et les trois boucles CDRL (en rose). SF12 établit plus d'interactions sur Env que ne le fait VRC-PG05. En A et C, les glycanes sur l'épitope ont été enlevés pour plus de clarté. **D.** Superposition des boucles CDRH3 des anticorps SF12 (23 résidus en violet) et VRC-PG05 (17 résidus en vert) montrant la différence d'angle d'approche lors de la reconnaissance du N-glycane en position 448 (en rouge) par les CDRH3. Adapté de (Schoofs et al., 2019).

glycosylation N234 et N276 sur la gp120 sont essentiels à l'activité de 8ANC195 suggérant que son épitope est proche du CD4bs. Plus précisément, sa CDRH2 se lie aux glycanes sur le N234 et la portion N-terminale de sa CDRH1 se lie à ceux du N276 sur la gp120. La CDRL1 stabilise la CDRH3 tandis que la CDRL2 accueille principalement le N-glycane N637 sur la gp41 (Scharf et al., 2015) (Seabright et al., 2019) (**Figure 33 B**). Les chaînes H de 8ANC195 sont entourées par les N-glycanes N234 et N276 de façon similaire à ceux d'autres bNAbs qui pénètrent le bouclier de glycanes tels que PG16 (avec N160 et N156/N173), PGT128 (avec N332 et N301) ou PGT121 (avec N332 et N137). La couverture de neutralisation de 8ANC195 est de 66 %. La reconnaissance de la gp120 et de la gp41 par 8ANC195 peut faciliter la neutralisation virale en empêchant des changements de conformation complets jusqu'à l'état ouvert du trimère qui sont nécessaires à la fusion des membranes virale et cellulaire médiée par la gp41 (Scharf et al., 2014). En fait, il a été montré que 8ANC195 reconnaît différentes conformations du trimère de Env ; un état fermé et un état partiellement ouvert lié au CD4, ce qui suggère une neutralisation potentielle des virus libres et fixés à la cellule. Il existerait en fait, une séquence de changements de conformation du trimère non lié impliquant des transitions d'états (i) fermé à totalement ouvert ; (ii) ouvert à partiellement ouvert ; (iii) partiellement ouvert à fermé montrant une plasticité structurale de l'Env et suggérant que le trimère lié à la membrane peut refermer spontanément un état totalement ouvert, un processus qui peut être assisté par un anticorps comme 8ANC195 (Scharf et al., 2015) (**Figure 33 C**).

Le bNAb 35O22 provient du même donneur chez lequel l'anticorps 10E8 anti-gp41 a été isolé (Huang et al., 2012). Sa couverture de neutralisation de 35O22 est de 62 %. Il ne reconnaît qu'un épitope quaternaire sur le trimère de l'Env à cheval sur la gp120 et la gp41, et est aussi dépendant des N-glycanes. Son épitope est distinct de celui de 8ANC195 et de PGT151 **(§ 4.3.2.6**). La chaîne H de 35O22 est à proximité de quatre sites de glycosylation qui contribuent à son épitope : N88 lié par la CDRH2, N230, N241 sur la gp120 et N625 lié par la CDRH3 sur la gp41 ; N88, N241 et N625 étant des glycanes hautement conservés (Huang et al., 2014) (Seabright et al., 2019) (**Figure 34 A**). Il a été montré que le bNAb 35O22 se liait mal à l'Env avant qu'elle ne s'attache à son récepteur CD4 car son épitope est trop proche de la membrane virale. Cependant, après l'attachement du CD4 à l'Env, les changements de conformation font que l'épitope de 35O22 est exposé par l'élévation de la spicule d'enveloppe d'environ 15 Å dans la membrane virale (**Figure 34 B**) (Huang et al., 2014).

Enfin, l'anticorps CAP248-2B qui a une couverture de neutralisation de 22 %, cible un épitope quaternaire sur le trimère Env dans sa conformation fermée à l'interface de la gp120 et de la gp41, mais est indépendant des glycanes. Le site de fixation de CAP248-2B se trouve prêt de la membrane virale (comme 35O22) sur la partie C-terminale de la gp120 et

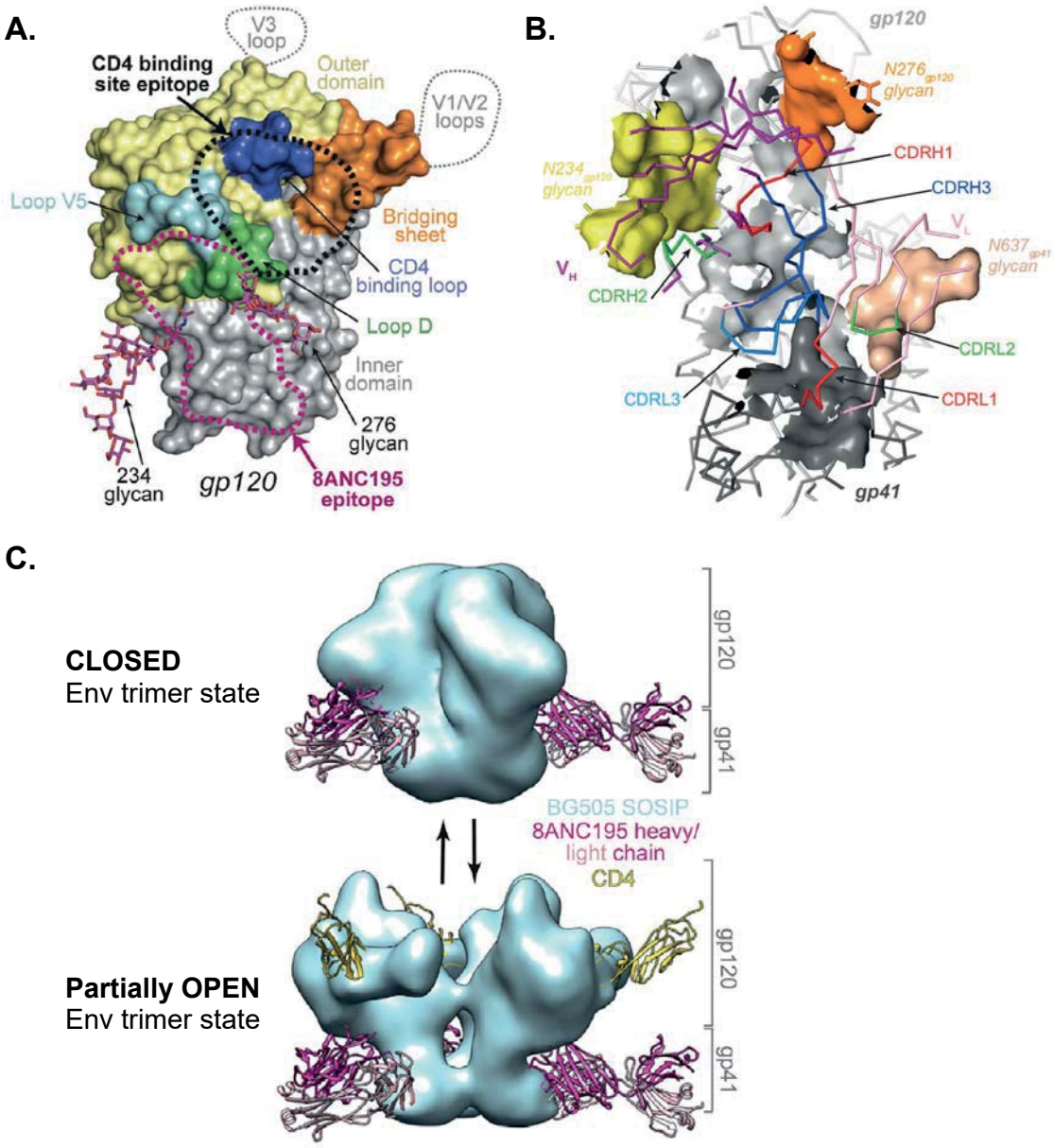


Figure 33 : Site N-Glycanes associés à l'interface entre la gp120 et la gp41 : bNAb 8ANC195

A. Localisation de l'épitope ciblé par l'anticorps 8ANC195 (en pointillé rose) correspondant à une large interface avec (i) des N-glycanes en position 234 et 276 (adjacents au CD4bs en pointillé noir) ; (ii) des régions du domaine interne (en gris) ; (iii) des boucles D (en vert) et V5 (en bleu) ; (iv) une petite zone du domaine externe (en jaune) de la gp120 ; (v) une portion de la gp41. D'après (Scharf et al., 2014). **B.** Interactions entre 8ANC195 Fab complexé avec l'Env de BG505 SOSIP.664. Sur la gp120 (en gris clair), la CDRH2 (en vert) de 8ANC195 se lie au N-glycane N234 (en jaune) et la portion N-terminale de sa CDRH1 (en rouge) se lie à N276 (en orange). La CDRL1 (en rouge) stabilise la CDRH3 (en bleu) tandis que la CDRL2 (en vert) accueille principalement le N-glycane N637 (en saumon) sur la gp41 (en gris foncé). D'après (Scharf et al., 2015). **C.** 8ANC195 reconnaît différentes conformations du trimère de l'Env BG505 SOSIP (en bleu clair), un état fermé (haut) et un état partiellement ouvert (bas) lié au CD4 (en jaune). L'anticorps 8ANC195 est indiqué avec ses chaînes H (en rose foncé) et L (en rose clair). Adapté de (Scharf et al., 2015).

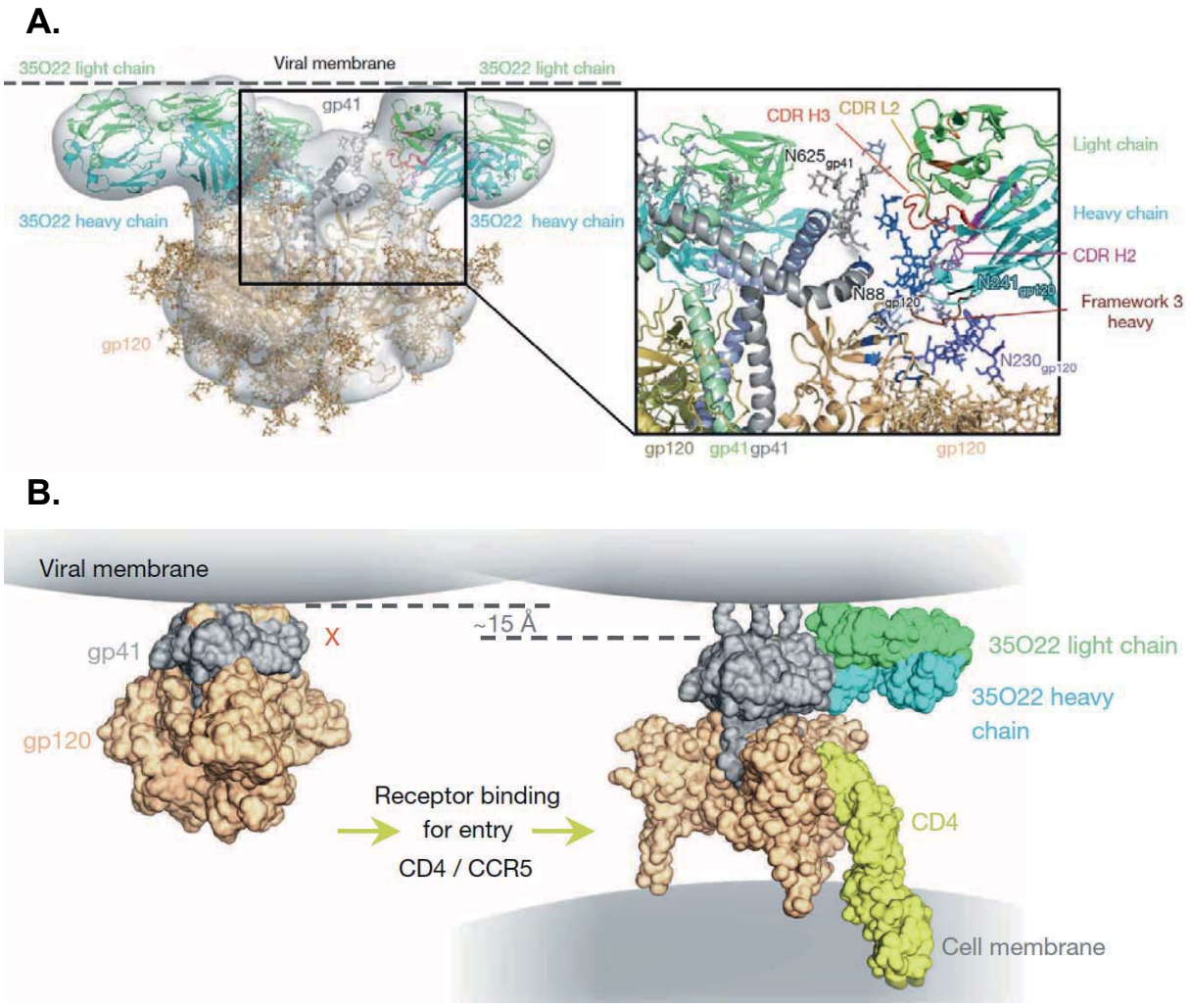


Figure 34 : Site N-Glycanes associés à l'interface entre la gp120 et la gp41 : bNAb 35O22

A. Structure cristallographique du complexe BG505 SOSIP.664 avec 35O22 en format Fab. La gp120 (saumon) et la gp41 (gris) sont montrées. La chaîne H de 35O22 est à proximité de quatre sites de glycosylation qui contribuent à son épitope : N88 est lié par la CDRH2 (en rose), N230 (en violet), N241 (en turquoise) sur la gp120 et N625 lié par la CDRH3 (en rouge) sur la gp41. **B.** Schéma montrant que l'anticorps 35O22 se lie mal à l'Env avant qu'elle ne s'attache à son récepteur CD4 car son épitope est trop proche de la membrane virale (gauche). Cependant, après attachement Env-CD4, les changements de conformation font que l'épitope de 35O22 est exposé par l'élévation de la spicule d'enveloppe de ≈ 15 Å dans la membrane virale (droite). La gp120 (saumon), la gp41 (gris), le récepteur CD4 (jaune), les chaînes H (turquoise) et L (vert) de 35O22 sont indiqué(e)s. D'après (Huang et al., 2014).

sur la gp41. La région VH de CAP248-2B se lie avec la gp41 tandis que sa longue CDRL3 (19 résidus) forme des interactions hydrophobes productives avec la membrane virale ; son apex pouvant interagir avec des lipides viraux. Finalement, la superposition des structures de CAP248-2B et d'autres bNAbs obtenues par cryo-EM qui ciblent un épitope distinct sur la gp41 suggère un chevauchement des sites de fixation de CAP248-2B avec 35O22 et 3BC315 proche de l'interface gp41-gp41, avec PGT151 et VRC34 proche du PF et avec 10E8 proche de la MPER (Wibmer et al., 2017).

4.3.2.6 Peptide de fusion sur la gp41

Le PF comprenant 15 à 20 résidus hydrophobes à l'extrémité N-terminale de la sous-unité gp41, est un composant critique du processus d'entrée du VIH-1. A ce jour, trois bNAbs ciblant ce nouveau site de vulnérabilité ont été décrits (**Figure 26**). PGT151, PGT152, VRC34.01 et ACS202 neutralisent 66, 64, 49 et 45 % des virus, respectivement.

Parmi la famille PGT151-158, PGT151-152 se fixent spécifiquement sur des trimères d'Env clivés et ne reconnaissent pas les formes non clivées. Ces bNAbs se lient à un épitope dépendant de N-glycanes de type complexe N611 et N637 sur la gp41 en conformation pré-fusion (Falkowska et al., 2014) (Seabright et al., 2019) (**Figure 35 A**).

VRC34.01, le plus puissant du clonotype VRC34.01-07 reconnaît un épitope quaternaire correspondant aux huit premiers résidus accessibles en N-terminale du PF de la gp41 et implique le N-glycane sur le résidu N88 de la gp120 (Kong et al., 2016) (**Figure 35 B**).

ACS202 du clonotype ACS201-205 se fixe seulement sur des trimères clivés natifs et cible le N-glycane N88, le PF de la gp41 et la région proximale du PF. Sa longue CDRH3 comprend un motif hydrophobe de quatre résidus tyrosine successifs (comme PGT151) qui interagirait avec le PF (van Gils et al., 2016). Il a été montré que PGT151 et ACS202 possèdent une stœchiométrie de fixation de deux et trois Fabs par trimère respectivement, ce qui souligne qu'ils n'engagent pas Env de la même manière (van Gils et al., 2016).

4.3.2.7 Région externe proximale membranaire sur la gp41 (MPER)

La région MPER, fortement conservée, relie le domaine transmembranaire et l'ectodomaine de la gp41 et joue un rôle critique dans l'infectivité virale (**Figure 11 A**). Le MPER, riche en résidus hydrophobes, peut adopter une variété de conformations allant de boucles étendues à des hélices en fonction qu'elle soit liée ou non à un anticorps. Bien qu'enfouie dans le trimère et proche de la membrane virale, le peptide MPER est la cible de plusieurs bNAbs tels que 2F5 (Muster et al., 1993), 4E10 et Z13 (Zwick et al., 2001),

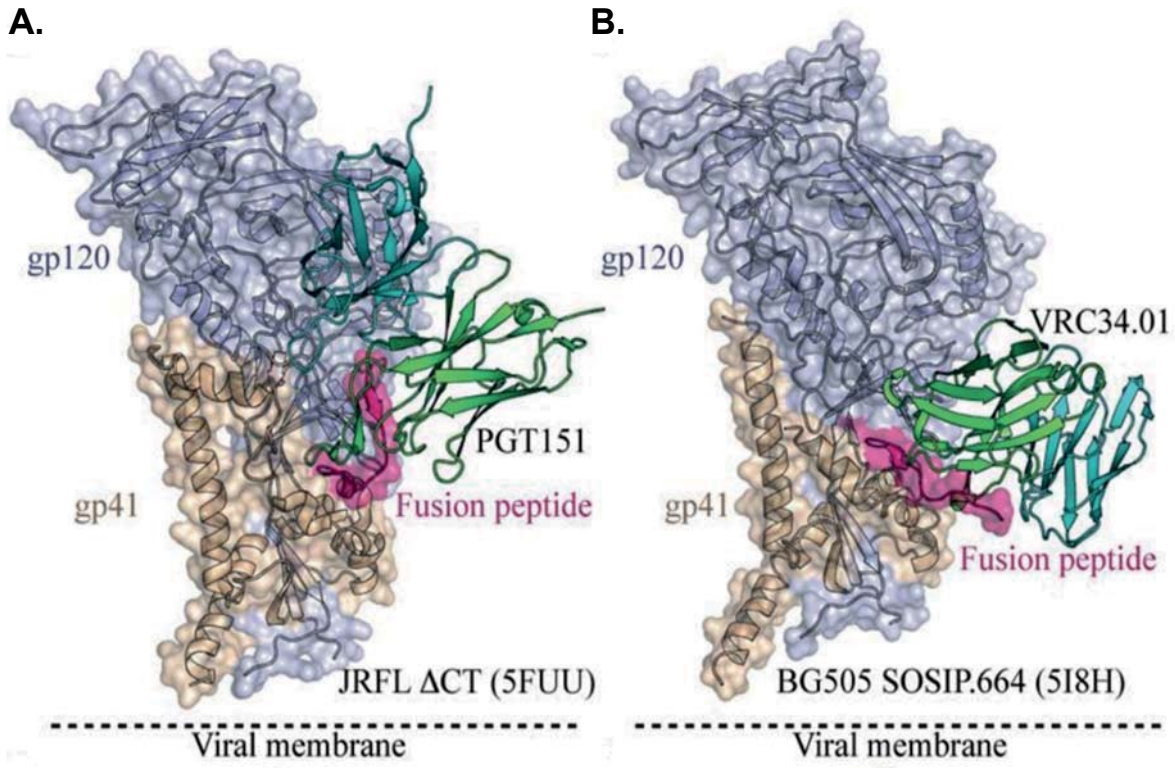


Figure 35 : Site peptide de fusion sur la gp41

Structures cristallographiques des anticorps PGT151 en **A.** et VRC34.01 en **B.** en version Fab sur le peptide fusion (en rose) de la gp41 de deux enveloppes virales JRFL ΔCT et BG505 SOSIP.664, respectivement. PGT151 approche le peptide fusion plus à la verticale tandis que VRC34.01 le fait de manière plus parallèle à la membrane virale. D'après (Kumar et al., 2019).

CAP206-CH12 (Morris et al., 2011), 10E8 (Huang et al., 2012) et m66/m66.6 (Ofek et al., 2014). Ces AN réagissent avec l'Env dans des états intermédiaires de fusion, reconnaissent des peptides chevauchants linéaires et sont capables de fixer leurs épitopes dans le contexte lipidique de la membrane virale (Ofek et al., 2014). Les anticorps 2F5, m66 et m66.6 reconnaissent un épitope en N-terminale du MPER (656-670 de gp41) tandis que Z13, 4E10, CAP206-CH12 et 10E8 ciblent un épitope en C-terminale du MPER (668-683 de gp41) (Ofek et al., 2014) (**Figure 36 A**). La couverture de neutralisation est de 54 % pour 2F5, de 24 % pour m66.6, de 37 % pour 4E10 et 72 % pour 10E8 pour des IC_{50} < 1 µg/ml.

Bien que l'épitope de 10E8 chevauche ceux de 4E10, CH12 et Z13, 10E8 est le plus puissant des anti-MPER et diffère des autres, dans la surface de reconnaissance, l'angle d'approche, la fixation aux lipides et l'auto-réactivité. 10E8 par l'intermédiaire de ses trois boucles CDRH et de sa CDRL3 établit des contacts avec les résidus conservés du MPER W672, F673, W680 et K/R683 ; ces deux derniers étant critiques à son activité neutralisante (Huang et al., 2012) (**Figure 36 B**). Le résidu F673 est déterminant pour la fixation et la neutralisation de CH12 (Morris et al., 2011). 4E10 reconnaît l'épitope NWF(D/N)IT dans une région du MPER qui est riche en tryptophane. Les résidus clés du peptide NWFDIT établissant des contacts avec le Fab 4E10 sont W672 avec la CDRH2, T676 avec la CDRH3, F673 et I675 (Cardoso et al., 2005). De plus, il a été montré que les épitopes de 4E10 et 10E8 incluent aussi des lipides de la membrane virale reconnus par les CDRH1 et CDRH3 de 4E10 et par les CDRH3, CDRL1 et CDRL2 de 10E8 (Irimia et al., 2016) (**Figure 36 D**).

2F5 reconnaît l'épitope ELDKWA hautement conservé sur l'ectodomaine de la gp41 au niveau du MPER (Muster et al., 1993). Les acides aminés L660, L663, D664, K665 et W666 sont importants pour la reconnaissance de m66/m66.6 et les trois derniers sont requis pour la fixation de 2F5. La majorité des contacts à l'interface des complexes m66/peptides MPER se fait par l'intermédiaire des trois boucles CDRH et des boucles CDRL1 et CDRL3 (**Figure 36 C**). Les résidus sur la CDRL1 (en particulier K30) de m66.6 sont critiques pour son activité neutralisante (Ofek et al., 2014). Enfin, la longue CDRH3 hydrophobe et flexible de 4E10, 2F5 et m66.6 est fortement impliquée dans la reconnaissance du MPER dans un contexte lipidique, dans la neutralisation du VIH-1, mais aussi dans leur poly- et auto-réactivités (Cardoso et al., 2005) (Ofek et al., 2014) (Irimia et al., 2016) (**Figure 36 D**).

4.3.3 Caractéristiques des bNAbs

Il est désormais, admis que les bNAbs apparaissent chez des individus chroniquement infectés par le VIH-1, deux à quatre ans après la primo-infection. La majorité

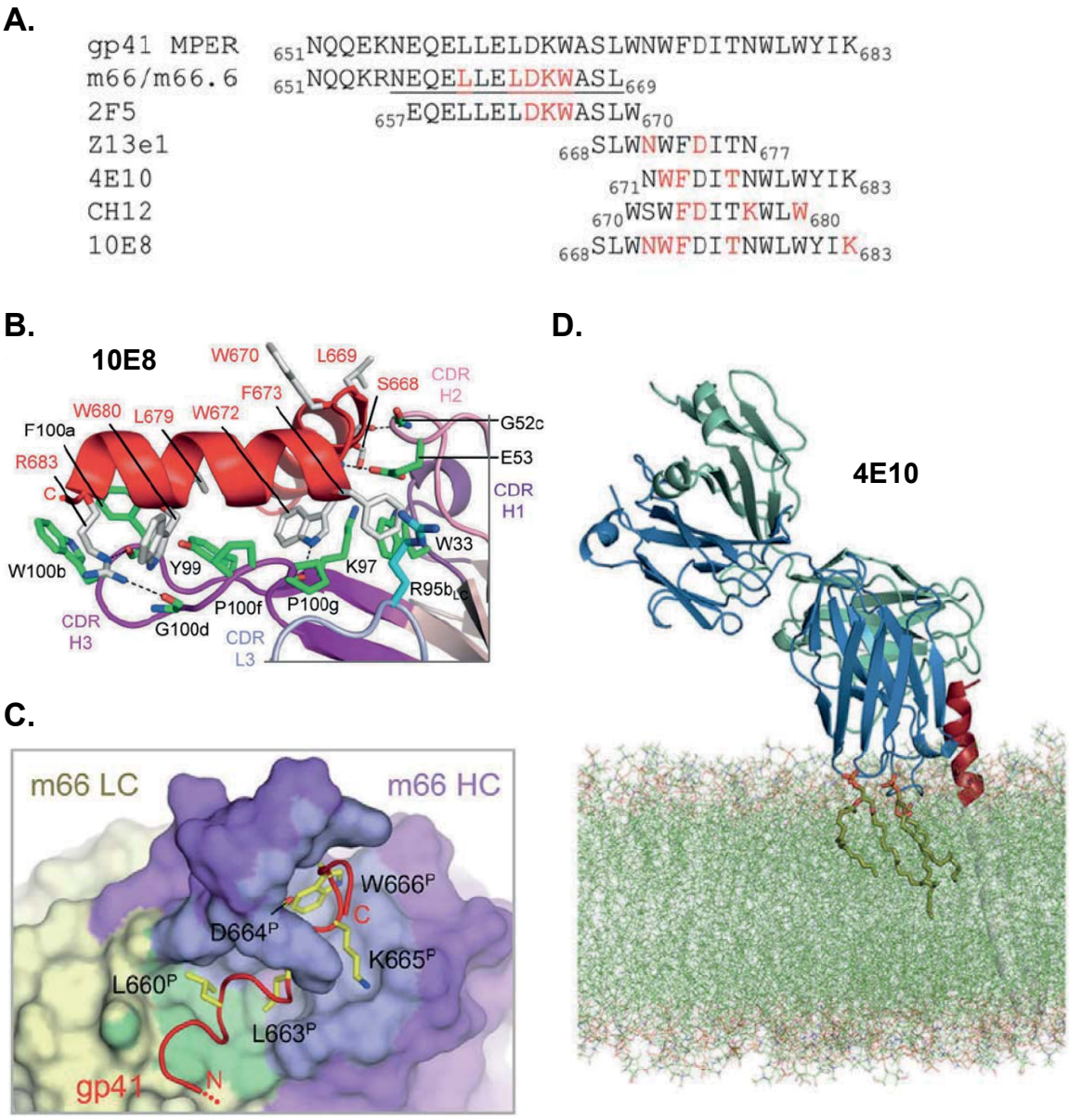


Figure 36 : Site région externe proximale membranaire sur la gp41 (MPER)

A. Alignement des séquences des épitopes des sept anticorps neutralisants ciblant la région externe proximale membranaire sur la gp41 (MPER). m66/m66.6 et 2F5 ciblent la région N-terminale du peptide MPER tandis Z13e1, 4E10, CH12 et 10E8 se fixent sur sa région C-terminale. Les résidus en rouge représentent les positions auxquelles la mutation en alanine abroge la liaison de l'anticorps. D'après (Ofek et al., 2014). **B.** Structure cristallographique de 10E8 Fab en complexe avec son épitope sur la gp41. 10E8 par l'intermédiaire de ses trois boucles CDRH et de sa CDRL3 établit des contacts avec les résidus conservés du peptide MPER W672, F673, W680 et R683 (en rouge). D'après (Huang et al., 2012). **C.** Interface de l'anticorps m66 avec la gp41. Représentation de surface des chaînes H (en bleu) et L (en vert) avec le peptide gp41 (en rouge). Les résidus du peptide L660, L663, D664, K665 et W666 importants à la fixation de m66 sont indiqués. D'après (Ofek et al., 2014). **D.** Epitope de 4E10 (CH en bleu et CL en vert) sur la gp41 et les lipides de la membrane virale. Seul le MPER (en rouge) pour l'un des protomères du trimère est montré. Les CDRH1 et CDRH3 de 4E10 se fixent sur les têtes polaires et les queues hydrophobes, respectivement des lipides de type acide phosphatidique, phosphatidylglycérol et glycérol phosphate de la membrane virale. D'après (Irimia et al., 2016).

des bNAbs anti-VIH-1 présentent des caractéristiques inhabituelles telles que leur très fort taux de MS dans les gènes des régions VH et VL (CDR et FWR), leur longue CDRH3 et leur niveau élevé de poly- et auto-réactivité (Mouquet, 2014) (Moore, 2018) (Roskin et al., 2020).

Sites de vulnérabilité	bNAbs	Longueur CDR H3 (acides aminés)	Mutations somatiques VH nt (%)
N-Glycanes associés Boucle V3 (gp120)	2G12	16	21,2
	PGT121	26	19,6
	10-1074	26	15,8
	PGT128	21	20,3
	PGT135	20	18,6
	BG18	21	21,2
N-Glycanes associés Boucles V1/V2 (gp120)	PG9	30	15,1
	PG16	30	14,9
	CH01	26	16,7
	PGT145	33	16,7
CD4bs (gp120)	b12	20	12,2
	VRC01	14	41,7
	NIH45-46	18	32,6
	3BNC117	12	26,0
	VRC-CH30	15	24,0
	VRC-PG04	16	29,2
	N6	15	31,0
Face silencieuse (gp120)	SF12	23	17-25
N-Glycanes associés Interface gp120-gp41	8ANC195	22	28,4
	35O22	16	35,0
	CAP248-2B	15	13,5
Peptide fusion (gp41)	PGT151	28	20,8
	PGT152	28	19,6
MPER (gp41)	2F5	24	14,1
	4E10	20	6,6
	10E8	22	21,4
	m66.6	23	3,8

Tableau 4 : Longueur de la CDRH3 et pourcentage de mutations somatiques des principaux bNAbs ciblant les sept sites de vulnérabilité décrits sur l'enveloppe du VIH-1. D'après (Yu and Guan, 2014) (Huang et al., 2014) (Huang et al., 2016a) (Freund et al., 2017) (Wibmer et al., 2017) (Schoofs et al., 2019).

Les bNAbs présentent un haut niveau de MS mais aussi d'insertions et/ou de délétions (Indels) de fragments nucléotidiques. Les anticorps accumulent classiquement entre 5 et 15 % de changements dans la séquence protéique des domaines variables durant le processus de maturation d'affinité (**§ 1.2.2**). Pour les bNAbs anti-VIH-1, la fréquence de MS dans la région VH est très fortement augmentée allant de 16 % pour les bNAbs qui se fixent sur une structure quaternaire de l'Env (PG9/PG16) à 31 % pour 2G12 et jusqu'à 40 à 46 % pour les bNAbs anti-CD4bs (HJ16, VRC01-02-03) (Wu et al., 2011). Les bNAbs ciblant les N-glycanes associés aux boucles V1/V2 et V3 ne nécessitent pas forcément un niveau important de MS pour développer une large neutralisation (Bonsignori et al., 2017b). L'étude

de la relation MS/affinité permet de conclure que les MS augmentent l'affinité et l'activité neutralisante des bNAbs. La réversion de mutations vers la configuration germinale induit en effet, une perte complète de l'activité neutralisante dans la grande majorité des cas (Scheid et al., 2009) (Mouquet et al., 2010) (**Tableau 4**).

Plusieurs bNAbs sont constitués d'une longue CDRH3 leur permettant atteindre leur épitope en pénétrant le bouclier de glycanes ou en l'extrayant de la membrane virale (Mouquet, 2014). D'une longueur moyenne de 14 résidus, la CDRH3 de certains bNAbs, en particulier ceux ciblant les N-glycanes associés aux boucles V1/V2, peut atteindre 28 résidus pour PG9/16 (Walker et al., 2009), 33 à 34 acides aminés pour PGDM1400 (Sok et al., 2014b) et jusqu'à 35 à 37 résidus pour CAP256 VRC26.01-12 (Doria-Rose et al., 2014). D'une longueur « classique » de 9 à 11 acides aminés, la CDRL3 de certains bNAbs peut être au contraire, bien plus courte. En effet, certains anti-CD4bs (VRC01, NIH45-46, 3BNC117, N6) ont une CDRL3 de 5 résidus afin d'éviter les collisions stériques avec les boucles V5 et D de la gp120 (West et al., 2012) (**Tableau 4**).

La poly-réactivité et l'auto-réactivité peuvent survenir suite à des réarrangements aléatoires de gènes d'Ig lors du développement des cellules B ou par l'introduction de MS au cours de la réaction de maturation/sélection des LB dans le CG. Les cellules B portant les anticorps auto- et poly-réactifs c'est-à-dire capables de se fixer avec une faible affinité sur divers ligands structurellement différents ou sur des antigènes du Soi, sont habituellement éliminées du répertoire durant leur ontogénie par les mécanismes physiologiques de tolérance immunitaire (délétion clonale et anergie ou révision du récepteur) (Mouquet and Nussenzweig, 2012). Pour les bNAbs, cela a été démontré expérimentalement dans un modèle de souris *knock-in* dont les LB co-exprimaient les chaînes H et L du bNAb 2F5 anti-gp41 poly-réactif. La grande majorité des précurseurs au niveau central et périphérique ont été purgés du répertoire par délétion clonale alors que les cellules B 2F5 restantes en périphérie, étaient anergiques (Verkoczy et al., 2011). Ainsi, le long et complexe processus de maturation d'affinité, et les mécanismes de tolérance immunitaire peuvent limiter le développement des bNAbs *in vivo* (Mascola and Haynes, 2013; Mouquet, 2014). Cependant, une fraction importante des bNAbs anti-VIH-1 sont poly-réactifs. Toutefois, la poly-réactivité des anticorps anti-VIH-1 est une caractéristique plus générale de la réponse anticorps de type mémoire contre le VIH-1. La fréquence de poly-réactivité des anticorps anti-VIH-1 Env isolés des compartiments cellulaires B mémoires chez les donneurs infectés par le VIH-1 est de 65 à 75 % (Mouquet et al., 2010) (Scheid et al., 2011) en comparaison de 23 % chez les donneurs sains utilisés comme contrôle (Tiller et al., 2007). L'étude de la relation MS/poly-réactivité indique que les bNAbs poly-réactifs pourraient posséder un avantage sélectif dans

la réponse immune contre le VIH-1. La réversion de mutations vers la configuration germinale a montré que ces anticorps sont poly-réactifs à hauteur de 60 % avant leur entrée dans le CG (Mouquet et al., 2010). La poly-réactivité des bNAbs pourrait provenir de la sélection préférentielle de cellules B matures naïves qui expriment des récepteurs poly-réactifs ou de leur maturation d'affinité vis-à-vis de l'Env. La faible densité des spicules d'Env à la surface de la particule virale pourrait en effet, exercer une pression de sélection qui favoriserait les interactions hétérotypiques. Cette hétéroligation permettrait à un bras de l'anticorps de se lier avec une forte affinité à un épitope conservé de l'Env et à l'autre bras de se fixer avec une faible affinité à un déterminant antigénique de la surface virale (lipides) ou à des molécules de l'hôte intégrées lors du bourgeonnement du virus, ce qui augmente l'avidité de ce dernier (Mouquet et al., 2010) (Mouquet and Nussenzweig, 2012) (**Figure 37 A**). Il a été proposé que l'auto- et/ou la poly-réactivité de certains bNAbs contriburaient au développement de l'activité largement neutralisante (Haynes et al., 2005). Des études ont en effet, démontré l'acquisition parallèle de la poly-réactivité et de propriétés de neutralisation améliorées (Liao et al., 2013) (Doria-Rose et al., 2014) (Bonsignori et al., 2017a) (Prigent et al., 2018) (**Figure 37 B**).

4.3.4 Coévolution entre VIH-1 et cellules B à anticorps neutralisants

Pour comprendre l'évolution des lignages/clonotypes de cellules B exprimant des bNAbs depuis les clones précurseurs (UCA, *unmutated common ancestors*) dirigés contre les virus fondateurs jusqu'aux cellules B différenciées de manière terminale exprimant les bNAbs, il est nécessaire de suivre la coévolution des virus au niveau de l'épitope cible sur l'enveloppe virale et des AN au niveau du paratope, de manière longitudinale au cours de l'infection à VIH-1 depuis la primo-infection (Bonsignori et al., 2017b). A partir de différents individus infectés, plusieurs études ont décodé l'évolution des lignages de bNAbs ciblant différents sites de vulnérabilité : CD4bs (Liao et al., 2013), N-glycanes de la boucle V3 (Bonsignori et al., 2017a), N-glycanes à l'apex des boucles V1/V2 (Doria-Rose et al., 2014) (Doria-Rose et al., 2016) (Rantalainen et al., 2018), CD4bs et N-glycanes de la boucle V2 (Wibmer et al., 2013).

D'une part, ces études ont montré que les anticorps UCA en configuration germinale de ces bNAbs ne neutralisent pas les virus fondateurs/transmis autologues (T/F, *Transmitted/Founder virus*) et les virus hétérologues alors que, les anticorps intermédiaires précoces eux, neutralisent les virus T/F. Les anticorps intermédiaires plus tardifs et les bNAbs, gagnant en puissance de neutralisation, neutralisent à la fois les virus autologues et hétérologues (Liao et al., 2013) (Bonsignori et al., 2017a) (Doria-Rose et al., 2014) (**Figure 37 B**). D'autre part, ces études illustrent bien le fait que l'apparition de virus qui échappent à

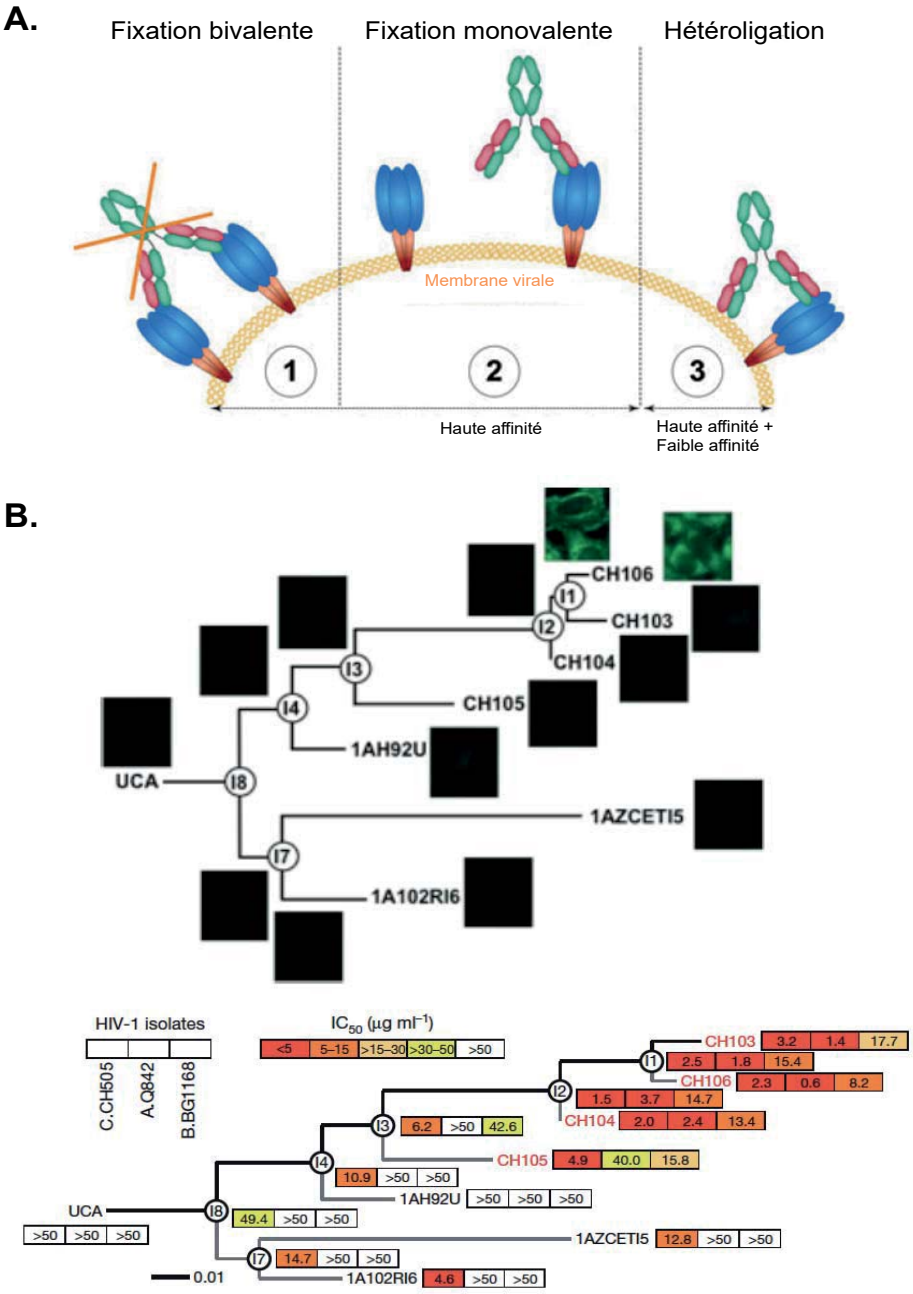


Figure 37 : Hétéroligation des bNAbs anti-VIH-1 poly-réactifs et relations mutation/poly-réactivité/neutralisation

A. Hétéroligation : (1) La faible densité des spicules d'Env à la surface de la particule virale ne permet pas une fixation bivalente de l'anticorps. (2) Un anticorps anti-gp160 non poly-réactif se fixe à son épitope avec une forte affinité par un seul de ses bras (fixation monovalente). (3) Au contraire, un anticorps anti-gp160 poly-réactif est capable de se fixer au virus de manière bivalente par hétéroligation. Un bras de l'anticorps se lie avec une forte affinité à son épitope sur l'Env et l'autre bras se fixe avec une faible affinité à un déterminant antigénique de la surface virale (lipides) ou à des molécules de l'hôte. Adapté de (Mouquet and Nussenzweig, 2012). **B.** L'étude de la coévolution anticorps-VIH-1 au cours de l'infection chez un individu chroniquement infecté a montré l'acquisition parallèle de la poly-réactivité (panel haut) et de la cross-neutralisation (panel bas) depuis les anticorps précurseurs (UCA, *unmutated common ancestors*) en passant par les anticorps intermédiaires jusqu'aux anticorps terminaux du lignage de bNAbs CH103-106. Parmi les isolats viraux montrés, C.CH505 est le virus fondateur/transmis autologue tandis que A.Q842 et B.BG1168 sont des virus hétérologues. L'évolution de la puissance de neutralisation est indiquée selon le code couleur de la concentration inhibitrice 50 % (IC_{50}). D'après (Liao et al., 2013).

la reconnaissance des anticorps en mutant l'épitope ciblé, précède toujours le développement de nouveaux clones d'anticorps dont le spectre de neutralisation s'élargit progressivement par l'introduction de MS durant les cycles de maturation d'affinité et de sélection dans les CG (AN hétérologues puis bNAbs) (**Figures 24 B** et **37 B**). Il est à noter que le développement de bNAbs largement neutralisants semble être associé à une vitesse d'échappement relativement lente (Liao et al., 2013).

La coopération de lignages de cellules B dans le développement de bNAbs a été décrite dans plusieurs études (lignages CH235/CH103 bNAb (Liao et al., 2013) (Gao et al., 2014), lignages DH272/DH475/DH270 bNAb (Bonsignori et al., 2017a)). En effet, ce processus a été observé entre le lignage d'AN autologues CH235 coopérant avec le lignage du bNAb CH103 (anti-CD4bs) (Liao et al., 2013) ciblant tous les deux, le même épitope. Cela a entrainé la sélection de mutants viraux d'échappement porteurs de mutations dans la boucle D de l'Env qui sont ainsi rendus plus sensibles au lignage CH103 dont la maturation d'affinité soutenue et prolongée à générer le bNAb mature CH103 (Gao et al., 2014) (Bonsignori et al., 2017b) (**Figure 38 A**).

De plus, l'existence de sous-lignages a été décrite dans le développement du lignage du bNAb CAP256-VRC26 (Doria-Rose et al., 2014) (Bhiman et al., 2015). Dans ce processus, à partir du même anticorps UCA, deux sous-lignages distincts se développent : (i) un sous-lignage abortif dit « sans issue » conduisant à des anticorps qui évoluent de façon limitée face à la diversité virale, (ii) un sous-lignage en constante évolution conduisant à des anticorps intermédiaires souche spécifique dits « hors piste » et aux bNAbs. Dans ce sous-lignage, bien que les anticorps possèdent des niveaux élevés de MS, seuls les bNAbs acquièrent une large activité neutralisante (Bhiman et al., 2015) (**Figure 38 B**). Ces processus soulignent bien, la complexité et la variété des voies conduisant à l'activité largement neutralisante des bNAbs et founissent de nouvelles informations pour les approches vaccinales basées sur le lignage de cellules B (Bhiman et al., 2015).

La caractérisation détaillée des mécanismes de coévolution entre virus et anticorps durant l'infection chez plusieurs patients a fourni des indices précieux pour tenter de mimer les phénomènes biologiques qui concourent au développement des bNAbs par des approches vaccinales. Basée sur le lignage de cellules B, cette stratégie vaccinale vise tout d'abord, à concevoir des glycoprotéines d'enveloppe trimériques germinales pour l'induction des précurseurs de bNAbs *in vivo*. Ensuite, l'administration séquentielle d'immunogènes permettrait de guider le système immunitaire vers une voie de maturation d'affinité des cellules B naïves dans le répertoire d'un receveur pour l'ontogénie naturelle des bNAbs (Bonsignori et al., 2017b). Plusieurs études ont utilisé des animaux (lapins ou souris

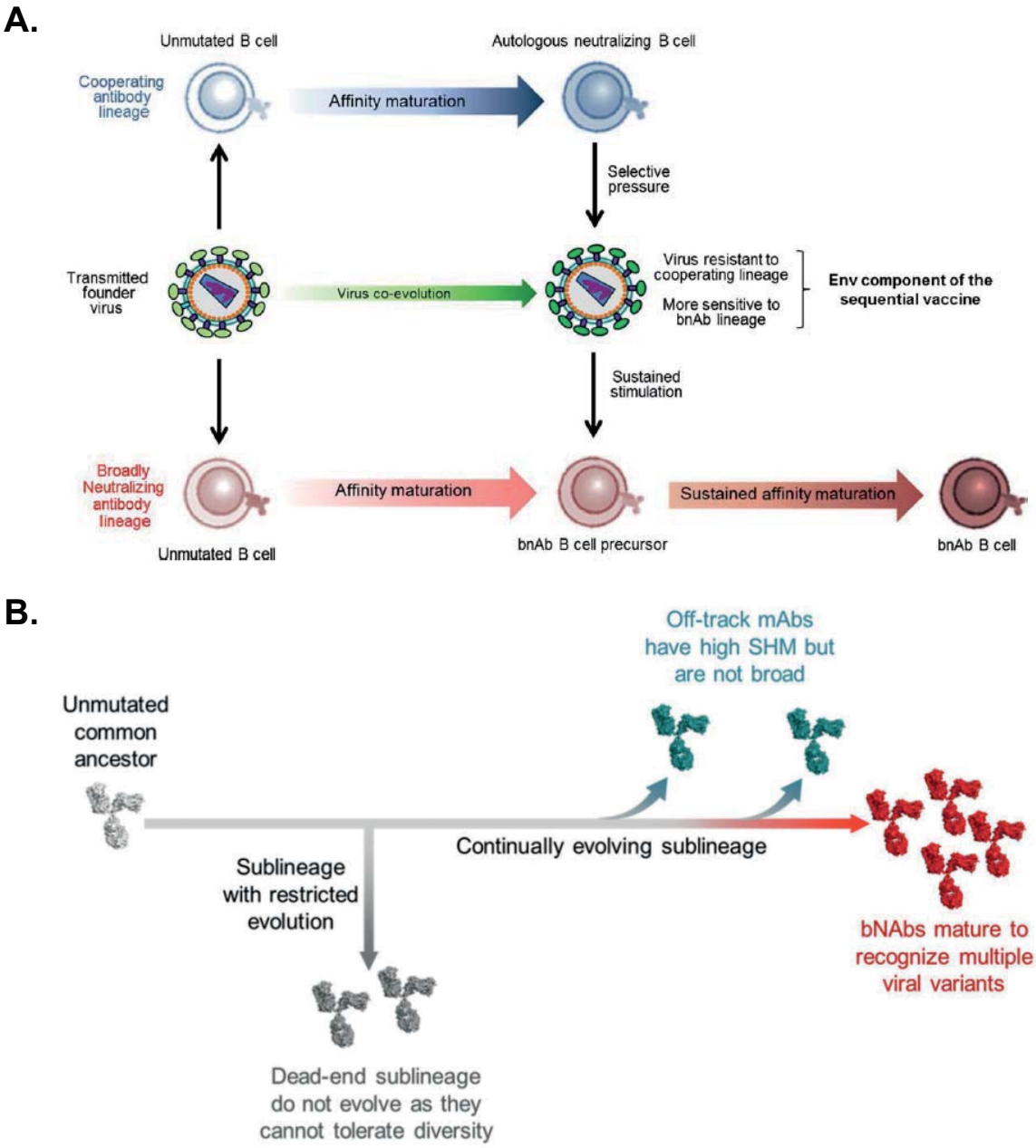


Figure 38 : Coévolution entre VIH-1 et cellules B à anticorps neutralisants : Existence de lignages coopérants et de sous-lignages

A. Mécanisme de coopération entre lignages de cellules B dans le développement de bNAbs. Le virus fondateur/transmis (en vert) évolue sous la pression des AN autologues. Le lignage d'AN autologues (en bleu) coopère avec le lignage du bNAb (en rouge), les deux ciblant le même épitope. Cette coopération a sélectionné des mutants viraux d'échappement plus sensibles au lignage de bNAb dont la maturation d'affinité soutenue et prolongée dans les centres germinatifs à générer le bNAb mature. D'après (Bonsignori et al., 2017). **B.** A partir du même ancêtre commun non muté (UCA, *unmutated common ancestors*), deux sous-lignages distincts se développent. D'une part, un sous-lignage abortif dit « sans issue » conduit à des anticorps qui évoluent de façon limitée face à la diversité virale (en gris foncé). D'autre part, un autre sous-lignage en constante évolution conduit à des anticorps intermédiaires souche spécifique dits « hors piste » (en bleu) et aux bNAbs (en rouge). Dans ce sous-lignage, bien que les anticorps possèdent des niveaux élevés de mutations somatiques, seuls les bNAbs acquièrent une large activité neutralisante. D'après (Bhiman et al., 2015).

transgéniques) dans lesquels le locus de la chaîne H endogène a été remplacé par la chaîne H germinale de VRC01 ou PGT121 ou 3BNC60, qui ont ensuite été immunisés avec des immunogènes appropriés (Jardine et al., 2015) (Dosenovic et al., 2015) (Sanders et al., 2015) (Briney et al., 2016) (Escolano et al., 2016). Bien que ces investigations n'ont pas permis d'induire des bNAbs, elles ont montré qu'il est possible de guider la maturation d'affinité en induisant un haut niveau de MS pour le développement de bNAbs partiellement matures (Briney et al., 2016) (Escolano et al., 2016). Pour se placer dans un répertoire anticorps polyclonal plus physiologique, d'autres équipes ont transféré des cellules B germinales de bNAb (VRC01, 3BNC60) dans des souris receveuses sauvages, qui ont ensuite été immunisées avec des antigènes de différentes affinités (Abbott et al., 2018) (Dosenovic et al., 2018). Là encore, ces études n'ont pas généré de bNAbs mais elles ont montré que l'activation des LB spécifiques de l'antigène et leur maturation d'affinité dans les CG sont dépendantes de la fréquence des cellules B précurseurs de bNAb, de la compétition à l'entrée dans les CG et de l'affinité de liaison pour l'antigène (Abbott et al., 2018) (Dosenovic et al., 2018). Enfin, dernièrement, l'immunogène RC1 optimisé pour faciliter le recrutement et l'expansion de LB spécifiques des glycanes associés à la boucle V3, a été administré à des souris, lapins et macaques ayant un répertoire anticorps polyclonal (Escolano et al., 2019). Les auteurs ont montré que RC1 active et expand des LB qui expriment des anticorps ressemblant aux précurseurs humains de bNAb ciblant le patch de glycanes sur la boucle V3 (Escolano et al., 2019). Ces résultats encourageants mimant les processus coévolutifs laissent à penser une faisabilité potentielle du développement naturel de bNAbs dans les années à venir.

Enfin, la comparaison de variants viraux de patients ayant été infectés au cours des périodes 1985-1989 et 2003-2006 de l'épidémie de SIDA, a permis de montrer que les souches de VIH-1 circulantes sont plus résistantes à la neutralisation par les anticorps au cours du temps (Bunnik et al., 2010).

4.3.5 Activités antivirales additionnelles des bNAbs

La neutralisation correspond à l'inhibition de la liaison du virus libre sur ses récepteurs cellulaires et/ou de la fusion virale par l'intermédiaire de la fixation des fragments Fab des AN sur la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1. Elle a pour conséquence la perte du pouvoir infectieux du virus (**§ 1.5.1 pour rappel, Figure 39**).

4.3.5.1 Inhibition de la transmission virale de cellule à cellule

Le VIH-1 se propage très efficacement à travers des contacts entre cellules infectées et cellules cibles impliquant les synapses virologiques (**Figure 39**). Selon les épitopes, les bNAbs peuvent altérer la formation de la synapse virologique et de conjugués cellulaires, le transfert de matériel viral aux cellules cibles ou la fusion. Ainsi, la prévention de la transmission du VIH-1 de cellule à cellule par les anticorps serait importante pour stopper la dissémination virale. Des différences mécanistiques sont néanmoins observées en fonction des anticorps, des souches virales et de la nature des cellules donneuses et receveuses (Dufloo et al., 2018). Les bNAbs les plus puissants (NIH45-46, 3BNC60, PGT121, 10-1074, PG16), qui se lient de manière stable aux cellules infectées et altèrent l'interaction CD4/Env ou la fusion virale, inhibent efficacement le transfert du VIH-1 de cellule à cellule. Il est toutefois à noter que l'efficacité d'un bNAb peut varier en fonction du contexte de virus libres ou associés aux cellules (Malbec et al., 2013) (Reh et al., 2015) (Suphaphiphat et al., 2020).

4.3.5.2 Fonctions effectrices médiées par le fragment Fc des Ig

Les fonctions effectrices dépendantes de la région Fc des anticorps nécessitent la formation d'un complexe tripartite comprenant le fragment Fab de l'anticorps avec la protéine virale présente à la surface d'une cellule infectée et le fragment Fc de l'anticorps avec le FcR présent à la surface d'une cellule effectrice de l'immunité innée (cellules NK, monocytes/macrophages, polynucléaires neutrophiles) ou des molécules du complément (Lu et al., 2018) (**§ 1.1)**. Il a été montré que l'activité protectrice *in vivo* de bNAbs anti-VIH-1 corrèle avec leur capacité à engager des interactions entre leur domaine Fc et des FcγR activateurs, mais pas avec leur activité de neutralisation *in vitro* (Bournazos et al., 2014).

4.3.5.2.1 ADCC (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)

Les interactions entre cellules effectrices (cellules NK, par exemple) et cellules infectées rendues possibles par des anticorps, permet l'activation des cellules effectrices qui libèrent des granules cytotoxiques de perforine-granzymes provoquant la cytolyse ou l'apoptose des cellules infectées (Lu et al., 2018) (**Figures 2B** et **39**). Dans l'essai clinique RV144, des AnN IgG ciblant la région V1/V2 de la gp120 et à activité ADCC ont permis de réduire le risque d'infection chez les vaccinés (**§ 4.2.1**). Plusieurs études ont investigué la capacité de bNAbs et d'AnN IgG à se fixer sur des cellules infectées et à induire l'ADCC médiée par les cellules NK. Certains bNAbs (3BNC117, NIH45-46, 10E8, PGT121 et 10-1074) et AnN (5-25) sont capables de déclencher l'ADCC de cellules infectées par des souches virales de laboratoire. Les cellules T infectées par des isolats primaires présentent

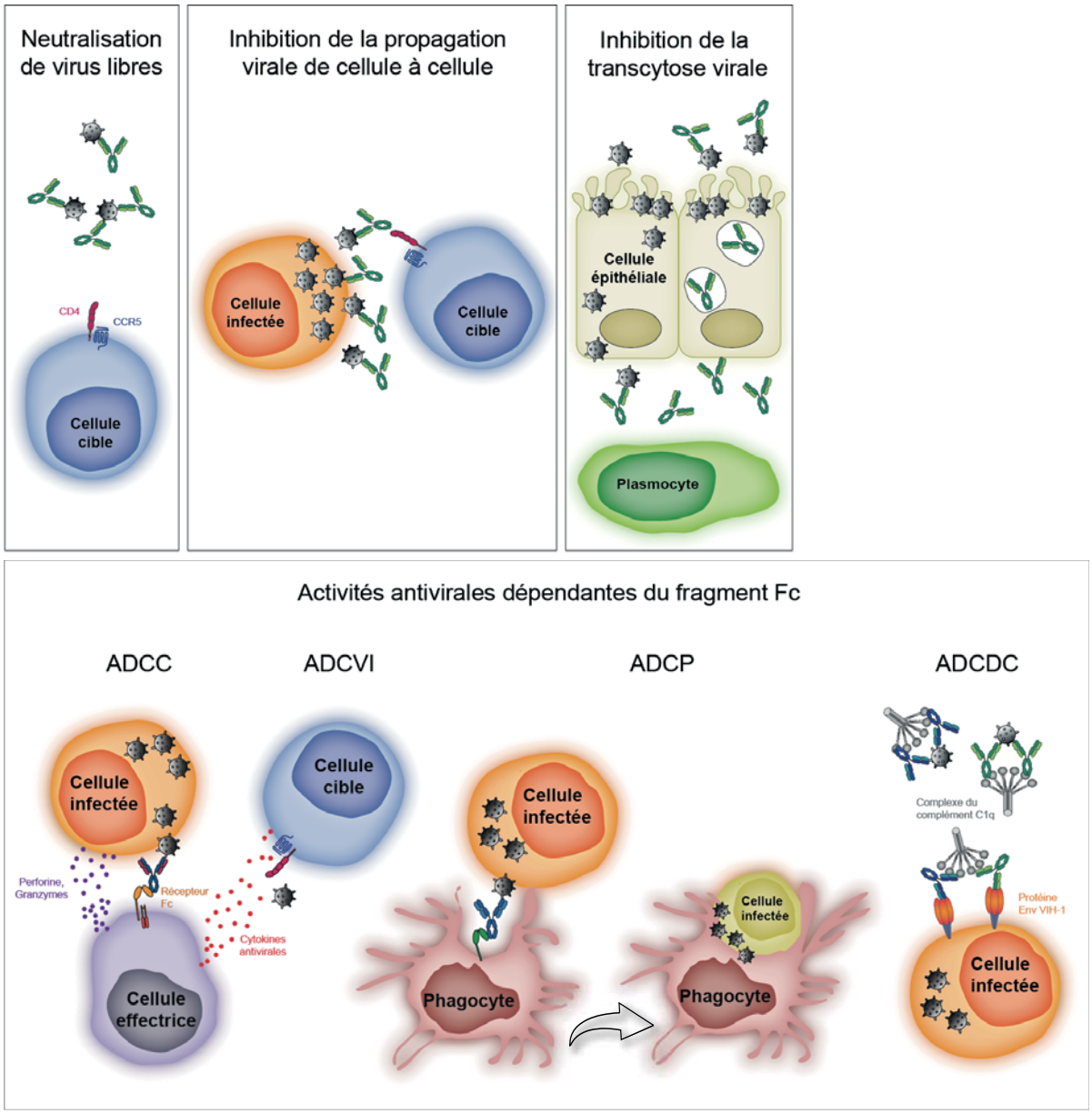


Figure 39 : Activités antivirales des bNAbs anti-VIH-1

Le mécanisme antiviral majeur des anticorps anti-VIH-1 est la neutralisation. La neutralisation de virus libres est basée sur l'inhibition par des anticorps, de l'attachement au récepteur CD4/corécepteur CCR5 ou de la fusion virale avec les cellules cibles. Seuls certains bNAbs sont capables de bloquer la transmission du virus de cellule à cellule. De plus, les bNAbs peuvent avoir un rôle majeur dans la protection des muqueuses au cours de l'infection par le VIH-1. Les anticorps anti-VIH-1 pourraient inhiber le transport trans-/intracellulaire des virions du pôle apical vers le pôle basal de cellules épithéliales polarisées. Ce transport est appelé transcytose virale. Enfin, certains anticorps anti-gp160 facilitent la clairance des cellules infectées par des mécanismes dépendants du fragment Fc tels que l'ADCC (*Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*), l'ADCVI (*Antibody-dependent cell-mediated virus inhibition*), l'ADCP (*Antibody-dependent cell-mediated phagocytosis*) ou l'ADCDC (*Antibody-dependent complement-dependent cytotoxicity*). Le fragment Fab de l'anticorps se lie à la protéine virale présente à la surface d'une cellule infectée et son fragment Fc se fixe avec le récepteur Fc (FcR) présent à la surface d'une cellule effectrice telle qu'une cellule NK (*Natural Killer*). L'interaction entre cellule effectrice activée et cellule infectée par l'intermédiaire de l'anticorps, libère des granules cytotoxiques de perforine-granzymes (ADCC) et de cytokines antivirales (ADCVI) entrainant la cytolyse ou l'apoptose de la cellule infectée. L'interaction du fragment Fc de l'anticorps aux FcR conduit à la phagocytose de virions opsonisés (ADCP) et celle avec le composant C1q déclenche une cascade de clivages successifs des protéines du complément conduisant à la lyse osmotique de la cellule infectée (ADCDC). Panel haut adapté de (Mouquet, 2014).

des niveaux hétérogènes d'Env à leur surface, qui sont très souvent, mais pas toujours, suffisants pour déclencher l'ADCC par les bNAbs. Les AnN quant à eux, sont plus modestement capables de se fixer sur ces mêmes cellules T et de médier une activité ADCC. Ces données suggèrent que les bNAbs présentent une capacité ADCC plus large et plus élevée que les AnN (Bruel et al., 2016) (Bruel et al., 2017). De plus, les IgA anti-VIH-1 (2F5-IgA2) sont aussi capables d'activité ADCC *via* le FcαRI (Duchemin et al., 2018).

4.3.5.2.2 ADCP (Antibody-dependent cell-mediated phagocytosis)

Les interactions des fragments Fc des anticorps aux FcR conduisent à la phagocytose du virion opsonisé et par conséquent, à son élimination. Les cellules capables d'induire ce mécanisme d'ADCP sont les monocytes, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles (Tay et al., 2019). L'un des tests ADCP *in vitro* est basé sur la capacité d'un anticorps à reconnaître des protéines Env (gp120 ou gp140) couplées à des billes fluorescentes et à induire la phagocytose par la lignée monocytaire THP-1 (Ackerman et al., 2011). Le travail de Sips et collaborateurs a montré que la phagocytose médiée par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles pouvait jouer un rôle dans la protection contre l'infection dans les tissus particulièrement vulnérables au VIH-1. De plus, le bNAb VRC01 (anti-CD4bs) porteur de la mutation SDIEGA (S239D/I332E/G236A) dans sa portion Fc augmente l'activité phagocytique des macrophages et des polynucléaires neutrophiles présents dans le colon (Sips et al., 2016). Une autre étude a révélé que des anticorps IgG anti-gp41 et anti-V2 présentent une activité ADCP plus importante contre les monomères mais pas, contre les trimères d'Env par rapport aux anticorps IgG anti-V3 et anti-CD4bs (Musich et al., 2017). Enfin, *in vivo*, l'ADCP mais pas l'ADCC semble directement associée dans la protection de PNH vaccinés par des vecteurs viraux Ad/MVA (Adénovirus/*Modified Vaccinia virus Ankara*) ou Ad/Ad contenant des antigènes du VIH-1 de type mosaïque puis infectés par le virus difficile à neutraliser, $SHIV_{SF162.P3}$ (Barouch et al., 2013a). Enfin, il a été montré récemment, que des anticorps IgA anti-VIH-1 sont aussi capables d'activité ADCP *via* le FcαRI (Wills et al., 2018) (Duchemin et al., 2020).

4.3.5.2.3 ADCVI (Antibody-dependent cell-mediated virus inhibition)

L'ADCVI mesure de façon plus indirecte, la diminution de la propagation virale. L'ADCVI est en effet, la conséquence de la mort cellulaire médiée par l'ADCC, de l'inhibition virale par la libération de cytokines antivirales par la cellule effectrice ou de la phagocytose du virus (Overbaugh and Morris, 2012) (**Figure 2C**).

4.3.5.2.4 ADCDC (Antibody-dependent complement-dependent cytotoxicity)

Le système du complément sert de lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Il comprend trois voies d'activation distinctes : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines. L'initiation de la voie classique se fait par l'interaction de la région Fc de l'anticorps (IgG ou IgM) avec le composant C1q (Diebolder et al., 2014). Les voies alterne et des lectines sont elles, indépendantes des anticorps. L'activation de ces voies déclenche une cascade de clivages successifs des protéines du complément. Leurs formes clivées sont reconnues par des récepteurs du complément (CR, *Complement receptor*) exprimés par les macrophages, les CD et les cellules NK. Les CR coopèrent avec les FcR pour moduler les réponses immunes dirigées contre les cibles décorées par les anticorps (Lu et al., 2018). Ces clivages entrainent la formation d'un pore lytique appelé complexe d'attaque membranaire (MAC, *Membrane attack complex*) qui conduit à l'élimination de l'agent pathogène par lyse osmotique. L'activation du complément par ces trois voies peut aussi contribuer à l'opsonisation des virions favorisant leur phagocytose ou la virolyse *via* le MAC (Blue et al., 2004).

La capacité des bNAbs à activer le complément a été très peu investiguée. Cependant, il a été récemment, montré *in vitro* que certains bNAbs (3BNC117, N6 et 10-1074) déclenchent le dépôt du composant 3 (C3) à la surface de cellules Raji exprimant un haut niveau d'enveloppe virale et induisent l'ADCDC. De même, les bNAbs déclenchent le dépôt de C3 et la formation du MAC à la surface de LT CD4+ primaires infectés, mais ce dépôt ne conduit pas à une lyse cellulaire rapide. Les auteurs indiquent que les protéines accessoires Vpu et Nef diminuent les niveaux de Env et le dépôt de C3 à la membrane plasmique tandis que la protéine cellulaire CD59 qui interfère avec l'assemblage de MAC, prévient la lyse rapide des cellules infectées. La contribution du complément aux activités antivirales des bNAbs anti-VIH-1 ouvre de nouvelles voies pour lutter contre ce virus (Dufloo et al., 2020).

4.3.5.3 Inhibition de la transcytose virale

La transcytose est un mécanisme de transport de molécules à travers des cellules épithéliales polarisées (Rojas and Apodaca, 2002) (**Figure 7**). La transcytose du VIH-1 est l'un des mécanismes potentiels de passage du virus à travers l'épithélium des muqueuses dans la transmission sexuelle du VIH-1 (**§ 3.2.3** et **Figure 39**). Les effets des anticorps anti-VIH-1 y compris des bNAbs sur la transcytose virale *in vitro* sont controversés. Ainsi, certaines études montrent l'incapacité de bNAbs anti-VIH-1 non neutralisants ou de première génération d'isotype IgG à inhiber la transcytose virale *in vitro* (Chomont et al., 2008) (Gupta et al., 2013). D'autres au contraire, illustrent la capacité des IgA anti-VIH-1 à diminuer la

transcytose virale *in vitro* (Alfsen et al., 2001) (Mantis et al., 2007) (Tudor et al., 2009) (Shen et al., 2010) (Tudor et al., 2012) (Watkins et al., 2013).

4.3.6 Ingénierie des bNAbs anti-VIH-1

Bien que les bNAbs anti-VIH-1 isolés dernièrement présentent un pouvoir neutralisant de plus en plus puissant (pan-bNAbs N6 et 1-18) et induisent une protection *in vivo* qui a permis à certains d'entre eux d'être évalué dans des essais cliniques, l'ingénierie des bNAbs permettrait d'améliorer à plusieurs niveaux, leur efficacité pour des approches curatives du SIDA avec ou sans traitement cART (Grobben et al., 2019).

4.3.6.1 Modulation du fragment Fc pour améliorer les fonctions effectrices et la demi-vie

Il est maintenant clair que la neutralisation n'est pas le seul facteur qui détermine l'efficacité du traitement par les bNAbs (Bournazos et al., 2014). Les fonctions effectrices dépendantes du fragment Fc ont été associées à la protection et pourraient être compléter ou améliorer par ingénierie. Ainsi, plusieurs mutations introduites dans la portion Fc d'anticorps ont été décrites : (i) GASDIE (G236A/S239D/I332E) ou SDIEGA (S239D/I332E/G236A) qui conduisent à une augmentation d'affinité des anticorps pour le FcγRIIa (Richards et al., 2008) ; (ii) GASDALIE (G236A/S239D/A330L/I332E) qui montre des affinités élevées pour les FcγRIIa et FcγRIIIa (Smith et al., 2012) ; (iii) E345R/E430G/S440Y qui favorisent l'hexamérisation des IgG (Diebolder et al., 2014). En conséquence, les anticorps mutés dans leur portion Fc présentent des activités ADCC, ADCP ou ADCDC plus élevées (Wang et al., 2018b). De plus, l'ingénierie du domaine Fc des bNAbs anti-VIH-1 augmentant sélectivement leur capacité à intéragir avec des récepteurs FcγR activateurs, entraine une augmentation de leur activité protectrice *in vivo* (Bournazos et al., 2014).

Les fonctions effectrices sont aussi dépendantes du statut de glycosylation de l'anticorps. Des techniques de glyco-ingénierie seraient intéressantes pour améliorer les fonctions effectrices des bNAbs anti-VIH-1 comme cela a été montré avec l'anticorps IgG VRC01 agalactosylé (G0). Ce dernier se fixe avec une forte affinité à la protéine mucine 16 (MUC16) qui tapisse les surfaces muqueuses. Les complexes VRC01(G0)-MUC16 peuvent capturer plus de virions augmentant ainsi, la protection des barrières muqueuses contre la transmission virale (Gunn et al., 2016).

Enfin, la demi-vie d'un anticorps peut être allongée par l'introduction des mutations M428L/N434S dites « LS » dans le fragment Fc entrainant une meilleure affinité des IgG pour le FcRn et ainsi, la prévention de leur dégradation cellulaire (recyclage des IgG) (Pegu

et al., 2017). En effet, le bNAb VRC01-LS testé en phase 1 chez des sujets sains présente une demi-vie d'environ 70 jours, ce qui est presque cinq fois supérieur par rapport au VRC01 non modifié (Gaudinski et al., 2018). Les bNAbs VRC01, 10-1074, 3BNC117, N6 et 10E8 en version LS ont été ou sont actuellement testés dans des essais cliniques suite à des résultats très prometteurs dans des modèles de PNH qui se traduisent par un allongement de la durée de protection (Ko et al., 2014) (Gautam et al., 2016) (Gautam et al., 2018) (Grobben et al., 2019) (**Tableau 5, § 4.3.7**).

4.3.6.2 Ingénierie des bNAbs pour améliorer l'efficacité thérapeutique

L'élargissement du spectre de neutralisation et de la puissance des bNAbs peut aussi être améliorée par l'ingénierie des anticorps. Plutôt que de mélanger plusieurs bNAbs ciblant divers épitopes afin d'augmenter la couverture de neutralisation, il est possible de combiner plusieurs Fab de différents bNAbs sur une même molécule afin de créer des anticorps bi- (VRC07/PG9-PG16 (Asokan et al., 2015)) ou tri-spécifiques (N6/PGDM1400/10E8 et VRC01/PGDM1400/10E8 (Xu et al., 2017), VRC01/PGT121/10E8 (Steinhardt et al., 2018)). Les molécules tri-spécifiques présentent une couverture de neutralisation bien supérieure aux anticorps individuels, de 99,5 ; 98 et 99,5 %, sur un panel de 208 virus, respectivement (**Figure 40**). *In vivo*, VRC01/PGDM1400/10E8 (SAR441236) semble conférer une totale protection des PNH après infection d'épreuve avec le SHIV (Xu et al., 2017). L'ingénierie d'anticorps bispécifiques peut aussi être utilisée pour la combinaison d'un bNAb anti-VIH-1 (10E8, PGT145, 3BNC117, PGT128, PGT151, PG9, PG16) et d'un anticorps dirigé contre le récepteur CD4, l'ibalizumab (iMab). Par exemple, 10E8/iMab, PG9/iMab et PG16/iMab neutralisent 100 % des virus sur un panel de 118 virus (Pace et al., 2013) (Huang et al., 2016b). A cet égard, des essais cliniques en phase 1 utilisant 10E8.4/iMab et SAR441236 ont été initiés (**Tableau 5**). Enfin, d'autres pistes ont été explorées telles que l'augmentation de la flexibilité de l'anticorps en incorporant la région charnière d'une IgG3 ou encore l'utilisation de molécules bispécifiques dépourvues de Fc qui combinent des Fab anti-VIH-1 avec des Fabs spécifiques du CD3 qui induit la destruction des cellules infectées (Grobben et al., 2019).

4.3.6.3 Ingénierie de lymphocytes B humains exprimant des bNAbs par édition génique CRISPR-Cas9

L'édition CRISPR-Cas9 (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-Cas9*) de génomes procaryote ou eucaryote consiste à introduire des cassures spécifiques de l'ADN double brin par des nucléases puis à intégrer un gène exogène d'intérêt par recombinaison homologue (Doudna and Charpentier, 2014). Une étude récente a montré

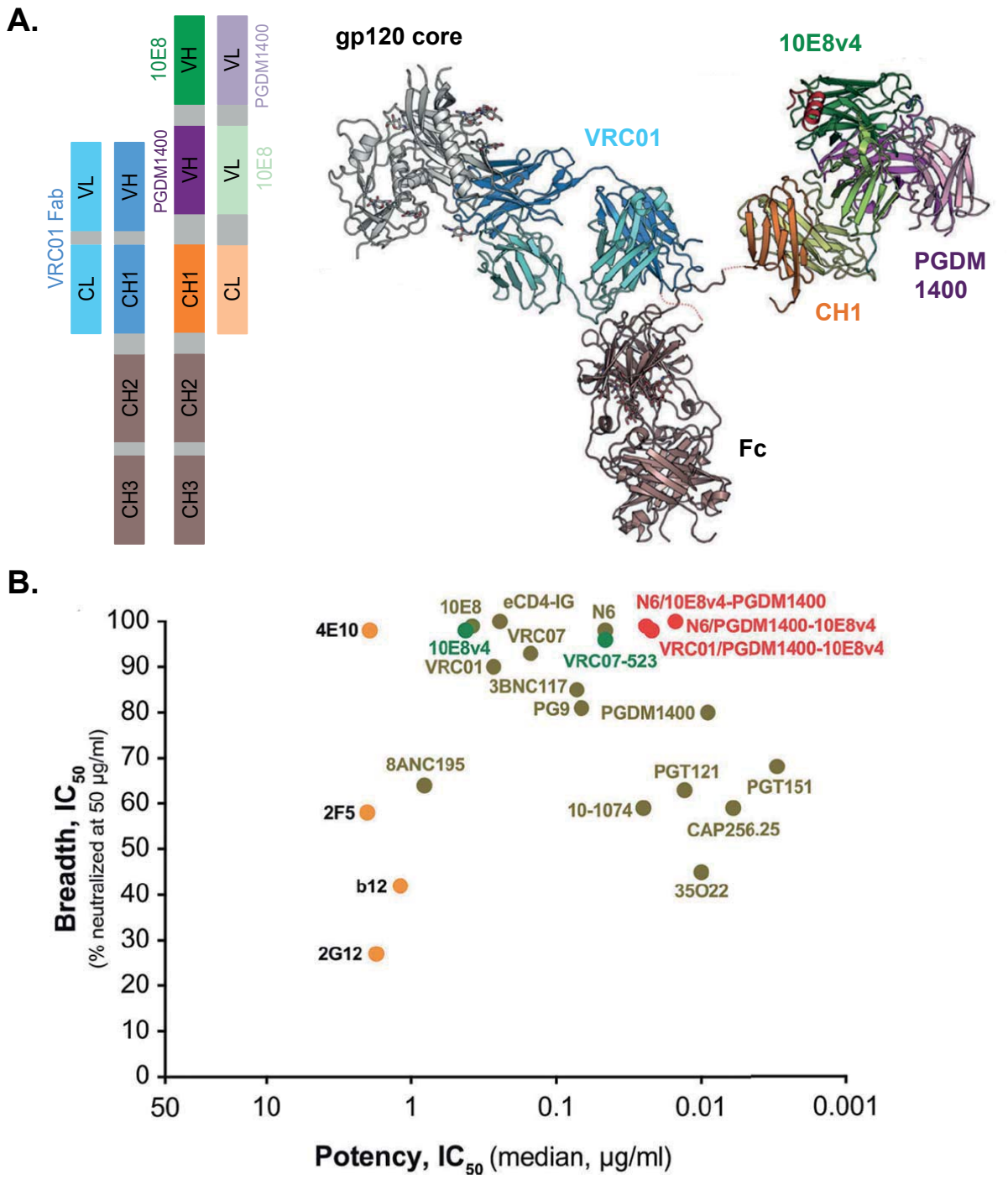


Figure 40 : Ingénierie des bNAbs : Exemple de l'anticorps tri-spécifique VRC01/PGDM1400/10E8

A. Schéma de l'organisation structurale (à gauche) et structure cristallographique (à droite) de l'anticorps tri-spécifique VRC01/PGDM1400/10E8v4 à partir de celle du bNAb VRC01 en complexe avec la gp120 (PDB 4LST). **B.** Graphique montrant la largeur du spectre (*Breadth*) en fonction de la puissance (*Potency*) de neutralisation des anticorps tri-spécifiques dont VRC01/PGDM1400/10E8v4 (en rouge) par rapport aux autres bNAbs incluant les bNAbs dits de première génération (en orange). Adapté de (Xu et al., 2017).

que des LB humains primaires peuvent être reprogrammés par le système CRISPR-Cas9 pour générer des LB transgéniques capables d'exprimer des bNAbs anti-VIH-1 tels que 10-1074 ou 3BNC60 à des fins thérapeutiques et/ou prophylactiques (Hartweger et al., 2019). En effet, chez des sujets infectés ou à risque, ces LB reprogrammés exprimant à leur surface des bNAbs pourraient continuer à participer à l'immunité humorale contre le VIH-1 en sécrétant des bNAbs mais aussi, par leur potentiel de maturation et d'évolution face aux quasi-espèces virales (Beretta and Mouquet, 2019). Bien que des obstacles restent encore à franchir, cette approche constitue une voie prometteuse dans le contexte de maladies qui nécessitent une réponse humorale spécifique et qui sont encore dépourvues de vaccin.

4.3.7 Efficacité des traitements utilisant des bNAbs

De nombreux travaux montrent qu'un vaccin protecteur contre le VIH-1 devrait induire des anticorps très largement neutralisants pour être efficaces contre la grande diversité des souches virales circulantes.

4.3.7.1 Immunothérapie à base de bNAbs dans les modèles animaux

Tandis que les PNH ont un système immunitaire intact, les souris humanisées ne développent pas de réponse adaptative robuste à l'infection. Dans des souris humanisées infectées par VIH-1_{YU2}, la monothérapie avec des bNAbs de seconde génération (3BNC117, PG16, 45-46^{G54W}, PGT128, 10-1074, BG8 ou BG18) réduit la virémie de façon transitoire avec l'apparition rapide de variants viraux d'échappement (Klein et al., 2012) (Horwitz et al., 2013) (Freund et al., 2017). Au contraire, un contrôle durable de la charge virale est observé après l'administration d'une tri- ou d'une penta-thérapie de bNAbs sans traitement cART (Klein et al., 2012) (Horwitz et al., 2013) (Freund et al., 2017). De même, une mono- (45-46^{G54W}, 10-1074, PG16 ou 3BNC117) ou une tri-thérapie (45-46^{G54W}+10-1074+PG16) de bNAbs chez des souris infectées et pré-traitées par cART permet de contrôler l'infection (Horwitz et al., 2013). De plus, chez des souris humanisées infectées par VIH-1_{YU2}, tandis que l'injection du bNAb SF12 entraine une baisse modeste de la virémie avec un rebond viral trois semaines après l'initiation de la thérapie, la tri-thérapie de bNAbs (SF12+10-1074+3BNC117) conduit à une baisse prononcée de la virémie durant les cinq semaines de traitement sans rebond viral (Schoofs et al., 2019). Enfin, dans le même modèle d'infection que précédemment, la monothérapie avec le pan-bNAb 1-18 supprime complètement la virémie sur une période de huit semaines. Contrairement à d'autres monothérapies de bNAbs contre l'infection par VIH-1_{YU2} (Klein et al., 2012) (Horwitz et al., 2013), l'immunothérapie avec 1-18 n'entraine pas l'apparition de variants d'échappement fonctionnels (Schommers et al., 2020).

Des expérimentations similaires ont été menées chez des PNH chroniquement infectés avec $SHIV_{SF162.P3}$ et $SHIV_{AD8}$. Dans les deux cas, une monothérapie avec des bNAbs (PGT121, 10-1074, N6-LS) supprime l'infection. Cependant, les deux souches de SHIV diffèrent car la monothérapie contrôle $SHIV_{SF162.P3}$ plus longtemps que $SHIV_{AD8}$. De plus, tandis que $SHIV_{SF162.P3}$ est incapable d'échappement viral avec PGT121 (Barouch et al., 2013b), 10-1074 qui cible un épitope proche de PGT121, induit rapidement une résistance du $SHIV_{AD8}$ (Shingai et al., 2013). Toutefois, la bithérapie 3BNC117+10-1074 chez des PNH infectés par $SHIV_{AD8}$ contrôle de manière prolongée l'infection sans échappement viral vis-à-vis des deux bNAbs (Shingai et al., 2013). Au contraire, la bithérapie N6-LS+PGT121 montre une efficacité relativement modeste par rapport à celle induite par PGT121 seul chez des PNH infectés par $SHIV_{SF162.P3}$ (Julg et al., 2017).

4.3.7.2 Immunoprophylaxie à base de bNAbs dans les modèles animaux

De nombreux bNAbs anti-VIH-1 administrés passivement avant l'infection de souris humanisées ou de PNH par voie vaginale, rectale, orale ont conféré des niveaux variés de protection en fonction de l'activité neutralisante du bNAb, de l'épitope ciblé et de la souche virale utilisée pour l'infection (Pegu et al., 2017). A titre d'exemples, quelques travaux qui ont utilisé des bNAbs de première (2F5, 2G12 ou b12) et de seconde générations (VRC01, 3BNC117, 10-1074) (Mascola et al., 1999) (Parren et al., 2001) (Veselinovic et al., 2012) (Ko et al., 2014) (Gautam et al., 2016). De plus, dans le modèle de PNH, il a été montré qu'une seule injection de bNAbs précédant des infections d'épreuve répétées par le $SHIV_{AD8}$ à faible dose (mimant l'exposition répétée du VIH-1 chez l'homme) par voie intra-rectale, protége contre l'infection jusqu'à 23 semaines. L'activité protectrice était directement liée à la puissance de neutralisation du bNAb. En effet, tandis que 3BNC117 et 10-1074 protègent pendant 13 semaines, VRC01, moins puissant, confère une protection plus courte de 8 semaines (Gautam et al., 2016). Dans les mêmes conditions, l'évaluation de 3BNC117-LS et de 10-1074-LS avec une demi-vie augmentée a montré un allongement de la protection de 13 à 17 semaines et de 13 à 27 semaines, respectivement (Gautam et al., 2018). Enfin, d'autres études ont comparé l'efficacité de VRC01 *versus* VRC01-LS dans des PNH infectés par $SHIV_{BaL.P4}$. Ces travaux démontrent la persistance dans le sérum et l'accumulation dans les tissus de VRC01-LS conduisant à une meilleure protection *in vivo* (Ko et al., 2014) (Gautam et al., 2016).

4.3.7.3 Effets vaccinaux induits par les bNAbs

Dans le contexte des immunothérapies médiées par les anticorps, des complexes immuns constitués d'anticorps recouvrant des virions ou des cellules infectées, peuvent

impacter la propagation virale : (i) par des mécanismes directs qui dépendent de la région Fc des anticorps tels que l'ADCC, l'ADCP ou l'ADCDC ; (ii) par des mécanismes indirects avec la reconnaissance des complexes immuns *via* des FcγR exprimés à la surface de CPA (CD) engageant la stimulation des réponses immunes de l'hôte à la fois, cellulaire et humorale, pour induire une immunité protectrice durable. Ce sont les effets dits vaccinaux qui peuvent être induits par les anticorps dirigés contre des virus humains tels que le VIH-1 ou le virus respiratoire syncytial (Pelegrin et al., 2015) (Naranjo-Gomez and Pelegrin, 2019). Des travaux ont montré que ces effets vaccinaux peuvent être induits par des immunothérapies à base de bNAbs anti-VIH-1 chez les PNH avec PGT121, 3BNC117 et b12 (Barouch et al., 2013b) ou HGN194 (Watkins et al., 2011) mais aussi, chez l'homme puisque l'amélioration des réponses humorales anti-VIH-1 a été rapportée pour la première fois chez des individus infectés virémiques et sous cART après l'administration du bNAb 3BNC117 (Schoofs et al., 2016). Afin d'améliorer les effets vaccinaux médiés par les bNAbs anti-VIH-1, deux approches complémentaires pourraient être envisagées par : (i) Fc-ingénierie et la glyco-ingénierie du fragment Fc des bNAbs afin d'augmenter leur affinité pour le FcRn, les FcγR ou les CR (**§ 4.3.6.1**) ; (ii) des traitements complémentaires avec des molécules immunostimulatrices et des agents d'inversion de latence (LRA, *Latency-reversing agents)* (Naranjo-Gomez and Pelegrin, 2019).

4.3.7.4 Essais cliniques chez l'homme

Plusieurs essais cliniques de phase 1 et 2 pour l'évaluation de bNAbs seuls ou en combinaisons, infusés par différentes voies d'administration (Intra-veineuse, IV ou sous-cutanée, SC), associés ou non à des traitements cART ont été, sont actuellement ou vont être réalisés (Gruell and Klein, 2018) (Grobben et al., 2019) (Caskey et al., 2019) (**Tableau 5**). Différentes stratégies sont considérées pour ces essais cliniques : (1) chez des adultes infectés (i) durant l'interruption du traitement cART appelé ATI pour *Analytical treatment interruption* ; (ii) dans l'optique du « *shock and kill* » ciblant les réservoirs viraux ; (iii) avec la combinaison de bNAbs pour la suppression du VIH-1 ; (iv) en prévention chez des adultes sains à risque ou (2) chez des nourrissons infectés ou exposés (Gruell and Klein, 2018). Les essais cliniques déjà finalisés permettent de dire que les bNAbs procurent généralement une sécurité d'emploi et sont très bien tolérés (**Tableau 5**).

bNAbs	Statut des essais cliniques	Réf/Divers
	Thérapie avec un seul bNAb anti-VIH-1	
3BNC117	NCT02018510 phase 1 Sur volontaires infectés et non infectés	(Caskey et al., 2015)
	NCT02446847 phase 2 Sur sujets infectés ATI	(Scheid et al., 2016)
	NCT02588586 phase 2 Durant brève ATI sur sujets infectés	(Cohen et al., 2018)
3BNC117 + Romidepsine	NCT02850016 phase 2a Sur patients infectés ATI	*Shock and kill*
3BNC117 + Romidepsine	NCT03041012 phase 2 Pour limiter l'établissement de réservoirs viraux durant l'initiation de cART	*Shock and kill*
VRC01	NCT01993706 phase 1	(Ledgerwood et al., 2015)
	NCT01950325 phase 1	(Lynch et al., 2015)
	NCT02165267 phase 1	(Mayer et al., 2017)
	NCT02463227 phase 1 NCT02471326 Sur patients infectés ATI	(Bar et al., 2016)
	NCT02568215 phase 2b Prévention de l'infection parmi des femmes hétérosexuelles à risque (1900 participants)	Afrique sub-saharienne
	NCT02716675 phase 2b Prévention de l'infection parmi des hommes/transgenres homosexuels (2701 participants)	Amérique du Nord et du Sud, Suisse
	NCT02664415 phase 2 Sur patients ayant commencé cART pendant la phase aigüe de l'infection	
	NCT02411539 phase 1 Sur adultes infectés sous cART	
	NCT02591420 phase 1 Sur adultes durant la phase aigüe de l'infection	
	NCT03208231 phase1/2 Combiné à cART pour favoriser l'élimination des cellules infectées chez 68 nourrissons	
10-1074	NCT02511990 phase 1 Sur individus sains et infectés	(Caskey et al., 2017)
10-1074 + Romidepsine	NCT03619278 phase1/2A Sur patients chroniquement infectés sous cART	*Shock and kill*
PGT121	NCT02960581 phase 1 Sur individus sains et infectés	
2G12	NCT02923999 phase 1 Sur sujets sains	
PGDM1400	NCT03205917 phase 1 Sur individus sains	
	Thérapie avec bNAbs LS anti-VIH-1	
3BNC117-LS	NCT03254277 phase 1 Sur participants sains et infectés par VIH-1	
VRC01, VRC01-LS, VRC07-523-LS	NCT02256631 phase 1 Sur nourrissons exposés au VIH-1qui présentent un risque de transmission mère-enfant	
VRC01 et VRC01-LS	NCT02797171 phase 1 Sur 80 participants sains	
	NCT02599896 phase 1 Sur individus sains	(Gaudinski et al., 2018)
VRC01-LS ou VRC07-523-LS	NCT02840474 phase 1 Sur adultes infectés	
VRC07-523-LS	NCT03015181 phase 1 Sur individus sains	
	NCT03387150 phase 1 Sur individus sains	
N6-LS	NCT03538626 phase 1 Sur individus sains	
10-1074-LS seul 10-1074-LS + 3BNC117-LS	NCT03554408 phase 1 Sur individus sains Sur individus infectés	
10E8V-LS ± VRC07-523-LS	NCT03565315 phase 1 Sur adultes sains Etude stoppée	Réactions locales après injection de 10E8V-LS

Thérapie combinée de bNAbs anti-VIH-1		
2F5 + 2G12 + 4E10	NCT00219986 phase 1/2 Sur sujets infectés sous cART	(Armbruster et al., 2004) (Joos et al., 2006)
10-1074 + VRC01	NCT03831945 phase 1 Sur personnes infectées par le VIH subissant des ATI séquentielles	
10-1074 + 3BNC117	NCT02824536 phase 1 En prophylaxie sur participants sains à risque	
3BNC117 + 10-1074	NCT02825797 phase 1b Sur individus infectés ± cART	(Bar-On et al., 2018) (Mendoza et al., 2018)
3BNC117 + 10-1074	NCT03526848 phase 1 Sur individus infectés sous ART ± brève ATI	
3BNC117 + 10-1074	NCT03571204 phase 1 Sur individus infectés ± cART	
3BNC117 + 10-1074 ± peg-IFN-α2b	NCT03588715 phase 1 Sur individus infectés	
PGDM1400 + PGT121 ± VRC07-523-LS	NCT03205917 phase 1 Sur individus sains et infectés sans cART	
PGT121 + VRC07-523-LS ± PGDM1400	NCT03721510 phase 1/2a Sur individus sains et infectés sous cART	
Thérapie avec des bNAbs multi-spécifiques anti-VIH-1		
10E8.4/iMab	NCT03875209 phase 1 Sur sujets sains et infectés	
SAR441236	NCT03705169 phase 1 Sur sujets infectés	

Tableau 5 : Synthèse des essais cliniques passés, en cours et à venir utilisant des bNAbs anti-VIH-1.
Phase 1 : Déterminer la sécurité d'emploi, la toxicité et études pharmacocinétiques chez des volontaires sains généralement. *Phase 2* : Déterminer la posologie optimale en terme d'efficacité et de tolérance chez des sujets malades. Stratégie « *shock and kill* » : des drogues (LRA, *Latency-reversing agents*) sont utilisées pour réactiver les VIH-1 latents dans les cellules des réservoirs (*shock*) puis les cibler et les tuer par des cellules immunes ou des molécules anti-VIH-1 (*kill*). La romidespine est un LRA et correspond à un puissant inhibiteur des histones deacétylases (HDACi). cART, thérapies antirétrovirales combinées ; ATI, *Analytical treatment interruption*. SAR441236 correspond à l'anticorps tri-spécifique anti-VIH-1 VRC01/PGDM1400/10e8v4. Adapté de (Gruell and Klein, 2018) (Grobben et al., 2019).

Un des premiers essais cliniques de phase 1 réalisé chez huit patients infectés par le VIH-1 mais asymptomatiques, a montré que des bNAbs de première génération, 4E10 seul ou en combinaison avec 2F5 et 2G12, sont bien tolérés mais très faiblement immunogéniques (Armbruster et al., 2004). Au contraire, une diminution importante de la virémie pendant 20-28 jours a été observée chez des sujets infectés suite à l'administration passive de 30-40 mg/kg de bNAbs de seconde génération en monothérapie tels que 3BNC117 (Caskey et al., 2015), VRC01 (Lynch et al., 2015) ou 10-1074 (Caskey et al., 2017). Mais, un rebond viral se produisait généralement dans les quatre semaines. De plus, l'évaluation de 3BNC117 après ATI chez 13 sujets infectés a montré un décalage du rebond viral de 7 et 10 semaines après deux ou quatre injections de 3BNC117, respectivement. Le rebond viral était associé à une augmentation de la résistance à l'anticorps (Scheid et al., 2016). Des résultats similaires ont été observés avec VRC01 (Bar et al., 2016). Enfin, deux

essais cliniques à très grande échelle évaluent actuellement la sécurité d'emploi et l'efficacité de VRC01 en prévention dans des populations à risque selon les modalités de dix injections à huit semaines d'intervalles de VRC01 à 10 ou 30 mg/kg en IV *versus* placebo (**Tableau 5**).

Afin de pallier à l'émergence de résistance virale observée en monothérapie, des essais cliniques plus récents ont évalué des combinaisons de bNAbs ciblant des épitopes distincts chez des patients infectés virémiques (sans traitement cART) ou après ATI. Par exemple, trois injections de 3BNC117/10-1074 chez des individus infectés par des VIH-1 sensibles à ces bNAbs, diminuent fortement la virémie jusqu'à 12 ou 21 semaines après la dernière injection, respectivement tant que les deux bNAbs sont détectés dans le sérum (au-dessus de 10 µg/ml) sans apparition de variants viraux double-résistants (Bar-On et al., 2018) (Mendoza et al., 2018). Un traitement cART suivi d'une thérapie à base de bNAbs pourrait être une stratégie prometteuse pour un contrôle à long terme du VIH-1. Enfin, dans la stratégie de type « *Shock and kill* », l'utilisation de bNAbs (3BNC117, 10-1074) combinée à la Romidepsine (puissant inhibiteur d'histones deacétylases, LRA) est actuellement à l'étude pour éliminer les cellules infectées des réservoirs viraux (**Tableau 5**).

Les combinaisons de bNAbs comme d'ailleurs, celles de molécules antivirales des traitements cART, sont des molécules qui ciblent des sites distincs. Les traitements cART sont hautement efficaces sur la réplication virale ou sur le risque de transmission, mais sont des traitements à vie avec une prise journalière ou plus espacée, qui peuvent occasionner des effets secondaires ou des résistances. Les thérapies à base de bNAbs formulées à haute concentration et administrées en SC pour une auto-injection, présentent quant à elles beaucoup d'avantages : (i) les bNAbs à longue durée de vie de type LS permettraient une diminution de la fréquence d'administration et des problèmes de non adhérence au traitement ; (ii) une sécurité d'emploi et une absence de toxicité ; (iii) une alternative pour les patients qui présentent des effets secondaires ou des résistances aux traitements cART. Les bNAbs ciblent directement les virus circulants, peuvent éliminer les cellules infectées exprimant Env et peuvent améliorer les réponses immunitaires adaptatives anti-VIH-1, à la fois cellulaire T CD4+ et CD8+ et humorale (Naranjo-Gomez and Pelegrin, 2019). Les limitations des bNAbs sont : (i) la production coûteuse sous forme de grade clinique ; (ii) l'apparition de variants viraux résistants ; (iii) les effets limités sur les réservoirs viraux et sur leur détection (Gruell and Klein, 2018) (Caskey et al., 2019) (Grobben et al., 2019). Les nouveaux bNAbs modifiés (LS par exemple) et de meilleures combinaisons de bNAbs pourraient donc, constituer un traitement alternatif en remplacement ou en association des

traitements cART/LRA, pour lutter efficacement contre la grande diversité des souches de VIH-1 circulantes en attendant la découverte d'un vaccin.

OBJECTIFS DE THESE

La transmission sexuelle du VIH-1 intervient au niveau des muqueuses génitales qui constituent les principales portes d'entrée du virus. La transmission se fait *via* le transport de virus à travers les muqueuses uro-génitales, soit par l'intermédiaire de cellules infectées, soit par des virions « libres » qui transitent par un mécanisme de transcytose. Le VIH-1 se dissémine ensuite dans l'organisme, et peut traverser l'endothélium de la BHE par la migration de monocytes et/ou de LT CD4+ infectés et potentiellement par le transport direct de virus libres à travers les cellules endothéliales (Kahn and Walker, 1998) (Gonzalez-Scarano and Martin-Garcia, 2005). Les cellules infectées de manière latente dans les tissus muqueux comme dans le SNC constituent des réservoirs viraux du VIH-1, ce qui lui permet de persister dans l'organisme malgré l'efficacité des traitements cART qui se manifeste par la diminution de la virémie jusqu'à des niveaux indétectables.

Les premiers AN autologues anti-gp160 apparaissent plusieurs semaines après la séroconversion et exercent une pression de sélection sur les virions qui vont acquérir des mutations d'échappement. Ce n'est qu'après plusieurs mois voir quelques années, que des AN hétérologues sont détectés chez 20 à 30 % des patients chroniquement infectés. Parmi eux, environ 1-2 % des sujets développent des anticorps neutralisants à large spectre, 2 à 3 ans post-infection (Euler and Schuitemaker, 2012). Ces bNAbs, en quasi-majorité des anticorps de sous-classe IgG1 et IgG3, sont des molécules effectrices versatiles capables de neutraliser les virions libres et associés aux cellules mais aussi, d'éliminer les cellules infectées *via* les fonctions effectrices dépendantes de leur région Fc (Mouquet, 2014). Les bNAbs les plus puissants protègent contre l'infection par le VIH-1 dans des modèles de souris humanisées (Horwitz et al., 2013), ou de PNH avec le SHIV (Gautam et al., 2016) (Gautam et al., 2018). Leur utilisation en clinique a par ailleurs montré un bénéfice clair en réduisant la virémie (Caskey et al., 2015) (Lynch et al., 2015) (Caskey et al., 2017) et en induisant des réponses de type vaccinales chez des sujets infectés virémiques ou sous cART (Schoofs et al., 2016). Toutefois, il est important de noter que bien que les IgG dirigées contre les protéines virales dont l'Env prédominent, des IgA anti-Env sont présentes dans les muqueuses et circulent aussi dans le sang. A cet égard, une étude très récente montre que des bNAbs d'isotype IgA peuvent être naturellement produits au cours de l'infection (Jia et al., 2020). Ainsi, les IgG mais aussi les IgA anti-Env contribueraient à l'activité séro-neutralisante globale (Jia et al., 2020).

L'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier de manière globale les mécanismes par lesquels les bNAbs de classes IgG et IgA interfèrent ou bloquent la transmission et la dissémination du VIH-1. Pour cela, deux axes de recherche ont été abordés.

Premièrement, l'étude du rôle des bNAbs contre la migration virale à travers deux barrières tissulaires d'intérêt majeur au cours de l'infection par le VIH-1 : l'épithélium de l'endomètre du tractus génital féminin (IgG et IgA) et l'endothélium de la BHE (IgG). Pour cela, nous avons développé des systèmes de culture cellulaire *in vitro* utilisant des cellules humaines HEC-1A et hCMEC/D3, respectivement, couplés à des analyses de microscopie confocale afin d'étudier en détail la transcytose du VIH-1 à travers l'épithélium muqueux et l'endothélium de la BHE en présence d'anticorps humains anti-Env y compris de bNAbs.

Deuxièmement, considérant l'absence de caractérisation des réponses anticorps IgA mémoires contre le VIH-1, l'un des objectifs de ce travail a été de caractériser au niveau moléculaire et fonctionnel en utilisant la stratégie de clonage et d'expression d'anticorps monoclonaux à partir de cellules B uniques, ainsi qu'au niveau structural, des anticorps IgA monoclonaux humains anti-Env isolés d'individus chroniquement infectés de type Elite. Considérant que les IgA n'utilisent pas les mêmes récepteurs (FcαRI *versus* FcγR) et les mêmes cellules effectrices (Monocytes/Macrophages/Neutrophiles *versus* cellules NK/ Monocytes/Macrophages/Neutrophiles/CD) que les IgG, l'évaluation des fonctions effectrices dépendantes du fragment Fc des IgA telles que l'ADCC ou l'ADCP a nécessité des développements technologiques, L'autre objectif de cette étude a été d'évaluer la protection induite par les IgA anti-VIH-1 *in vivo* dans un modèle de souris humanisées infectées et traitées par un traitement antirétroviral combiné.

L'ensemble de ces travaux permettra d'une part, d'identifier les mécanismes par lesquels les bNAbs préviennent la transmission du VIH-1 à travers deux barrières tissulaires particulièrement sensibles au cours de l'infection par le VIH-1 et d'autre part, de caractériser de nouveaux IgA anti-VIH-1 cross-neutralisants par leurs propriétés fonctionnelles, structurales et protectrices *in vivo*.

RESULTATS

ARTICLE 1

Broadly Neutralizing Antibodies Suppress Post-Transcytosis HIV-1 Infectivity

V Lorin[1], M Malbec[1], C Eden[2], T Bruel[3], F Porrot[3], MS Seaman[4], O Schwartz[3] and H Mouquet[1].

1 Laboratoire Réponse Humorale aux Pathogènes, INSERM U1222, Département d'Immunologie, Institut Pasteur, Paris, France **2** Laboratory of Molecular Immunology, The Rockfeller University, New York City, New York, USA **3** Unité Virus et Immunité, CNRS URA3015, Département de Virologie, Institut Pasteur, Paris, France **4** Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, Massachusetts, USA.

Publié dans Mucosal Immunology : Lorin *et al*., Mucosal Immunol 2017 May;10(3):814-826. doi: 10.1038/mi.2016.106. PMID : 279665

Les muqueuses génitales constituent les principales portes d'entrée du VIH-1. Après l'événement de transmission sexuelle, le VIH-1 pénètre à travers la muqueuse urogénitale et infecte localement les premières cellules cibles qu'il rencontre (cellules de Langerhans, LT CD4+, CD tissulaires). La transmission virale s'effectue par différentes voies : (i) la diffusion passive de virus libres ou de cellules infectées suite à la rupture de l'effet barrière ; (ii) par la transmigration de cellules infectées par diapédèse ; (iii) par la capture du VIH-1 depuis la surface de la muqueuse par les dendrites des cellules intra- et/ou subépithéliales ; (iv) par transcytose qui correspond au passage de virions libres à travers des cellules épithéliales polarisées du pôle apical vers le pôle basal (Frouard et al., 2018) (Gonzalez et al., 2019). Le VIH-1 atteint les ganglions lymphatiques puis se dissémine à tout l'organisme par l'intermédiaire des cellules infectées (Kahn and Walker, 1998). Les IgG transsudatées (Passage d'IgG du plasma vers les muqueuses par transsudation) et les IgA sécrétoires sont des composants majeurs de l'immunité humorale des tissus muqueux. Les IgA pourraient être impliquées dans la protection contre l'infection au niveau muqueux chez des sujets hautement exposés au VIH-1 mais qui demeurent séronégatifs (Devito et al., 2000) et chez des PNH infectés par le SHIV en bloquant la transcytose virale (Watkins et al., 2013). Cependant, les effets des anticorps anti-VIH-1 sur la transcytose du virus restent débattus.

Les bNAbs se développent chez 1-2 % des patients chroniquement infectés après plusieurs années de coévolution entre virus et anticorps. Ils ciblent différents épitopes sur la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1 (Mouquet, 2014). L'immunothérapie passive des bNAbs dits de seconde génération, les plus puissants, ciblant le site de liaison au CD4 et les N-glycanes associés à la boucle V3 de l'Env, seuls ou en combinaisons, protègent contre l'infection dans des modèles SHIV chez les PNH. Ils diminuent également de manière drastique, la virémie dans des modèles animaux en préclinique (souris humanisées et PNH) et chez les individus infectés en clinique (Caskey et al., 2019) (Grobben et al., 2019). La neutralisation virale et les fonctions effectrices dépendantes du fragment Fc (ADCC, ADCP) des bNAbs jouent probablement un rôle clé dans les activités antivirales *in vivo*. Cependant, les mécanismes par lesquels les bNAbs sont capables d'interférer avec la transmission muqueuse du VIH-1 ne sont pas bien connus.

Pour qu'un vaccin soit efficace contre le VIH-1, il doit induire des anticorps très largement neutralisants ; il est donc important de comprendre les mécanismes d'inhibition virale médiés par les bNAbs au niveau des muqueuses.

Dans cette étude, nous avons sélectionné cinq bNAbs de seconde génération représentatifs ciblant différents épitopes de l'Env : NIH45-46, 3BNC117 ciblant le site de liaison au CD4, 10-1074 ciblant les N-glycanes associés à la boucle V3, PG16 ciblant les N-

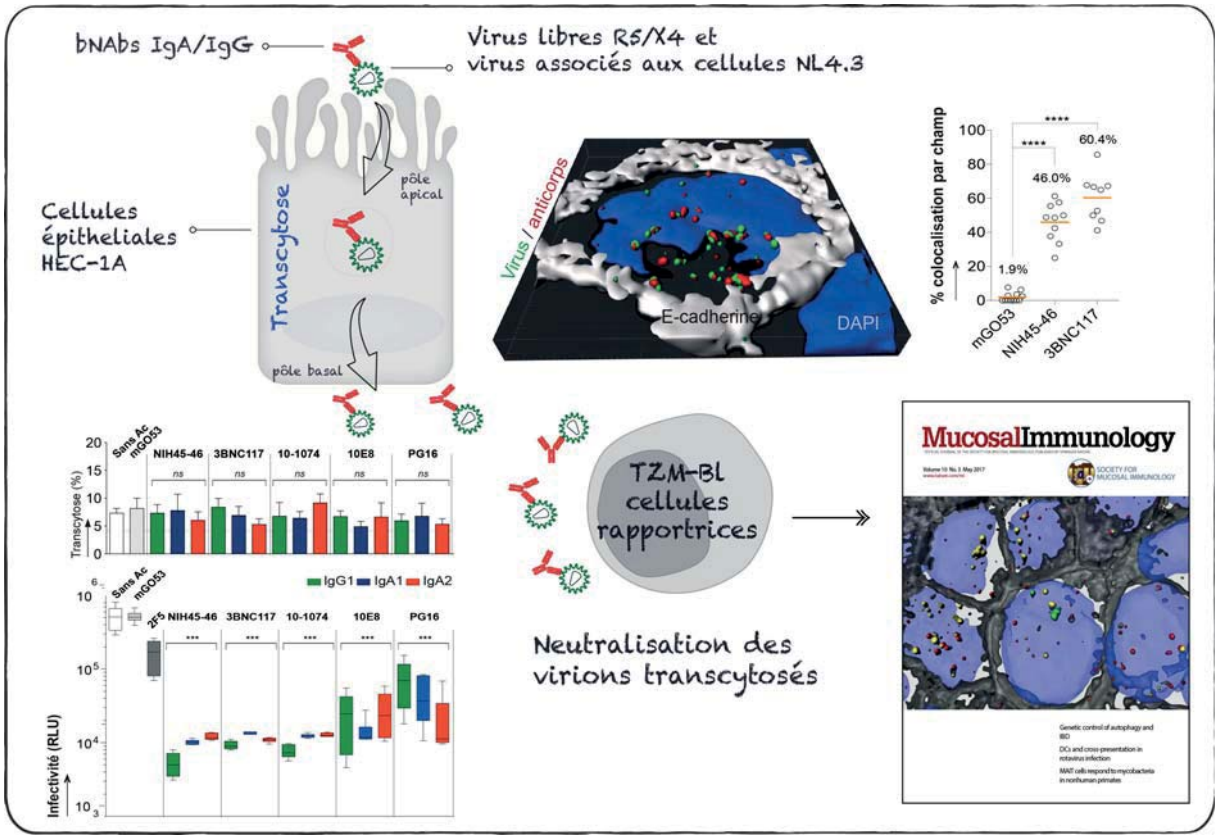
glycanes associés aux boucles V1/V2 et 10E8 ciblant le MPER. Ces bNAbs ont été exprimés et produits sous forme d'IgG1, d'IgA1 et d'IgA2. Nos résultats montrent que la commutation de classe IgG vers IgA des cinq bNAbs étudiés ne modifie ni leur affinité vis-à-vis de leurs épitopes sur la gp160, ni leurs propriétés antivirales (neutralisation de virus libres et transmission virale de cellule à cellule).

Afin d'étudier l'effet des bNAbs sur la transcytose virale au travers d'épithéliums muqueux, nous avons développé un test de transcytose virale *in vitro* en utilisant une monocouche de cellules épithéliales polarisées de l'endomètre humain (HEC-1A) (Bomsel, 1997). En accord avec les mesures de résistances électriques transépithéliales, les cellules HEC-1A forment une monocouche confluente en six jours qui est caractérisée par la formation de jonctions serrées avec l'expression de E-cadhérine détectée par immunofluorescence, et par l'absence de perméabilité aux molécules de DEAE-Dextran. Des expériences ont aussi été réalisées avec deux autres lignées de cellules épithéliales de l'intestin, Caco-2 et T84. Tout d'abord, nous avons évalué les effets des bNAbs IgG1 et IgA1/IgA2 sur la transcytose du VIH-1. Nos investigations ont montré que les bNAbs IgG1 et IgA (mIgA, dIgA et pIgA) n'interfèrent pas avec la transcytose virale en conditions de virus libres ou associés aux cellules, et que la transcytose est indépendante de l'enveloppe virale.

Afin d'étudier le passage des VIH-1 et des bNAbs à travers les cellules épithéliales, des analyses de microscopie confocale ont été réalisées pour visualiser les virus, les anticorps (NIH45-46, 3BNC117 et mGO53 contrôle isotypique) ou les complexes virus-anticorps et pour quantifier les évènements de colocalisation. Nos résultats montrent que seuls les bNAbs anti-VIH-1 colocalisent avec les virions : 46,0 et 60,4 % pour NIH45-46 et 3BNC117, respectivement contre 1,9 % pour mGO53. Dans ces expériences, les complexes VIH-1-bNAbs sont distribués sur toute l'épaisseur de la monocouche cellulaire.

Enfin, nous avons démontré que les bNAbs inhibent l'infectivité des virions transcytosés et ceci, de manière dose dépendante.

En conclusion, les résultats de notre étude mettent en lumière l'un des mécanismes potentiels par lequel les bNAbs préviennent la transmission du VIH-1 dans les muqueuses, en ne bloquant pas le transport du virus à travers les cellules épithéliales des muqueuses génitales et intestinales mais en neutralisant les virions transcytosés. Comprendre les processus impliqués dans la prévention de la transmission muqueuse du VIH-1 par les bNAbs est donc essentiel afin d'optimiser les immunothérapies à base d'anticorps et de développer de nouvelles stratégies vaccinales.



L'ensemble de ce travail a été publié dans le journal *Mucosal Immunology* dont notre article a fait la couverture du numéro de mai 2017.

OPEN

Broadly neutralizing antibodies suppress post-transcytosis HIV-1 infectivity

V Lorin[1,2,3,10], M Malbec[1,2,10], C Eden[4,5,10], T Bruel[6,7,8], F Porrot[6,7], MS Seaman[9], O Schwartz[6,7,8] and H Mouquet[1,2,8]

Broadly neutralizing antibodies (bNAbs) offer promising opportunities for preventing HIV-1 infection in humans. Immunoprophylaxis with potent bNAbs efficiently protects non-human primates from mucosal transmission even after repeated challenges. However, the precise mechanisms of bNAb-mediated viral inhibition in mucosal tissues are currently unknown. Here, we show that immunoglobulin (Ig)G and IgA bNAbs do not interfere with the endocytic transport of HIV-1 across epithelial cells, a process referred to as transcytosis. Instead, both viruses and antibodies are translocated to the basal pole of epithelial cells, possibly in the form of an immune complex. Importantly, as opposed to free virions, viral particles bound by bNAbs are no longer infectious after transepithelial transit. Post-transcytosis neutralization activity of bNAbs displays comparable inhibitory concentrations as those measured in classical neutralization assays. Thus, bNAbs do not block the transport of incoming HIV-1 viruses across the mucosal epithelium but rather neutralize the transcytosed virions, highlighting their efficient prophylactic and protective activity *in vivo*.

INTRODUCTION

Genitorectal mucosal surfaces are frequent portals of entry for HIV-1.[1,2] Mucosal transmission of HIV-1 is mediated by virus-infected cells or by free infectious virions and is a rapid process, with viral spread to draining lymph nodes occurring within a few days.[3,4] Viral dissemination necessitates the passage of viruses across the mucosal epithelium, and the subsequent infection of subepithelial dendritic cells, macrophages, or T cells.[4] Transport of HIV-1 through intact mucosal tissues can be mediated by M cells in pseudostratified epithelium of the intestine,[5] and by dendritic cells sampling antigens in the lumen.[6] Moreover, intraepithelial T lymphocytes and Langerhans cells constitute primary HIV-1 target cells that can later on efficiently transfer viruses to susceptible cells in subepithelial stromal tissues.[7,8] Lastly, a process called transcytosis is thought to be one of the major mechanisms involved in HIV-1 translocation across the single-layer columnar epithelium found in the vaginal endocervix, colon, and rectum.[9] Transcytosis is a transcellular transport of cargo molecules from the apical to the basal end of polarized epithelia via endocytic vesicles.[9]

Antibodies, particularly locally produced secretory immunoglobulin (Ig)A and transudated IgG are well known to protect mucosal tissues from invading pathogens.[10] In this regard, there is suggestive evidence that antibodies might block HIV-1 transcytosis at mucosal sites.[11] HIV-infected individuals and more interestingly, HIV-exposed individuals that are persistently seronegative (HEPS) can develop mucosal HIV-specific IgAs capable of blocking viral transcytosis through epithelial cells.[12–14] In addition, monoclonal IgA antibodies against HIV-1 envelope protein gp160 have been shown to inhibit intracellular HIV replication and HIV transcytosis.[15,16] However, whether HIV-specific antibodies actually inhibit viral transcytosis is still debated.[11]

Several years after co-evolution with diversifying viruses, B-cell maturation can lead, in rare infected individuals, to the development of cross-reactive antibodies called broadly neutralizing antibodies (bNAbs) capable of neutralizing most of the known HIV-1 strains.[11] Over the past decade, the most potent and broad HIV-1 bNAbs, categorized as "next generation", have been isolated and characterized thereby

[1]Laboratory of Humoral Response to Pathogens, Department of Immunology, Institut Pasteur, Paris, France. [2]INSERM U1222, Paris, France. [3]Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France. [4]Laboratory of Molecular Immunology, The Rockefeller University, New York City, New York, USA. [5]Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York City, New York, USA. [6]Virus & Immunity Unit, Department of Virology, Institut Pasteur, Paris, France. [7]CNRS URA3015, Paris, France. [8]Vaccine Research Institute, Créteil, France and [9]Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, Massachusetts, USA. Correspondence: H Mouquet (hugo.mouquet@pasteur.fr)
[10]These authors contributed equally to this work.

Received 23 May 2016; accepted 25 October 2016; advance online publication 14 December 2016. doi:10.1038/mi.2016.106

allowing the mapping of conserved and functionally critical epitopes on the HIV-1 surface envelope glycoprotein gp160. Five of these pan-neutralizing epitopes named "supersites of vulnerability" have been identified so far: the CD4 binding site, *N*-glycan-associated epitopes on the V1/V2 loops and the V3 loop, the membrane proximal external region (MPER) on gp41, and the *N*-glycan-associated gp120/gp41 bridging region.[11] Passive immunotherapy with potent HIV-1 bNAbs has been shown to protect from infection in animal models,[17–21] particularly from mucosal infection even after repeated virus challenges.[22–28] In addition, passive administration of a single dose of CD4 binding site-specific bNAbs can substantially reduce viraemia in infected humans.[29,30] Potency of the inhibitory activity against cell free and cell-to-cell infection,[17,31] as well as Fc-dependent effector function of bNAbs such as antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC),[32] likely play critical roles for *in vivo* protection.[33–36] But whether bNAbs are effective in *in vivo* models using mucosal challenges due to their ability to directly interfere with viral transcytosis and/or to decrease the infectivity of transcytosed viruses is not yet known.

Since successful HIV-1 vaccines would ideally elicit cross-neutralizing antibodies capable of protecting mucosal tissues, it is thus important to understand the mechanisms allowing bNAbs to interfere with the mucosal transmission of HIV-1. A better comprehension of these mechanisms will also help optimize immunotherapy strategies to confer pre-exposure prophylaxis. In this study, we show that potent bNAbs were unable to block *in vitro* HIV-1 transcytosis, which we found to be independent of envelope glycoproteins, but efficiently inhibited the infectivity of the transcytosed virus. Their inhibitory activity was not dependent on the targeted epitopes and antibody sub-classes but directly correlated to *in vitro* potency for neutralizing cell-free viruses. These findings highlight the mechanisms involved in the potential prophylactic activity of HIV-1 bNAbs.

RESULTS

IgA class-switched HIV-1 bNAbs maintain their binding specificities

To test the activity of next generation HIV-1 bNAbs against viral transcytosis, we selected five of the most potent and broad antibodies. Two of them bind to the CD4 binding site, 3BNC117, and NIH45-46;[37] PG16[38] and 10-1074[39] react with *N*-glycan-associated V1/V2- and V3-loop epitopes, respectively; and 10E8 recognizes the membrane proximal external region on the gp41 subunit.[40] To directly compare the activity of IgG *vs* IgA immunoglobulins, we generated HIV-1 bNAbs as recombinant IgG1, IgA1, and IgA2 monoclonal antibodies (**Supplementary Figure S1** online).[41] To determine whether the IgA class-switching can preserve the original binding properties of IgG1 bNAbs, we tested monomeric IgA and IgG bNAbs' recognition of gp160 expressed by virus-infected cells or purified as a recombinant protein. Flow cytometry analysis showed that apart from 10E8, all IgG1, IgA1, and IgA2 bNAbs bound to MT4C5 lymphoblastoid T cells infected by the NLAD8 viral strain, although a direct comparison between IgG and IgA molecules was not possible (due to the use of different secondary antibodies) (**Figure 1a,b**). IgA1 and IgA2 bNAbs recognized trimeric YU-2 gp140 antigen by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with the same binding profiles as their IgG counterparts (**Figure 1c**). Binding experiments performed by surface plasmon resonance (SPR) confirmed that IgAs have no substantial modifications of their relative affinities for YU-2 gp140 and gp120 proteins (**Figure 1d**). Finally, we could verify by ELISA binding analyses that anti-gp120 IgAs (except conformation-sensitive PG16) were still sensitive to specific mutations in bNAbs epitopes (**Figure 1e**, **Supplementary Figure S2**), and that 10E8 IgAs were highly reactive against the MPER peptide (**Figure 1f**). Thus, *ex-vivo* IgA-class switching of HIV-1 bNAbs does not appreciably modify their original binding and affinity for gp160.

IgA HIV-1 bNAbs display IgG-equivalent viral inhibitory activities

We then determined whether IgA bNAbs could recapitulate the antiviral properties of the original IgGs. To this end, we first measured the capacity of purified IgA1 and IgA2 antibodies to inhibit HIV-1 infection of TZM-bl cells using a panel of five selected viral strains. As expected from the ELISA data using YU-2 gp140 trimers as antigen, the *in vitro* neutralization activities of IgA1 and IgA2 bNAbs against YU-2 viruses were very similar to parental IgGs (**Figure 2a**). The four other selected viruses were neutralized by IgA bNAbs, with modest ($\leq$ 2-fold change) to more marked (up to sixfold change) differences depending on the antibody and viral strain when compared to IgGs (**Figure 2b**). These bNAbs, except 10E8, efficiently inhibit the cell-to-cell spread of HIV-1.[31] We thus evaluated the *in vitro* activity of HIV-1 IgA bNAbs against the cell-to-cell transmission of the CCR5-tropic (R5) HIV-1 strain, NLAD8, and compared it to historical data obtained with IgGs[31] (**Figure 2c-e**). IgA1/IgA2 and IgG bNAbs exhibited comparable inhibitory activity against HIV-1 cell-to-cell spread (**Figure 2e**). Together, our data show that bNAbs expressed as IgA faithfully conserved their affinity for HIV-1 envelope trimers, and inhibitory activities against cell-free and cell-associated infection.

HIV-1 and antibody transport through polarized epithelial cell monolayers

To evaluate the activity of HIV-1 bNAbs against HIV-1 transcytosis, we first established an *in vitro* assay using the human endometrial adenocarcinoma cell line HEC-1A exposed to the HIV-1 strain NLAD8. In accordance with transepithelial electrical resistance (TER) measurements, HEC-1A cells in culture assembled in tight monolayers from day 5 until at least day 9 (**Figure 3a**). Epithelial monolayers were characterized by the formation of tight junctions with homogenous E-cadherin expression (**Figure 3b**), and an absence of permeability to 40 kDa diethylaminoethyl (DEAE) Dextran molecules across the lower chamber of the transwell system (**Figure 3c**). HIV-1 transcytosis was assayed at day 6, and showed that an average of 47% of the viral input passed through

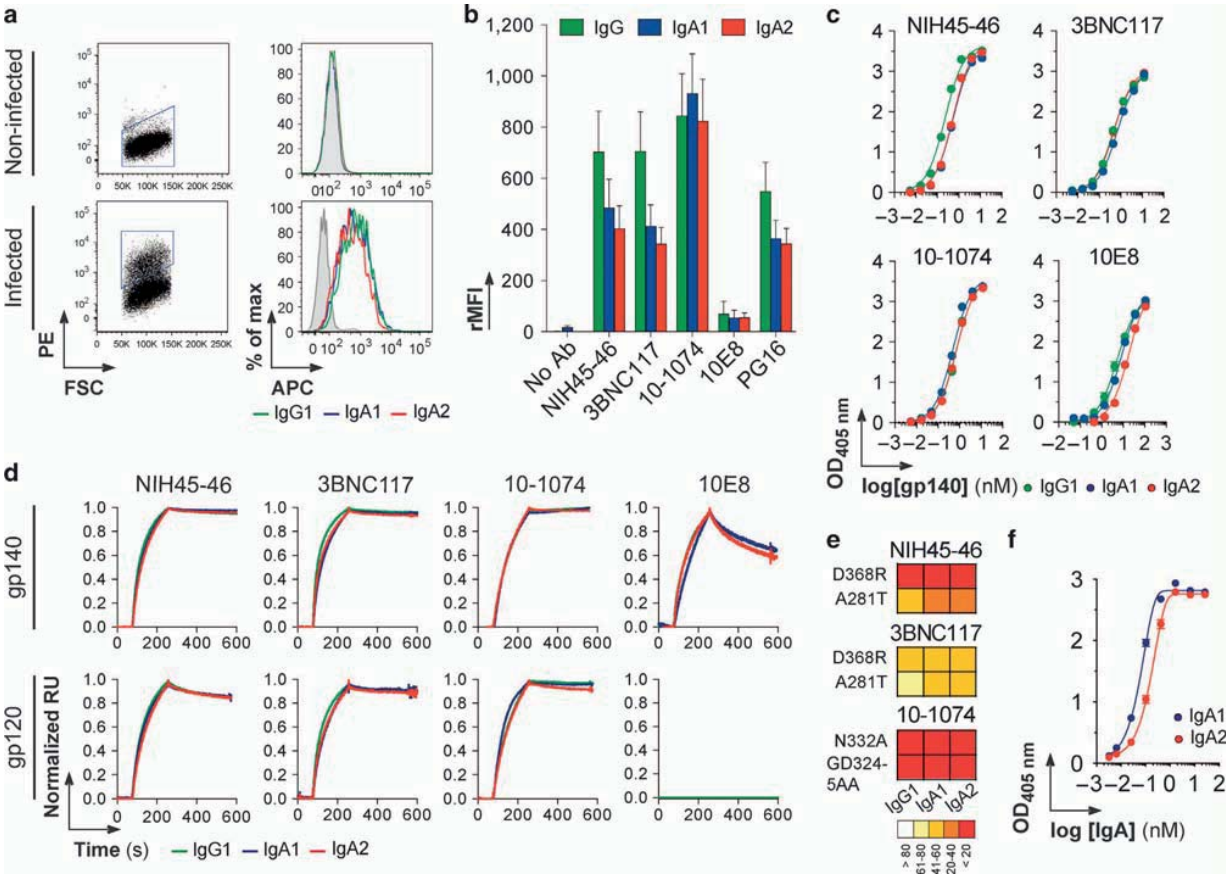
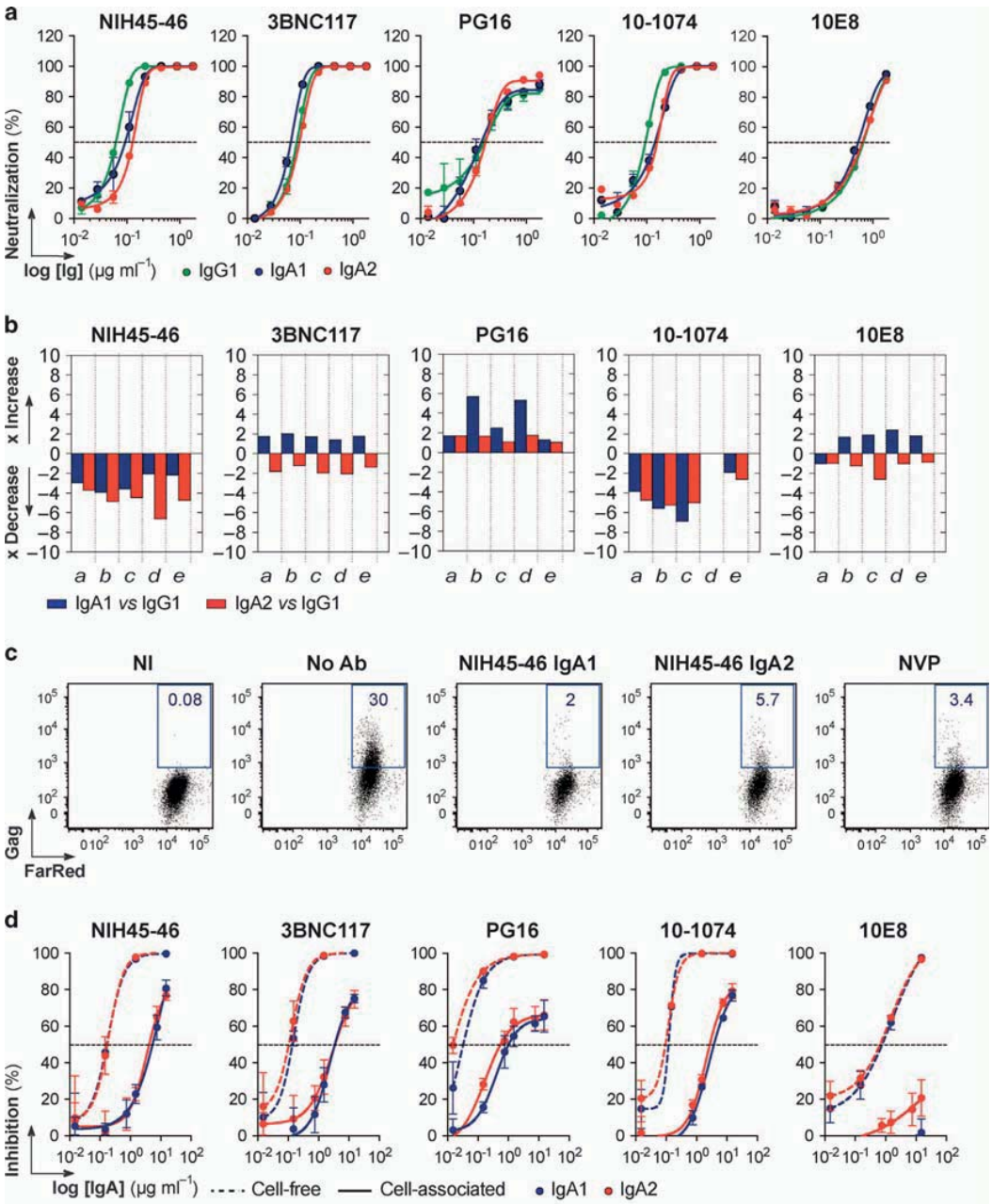


Figure 1 IgA class switching of HIV-1 bNAbs. (**a**) Cytograms show the binding of 3BNC117 IgG1 (green), IgA1 (blue), and IgA2 (red) antibodies (as examples) to uninfected MT4C5 T cells (upper part), and to Gag$^+$ (PE) MT4C5 cells infected with the NLAD8 viral strain (bottom part). (**b**) Bar graph shows the binding of the selected bNAbs expressed as IgG1 (green), IgA1 (blue), and IgA2 (red) to Gag+ infected MT4C5 cells. Horizontal bars represent the relative mean fluorescence intensity (rMFI). Error bars indicate the s.e.m. of triplicate values from two independent experiments. (**c**) ELISA graphs comparing the binding of YU-2 gp140 to IgG1 (green), IgA1 (blue), and IgA2 (red) bNAbs. The *x*-axis shows the gp140 concentration (nM) required to obtain the ELISA values ($OD_{405\,nm}$) indicated on the *y*-axis. Error bars indicate the s.e.m. of duplicate values. (**d**) SPR sensorgrams showing the binding of bNAbs expressed as IgG1 (green), IgA1 (blue), and IgA2 (red) to YU-2 gp140 or gp120 ligands expressed as normalized response units (RU) over time. (**e**) Heat map (expressed as % binding to wild-type gp120) summarizing the binding of IgG1, IgA1, and IgA2 bNAbs to selected mutant protein antigens (see **Supplementary Figure 2** online). Darker colors = stronger inhibition; light colors = moderate inhibition. (**f**) ELISA graph shows binding of 10E8 IgA1 and IgA2 antibodies to MPER peptide. The *x*-axis shows the antibody concentration (nM) required to obtain the ELISA values ($OD_{405\,nm}$) indicated on the *y*-axis. Error bars indicate the s.e.m. of duplicate values. bNAbs, broadly neutralizing antibodies; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; Ig, immunoglobulin; MPER, membrane proximal external region; SPR, surface plasmon resonance.

the porous membrane of the insert without cells and that 6.8% of the applied viral load vtranslocated across epithelial cell monolayers (**Figure 3d**).

HIV-1 transcytosis assessed in various human epithelial cell lines was previously shown to be independent of envelope glycoproteins.[42–44] In the *in vitro* transcytosis assay developed here, we also found that envelope-deficient HIV-1 virions (ΔEnv-NL) translocated across HEC-1A epithelial monolayers comparably to wild-type NLAD8 virus (9.2%, $P = 0.93$) (**Figure 3e**). To determine whether antibodies could passively traverse epithelial monolayers, we quantified by ELISA the amount of antibodies being transported through HEC-1A cells into the basal chamber. Both NIH45-46 and mGO53 isotype control antibodies were detected in the basal compartment, transcytosed at a similar level in the presence or absence of NLAD8 viruses, and independently of their isotype (either IgG or IgA) (ranging from 0.9 to 1.9%) (**Figure 3f**). Antibody transcytosis occurred at physiologic pH (pH 7.6 on average), at the same rate for IgGs and IgAs, and was unaltered in presence of the vesicular acidification inhibitor bafilomycin A1 (*data not shown*). This suggests that antibody transcytosis was unlikely to be due to the neonatal Fc receptor (FcRn) expressed on the apical pole of HEC-1A cells, which only binds IgG molecules at acidic pH (<6.5).

In order to gain insights into HIV-1 and antibody transport through polarized epithelial cell monolayers, we performed confocal microscopy experiments with green fluorescent protein-labeled HIV-1 viruses alone or incubated with NIH45-46 and 3BNC117 IgG, and mGO53 isotype control. After 4 h, viruses and antibodies were visualized inside HEC-1A



e

	Cell-free					Cell-associated				
	IC_{50} (µg ml^{-1})			Fold change		IC_{50} (µg ml^{-1})			Fold change	
	IgA1	IgA2	IgG	IgG:IgA1	IgG:IgA2	IgA1	IgA2	IgG	IgG:IgA1	IgG:IgA2
NIH45-46	0.18	0.17	0.20	**1.04**	**1.10**	5.40	4.20	2.50	**2.30**	**1.79**
3BNC117	0.11	0.14	0.07	**1.68**	**2.13**	3.40	3.50	1.50	**2.42**	**2.49**
10-1074	0.06	0.07	0.10	**1.56**	**1.34**	3.70	2.80	1.60	**2.47**	**1.87**
10E8	0.67	0.77	1.10	**1.54**	**1.34**	X	X	>15	X	X
PG16	0.02	0.03	0.05	**2.34**	**1.56**	0.90*	0.50*	0.50*	**1.92***	**1.07***

Figure 2 Antiviral properties of HIV-1 IgA bNAbs. (**a**) Graphs show neutralization curves of the YU-2 viral strain by IgG1 (green), IgA1 (blue), and IgA2 (red) bNAbs (as an example). The dotted horizontal line indicates 50% neutralization, from which the IC_{50} value can be derived from the antibody concentration on the *x*-axis. Error bars indicate the s.d. of triplicate measurements. (**b**) Bar graphs comparing the neutralization potencies (IC_{50} values) of IgA1 and IgA2 *vs* IgG1 bNAbs (expressed as fold increase or decrease) against a panel of five selected viruses: a, SC422661.8; b, PVO.4; c, CAAN5342.A2; d, THRO4156.18; e, YU-2. Experiments were performed in triplicate. (**c**) Cytograms show, using NIH45-46 as example, the inhibition of cell-to-cell HIV-1 transmission by IgG and IgA bNAbs as compared to the infection of non-antibody-treated Far-red-stained primary CD4 + target cells (No Ab). NI, non-infected cells control; NVP, nevirapine treated cells control. (**d**) Graph comparing the inhibitory activity of IgA1 and IgA2 bNAbs against cell-free (dotted lines) and cell-associated (straight lines) infection. (**e**) Table comparing the inhibitory activity (IC_{50} values calculated from (d)) of IgA1 and IgA2 *vs* IgG1 bNAbs against cell-free and cell-associated infection, and expressed as fold increase (blue) or decrease (red). bNAbs, broadly neutralizing antibodies; Ig, immunoglobulin.

cell monolayers, but only anti-gp160 antibodies showed co-localization with virions (**Figure 3g**, **Supplementary Figure S3**, **Supplementary Movies 1–3**). Although mostly accumulated in the apical zone, antibody-virus complexes, as well as viruses and antibodies alone, were spread throughout the depth of epithelial cells and were located in the cytoplasm, suggesting entry by endocytosis (**Figure 3h**, **Supplementary Figure S3**, **Supplementary Movie 4**). Quantification of the co-localization events indicated that about 46 and 60% of total viral particles were associated with NIH45-46 and 3BNC117, respectively (*vs* 1.9% for mGO53, $P < 0.0001$), **Figure 3i,j**).

bNAbs do not block *in vitro* transcytosis of cell-free and cell-associated HIV-1

Since we observed intracellular fluorescent clusters of HIV-1 with bNAbs by confocal microscopy, we tested the ability of bNAbs to decrease transcytosis of cell-free HIV-1. Surprisingly, none the five bNAbs (expressed as monomeric IgG1 or IgA1 and IgA2) interfered with the passage of HIV-1 (NLAD8 strain) through HEC-1A monolayers (**Figure 4a**). Increasing the quantity of antibody or decreasing the amount of virus did not impact viral transcytosis (**Figure 4b,c**). As observed with 10-1074 IgG1 and monomeric IgAs, 10-1074 IgA dimers and multimers had no measurable effect on HIV-1 transcytosis (**Figure 4d**). Similarly, all bNAbs tested as IgGs were ineffective at preventing transcytosis of two other HIV-1 strains, YU-2 (**Figure 4e**) and NL4.3 (**Figure 4f**).

HIV-1 transcytosis mediated by the formation of a "viral synapse" between infected blood mononuclear cells and epithelial cells is thought to be more efficient than transcytosis with free virions, and can also be blocked by gp160-specific antibodies.[12,16,45–47] We therefore used human T lymphoblastic cells chronically infected with NL4.3 as a source of HIV-1. As observed with cell-free virions, none of the IgG bNAbs inhibited cell-associated HIV-1 transcytosis (**Figure 4f**).

HIV-1 can cross human intestinal epithelial barriers *in vivo* and *in vitro*. Thus, we next performed a series of transcytosis experiments using colonic adenocarcinoma cell lines, T84 and Caco-2.[48,49] As for HEC1-A cells, viral transcytosis across intestinal cell monolayers was unaffected by the absence of envelope glycoproteins (*data not shown*), and was not inhibited by IgG bNAbs (**Figure 4g-i**).

bNAbs potently inhibit infectivity of transcytosed HIV-1

We next evaluated whether HIV-1 bNAbs could alter the infectivity of transcytosed viruses. We harvested virus-containing basal medium following transcytosis of HIV-1 in the presence or absence of bNAbs, and tested for viral infectivity using TZM-bl reporter cells after normalizing viral input by p24 content. The bNAbs NIH45-46, 3BNC117, and 10-1074 induced on average a 1.6-2 log drop of NLAD8 infectivity whereas 10E8 and PG16 were less potent with a 0.9-1.6 log decrease (**Figure 5a**). Consistent results were obtained with transcytosed YU-2, whose infectivity was inhibited by 0.5-1.7 log in the presence of 10E8 and 3BNC117 IgG, respectively (**Figure 5b**). The effect was dose-dependent, as assessed with 2F5 IgG bNAb (**Figure 5c**). To determine IC_{50} values of NLAD8 neutralization by 3BNC117 and 10-1074 following *in vitro* transcytosis, we tested IgG and IgA bNAbs across a broad concentration range. As expected, viral transcytosis was not impacted regardless of the antibody amount used (**Figure 5d**). As observed for 2F5, post-transcytosis neutralization mediated by 3BNC117 and 10-1074 was dependent on antibody concentration (**Figure 5d**). Interestingly, IC_{50} values determined in the traditional neutralization assay and after viral transcytosis were comparable, with only a 1.4-2.3 and 0.5-1.7-fold difference for IgG and IgA, respectively (**Figure 5e**). Finally, NLAD8 infectivity was also dramatically decreased in the presence of IgG bNAbs following viral transcytosis across T84 and Caco-2 cell monolayers (**Figure 5f**).

DISCUSSION

To achieve sterilizing immunity at mucosal sites, antibodies must prevent entry and/or block viral infectivity. Transcytosis is one of the putative mechanisms by which HIV-1 could traverse epithelial barriers following sexual transmission. Compelling evidence on the role of HIV-specific antibodies from both sera and mucosal secretions from HIV-infected patients[12,13,50] and HEPS individuals[14] in preventing viral transcytosis *in vitro* have accumulated over the past 20 years. Similar observations were made using human gp160-reactive monoclonal antibodies derived from HEPS[16] and HIV-seropositive individuals.[51–53] Nevertheless, whether anti-gp160 antibodies can truly interfere with HIV-1 transcytosis is still a matter of debate.

In this study, we tested the capacity of potent bNAbs to inhibit HIV-1 transcytosis in a well-established *in vitro* system

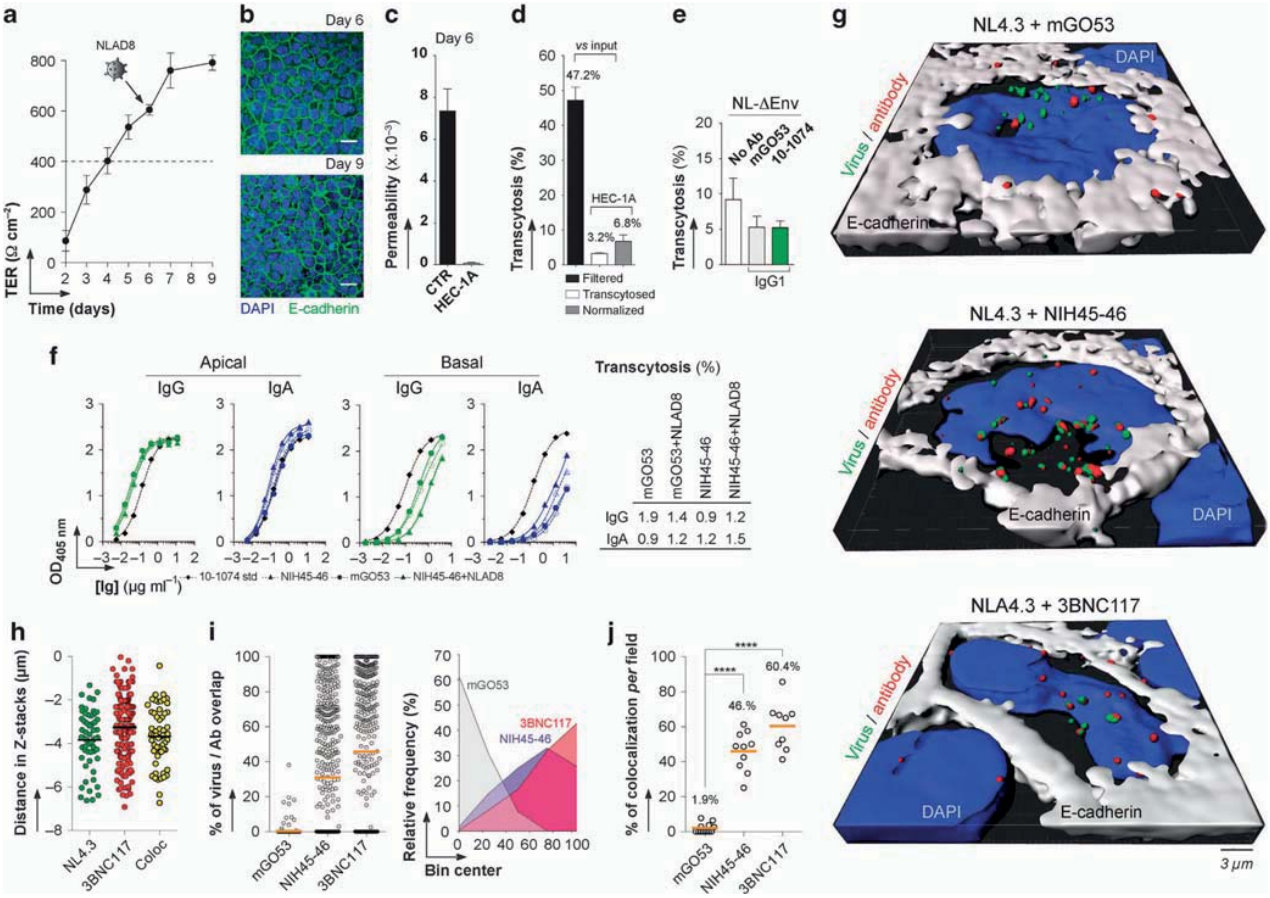


Figure 3 *In vitro* transcytosis of HIV-1 and bNAbs. (**a**) Graph shows the transepithelial electrical resistance (TER) values of HEC-1A epithelial cell monolayers according to time of culture. Mean values ± s.e.m. of two representative experiments (in duplicate) are shown. Transcytosis experiments were performed at day 6 (virus and black arrow). Dotted line indicates the threshold (400 Ohms cm^{-2}) to obtain monolayer confluence and integrity of cells. (**b**) Immunofluorescence staining of HEC-1A monolayers with DAPI and anti-human E-cadherin antibody at day 6 and 9 of culture. Representative images are shown. Scale bar indicates 10 µm. (**c**) Bar graph comparing the diffusion of FITC-labeled DEAE-dextran molecules to the basal compartment when passing through the transwell membrane (CTR, control) and the HEC-1A cell monolayer at day 6. Mean values ± s.e.m. of two representative experiments (in duplicate) are shown. (**d**) Bar graph shows the percentage of cell-free virus detected in the basal compartment compared to the input placed in the apical part of the transwell in presence of HEC-1A cells monolayer (transcytosed) or not (filtered). The gray bar corresponds to values for NLAD8 transcytosis (as a percentage of transcytosed viruses) normalized by the filtered virus amount. Mean values ± s.e.m. of four representative experiments (in triplicate) are shown. (**e**) Bar graph shows the normalized transcytosis of NL-ΔEnv alone, and in presence of anti-gp120 10-1074 IgG1 (green) and non-HIV-1 reactive mGO53 control IgG1 (gray) antibodies. Mean values of duplicate obtained in three independent experiments are shown. Error bars indicate the s.e.m. Groups were compared to mGO53 negative control using Mann-Whitney test. ns, not significant. (**f**) Graphs show the ELISA detection post-transcytosis of IgG (green) and IgA (blue) antibodies in the apical and basal compartments. Error bars indicate the s.d. of duplicate measurements. Table in the right-hand side indicates the calculated percent of antibody transcytosis for mGO53 and NIH45-46 IgG and IgA antibodies. (**g**) Representative images corresponding to the 3D-reconstruction of the confocal microscopy experiments made on HEC-1A cell monolayers with GFP-labeled HIV-1 (green) in presence of mGO53, NIH45-46 or 3BNC117 (red). Nuclei and intercellular junctions were stained with DAPI (blue) and anti-E-cadherin antibody (gray), respectively. (**h**) Dot plot shows the number of fluorescent objects corresponding to HIV-1 alone (NL4.3), 3BNC117 IgG alone and virus-antibody complexes (Coloc) according to the distance across the Z-stack depth. Quantification was made using one representative 6 µm Z-stack acquisition. (**i**) Graphs show the percentage of overlap between fluorescent HIV-1 and antibodies (left-hand side), and calculated relative frequency according to bin center (right-hand side). Quantification was made using 9-12 different 2 µm Z-stack acquisitions *per* condition (field). (**j**) Dot plot shows the percentage of colocalization between virus and antibodies calculated from (i). ****P value <0.0001 (Mann-Whitney test). bNAbs, broadly neutralizing antibodies; DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole; DEAE, diethylaminoethyl; Ig, immunoglobulin; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; GFP, green fluorescent protein.

using HEC-1A cell monolayers. If induced by a vaccine, these types of antibodies could be transudated in the lumen as IgG and/or locally produced IgA molecules. For this reason, we produced selected bNAbs as recombinant IgG and IgA1/IgA2 monoclonal antibodies. In contrast to what was reported in previous works,[46,54,55] we showed that swapping the bNAbs' Fc region from IgG to IgA did not substantially modify or alter their affinities, targeted epitopes or antiviral inhibitory activities. When applied with or without virus at the surface of the epithelial monolayers, we observed that a similar fraction of purified IgG and IgA was transported to the basal pole, likely in a FcRn-independent manner. As expected, a small proportion of HIV-1 virions (~ 3.5% of viral inoculum) transcytosed across HEC1-A epithelial cells *in vitro*.[42,45] Although the role of envelope glycoproteins for mediating viral endocytosis was disputed,[42–44,56,57] our experiment clearly demonstrated that

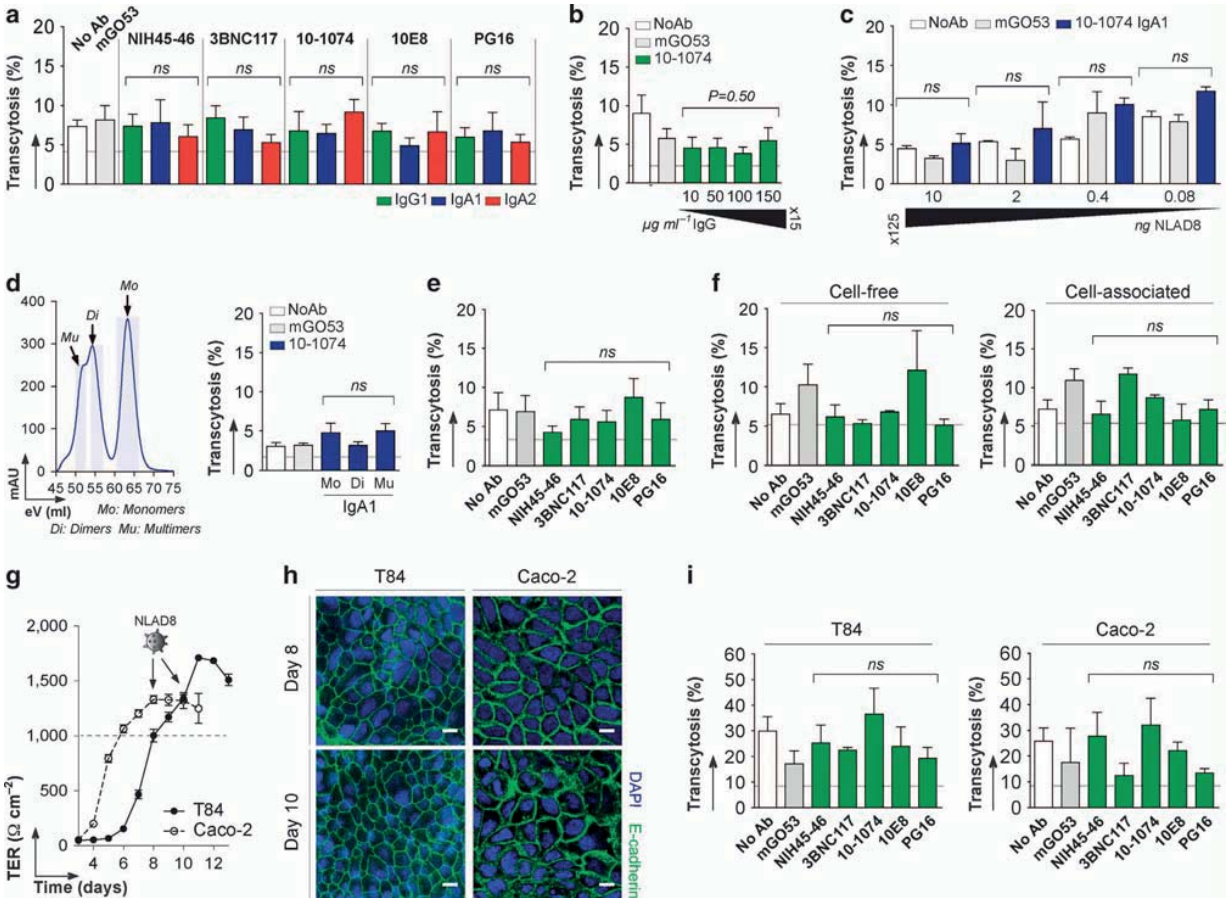


Figure 4 HIV-1 transcytosis in presence of bNAbs. (**a**) Bar graph shows the percent of transcytosis of NLAD8 alone (No Ab, white), in presence of non-HIV-1 mGO53 control (gray) and selected bNAbs expressed as monomeric IgG1 (green), IgA1 (blue), and IgA2 (red) antibodies. Dotted line indicates an arbitrary threshold corresponding to a twofold decrease of the values obtained with mGO53 control antibody. Mean values ± s.e.m. of three to five independent experiments performed in duplicate are shown. (**b**) Bar graph shows the percent of transcytosis as in (a) but with increasing amount of 10-1074 IgG antibodies. Mean values ± s.e.m. of three independent experiments performed in duplicate are shown. (**c**) Bar graph shows the percent of transcytosis as in (a) for 10-1074 IgA1 but with decreasing amount of NLAD8 virus used as input (as indicated above bars). Mean values of duplicate are shown. Error bars indicate the s.e.m. (**d**) Bar graph shows the percent of transcytosis as in (a) but with virus in presence of monomeric (Mo), dimeric (Di) and multimeric (Mu) 10-1074 IgA1 antibodies. Mean of triplicate values are shown. Error bars indicate the s.e.m. On the left-hand side, FPLC chromatogram shows the protein separation of IgA monomers, dimers, and multimers by size exclusion chromatography. The *x*-axis shows the elution volume (eV) required to obtain the values of absorption units at 280 nm (mAU) indicated on the *y*-axis. Light blue bars indicate selected fractions. (**e**) Bar graph shows the percent of transcytosis of as in (a) but using YU-2 viral strain. Mean values ± s.e.m. of four independent experiments performed in duplicate are shown. (**f**) Bar graphs show the percent of transcytosis as in (a) but using cell-free and cell-produced NL4.3 viruses. Mean values ± s.e.m. of two independent experiments performed in duplicate are shown. (**g**) Graph shows the TER values of T84 and Caco-2 epithelial cell monolayers according to time of culture. Mean values ± s.e.m. of three independent experiments (more than 50 transwells in total) are shown. Transcytosis experiments were performed at days 8 and 10 for Caco-2 and T84 cells, respectively (virus and black arrows). Dotted line indicated the threshold (1,000 Ohms cm^{-2}) to obtain monolayer confluence and integrity of cells. (**h**) Immunofluorescence staining of T84 and Caco-2 monolayers with DAPI and anti-human E-cadherin antibody at days 8 and 10 of culture. Representative images are shown. Scale bar indicates 20 µm. (**i**) Bar graph shows the percent of transcytosis of as in (a) but using T84 and Caco-2 monolayers and IgG bNAbs only. Mean values ± s.e.m. of two independent experiments performed in triplicate are shown. Groups were compared to mGO53 negative control using Mann-Whitney test for all except (b), and using one-way ANOVA test for (b). ANOVA, analysis of variance; bNAbs, broadly neutralizing antibodies; FPLC, fast protein liquide chromatography; Ig, immunoglobulin; ns, not significant; TER, transepithelial electrical resistance.

wild-type and envelope-deficient viruses translocated into the basal compartment at equal rates. Therefore, HIV-1 spike interactions with epithelial cell surface receptors may not be required for transcytosis as shown by others.[43,44,57] Considering that transcytosis is a phenomenon occurring independently of HIV-1 envelope glycoproteins, we asked whether viruses in complex with antibodies still penetrate and cross the epithelia. We found that high concentrations of diverse bNAbs expressed as either monomeric IgG, IgA1, or IgA2 were inefficient at blocking transcytosis of cell-free X4- and R5-tropic as well as cell-associated viruses. This observation is in accordance with previous works reporting the inability of non-neutralizing and first generation bNAbs to inhibit *in vitro* HIV-1 transcytosis.[42,49] Furthermore, we did not observe any superior inhibitory effect of dimeric/polymeric over monomeric IgA1 as previously shown for 2G12 and anti-gp41 antibodies 2F5 and HGN194.[51–53] Importantly, no mechanistic evidence has yet been produced showing that dimeric IgAs in complex with virions form large "aggregates" that lead to blocking HIV-1 entry at mucosal sites as hypothesized by others.[58] It is

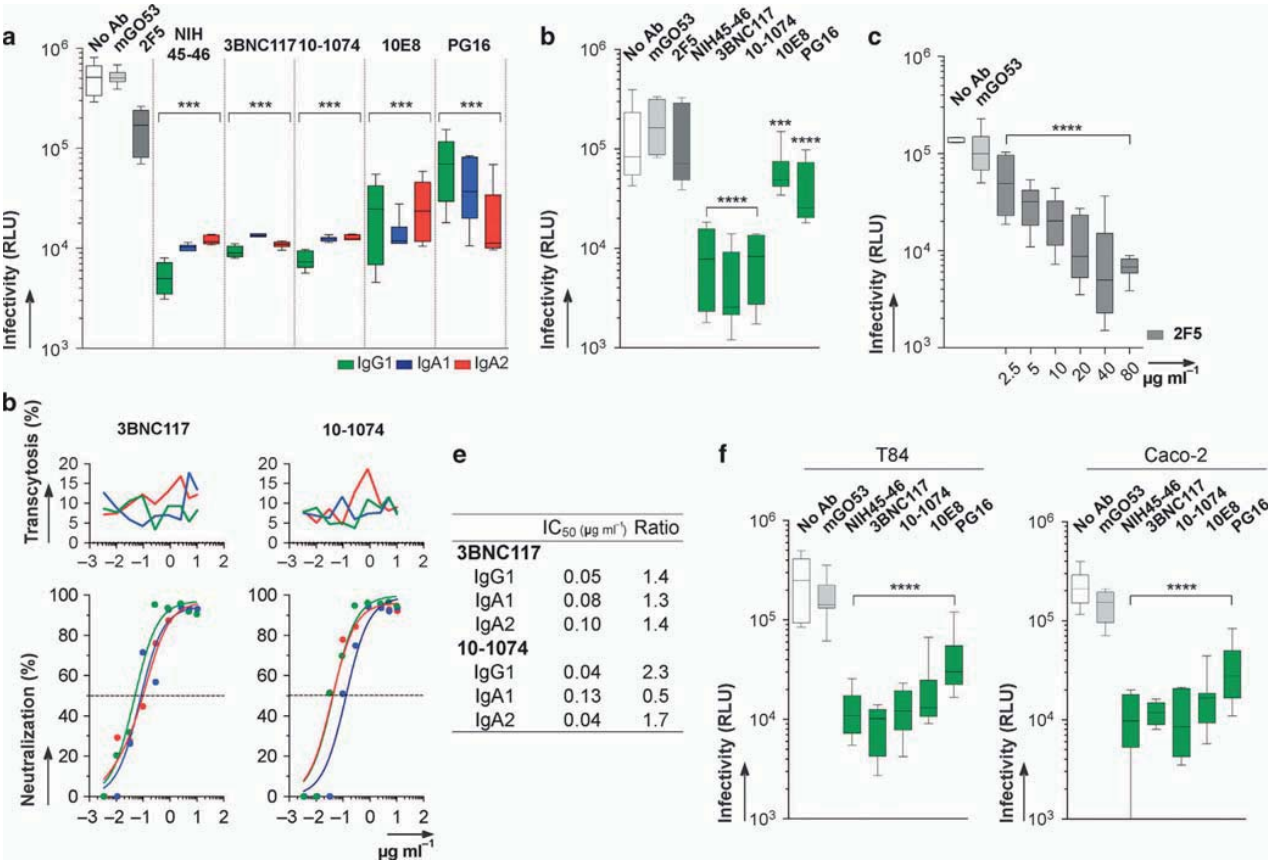


Figure 5 Infectivity of transcytosed HIV-1. (**a**) Scatter plot shows the infectivity of transcytosed NLAD8 alone (No Ab, white), in presence of non-HIV-1 mGO53 control (light gray), 2F5 IgG1 bNAb (dark gray) and selected bNAbs expressed as monomeric IgG1 (green), IgA1 (blue), and IgA2 (red) antibodies on TZM-bl reporter cells. Antibodies were tested at a final concentration of 66.7 nM (originating from experiments in **Figures 4a**). (**b**) Same as in (a) but with IgG1 bNAbs only in contact with YU-2 viruses used as viral input for transcytosis. (**c**) Same as in (a) but with increasing concentration of 2F5 IgG antibodies (from 2.5 to 80 μg ml^{-1}) in contact with NLAD8 virions. (**d**) Upper graph shows the percent of transcytosis of 3BNC117 and 10-1074 IgG1 (green), IgA1 (blue), and IgA2 (red) bNAbs tested across a large concentration range (from 0.023 to 66.7 nM). Mean values ± s.e.m. of duplicate data are shown. Lower graph shows the percent of post-transcytosis neutralization of 3BNC117 and 10-1074 IgG1, IgA1, and IgA2 antibodies as tested above. (**e**) Table indicating IC_{50} values obtained after viral transcytosis (left), and calculated ratios (right) comparing them to IC_{50} values determined using the traditional neutralization assay. (**f**) Same as in (a) but with IgG1 bNAbs only in transcytosis assays using T84 and Caco-2 epithelial cell monolayers. Data represent mean of triplicate values obtained for each transcytosis point performed as shown in **Figure 4**. Error bars indicate the s.e.m. Groups were compared to mGO53 negative control using Mann-Whitney test for all except (c), and using one-way ANOVA test for (c). ***$P<0.001$; ****$P<0.0001$. ANOVA, analysis of variance; bNAbs, broadly neutralizing antibodies; Ig, immunoglobulin; ns, not significant.

possible, however, that through interaction of IgG/IgA with gel-forming mucin glycoproteins *in vivo*, HIV-antibody complexes get trapped in mucus layers,[59,60] and subsequently get washed out by draining, genital secretions. The inefficacy of potent bNAbs in diminishing viral transepithelial migration is on the other hand, contrasting with the blocking capacity on transcytosis that was previously reported for some gp160-specific antibodies, especially for IgAs.[12,16,46,51–53,61] Although the reason(s) for this discordance remain unclear, we demonstrate here that a large proportion of intracellular virions (~50-60%) were co-localized with antibodies in the cytoplasm of epithelial cells. Importantly, this observation provides a mechanistic explanation of why anti-gp160 IgG and IgA molecules were not interfering with viral transcytosis; HIV-1 in complex with high affinity immunoglobulins are not sequestered at the surface of the epithelium but instead, enter epithelial cells and migrate to reach the basal cellular pole to be released. The identification of the molecular processes for immune complex entry and transit will demand further investigation, but it appears from our data that the uptake of antibody-coated virions by epithelial cells does not involve the FcRn or the polymeric Ig receptor (not binding IgGs and expressed only at the basal pole of HEC-1A cells[62]).

Subsequent to their translocation through epithelial cells, free HIV-1 virions were still infectious. Because antibodies were incapable of inhibiting viral transcytosis, preventing mucosal transmission would require direct neutralization of free particles and/or Fc-dependent antiviral activity against infected cells such as antibody-dependent cellular cytotoxicity,[63] and macrophage- and neutrophil-mediated phagocytosis.[64] Notably, bNAbs could efficiently decrease infectivity of transcytosed viruses suggesting that these antibodies remain associated with HIV-1 during trafficking,[49] or bind to the virions after their transport to the basal pole. We measured equivalent IC_{50} values of

the bNAbs in a traditional neutralization assay and with transcytosed viruses. With a few bNAbs tested in a human mucosa explant model, the neutralization potency correlated with the magnitude of reduction for HIV-1 replication and *ex vivo* mucosal HIV-1 transmission.[65] Whether some neutralization events take place intracellularly such as in endosomal vesicles as previously reported[13,66] still remains to be investigated.

Our data provide a mechanistic explanation of how modest titers of potent bNAbs confer protection against SHIV mucosal challenges in infected macaques.[19,20,67,68] Following systemic passive administration *in vivo*, IgG bNAbs diffuse in plasma, distribute rapidly in various tissues including mucosa,[68,69] and via FcRn interactions and/or passive diffusion can be translocated into the lumen where they most likely do not block viral transcytosis but may neutralize inoculated infectious virions before their entry into mucosal tissues. In this regard, engineering bNAbs for enhanced binding to FcRn clearly ameliorated their half-lives *in vivo* and consequently, considerably improved their protective effect in non-human primate models for HIV-1 infection.[70,71]

In summary, our results indicate that HIV-1 antibodies targeting various neutralizing gp160 epitopes do not block viral transcytosis in human mucosal epithelia. Rather, HIV-1 virions in complex with high affinity IgG or IgA can penetrate epithelial cells, and translocate to be released at the basal pole. However, viruses that are transcytosed in the presence of potent bNAbs are no longer infectious. This phenomenon presumably represents one of the mechanisms by which highly active bNAbs prevent infection in non-human primates challenged at mucosal sites. Understanding the processes involved in preventing HIV-1 mucosal transmission by bNAbs is essential for optimizing antibody-mediated immunotherapies and developing adequate vaccine strategies.

METHODS

Antibodies and HIV-1 antigens. HIV-1 gp160-specific antibodies (2F5,[72] NIH45-46, 3BNC117,[37] 10-1074,[39] 10E8,[40] PG16[38]) and non-HIV mGO53 control antibody[73] were produced as recombinant IgG monoclonal antibodies and purified as previously described.[39,74] Each antibody was also produced as recombinant IgA1 and IgA2 molecules using our expression cloning strategy recently described.[41] Briefly, bNAbs' IgH variable domain (V_H) genes were cloned into Igα1- and Igα2-expression vectors using *Age*I and *Sal*I restrictions sites. bNAbs IgH vectors with their corresponding IgL expression vectors were then used to co-transfect FreeStyle 293-F cells using the polyethylenimine-precipitation method.[41] Human IgA monoclonal antibodies were purified by affinity chromatography using either peptide M-coupled agarose (Invivogen, San Diego, CA) or cHB-200-coupled sepharose beads.[41] The quality of purified IgA bNAbs was evaluated by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) using 4-12% Bis-Tris Novex gels (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) in non-reducing conditions followed by a silver staining (Pierce Silver Stain kit, Thermo Fisher Scientific), and immunoblot analysis following protein separation by SDS–PAGE (using 250 ng of IgA), and electrotransfer onto nitrocellulose membranes. Briefly, after a 2 h saturation step in 5% dry-milk, 0.05% Tween 20-Phosphate-buffered saline (PBST), filters were washed with PBST and incubated 1 h with 1:10,000-diluted goat peroxidase-conjugated anti-human IgA antibodies (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). After washings, filters were revealed by chemiluminescence reaction (ECL Prime, GE Healthcare, Chicago, IL), and images were acquired using a G:Box imaging system (Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France). Immunoglobulin polymerization of recombinant IgAs was quantified by size-exclusion chromatography. Briefly, after column equilibration with PBS, IgA1 and IgA2 antibodies (0.5 mg) were injected in a Superdex 200 (Increase 10/300GL, GE Healthcare) at a flow rate of 0.3 ml min^{-1}, and separated using the AKTA pure liquid chromatography system (GE Healthcare) as previously described.[41] UV absorbance and conductivity measurements were recorded and analyzed using Unicorn 6.3 software (GE Healthcare). The proportion of multimeric immunoglobulins was calculated using area under the curve values of the specific size-exclusion chromatography pics (compared to the total signal). 10-1074 dimers and multimers were produced by adding J-chain pcDNA3.1/Zeo$^{(+)}$ expression vector to the co-transfection reaction, and were fast protein liquide chromatography-purified using cHB-200 gel affinity chromatography followed by size exclusion-based fast protein liquide chromatography.[41]

The production and purification of trimeric gp140, gp120 and mutant proteins were performed as previously described.[39,41,75] Purified YU-2 gp140 was biotinylated using BirA biotin-protein ligase bulk reaction kit according to the manufacturer's instructions (Avidity LLC, Aurora, CO).

Cells and viruses. Human endometrial carcinoma type A HEC-1A cells (HTB-112, ATCC, Manassas, VA) were cultivated in modified McCoy's 5a medium (Sigma, Saint-Louis, MO). MT4C5 cells, derived from MT4 cells (ATCC) to express CCR5 molecule,[76] were grown in RPMI 1640 medium (Thermo Fisher Scientific). For both cultures, medium was supplemented with 1% antibiotic-antimycotic (Thermo Fisher Scientific) and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (HyClone, GE Healthcare). TZM-bl cells (#8129, NIH AIDS Reagent Program, Germantown, MD) were cultivated in 10% FBS-DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplemented with 1% penicillin-streptomycin (10,000 U ml^{-1}, Thermo Fisher Scientific) and routinely passaged by treatment with trypsin-EDTA, and with 0.1% EDTA-PBS before performing the infectivity assay (avoiding proteolysis of CD4 receptors). P4C5 cells[77] were cultivated in 10% FBS-DMEM supplemented with 1% penicillin-streptomycin (10,000 U ml^{-1}, Thermo Fisher Scientific), G418 (500 μg ml^{-1}, Sigma) and Hygromycin (50 μg ml^{-1}, GE Healthcare). MOLT NL4.3 were grown in RPMI 1640 medium (Thermo Fisher Scientific) supplemented by 1% penicillin-streptomycin and 10% heat-inactivated FBS. T84 cells (CCL-248, ATCC) were cultivated in DMEM-F12 medium (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (HyClone, Thermo Fisher Scientific) and 1% penicillin-streptomycin (10,000 U ml-, Thermo Fisher Scientific). Caco-2 cells (HTB-37, ATCC) were grown in DMEM + Glutamax (Thermo Fischer Scientific) supplemented with 18% heat-inactivated FBS (HyClone, GE Healthcare). All the cells were cultivated at 37 °C with 5% CO_2, and medium was renewed every two days for T84 and Caco-2 cell cultures.

Primary CD4 + T cells were purified from human peripheral blood of healthy donors (Etablissement Français du Sang, Rungis, France) by density gradient centrifugation (Ficoll Paque Plus, GE Healthcare) followed by a positive enrichment by magnetic activated cell sorting (MACS) using anti-human CD4-microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Primary CD4 + T cells were then activated by a 24 h treatment with phytohemagglutinin (PHA, 1 μg ml^{-1}, Oxoid, Basingstoke, UK) at 37 °C, and then cultivated for 3-5 days before adding them to interleukin 2 (IL-2)-containing complemented RPMI medium (50 IU ml^{-1}, Eurobio-Abcys, Ulis, France). Cells were infected with HIV-1 strains NL4-3, NLAD8, YU-2, and NL4-3ΔEnv in BSL3 as previously described.[78,79]

Flow cytometry binding analysis to infected cells. MT4C5 cells infected with NLAD8 (5 ng) were incubated with 30 μg ml^{-1} (NIH45-46, 3BNC117, 10-1074, 10E8) or 1 μg ml^{-1} (PG16) of IgG,

IgA1, and IgA2 antibodies for 1 h at 37 °C. After two washes with 1% bovine serum albumin-PBS and centrifugation, cells were stained with 1:400-diluted Alexa 647-conjugated goat anti-human IgG antibodies (Thermo Fisher Scientific) or with purified mouse anti-human IgA HB200 antibodies (30 μg ml^{-1} final)[41] for 30 min and 1 h at 4 °C, respectively. Binding reactions using HB200 were revealed after washings using 1:400-diluted Alexa 647-conjugated goat anti-mouse IgG antibodies (Thermo Fisher Scientific) for 30 min at 4 °C. After washes, stained cells were fixed with paraformaldehyde (4% in PBS) for 5 min and analyzed by flow cytometry (BD FACS Canto II, BD Biosciences, San Jose, CA).

ELISAs. For HIV-1 gp140 trimers binding experiments, high-binding 96-well ELISA plates (Costar, Corning, Corning, NY) were coated overnight with 16.67 nM of purified IgG1, IgA1, and IgA2 bNAbs in PBS. After washing with 0.05% PBST, plates were blocked for 2 h with blocking buffer (2% bovine serum albumin, 1 mM EDTA, PBST), and then incubated for 2 h with purified biotinylated YU-2 gp140 protein at 12 μg ml^{-1} and seven consecutive 1:3 dilutions in PBS. After washings, the plates were developed by incubation with goat horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (BD Biosciences) (at 0.5 μg ml^{-1} in blocking buffer) for 30 min, and by addition of 100 μl horseradish peroxidase chromogenic substrate (ABTS solution, Euromedex, Souffelweyersheim, France). Optical densities were measured at 405 nm ($OD_{405\,nm}$), and background values given by incubation of PBS alone in coated wells were subtracted. All experiments were performed in duplicate and at room temperature using HydroSpeed microplate washer and Sunrise microplate absorbance reader (Tecan, Männedorf, Switzerland). For epitope mapping analyses, all anti-gp160 IgG and IgA antibodies were tested at 26.67 nM (excepted for NIH45-46 used at 213.3 nM) and seven consecutive 1:4 dilutions in PBS by ELISAs as described above using YU-2 gp120, gp120^{D368R}, gp120^{A281T}, gp120^{N332A}, and gp120$^{GD324\text{-}5AA}$ purified proteins as antigens (125 ng per well). For each antibody, binding activity against the selected antigens was calculated as area under the best-fit curve (AUC) using GraphPad Prism software (v6.0a), which fits ELISA values ($OD_{405\,nm}$) according to antibody concentrations using the four-parameter sigmoidal model. Data were expressed as % AUC compared to wild-type YU-2 gp120. Binding of 10E8 IgG and IgA immunoglobulins to the MPER.03 peptide (NIH AIDS Reagent Program) was tested using a previously described peptide-ELISA method.[75]

To quantify IgG or IgA concentrations in apical and basal media following HIV-1 transcytosis assay, high-binding 96-well ELISA plates (Costar) were coated overnight with 2.5 μg ml^{-1} of goat anti-human IgG (Jackson ImmunoReseach) or 4.0 μg ml^{-1} of mouse anti-human IgA (AbD Serotec, Bio-Rad, Hercules, CA) in PBS. After washing with PBST, plates were blocked for 2 h with blocking buffer. Prior to primary antibody incubation, viral particles present in both media were first inactivated by heating them for 1 h at 60 °C with agitation at 1,400 rpm every 10 min using a thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Germany). Plates were then incubated for 2 h with inactivated media and seven consecutive 1:3 dilutions in PBS. Purified 10-1074 IgG and IgA1/IgA2 monoclonal antibodies[41] were used as standards (12 μg ml^{-1} and 4 μg ml^{-1} in PBS for apical and basal medium, respectively). After washings, the plates were developed by incubation for 1 h with goat horseradish peroxidase-conjugated anti-human IgG or anti-human IgA at 0.5 μg ml^{-1} in blocking buffer (Jackson ImmunoReseach), and by addition of horseradish peroxidase chromogenic substrate as described above. Concentrations were determined by fitting data with the four-parameter sigmoidal model using GraphPad Prism software (v6.0a).

Surface plasmon resonance. All experiments were performed with a Biacore T100 instrument (Biacore, Uppsala, Sweden) in HBS-EP + running buffer (Biacore) at 25 °C as described previously.[80] Briefly, YU-2 gp140 and gp120 proteins were primary amine-coupled on CM5 chips (Biacore) at a coupling density of 500 response units. Anti-HIV-1 gp160 bNAbs were injected over flow cells at 0.5 μM, at flow rates of 40 μl min^{-1} with 3 min association and 5 min dissociation phases. The sensor surface was regenerated by a 30 s injection of 10 mM glycine-HCl pH 2.5 at a flow rate of 50 μl min^{-1}. All antibodies were tested in at least two independent experiments. Sensorgram data were obtained using the Biacore T100 Evaluation software, and expressed as normalized response units (RU/RUmax) according to the time variable using GraphPad Prism software (v6.0a).

Neutralization assays. Neutralization of cell-free HIV-1 was measured using TZM-bl cells as previously described.[81] The neutralization activity of bNAbs expressed as IgG1, IgA1, and IgA2 was also evaluated on P4C5 cells infected with NLAD8 for direct comparison with inhibitory activity values determined in the cell-to-cell HIV-1 transmission assay. One day before infection, 7.0×10^3 P4C5 cells were plated in 96-well plates. Cells were infected in triplicate with 3 ng Gag p24 of NLAD8 virus. Viruses were incubated with purified IgG and IgA bNAbs for 1 h before infection. After 36 h, cells were lysed in PBS, 0.1% NP-40, 5 mM $MgCl_2$ and incubated with the ß-gal substrate CPRG (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN), before measurement of optical densities at 570 nm. Percentage of inhibition was defined as (percent signal in non-treated target cells—percent signal in bNAb-treated cells)/(percent signal in non-treated target cells) × 100. The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) values were calculated using GraphPad Prism software (v6.0a) by fitting data from 3 to 6 independent experiments with the sigmoid dose response curves (variable slope) model.

Viral cell-to-cell transmission assay. Viral cell-to-cell transmission assay was performed as previously described.[31] Briefly, primary donor CD4 + T cells were infected with NLAD8 strain and plated at a final concentration of 1.5×10^5 cells in 24-well plates. Two days later, when about 10-50% of the cells were Gag +, primary donor cells were preincubated with the indicated doses of IgG and IgA bNAbs for 1 h, and then mixed with FarRed-labeled target cells at a 1:2 ratio in 96-well plates at a final concentration of 1.5×10^6/ml in 200 μl. After 48 h, cells were stained for intracellular Gag (KC57 mAb, Beckman Coulter, Brea, CA) and analyzed by flow cytometry (BD FACS Canto II, BD Biosciences). When stated, 12.5 nM Nevirapine (NVP, NIH AIDS Reagent Program) was added 1 h before coculture.

***In vitro* viral transcytosis assay**. HEC-1A, T84, and Caco-2 monolayer formation was routinely monitored by measuring transepithelial electrical resistance (TER) at the apical and basolateral poles using an epithelial volt-ohm meter (Millicell ERS-2 system, Millipore, Molsheim, Germany). Resistance values of blank filters (without cells) were subtracted from each reading. TER values > 400 (400-600) Ohms cm^{-2} (Ω cm^{-2}) for HEC1-A and > 1,000 (1,000-1,500) Ω cm^{-2} for T84 and Caco-2 cells were indicative of monolayer confluence, tightness, and integrity. Paracellular permeability of the HEC1-A epithelium was estimated by measuring the transit of FITC-labeled diethylaminoethyl-dextran (molecular weight of 40 kDa, Molecular Probes, Eugene, OR) as previously described.[82] Briefly, culture medium was replaced by DMEM without phenol red (Thermo Fisher Scientific). FITC-labeled dextran was added to the upper chamber and filters were sequentially transferred from well to well after 5, 10, and 15 min of incubation. The quantity of DEAE-dextran molecules diffusing through the monolayer into the basolateral compartment was determined using a fluorescence plate reader (Enspire, Perkin Elmer, Waltham, MA). Permeability coefficients of HEC-1 monolayers were then calculated as previously described.[83] The expression of tight junction proteins was checked by confocal microscopy using 1:50-diluted anti-E-cadherin antibody-clone 67A4 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), and 1:100-diluted AF647-conjugated goat anti-mouse IgG antibodies (Thermo Fisher Scientific), with the same permeabilization conditions as described below. Preparations were examined using the fluorescence microscope TCS Sp5 (Leica, Wetzlar, Germany), and pictures were taken at magnification × 63 at the Imagopole platform (Institut Pasteur, Paris, France).

Transcytosis assays were conducted using 2.5×10^4 HEC-1A and T84 cells, and 3×10^4 Caco-2 cells *per* transwell to generate a cell monolayer on 0.4 μm polyethylene terephthalate membrane hanging cell culture inserts (Millicell, Millipore). Following culture at 37 °C with 5% CO_2, the transwells with a monolayer displaying TER values ranging from 400 to 600 Ω cm-^{2} for HEC-1A cells (at day 6), and 1,000-1,500 Ω cm^{-2} for Caco-2 (at day 8) and T84 (at day 10) cells were used for the transcytosis assay. For T84 and Caco-2 cells, basal and apical media were changed twice during cell culture. HIV-1 viruses (10 ng of p24 HIV-1 cell-free NLAD8, NL4.3, YU-2 or NLΔEnv virions in 160 μl final volume) were incubated v/v for 1 h at 37 °C with purified monomeric, dimeric or multimeric antibodies (66.67 nM final concentration), and mixtures were added onto the monolayers. For the cell-associated condition, 6.5×10^4 MOLT NL4.3 cells were mixed v/v with IgG1 bNAbs (with the same final concentration as in cell-free condition) and were added directly without incubation onto the monolayers. This amount of infected cells allowed obtaining the same p24 concentration than in cell-free (62.5 ng ml^{-1} p24 antigen in the apical compartment's medium). As controls, HIV-1 alone was added into inserts with cells (No Ab) and without cells (CTL) to take into account the proportion of virions that would not pass through the transwell filter. After 24 h of incubation, media in the upper and lower compartments of the transwells were collected and stored at − 80 °C. Basal media were used to measure p24 concentration and infectivity while lower and upper fluids were used to determine the IgG or IgA concentrations by ELISA. p24 concentration in the lower compartment was determined by ELISA (HIV-1 p24 Antigen Capture Assay, Advanced Bioscience Laboratories, Rockville, MD) according to the manufacturer's instructions. Some transcytosis experiments were performed with: (i) a dose range of NLAD8 virus (0.08, 0.4, 2, and 10 ng p24 HIV-1); (ii) a dose range of purified 10-1074 IgG1 antibody (10, 50, 100, and 150 μg ml^{-1}); (iii) a pre-treatment with Bafilomycin A1 (Sigma). HEC-1A cell monolayers with TER values > 400 Ω cm^{-2} were incubated 1 h with or without 0.1 μM Bafilomycin A1 in apical and basal compartments before exposure with NLAD8 alone and antibodies (mGO53 and NIH45-46 expressed as IgG1 and IgA1) *plus* viruses. After washes with full Mac Coy's medium, transcytosis assay was performed as described above. To calculate the percentage of transcytosis as normalized % of input, we have used the following formula: (concentration p24 sample/mean concentration p24 CTL) × 100. Two to five independent experiments (at least in duplicate) were performed except for experiments testing multimeric IgAs and various concentrations of NLAD8 virus.

Cell preparation and confocal microscopy. 1.6×10^5 HEC-1A cells were grown onto coverslips (12 mm) for 6 days to achieve optimal confluence. NL4.3-Gag-eGFP viruses[76] (100 ng) were incubated with mGO53 (isotype negative control), NIH45-46 or 3BNC117 IgGs (66.67 nM final concentration) for 1 h at 37 °C. Mixtures were then applied onto the cells for 4 h at 37 °C. After washing with PBS, cells were fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde and then, with 1% paraformaldehyde before washes in PBS and storage at 4 °C. The intracellular immunostaining was performed after permeabilization of the cells with 0.05% Saponine (Sigma) in PBS-1% bovine serum albumin w/vol-0.01% sodium azide buffer. The following antibodies were used for the detection of adhesion junctions and bNAbs: E-cadherin clone 67A4 (1:300) (Santa Cruz Biotechnology), AF647-conjugated goat anti-human IgG (1:400) (Thermo Fisher Scientific). Secondary antibody labeled with Cy3-conjugated goat anti-mouse IgG1 (1:800 final dilution, Jackson Immunoresearch). Between each step, coverslips were washed three times with PBS, and mounted using DAPI-Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL) before observation.

Z-stack confocal acquisitions were performed on microscope Leica TCS Sp5 with a HCX PL APO × 63 1.4N.A. objective in the Imagopole platform (Institut Pasteur). Channel alignments were performed with the tetraSpeck microspheres 0.1 μm (Blue/Green/Orange/Dark red; Thermo Fisher Scientific) to control and correct the chromatic shift. The data were analyzed after chromatic shift and deconvolution with object analyzer advanced modules using Huygens Professional software (v14-10; SVI). For 3D reconstitutions and movies, the Imaris software (v 7.7.2; Bitplane) was used.

***In vitro* viral infectivity assay**. Infectivity of transcytosed free virions in the presence or absence (No Ab) of anti-HIV-1 gp160 IgG/IgA and negative control mGO53 antibodies was measured using TZM-bl cells assay. 1.0×10^4 TZM-bl reporter cells *per* well in full DMEM containing DEAE-dextran at 8 μg ml^{-1} (final concentration) were incubated for 48 h at 37 °C with 0.05 ng of transcytosed virus (recovered from post-transcytosis basal medium volume). Experiments were also performed to evaluate infectivity of NLAD8 transcytosed in the presence of antibodies at concentration ranges of 2F5 IgG (16.67-533.3 nM), 10-1074 and 3BNC117 IgG/IgA (0.023-66.67 nM) antibodies. In each experiment, controls were tested in parallel and include: 0.05 ng of NLAD8 virus alone, 0.05 ng of NLAD8 virus in presence of 10-1074 IgG1 mAb (20 μg ml^{-1} final concentration) or nevirapine (12.5 μM final concentration). Cells were lysed and the assay developed with Bright-Glo luciferase assay reagent according to the manufacturer's instructions (Promega, Madison, WI). Luminescence signal was measured as relative light units (RLU) using the Enspire microplate luminometer (Perkin Elmer). Each supernatant collected from the transcytosis experiments, when analyzed for neutralization activity, was tested in triplicate. To determine IC_{50} values for each antibody, we applied the following formula: 100 – [(RLU mean sample/RLU mean no antibody control) × 100]. Graphs were made by fitting data with non-linear regression with two-site binding hyperbola equation using GrapPad Prism software (v6.0a).

Statistics. Percentages of transcytosis (transcytosis %) and levels of infectivity were compared for each antibody group to mGO53 negative control group using Mann-Whitney test. One-way analysis of variance test was used to compare the transcytosis % in all groups across the 10-1074 IgG concentration range, and the levels of infectivity in all groups across the 2F5 IgG concentration range. Percentages of colocalization events measured by confocal microscopy experiments were compared across groups of antibodies using Mann-Whitney test. Statistical analyses were performed using *GraphPad Prism* software (v6.0a).

SUPPLEMENTARY MATERIAL is linked to the online version of the paper at http://www.nature.com/mi

ACKNOWLEDGMENTS

We warmly thank Aaron D. Denahue (Virus & Immunity Unit) for manuscript editing, Michel C. Nussenzweig and Johannes F. Scheid (Laboratory of Molecular Immunology) for providing us bNAbs expression vectors, Nicoletta Casartelli (Virus & Immunity Unit), Pierre-Emmanuel Ceccaldi (Oncogenic Virus Epidemiology & Pathophysiology Unit, Institut Pasteur), and Pascal Roux and Anne Danckaert (Imagopole platform, Institut Pasteur) for their technical advices and/or help on data analyses. We also thank the NIH AIDS Reagent Program for contributing to reagents. O.S. was supported by grants from the ANRS, SIDACTION, the Vaccine Research Institute, the Labex IBEID program, the FP7 program HIT Hidden HIV (Health-F3-2012–305762) and Institut Pasteur. This work was supported by the European Research Council (ERC) – Seventh Framework Program (ERC-2013-StG 337146). H.M. was supported by the ANRS, the G5 Institut Pasteur Program, and the *Milieu Intérieur* Program (ANR-10-LABX-69-01). M.M. was supported by a fellowship from the ERC-2013-StG 337146 Program.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

H.M. conceived the study. V.L., M.M., C.E., T.B., M.S.S., O.S., and H.M. designed, performed, and analyzed the experiments; F.P. and O.S. contributed to reagents; V.L., O.S., and H.M. wrote the manuscript with contributions from all the authors.

DISCLOSURE
The authors declared no conflict of interest.

Society for Mucosal Immunology

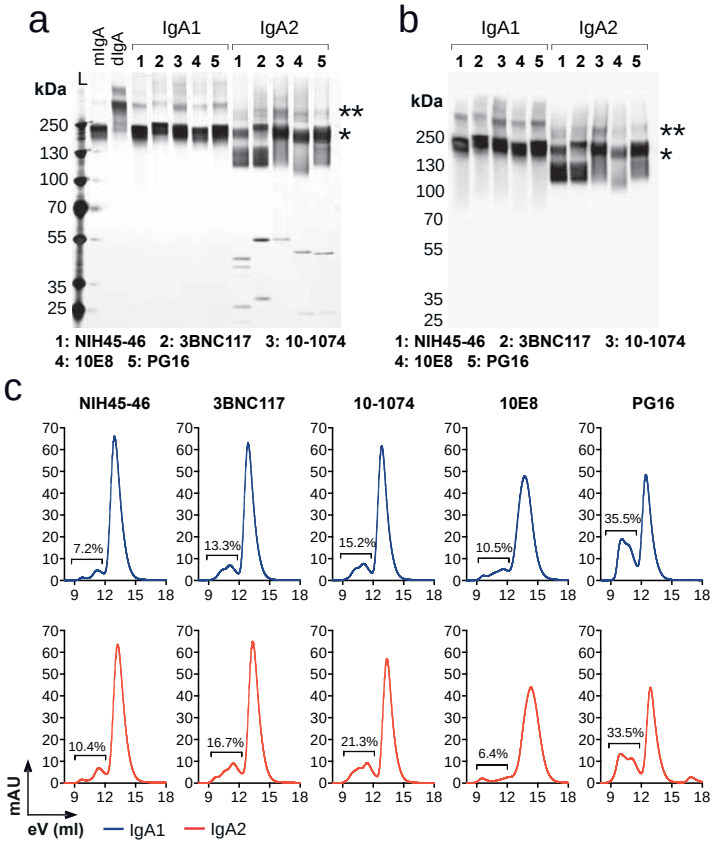
REFERENCES

1. Levy, J.A. *HIV and the Pathogenesis of AIDS*. ASM Press (2013).
2. Xu, H., Wang, X. & Veazey, R.S. Mucosal immunology of HIV infection. *Immunol. rev.* **254**, 10–33 (2013).
3. Haase, A.T. Early events in sexual transmission of HIV and SIV and opportunities for interventions. *Ann. rev. med.* **62**, 127–139 (2011).
4. Pope, M. & Haase, A.T. Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. *Nat. med.* **9**, 847–852 (2003).
5. Neutra, M.R. Interactions of viruses and microparticles with apical plasma membranes of M cells: implications for human immunodeficiency virus transmission. *J. infect. dis.* **179**, S441–S443 (1999).
6. Geijtenbeek, T.B. *et al.* DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**, 587–597 (2000).
7. Haase, A.T. Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. *Nature* **464**, 217–223 (2010).
8. Shattock, R.J. & Moore, J.P. Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nat. rev. Microbiol.* **1**, 25–34 (2003).
9. Bomsel, M. & Alfsen, A. Entry of viruses through the epithelial barrier: pathogenic trickery. *Nat. rev. Mol. cell biol.* **4**, 57–68 (2003).
10. Kaetzel, C.S. *Mucosal immune defense: immunoglobulin A* xv, 433 (Springer: New York, 2007).
11. Mouquet, H. Antibody B cell responses in HIV-1 infection. *Trends immunol.* **35**, 549–561 (2014).
12. Alfsen, A., Iniguez, P., Bouguyon, E. & Bomsel, M. Secretory IgA specific for a conserved epitope on gp41 envelope glycoprotein inhibits epithelial transcytosis of HIV-1. *J. immunol.* **166**, 6257–6265 (2001).
13. Bomsel, M. *et al.* Intracellular neutralization of HIV transcytosis across tight epithelial barriers by anti-HIV envelope protein dIgA or IgM. *Immunity* **9**, 277-287 (1998).
14. Devito, C. *et al.* Mucosal and plasma IgA from HIV-1-exposed uninfected individuals inhibit HIV-1 transcytosis across human epithelial cells. *J. immunol.* **165**, 5170–5176 (2000).
15. Friedman, J. *et al.* Isolation of HIV-1-neutralizing mucosal monoclonal antibodies from human colostrum. *PLoS One* **7**, e37648 (2012).
16. Tudor, D. *et al.* HIV-1 gp41-specific monoclonal mucosal IgAs derived from highly exposed but IgG-seronegative individuals block HIV-1 epithelial transcytosis and neutralize CD4(+) cell infection: an IgA gene and functional analysis. *Mucosal immunol.* **2**, 412–426 (2009).
17. Horwitz, J.A. *et al.* HIV-1 suppression and durable control by combining single broadly neutralizing antibodies and antiretroviral drugs in humanized mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 16538–16543 (2013).
18. Klein, F. *et al.* HIV therapy by a combination of broadly neutralizing antibodies in humanized mice. *Nature* **492**, 118–122 (2012).
19. Moldt, B. *et al.* Highly potent HIV-specific antibody neutralization in vitro translates into effective protection against mucosal SHIV challenge in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 18921–18925 (2012).
20. Shingai, M. *et al.* Antibody-mediated immunotherapy of macaques chronically infected with SHIV suppresses viraemia. *Nature* **503**, 277–280 (2013).
21. Barouch, D.H. *et al.* Therapeutic efficacy of potent neutralizing HIV-1-specific monoclonal antibodies in SHIV-infected rhesus monkeys. *Nature* **503**, 224–228 (2013).
22. Hessell, A.J. *et al.* Broadly neutralizing human anti-HIV antibody 2G12 is effective in protection against mucosal SHIV challenge even at low serum neutralizing titers. *PLoS pathog.* **5**, e1000433 (2009).
23. Hessell, A.J. *et al.* Broadly neutralizing monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 directed against the human immunodeficiency virus type 1 gp41 membrane-proximal external region protect against mucosal challenge by simian-human immunodeficiency virus SHIVBa-L. *J. virol.* **84**, 1302–1313 (2010).
24. Hessell, A.J. *et al.* Effective, low-titer antibody protection against low-dose repeated mucosal SHIV challenge in macaques. *Nat. med.* **15**, 951–954 (2009).
25. Moog, C. *et al.* Protective effect of vaginal application of neutralizing and nonneutralizing inhibitory antibodies against vaginal SHIV challenge in macaques. *Mucosal immunol.* **7**, 46–56 (2014).
26. Mascola, J.R. *et al.* Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat. med.* **6**, 207–210 (2000).
27. Balazs, A.B. *et al.* Vectored immunoprophylaxis protects humanized mice from mucosal HIV transmission. *Nat. med.* **20**, 296–300 (2014).
28. Hur, E.M., Patel, S.N., Shimizu, S., Rao, D.S. & Gnanapragasam, P.N. An DS et al. Inhibitory effect of HIV-specific neutralizing IgA on mucosal transmission of HIV in humanized mice. *Blood* **120**, 4571–4582 (2012).
29. Caskey, M. *et al.* Viraemia suppressed in HIV-1-infected humans by broadly neutralizing antibody 3BNC117. *Nature* **522**, 487–491 (2015).
30. Lynch, R.M. *et al.* Virologic effects of broadly neutralizing antibody VRC01 administration during chronic HIV-1 infection. *Sci. transl. med.* **7**, 319ra206 (2015).
31. Malbec, M. *et al.* Broadly neutralizing antibodies that inhibit HIV-1 cell to cell transmission. *J. exp. med.* **210**, 2813–2821 (2013).
32. Bruel, T. *et al.* Elimination of HIV-1-infected cells by broadly neutralizing antibodies. *Nat. commun.* **7**, 10844 (2016).
33. Bournazos, S., Klein, F., Pietzsch, J., Seaman, M.S., Nussenzweig, M.C. & Ravetch, J.V. Broadly neutralizing anti-HIV-1 antibodies require Fc effector functions for in vivo activity. *Cell* **158**, 1243–1253 (2014).
34. Halper-Stromberg, A. *et al.* Broadly neutralizing antibodies and viral inducers decrease rebound from HIV-1 latent reservoirs in humanized mice. *Cell* **158**, 989–999 (2014).
35. Hessell, A.J. *et al.* Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV. *Nature* **449**, 101–104 (2007).
36. Lu, C.-L. *et al.* Enhanced clearance of HIV-1–infected cells by broadly neutralizing antibodies against HIV-1 in vivo. *Science* **352**, 1001–1004 (2016).
37. Scheid, J.F. *et al.* Sequence and structural convergence of broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding. *Science* **333**, 1633–1637 (2011).
38. Walker, L.M. *et al.* Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science* **326**, 285–289 (2009).
39. Mouquet, H. *et al.* Complex-type N-glycan recognition by potent broadly neutralizing HIV antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, E3268–E3277 (2012).
40. Huang, J. *et al.* Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. *Nature* **491**, 406–412 (2012).
41. Lorin, V. & Mouquet, H. Efficient generation of human IgA monoclonal antibodies. *J. immunol. meth.* **422**, 102–110 (2015).
42. Chomont, N. *et al.* Neutralizing monoclonal antibodies to human immunodeficiency virus type 1 do not inhibit viral transcytosis through mucosal epithelial cells. *Virology* **370**, 246–254 (2008).
43. Kinlock, B.L., Wang, Y., Turner, T.M., Wang, C. & Liu, B. Transcytosis of HIV-1 through vaginal epithelial cells is dependent on trafficking to the endocytic recycling pathway. *PLoS One* **9**, e96760 (2014).
44. Zheng, J. *et al.* gp120-independent HIV infection of cells derived from the female reproductive tract, brain, and colon. *J. acquir. immune defic. syndr.* **43**, 127–136 (2006).
45. Alfsen, A., Yu, H., Magerus-Chatinet, A., Schmitt, A. & Bomsel, M. HIV-1-infected blood mononuclear cells form an integrin- and agrin-dependent viral synapse to induce efficient HIV-1 transcytosis across epithelial cell monolayer. *Mol. biol. cell* **16**, 4267–4279 (2005).
46. Tudor, D. *et al.* Isotype modulates epitope specificity, affinity, and antiviral activities of anti-HIV-1 human broadly neutralizing 2F5 antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 12680–12685 (2012).
47. Bomsel, M. *et al.* Immunization with HIV-1 gp41 subunit virosomes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges. *Immunity* **34**, 269–280 (2011).
48. Bomsel, M. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat. med.* **3**, 42–47 (1997).
49. Gupta, S. *et al.* The Neonatal Fc receptor (FcRn) enhances human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transcytosis across epithelial cells. *PLoS pathog.* **9**, e1003776 (2013).

50. Hocini, H. *et al.* High-level ability of secretory IgA to block HIV type 1 transcytosis: contrasting secretory IgA and IgG responses to glycoprotein 160. *AIDS res. hum. retroviruses* **13**, 1179–1185 (1997).
51. Shen, R. *et al.* GP41-specific antibody blocks cell-free HIV type 1 transcytosis through human rectal mucosa and model colonic epithelium. *J. immunol.* **184**, 3648–3655 (2010).
52. Watkins, J.D. *et al.* Anti-HIV IgA isotypes: differential virion capture and inhibition of transcytosis are linked to prevention of mucosal R5 SHIV transmission. *Aids* **27**, F13–F20 (2013).
53. Wolbank, S., Kunert, R., Stiegler, G. & Katinger, H. Characterization of human class-switched polymeric (immunoglobulin M [IgM] and IgA) anti-human immunodeficiency virus type 1 antibodies 2F5 and 2G12. *J. virol.* **77**, 4095–4103 (2003).
54. Yu, X. *et al.* Impact of IgA constant domain on HIV-1 neutralizing function of monoclonal antibody F425A1g8. *J. immunol.* **190**, 205–210 (2013).
55. Janda, A., Bowen, A., Greenspan, N.S. & Casadevall, A. Ig constant region effects on variable region structure and function. *Front. microbiol.* **7**, 22 (2016).
56. Bobardt, M.D. *et al.* Cell-free human immunodeficiency virus type 1 transcytosis through primary genital epithelial cells. *J. virol.* **81**, 395–405 (2007).
57. Carias, A.M. *et al.* Defining the interaction of HIV-1 with the mucosal barriers of the female reproductive tract. *J. virol.* **87**, 11388–11400 (2013).
58. Zhou, M. & Ruprecht, R.M. Are anti-HIV IgAs good guys or bad guys?. *Retrovirology* **11**, 109 (2014).
59. Chen, A. *et al.* Transient antibody-mucin interactions produce a dynamic molecular shield against viral invasion. *Biophys. j.* **106**, 2028–2036 (2014).
60. Fahrbach, K.M., Malykhina, O., Stieh, D.J. & Hope, T.J. Differential binding of IgG and IgA to mucus of the female reproductive tract. *PLoS One* **8**, e76176 (2013).
61. Mantis, N.J. *et al.* Inhibition of HIV-1 infectivity and epithelial cell transfer by human monoclonal IgG and IgA antibodies carrying the b12 V region. *J. immunol.* **179**, 3144–3152 (2007).
62. Ball, J.M. *et al.* A polarized human endometrial cell line that binds and transports polymeric IgA. *In vitro cell. dev. biol. Anim.* **31**, 196–206 (1995).
63. Haynes, B.F. *et al.* Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *N. Engl. J. Med.* **366**, 1275–1286 (2012).
64. Sips, M. *et al.* Fc receptor-mediated phagocytosis in tissues as a potent mechanism for preventive and therapeutic HIV vaccine strategies. *Mucosal immunol.* **9**, 1584–1595 (2016).
65. Scott, Y.M., Park, S.Y. & Dezzutti, C.S. Broadly neutralizing anti-HIV antibodies prevent HIV infection of mucosal tissue ex vivo. *Antimicrob. agents chemother.* **60**, 904–912 (2015).
66. Huang, Y.T., Wright, A., Gao, X., Kulick, L., Yan, H. & Lamm, M.E. Intraepithelial cell neutralization of HIV-1 replication by IgA. *J. immunol.* **174**, 4828–4835 (2005).
67. Pegu, A. *et al.* Neutralizing antibodies to HIV-1 envelope protect more effectively in vivo than those to the CD4 receptor. *Sci. transl. med.* **6**, 243ra288 (2014).
68. Shingai, M. *et al.* Passive transfer of modest titers of potent and broadly neutralizing anti-HIV monoclonal antibodies block SHIV infection in macaques. *J. exp. med.* **211**, 2061–2074 (2014).
69. Hessell, A.J. *et al.* Early short-term treatment with neutralizing human monoclonal antibodies halts SHIV infection in infant macaques. *Nat. med.* **22**, 362–368 (2016).
70. Gautam, R. *et al.* A single injection of anti-HIV-1 antibodies protects against repeated SHIV challenges. *Nature* **533**, 105–109 (2016).
71. Ko, S.Y. *et al.* Enhanced neonatal Fc receptor function improves protection against primate SHIV infection. *Nature* **514**, 642–645 (2014).
72. Muster, T. *et al.* A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J. virol.* **67**, 6642–6647 (1993).
73. Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J.W., Meffre, E. & Nussenzweig, M.C. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* **301**, 1374–1377 (2003).
74. Tiller, T., Meffre, E., Yurasov, S., Tsuiji, M., Nussenzweig, M.C. & Wardemann, H. Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J. immunol. meth.* **329**, 112–124 (2008).
75. Mouquet, H. *et al.* Memory B cell antibodies to HIV-1 gp140 cloned from individuals infected with Clade A and B viruses. *PLoS One* **6**, e24078 (2011).
76. Casartelli, N. *et al.* Tetherin restricts productive HIV-1 cell-to-cell transmission. *PLoS pathog.* **6**, e1000955 (2010).
77. Schwartz, O., Alizon, M., Heard, J.M. & Danos, O. Impairment of T cell receptor-dependent stimulation in CD4+ lymphocytes after contact with membrane-bound HIV-1 envelope glycoprotein. *Virology* **198**, 360–365 (1994).
78. Lepelley, A. *et al.* Innate sensing of HIV-infected cells. *PLoS pathog.* **7**, e1001284 (2011).
79. Rudnicka, D. *et al.* Simultaneous cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus to multiple targets through polysynapses. *J. virol.* **83**, 6234–6246 (2009).
80. Mouquet, H. *et al.* Polyreactivity increases the apparent affinity of anti-HIV antibodies by heteroligation. *Nature* **467**, 591–595 (2010).
81. Li, M. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 env clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. *J. virol.* **79**, 10108–10125 (2005).
82. Afonso, P.V. *et al.* Alteration of blood-brain barrier integrity by retroviral infection. *PLoS pathog.* **4**, e1000205 (2008).
83. Dehouck, M.P., Jolliet-Riant, P., Bree, F., Fruchart, J.C., Cecchelli, R. & Tillement, J.P. Drug transfer across the blood-brain barrier: correlation between in vitro and in vivo models. *J. neurochem.* **58**, 1790–1797 (1992).

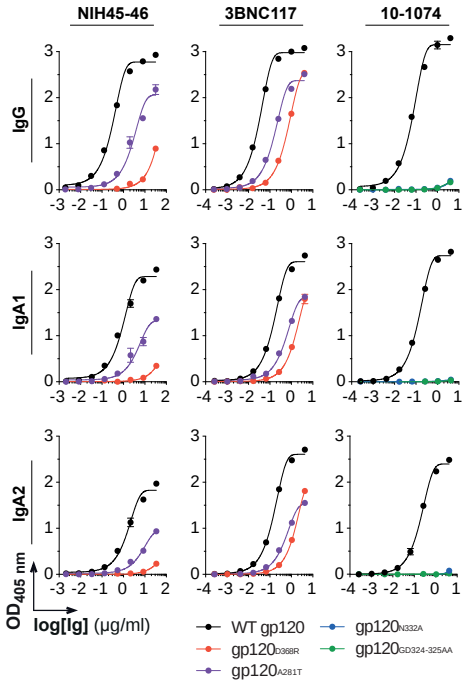
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/

Supplementary Figure S1



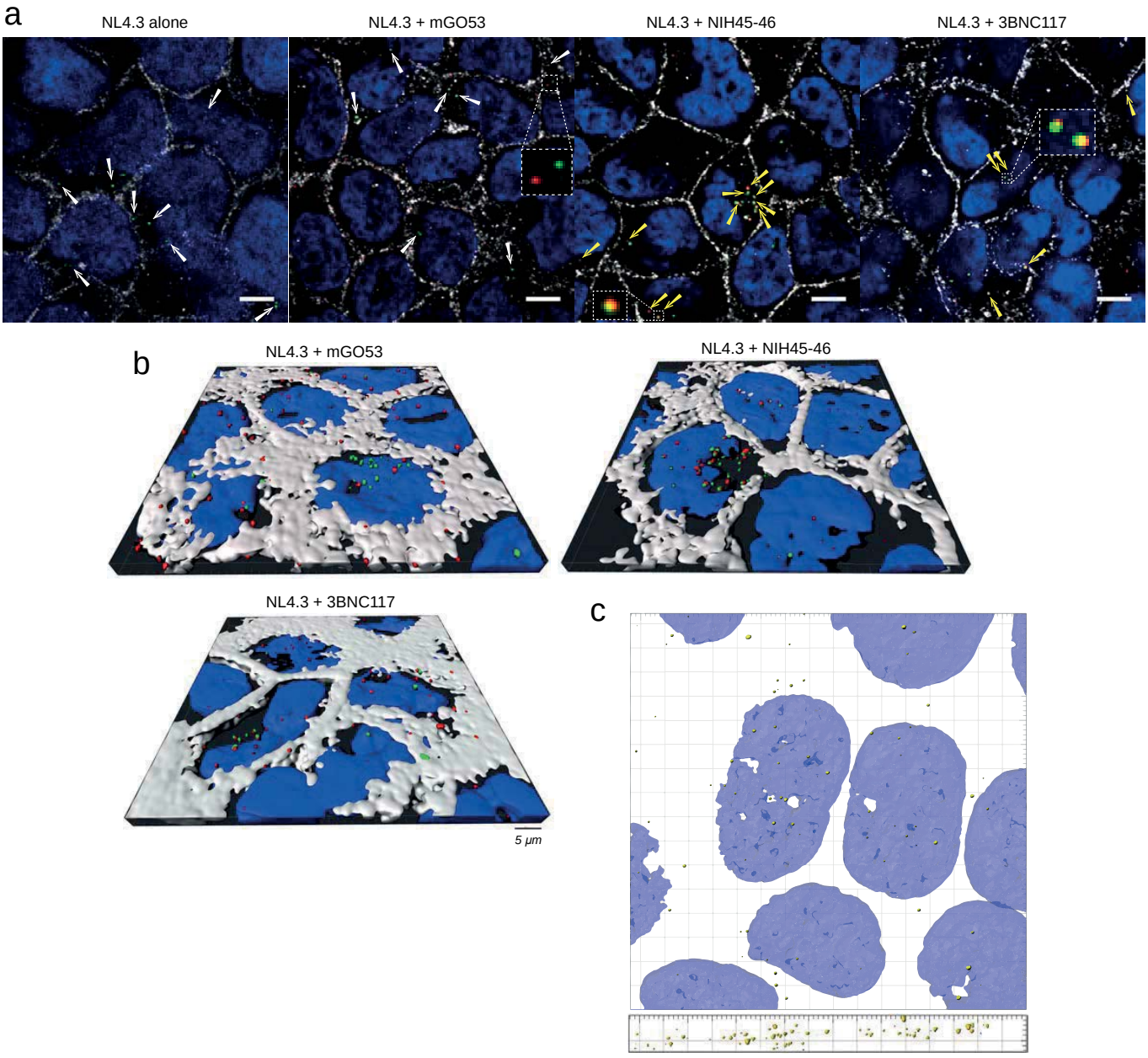
Supplementary Figure S1. Production of recombinant IgA bNAbs. (**a**) Silver-stained SDS-PAGE gel showing selected purified HIV-1 bNAbs produced as native IgA1 and IgA2 molecules. L, protein ladder indicating molecular masses. mIgA, purified monomeric 10-1074 HIV-1 IgA antibody used as control; dIgA, purified dimeric 10-1074 HIV-1 IgA antibody used as control [41]. *, monomeric immunoglobulins; **, dimeric immunoglobulins. (**b**) Immunoblotting showing the reactivity of peroxydase-conjugated anti-human IgA antibodies against native IgA bNAbs. Molecular masses are indicated on the left. (**c**) FPLC chromatogram showing the protein distribution (monomers and dimers/multimers) of the purified IgA bNAbs produced as native IgA1 (blue) and IgA2 (red) molecules after size exclusion chromatography (SEC). The x axis shows the elution volume (eV) required to obtain the values of absorption units at 280 nm (mAU) indicated on the y axis. The proportion of dimeric/multimeric immunoglobulins is indicated above the corresponding SEC pic.

Supplementary Figure S2



Supplementary Figure S2. Binding of selected bNAbs to gp120 mutants. ELISA-based binding analyses of NIH45-46, 3BNC117 and 10-1074 antibodies to indicated mutant proteins compared to intact YU-2 gp120 (WT gp120). A281T and D368R mutations lie within the CD4 binding site. GD324-325AA and N332A are located at the basis of the V3 loop and at the begining of the C4 domain, respectively. The x axis shows the antibody concentration (µg/ml) required to obtain the ELISA values ($OD_{405\ nm}$) indicated on the y axis. Error bars indicate the SEM of duplicate values. All experiments were performed at least in duplicate. Representative data are shown.

Supplementary Figure S3



Supplementary Figure S3. Confocal microscopy analysis of HIV-1 transcytosis. (**a**) Original pictures of the confocal microscopy experiments made on HEC-1A cell monolayers with GFP-labeled HIV-1 (green) in presence of mGO53, NIH45-46 or 3BNC117 (red). Nuclei and intercellular junctions were stained with DAPI (blue) and anti-E-cadherin antibody (grey), respectively. White arrows show representative events of GFP-labeled HIV-1 alone. Yellow arrows indicate colocalization events between HIV-1 and antibodies. Scale bar indicates 10 µm. (**b**) 3D-images reconstructed from the confocal microscopy experiments made in (a) using the Imaris sofware. Scale bar indicates 5 µm. (**c**) 3D confocal microscopy pictures show the repartition of virus-3BNC117 antibody complexes (yellow objects) on the field (top) and across it depth (6 µm Z-stack) (bottom).

ARTICLE 2

Antibody Neutralization of HIV-1 Crossing the Blood-Brain Barrier

Valérie Lorin[1], Anne Danckaert[2], Françoise Porrot[3], Olivier Schwartz[3], Philippe V. Afonso[4], Hugo Mouquet[1]

1 Laboratoire d'Immunologie Humorale, INSERM U1222, Département d'Immunologie, Institut Pasteur, Paris, France **2** UTechS PBI (Imagopole)-Citech, Institut Pasteur, Paris, 75015, France **3** Unité Virus et Immunité, CNRS URA3015, Département de Virologie, Institut Pasteur, Paris, France **4** Unité Epidémiologie et Physiopathologie des Virus Oncogènes, CNRS UMR 3569, Département de Virologie, Institut Pasteur, Paris, France.

Publié dans mBio : Lorin *et al*., mBio 2020 Oct 20;11(5):e02424-20. doi: 10.1128/mBio.02424-20. PMID: 33082263

Très tôt après la contamination, le VIH-1 peut pénétrer dans le SNC. La réplication du VIH-1 dans les cellules cibles cérébrales telles que les macrophages périvasculaires et les cellules de la microglie, peut favoriser l'établissement d'un réservoir et causer une neuroinflammation. Ces éléments concourent au développement de désordres neurocognitifs associés au VIH (HAND, *HIV-associated neurocognitive disorders*). Les HAND incluent un spectre de dysfonctionnements neurocognitifs de gravité croissante : (i) des déficits neurocognitifs asymptomatiques ; (ii) des troubles neurocognitifs légers ; (iii) la démence associée au VIH (Antinori et al., 2007) (Clifford and Ances, 2013). Les traitements cART ont très largement contribués à réduire la sévérité des HAND en ralentissant leur progression vers la démence. On estime que 15 à 55 % des individus vivant avec le VIH-1 sous cART développent des désordres neurocognitifs suite au passage du virus à travers la BHE (Saylor et al., 2016).

La BHE est composée de cellules endothéliales liées entre elles par des jonctions serrées et adhérentes, de macrophages périvasculaires, de cellules microgliales, d'astrocytes, de neurones et d'une lame basale. Physiologiquement, la BHE est une barrière sélective qui contrôle les échanges entre les compartiments sanguin et cérébral, et qui protège le SNC de molécules toxiques et de pathogènes circulants (Ivey et al., 2009) (Weiss et al., 2009). Plusieurs mécanismes d'entrée du VIH-1 ont été décrits dont les principaux sont : (i) le passage para-/extracellulaire (transmigration) de monocytes ou LT CD4+ infectés à travers une BHE intacte (hypothèse du cheval de Troie) (Nottet et al., 1996) ; (ii) l'infection directe de cellules de la BHE (Gonzalez-Scarano and Martin-Garcia, 2005) (Eugenin and Berman, 2007) ; (iii) l'altération de la fonction barrière de la BHE (rupture des jonctions intercellulaires) (Kanmogne et al., 2005) ; (iv) le passage trans-/intracellulaire (transcytose) par endocytose adsorptive (Banks et al., 1998) (Banks et al., 2001).

Certains anticorps neutralisants à large spectre anti-VIH-1 (bNAbs) parmi les plus efficaces ont montré des capacités prophylactiques et thérapeutiques dans des études précliniques et dans des essais cliniques, ce qui a entrainé un regain d'intérêt dans ce champ de recherche (Caskey et al., 2019) (Grobben et al., 2019). Pour rappel, la neutralisation virale et les fonctions effectrices dépendantes du fragment Fc des bNAbs sont des paramètres cruciaux pour l'activité des bNAbs *in vivo*. Cependant, il n'est pas connu si les anticorps anti-VIH-1 y compris les bNAbs peuvent interférer ou non dans le transport des VIH-1 à travers l'endothélium de la BHE.

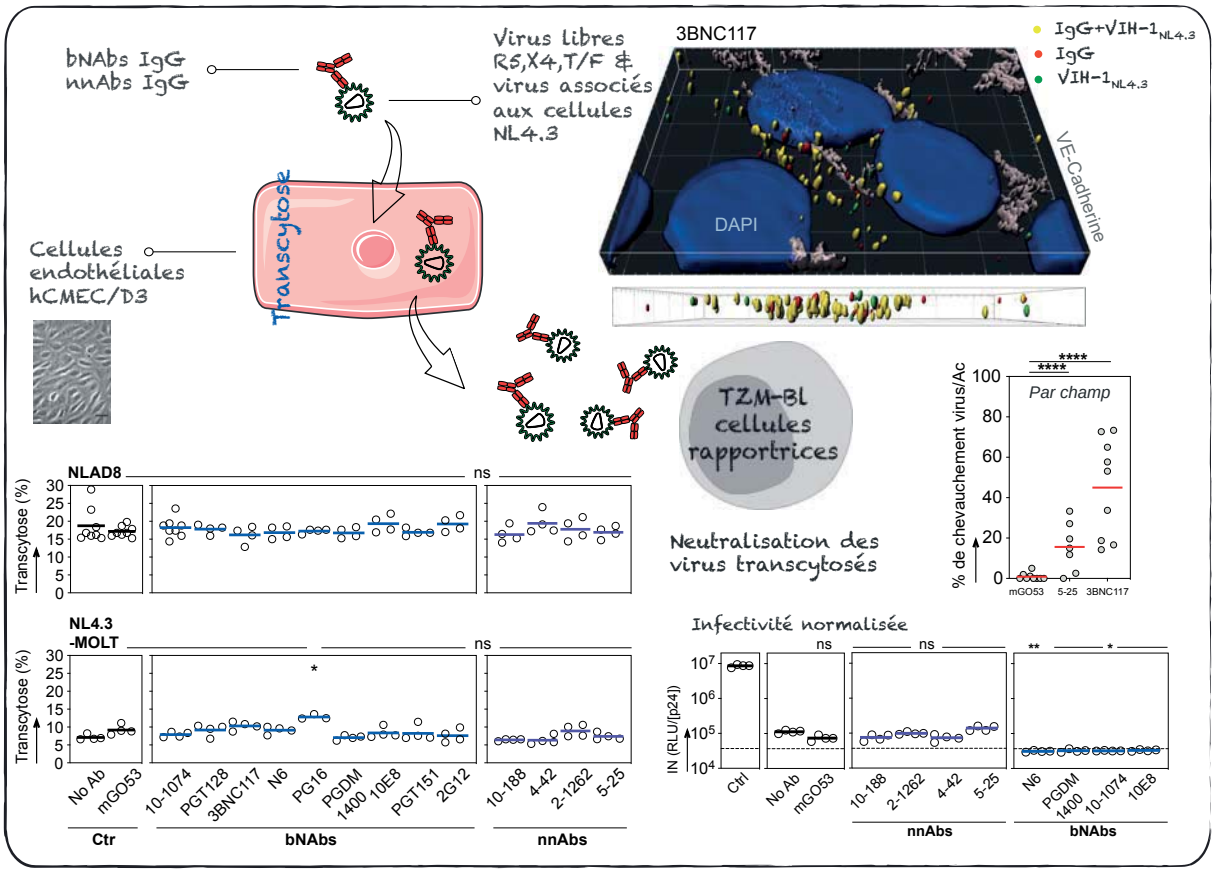
Dans cette étude, nous avons évalué la capacité des anticorps anti-VIH-1 à protéger de la pénétration du virus dans le cerveau. Pour cela, nous avons étudié les propriétés d'une collection de neuf bNAbs IgG1 de seconde génération ciblant différents épitopes sur la

gp160 : 3BNC117 et N6 ciblant le site de liaison au CD4 ; 2G12, 10-1074 et PGT128 ciblant les N-glycanes associés à la boucle V3 ; PG16 et PGDM1400 ciblant les N-glycanes associés aux boucles V1/V2 ; PGT151 ciblant le peptide de fusion sur la gp41 et 10E8 ciblant le peptide MPER, ainsi que quatre anticorps anti-Env peu ou pas neutralisants (nnAbs IgG1, 4-42, 2-1262, 5-25 et 10-188) dans un modèle de BHE *in vitro*. Ce système utilise une monocouche de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines polarisées (hCMEC/D3) (Weksler et al., 2005) (Weksler et al., 2013). La validation du test de transcytose virale a été réalisée par : (i) le suivi des résistances électriques transendothéliales avec une confluence cellulaire atteinte en huit jours ; (ii) l'expression de protéines de jonction serrées et adhérentes (VE-cadhérine, ZO-1, JAM-A) ; (iii) l'absence de perméabilité aux molécules Dextran-FITC. Nos expériences ont montré que l'enveloppe virale est partiellement requise pour une transcytose virale optimale faisant intervenir potentiellement des récepteurs alternatifs ou des corécepteurs exprimés par les cellules hCMEC/D3 qui sont dépourvues du récepteur CD4. De plus, aucun des bNAbs et nnAbs testés seuls ou en combinaison ne bloquent le passage des virus à travers l'endothélium *in vitro* en conditions de virus libres (virus R5, X4, T/F) ou associés aux cellules (MOLT). Par ailleurs, les IgG anti-VIH-1 polyclonales sériques de patients Elite immunopurifiées contre la $gp140_{YU2}$ trimérique afin de dépléter les anticorps anti-p24 bloquant la détection de l'antigène p24 des virus transcytosés, n'ont pas d'effet sur la transmigration endothéliale de virus libres R5.

Nous avons ensuite étudié le passage de VIH-1, des anticorps ou des complexes virus-anticorps à travers les cellules endothéliales par microscopie confocale. Les analyses de colocalisation des VIH-1 et des anticorps (bNAb 3BNC117, nnAb 5-25 et contrôle isotypique mGO53) ont montré que seuls les anticorps anti-VIH-1 colocalisent avec les virions : 45,0 et 15,6 % pour 3BNC117 et 5-25, respectivement contre 0,9 % pour mGO53. De plus, les analyses de microscopie confocale mettent en évidence que les VIH-1 seuls, les anticorps seuls et les complexes virus-anticorps sont distribués à travers toute l'épaisseur des cellules endothéliales, suggérant clairement un transport transendothélial par endocytose.

Enfin, nous avons observé que la capacité infectieuse des virions est considérablement altérée par le processus de transcytose à travers les cellules hCMEC/D3 mais toutefois, encore détectable en présence des nnAbs. Au contraire, nos résultats montrent que les virions fixés par les bNAbs et transcytosés perdent complètement leur potentiel infectieux. Nous avons aussi estimé avec une gamme de concentrations du bNAb 3BNC117, que la neutralisation virale post-transcytose est moins efficace en-dessous de 1 µg/ml.

L’ensemble de ces données démontre pour la première fois que la capacité de neutralisation des bNAbs anti-VIH-1 est un facteur clé dans la protection des cellules cérébrales contre l'infection par le VIH-1. En effet, malgré l'incapacité des bNAbs à bloquer la migration virale transendothéliale, ils peuvent inhiber l’infectivité des virus ayant transcytosés à travers la BHE.



L’ensemble de ce travail a été publié dans le journal *mBio*.

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY | mBio®

OBSERVATION
Host-Microbe Biology

Antibody Neutralization of HIV-1 Crossing the Blood-Brain Barrier

Valérie Lorin,[a,b,c] Anne Danckaert,[d] Françoise Porrot,[e,f] Olivier Schwartz,[e,f] Philippe V. Afonso,[g,h] Hugo Mouquet[a,b]

[a]Laboratory of Humoral Immunology, Department of Immunology, Institut Pasteur, Paris, France
[b]INSERM U1222, Paris, France
[c]Université de Paris, Sorbonne Paris Cité, Paris, France
[d]UTechS Photonic BioImaging, C2RT, Institut Pasteur, Paris, France
[e]Virus & Immunity Unit, Department of Virology, Institut Pasteur, Paris, France
[f]CNRS URA3015, Paris, France
[g]Oncogenic Virus Epidemiology and Pathophysiology Unit, Department of Virology, Institut Pasteur, Université de Paris, Paris, France
[h]CNRS UMR 3569, Université de Paris, Paris, France

ABSTRACT HIV-1 can cross the blood-brain barrier (BBB) to penetrate the brain and infect target cells, causing neurocognitive disorders as a result of neuroinflammation and brain damage. Here, we examined whether antibodies targeting the HIV-1 envelope glycoproteins interfere with the transcytosis of virions across the human BBB endothelium. We found that although the viral envelope spike gp160 is required for optimal endothelial cell endocytosis, no anti-gp160 antibodies blocked the BBB transcytosis of HIV-1 *in vitro*. Instead, both free viruses and those in complex with antibodies transited across endothelial cells in the BBB model, as observed by confocal microscopy. HIV-1 infectious capacity was considerably altered by the transcytosis process but still detectable, even in the presence of nonneutralizing antibodies. Only virions bound by neutralizing antibodies lacked posttranscytosis infectivity. Overall, our data support the role of neutralizing antibodies in protecting susceptible brain cells from HIV-1 infection despite their inability to inhibit viral BBB endocytic transport.

IMPORTANCE HIV-1 can cross the blood-brain barrier (BBB) to penetrate the brain and infect target cells, causing neurocognitive disorders as a result of neuroinflammation and brain damage. The HIV-1 envelope spike gp160 is partially required for viral transcytosis across the BBB endothelium. But do antibodies developing in infected individuals and targeting the HIV-1 gp160 glycoproteins block HIV-1 transcytosis through the BBB? We addressed this issue and discovered that anti-gp160 antibodies do not block HIV-1 transport; instead, free viruses and those in complex with antibodies can transit across BBB endothelial cells. Importantly, we found that only neutralizing antibodies could inhibit posttranscytosis viral infectivity, highlighting their ability to protect susceptible brain cells from HIV-1 infection.

KEYWORDS antibodies, blood brain barrier, HIV-1, neutralization, transcytosis

Early postinfection, HIV-1 can invade the central nervous system (CNS) and be transmitted to CNS-resident susceptible cells, such as perivascular macrophages, microglia, astrocytes, and pericytes (1–3). HIV-1 replication in brain target cells may favor establishing a local viral reservoir (4) and causes a neuroinflammation contributing to neurocognitive dysfunctions (1, 5, 6). HIV-1-associated neurocognitive disorders range from asymptomatic and mild neurocognitive impairment to dementia (5). To penetrate into the CNS, HIV-1 must cross the blood-brain barrier (BBB), which is a selective diffusion barrier essential for protecting the CNS from toxic molecules and

Citation Lorin V, Danckaert A, Porrot F, Schwartz O, Afonso PV, Mouquet H. 2020. Antibody neutralization of HIV-1 crossing the blood-brain barrier. mBio 11:e02424-20. https://doi.org/10.1128/mBio.02424-20.

Editor Matthew S. Miller, McMaster University

Copyright © 2020 Lorin et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Hugo Mouquet, hmouquet@pasteur.fr.

Received 24 August 2020
Accepted 21 September 2020
Published 20 October 2020

Downloaded from http://mbio.asm.org/ on October 20, 2020 at INSTITUT PASTEUR-Bibliotheque

circulating pathogens as well as for controlling brain homeostasis (7). The BBB is made of capillary endothelial cells joined by tight and adherent junctions, covered by a basal membrane, and surrounded by pericytes and astrocytic endfeet (7). Free and cell-associated HIV-1 virions can translocate across the BBB and enter the CNS via mechanisms common to other neuroinvasive pathogens (8). HIV-1 crosses the BBB following a Trojan horse model in which infected cells transmigrate by diapedesis through intact endothelial cells and by a direct paracellular transversal of the BBB damaged as a result of the infection (9, 10). HIV-1 also traverses the BBB through a transcytosis pathway (1), which may be initiated by viral envelope gp160 glycoproteins binding to proteoglycans (11) and mannose-6-phoshate receptors on endothelial cells (12). Antibodies specific to the HIV-1 envelope spike are rapidly elicited in infected humans, but only those targeting functional gp160 epitopes are neutralizing (13). Moreover, only rare infected individuals develop broadly reactive antibodies neutralizing most HIV-1 strains (13). These broadly neutralizing antibodies (bNAbs) efficiently protect nonhuman primates from infection and decrease viremia in infected humans (14), and thus, they offer promise for HIV-1 prevention and treatment. Whether bNAbs, and more generally anti-gp160 IgG antibodies, interfere with or block HIV-1 transcytosis across the BBB has remained unknown.

gp160 antibodies do not block HIV-1 transcytosis across the blood-brain barrier. To test the ability of gp160-specific antibodies to block HIV-1 transcytosis across the BBB, we established an *in vitro* model using the human brain microvascular endothelial cell line hCMEC/D3, which reproduces most characteristics of the BBB endothelium (15). hCMEC/D3 cells grown on Transwell culture membranes for a week assembled in confluent and tight monolayers characterized by a low permeability to 40-kDa DEAE-dextran molecules (Fig. 1A to C). hCMEC/D3 cell monolayers formed both tight and adherent junctions, with expression of vascular endothelial (VE)-cadherin, junctional adhesion molecule A (JAM-A), and zonula occludens-1 (ZO-1) (Fig. 1D). HIV-1 transcytosis was assayed at day 8 of culture by exposing cells to CCR5- or CXCR4-tropic HIV-1 virions (NLAD8 and NL4.3 strains, respectively), and measuring the HIV-1 p24 protein content in the basal compartment medium of the Transwell (Fig. 1A). We found that on average, ~17% of the viral inoculum passing through the porous membrane translocated across the hCMEC/3 endothelium after 4 h (Fig. 1E). In agreement with previous observations (16), envelope-deficient HIV-1 virions (NL-ΔEnv) displayed lower transcytosis capacity ($P = 0.0003$ versus NLAD8) (Fig. 1E), indicating that HIV-1 transcytosis across the BBB partially depends on envelope glycoproteins. Still, HIV-1 can traverse the BBB endothelium through an Env-independent pathway, for which we cannot completely rule out a paracellular transit of a fraction of HIV-1 virions. However, confocal microscopy analyses of green fluorescent protein (GFP)-labeled HIV-1 showed fluorescent virions located in the cytoplasm and scattered across the depth of endothelial cells (Fig. 1F), arguing in favor of viral entry by endocytosis, as previously shown (17). Whether the endothelial cell transcytosis of HIV-1 involves macropinocytosis, interactions with proteoglycans (11), or receptor-mediated endocytosis through mannose-6-phoshate receptors (12), and possibly its coreceptors CCR5 and CXCR4 expressed on hCMEC/3 cells (11, 18), or alternative receptors remains, however, to be precisely determined.

We next measured HIV-1 transcytosis in the presence of nonneutralizing antibodies (NnAbs) and bNAbs targeting various gp160 epitopes. Unexpectedly, none of the 13 tested single NnAbs and bNAbs showed inhibitory activities against the transport of NLAD8 and NL4.3 virions across hCMEC/D3 cell monolayers (Fig. 2A). The neonatal Fc receptor (FcRn) is expressed on BBB endothelial cells (19), but its role in antibody transcytosis across the BBB is still debated (20). FcRn expression on cultured hCMEC/D3 cells is also greatly reduced compared to that on human primary BBB endothelial cells (21). Thus, as HIV-1 virions alone and bound by antibodies exhibited comparable transcytosis rates, the uptake of antibody-virus complexes by hCMEC/D3 cells is unlikely to occur through the FcRn, as previously shown for mucosal epithelial cell transcytosis (22). Since HIV-1 entry into the CNS is thought to result mainly from HIV-1-infected cells

Downloaded from http://mbio.asm.org/ on October 20, 2020 at INSTITUT PASTEUR-Bibliotheque

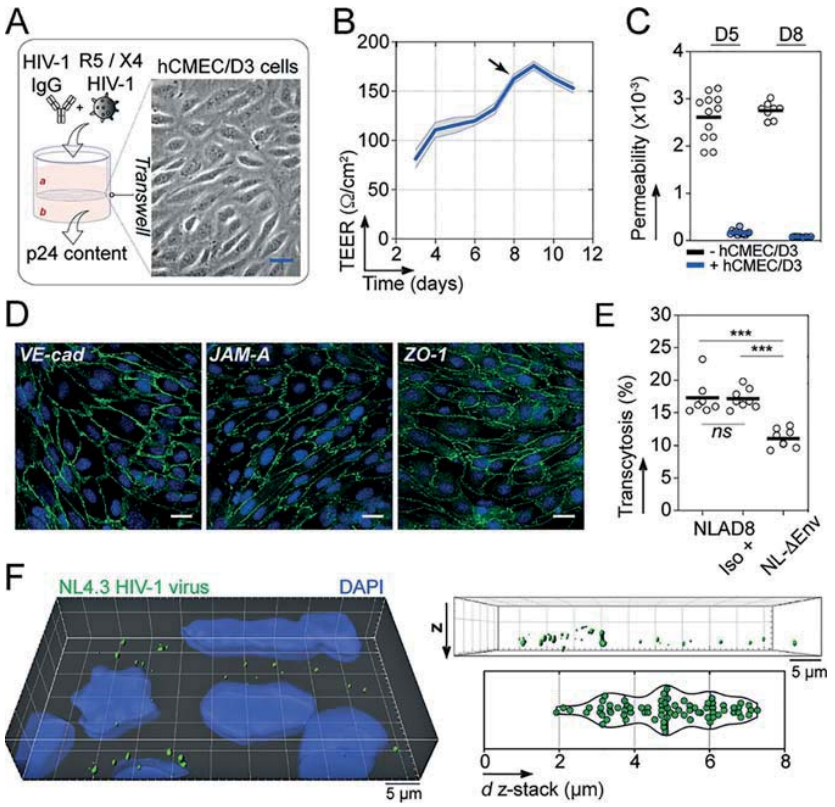


FIG 1 HIV-1 transcytosis across the BBB endothelium. (A) *In vitro* BBB endothelial cell system. The phase-contrast image shows an hCMEC/D3 endothelial cell monolayer separating apical (a) and basal (b) compartments when grown at confluence on a Transwell membrane (bar, 25 μm). HIV-1 virions alone or in the presence of antibodies applied to the apical compartment transcytose and are quantified in the basal medium by p24 ELISA. (B) Transendothelial electrical resistance (TEER) values over time of hCMEC/D3 endothelial cell monolayers. Means of quadruplicate values ± standard errors of the means (SEM) from three independent experiments are shown. Transcytosis experiments were performed at day 8 (black arrow). (C) Dot plots comparing the diffusion of FITC-labeled DEAE-dextran molecules from the apical to the basal compartment when passing through the Transwell membrane without cells (black) and with hCMEC/D3 cells (blue) at day 5 (D5; $n = 12$) and day 8 (D8; $n = 8$). Means of quadruplicate values ± SEM from two or three independent experiments are shown. (D) Immunofluorescence staining of hCMEC/D3 monolayers with DAPI (blue) and anti-VE-cadherin, anti-JAM-A, and anti-ZO-1 antibodies (green) at day 7 of culture. Bar, 20 μm. (E) Dot plots show the percent transcytosis of NLAD8 viruses incubated with or without non-HIV-1 isotype control (Iso) and of NL-ΔEnv alone (8 Transwells each). Means of quadruplicate values from two independent experiments are shown. ***, $P < 0.001$ (Mann-Whitney test); ns, not significant. (F) 3D confocal microscopy image (left) showing nuclei (blue) and NL4.3 HIV-1-GFP viruses (green). Bar, 5 μm. Box (top right) and violin plot (bottom right) show the distribution of fluorescently labeled NL4.3 virions across the z-stack depth of hCMEC/D3 cells using a representative 7.7-μm z-stack confocal microscopy acquisition.

migrating through the BBB (the Trojan horse hypothesis) (1), we then used human T lymphoblastic cells chronically infected with HIV-1 NL4.3 viral strain as a source of virions and tested the same panel of antibodies in the *in vitro* BBB model. As observed with cell-free virus, none of the NnAbs and bNAbs tested as IgG antibodies inhibited the transendothelial transit of cell-associated HIV-1 (Fig. 2A). However, whether HIV-1 gp160 antibodies have the capacity to limit the translocation of HIV-1-infected cells into the brain is a key point that still remains to be resolved. As CNS-invading HIV-1 subpopulations are mainly transmitted/founder (T/F) viruses (23), we measured the transcytosis of CH058 T/F virions and also found the viral endocytic transport across the BBB endothelium to be unaffected by HIV-1 gp160 NnAbs and bNAbs (Fig. 2B). In this regard, it would be interesting to reproduce these experiments with T/F viruses isolated from the cerebrospinal fluid of HIV-1-infected subjects and for which the neutralization sensitivity to some of the bNAbs tested here has been previously measured (24). Finally,

Downloaded from http://mbio.asm.org/ on October 20, 2020 at INSTITUT PASTEUR-Bibliotheque

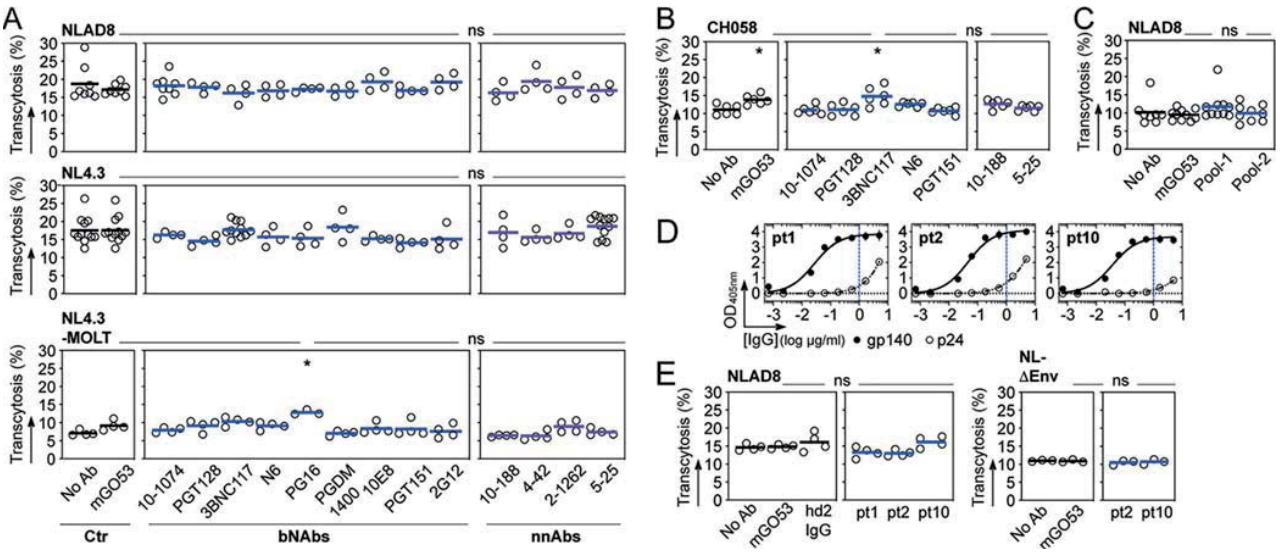


FIG 2 HIV-1 virions in the presence of anti-gp160 antibodies transcytose across the BBB. (A) Dot plots comparing the *in vitro* transcytosis of HIV-1 virions (cell-free NLAD8 [CCR5-tropic]; cell-free and MOLT cell-produced NL4.3 [CXCR4-tropic]) across the hCMEC/D3 cell endothelium (as a percentage of normalized viral input) alone (No Ab) and in the presence of selected bNAbs, NnAbs and non-HIV-1 mGO53 control IgG antibodies. Means of quadruplicate values from one or two experiments are shown. (B) Same as for panel A but with CH058 T/F virions. Means of triplicate values from two experiments are shown. (C) Dot plots comparing the percentage of *in vitro* transcytosis of NLAD8 alone (No Ab) and in the presence of non-HIV-1 isotype control mGO53 and combinations of anti-HIV-1 gp160 antibodies (pool 1, 10-1074, 3BNC117, 10E8 and PGDM1400; pool 2, 10-1074, 3BNC117, 10E8, PGDM1400, 10-188, and 5-25). Means of quadruplicate values from two independent experiments are shown. (D) Graphs showing the ELISA binding of gp140-immunoabsorbed serum IgG antibodies from selected elite neutralizers (pt1, pt2, and pt10) against YU2 gp140 and p24 proteins. Means of duplicate values ± standard deviations (SD) are shown. Vertical dotted lines indicate the IgG concentration (1 μg/ml) used in the experiments presented in panel E. (E) Dot plots comparing the percentage of *in vitro* transcytosis of NLAD8 and NL-ΔEnv virions alone (No Ab) and in the presence of the non-HIV-1 isotype control mGO53, purified serum IgG antibodies from a healthy donor (hd2) (54), and immunopurified polyclonal anti-gp140 antibodies, as shown in panel D. Means of quadruplicate (NLAD8) or triplicate (NL-ΔEnv) values are shown. Groups in panels A, B, C, and E were compared to the no-Ab controls using Dunn's multiple-comparison test. *, $0.035 < P < 0.05$; ns, not significant.

we evaluated whether combinations of antibodies recognizing nonoverlapping epitopes would be more effective than single molecules against HIV-1 transcytosis. Neither of the two antibody mixtures composed of 4 bNAbs with and without 2 NnAbs decreased NLAD8 viral transcytosis across hCMEC/D3 endothelial monolayers (Fig. 2C). Similarly, elite neutralizers' serum IgGs immunopurified against trimeric YU2 gp140 glycoproteins to deplete anti-p24 antibodies blocking p24 HIV-1 detection posttranscytosis had no impact on the intra-endothelial cell migration of NLAD8 virions (Fig. 2D and E).

HIV-1–bNAb complexes can cross the BBB endothelium but lack infectious potential. To investigate the mechanisms of HIV-1 transport in the BBB endothelium in the presence of anti-gp160 antibodies, we performed confocal microscopy experiments using the *in vitro* BBB model with GFP-labeled HIV-1 viruses alone or incubated with the bNAb 3BNC117, the NnAb 5-25, and the non-HIV-1-targeting control IgG mGO53 (Fig. 3A). As expected, viruses and antibodies were observed inside adherent hCMEC/D3 cells and found as antibody-bound HIV-1 virions only with anti-gp160 antibodies regardless of their neutralizing potential (Fig. 2A). Pearson coefficient analyses of the fluorescent objects revealed a significant trend for HIV-1 colocalization with gp160-specific antibodies, predominantly with the bNAb 3BNC117 (26% [$P < 0.0001$] versus 17% [$P = 0.0045$] for 5-25), but not with the isotype control (Fig. 3B). In agreement with this, overlapping virus-antibody fluorescent signals were more frequently detected with 3BNC117 than with 5-25 (45% versus 16% [$P = 0.0077$]) and in less than 1% with the IgG control (Fig. 2B). As for HIV-1 and antibodies alone, virions in complex with 5-25 and 3BNC117 were located in the cytoplasm and distributed across the endothelial cell depth (Fig. 3A and C).

As we observed intracellular fluorescent clusters of HIV-1 with anti-gp160 IgGs by confocal microscopy, we next determined whether HIV-1 transcytosed alone and in the

Downloaded from http://mbio.asm.org/ on October 20, 2020 at INSTITUT PASTEUR-Bibliotheque

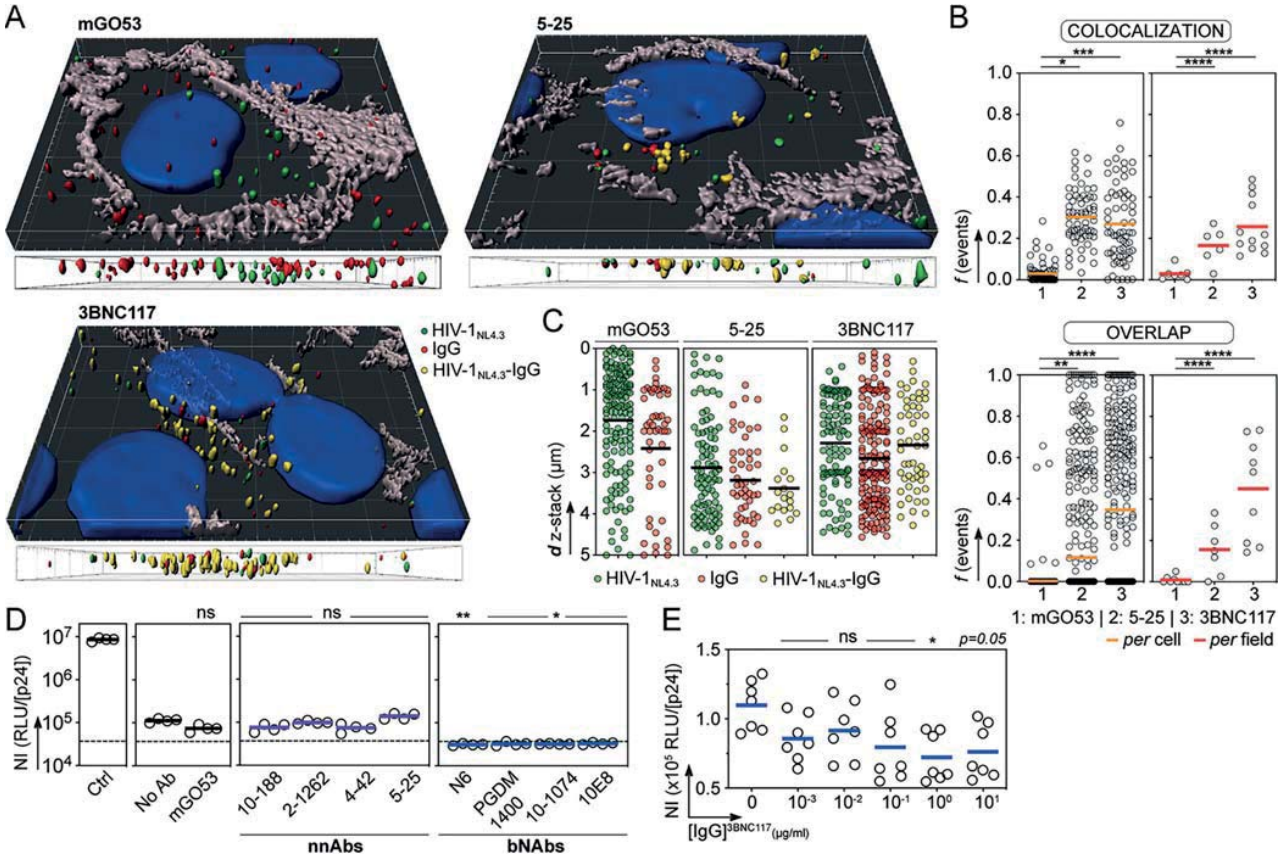


FIG 3 bNAbs neutralize HIV-1 transcytosed through the BBB endothelium. (A) Representative images from the 3D reconstruction of the confocal microscopy experiments on hCMEC/D3 cell monolayers with GFP-labeled HIV-1 (green) in the presence of mGO53, 5-25 and 3BNC117 antibodies (red). Yellow objects represent HIV-1 virions collocating with antibodies. Nuclei and intercellular junctions were stained with DAPI (blue) and anti-VE cadherin antibody (gray), respectively. Side views of the 3D confocal microscopy pictures across the depth of endothelial cells are shown below each image. (B) Graphs comparing colocalization using Pearson coefficient (*r*) and percentage of overlap between fluorescent HIV-1 viruses and mGO53, 5-25, and 3BNC117 antibodies, per cell and per field. Values of the Pearson coefficient and frequency of overlapping virus-IgG objects were compared between groups using Dunn's multiple-comparison and Mann-Whitney tests, respectively. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; **** $P \leq 0.0001$. (C) Dot plots show the number of fluorescent objects corresponding to HIV-1 NL4.3 virus alone (green) or antibodies IgG alone (red) or virus-antibody complexes ($HIV_{NL4.3}$-IgG; yellow) according to the distance across the z-stack depth. Quantification was made using three representative 4- to 5-μm z-stack acquisitions. (D) Dot plots comparing the normalized infectivity (NI; calculated as RLU/p24 concentration [nanograms per milliliter) of HIV-1 virions transcytosed across the BBB in the absence (No Ab) or presence of a non-HIV-1 isotype control (mGO53), HIV-1 gp160 NnAbs, and bNAbs. Ctrl, HIV-1 applied to Transwell membranes without endothelial cells. Each replicate per condition ($n = 4$) was tested in triplicate for infectivity. Dotted lines indicate basal levels of luminescence given by TZM-bl cells alone. (E) Same as for panel D but with various concentrations of 3BNC117 IgG antibodies. Each replicate ($n = 3$ or 4) per independent experiment ($n = 2$) was tested in triplicate for infectivity. Groups in panels D and E were compared to no-Ab controls using Dunn's multiple-comparison test. *, $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; ns, non significant.

presence of antibodies was still infectious using TZM-bl reporter cells. Infectivity data normalized for virus input by p24 content revealed that the viral transit through hCMEC/D3 endothelial monolayers substantially decreased HIV-1 infectivity compared to virions that only crossed the membrane without hCMEC/D3 cells, with an average drop of 1.2 to 1.4 $\log_{10}$ (Fig. 3D). Comparable low but detectable infectivity levels were measured with transcytosed viruses preincubated with anti-gp160 NnAbs (Fig. 3D). However, as opposed to HIV-1 alone and mixed with NnAbs, posttranscytosis infectivity of virions bound by bNAbs reached basal signal levels (Fig. 3D). HIV-1 residual infectivity following BBB intracellular migration was completely inhibited by bNAbs regardless of the targeted neutralizing epitope (Fig. 3D). To estimate the amount of antibodies required to neutralize transcytosed HIV-1, we tested the IgG bNAb 3BNC117 across a broad concentration range. Even if virions were poorly infectious after crossing endothelial cells, we observed a dose-dependent effect of 3BNC117 on viral neutralization posttranscytosis, which was less effective below 1 μg/ml (Fig. 3E).

Downloaded from http://mbio.asm.org/ on October 20, 2020 at INSTITUT PASTEUR-Bibliotheque

Collectively, our data show that although the envelope spike of HIV-1 is partially needed for its transcytosis across the BBB, gp160-specific antibodies, singly or in combination, had no measurable effects on the intracellular transport of the virus *in vitro*. HIV-1 virions migrating by endocytosis through the BBB endothelium alone or in the presence of NnAbs remained infectious, but at much lower levels than nontranscytosed viruses. Thus, it is not clear whether transcytosed HIV-1 would support the productive infection of susceptible CNS cells *in vivo*. Alternatively, HIV-1 opsonized by NnAbs could be captured by brain phagocytic cells, such as microglia, and then eliminated by antibody-dependent cellular phagocytosis. Deprived of neutralization capacity, HIV-1-binding antibodies could still promote killing of infected cells crossing the BBB via Fc effector functions. In this regard, HIV-1 NnAbs in the cerebrospinal fluid of infected individuals have been shown to induce the destruction of cells infected by a laboratory-adapted strain by antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) (25). However, while lab-adapted strains are commonly sensitive to NnAb-mediated ADCC, primary and T/F viruses are generally resistant (26, 27). On the other hand, we demonstrate in this study that gp160 bNAbs are able to fully neutralize cell-free HIV-1 crossing the BBB. We and others have previously found that the neutralizing activity of anti-gp160 antibodies is essential in protecting target cells from being infected by HIV-1 translocating across mucosal barriers (22, 28, 29). Hence, we propose that the neutralization ability of gp160 antibodies is also a key factor to protect the CNS from HIV-1 infection and spread. Since bNAbs are also potent inducers of Fc-dependent antiviral activities such as ADCC (30, 31), they are the most suitable HIV-1 antibodies for preventing viral brain invasion.

Antibodies, cells, and viruses. HIV-1 gp160 bNAbs targeting the CD4bs (3BNC117 [32] and N6 [33]), the *N*-glycan V1/V2 loops (PG16 [34] and PGDM1400 [35]), the *N*-glycan V3 loop (10-1074 [36] and PGT128 [37]), *N*-glycans (2G12 [38]), the gp120/gp41 interface (PGT151 [39]), and the membrane-proximal external region (10E8 [40]), nonneutralizing antibodies targeting the V3 loop crown (10-188 [41], the CD4bs [2-1262], the CD4 induced site [4-42], and the gp41 PID [5-25] [42]), and the non-HIV-1 isotypic control antibody mGO53 (43) were produced as recombinant IgG monoclonal antibodies and purified as previously described (44). Immortalized human cerebral microvascular endothelial cells (hCMEC/D3; Millipore) (18) were cultivated in endothelial basal medium 2 (EBM-2; Lonza) supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin (10,000 U/ml), Gibco chemically defined lipid concentrate (1:100), 10 mM HEPES (Thermo Fisher Scientific), 1.4 μM hydrocortisone, 1 ng/ml fibroblast growth factor (basic), and 5 μg/ml L-ascorbic acid (both from Sigma-Aldrich). Culture flasks were pretreated for 1 h with 150 μg/ml of Cultrex rat collagen I (R&D Systems; Bio-Techne) and washed with phosphate-buffered saline (PBS) before addition of cells. hCMEC/D3 cells were detached by trypsinization (0.05% trypsin-EDTA solution; Thermo Fisher Scientific) and cultivated for up to 35 passages (15, 45). TZM-bl cells (no. 8129; NIH AIDS Reagent Program) were cultivated in 10% heat-inactivated FBS–Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), high glucose, glutaMAX (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 1% penicillin-streptomycin (10,000 U/ml; Thermo Fisher Scientific) and routinely passaged by treatment with 0.05% trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific) or with 0.1% EDTA-PBS prior to the infectivity assay. Chronically NL4.3-infected MOLT cells (46) were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 1% penicillin-streptomycin and 10% heat-inactivated FBS (Thermo Fisher Scientific). All aforementioned cell cultures were carried out at 37°C with 5% CO_2. Infectious molecular clones NLAD8 (no. 11346), NL4.3 (no. 114), and CH058 (no. 11856) (NIH AIDS Reagent Program), viral strain NL-ΔEnv (47, 48), and NL4.3-Gag-eGFP (49) were produced by transfection of 293T cells as previously described (50).

gp160-specific serum IgG immunopurification. Trimeric YU2 gp140 protein was produced by transient transfection of Freestyle 293-F suspension cells (Thermo Fisher Scientific) using the polyethylenimine (PEI) precipitation method and were purified by affinity chromatography using high-performance HisPur nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-

Downloaded from http://mbio.asm.org/ on October 20, 2020 at INSTITUT PASTEUR-Bibliotheque

NTA) resin (Thermo Fisher Scientific) as previously described (51). Serum IgG antibodies from HIV-1-positive elite neutralizers (pt1, pt2 [42], and pt10) and were purified by affinity chromatography using protein G Sepharose 4 Fast Flow beads according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare). To conjugate gp140 proteins to Sepharose beads, 2 ml of *N*-hydroxysuccinimide (NHS)-activated Sepharose 4 Fast Flow gel beads (GE Healthcare) was mixed with 200 ml of a 1 mM HCl solution and then washed twice with coupling buffer (0.2 M $NaHCO_3$, 0.5 M NaCl [pH 8.3]). NHS-activated beads were incubated 3 h at room temperature on a rolling wheel with 7 mg of purified gp140 in coupling buffer (after 2 successive dialysis cycles). After centrifugation at 3,000 rpm for 3 min, beads were blocked 4 h at 4°C with blocking buffer (0.5 M ethanolamine, 0.5 M NaCl [pH 8.3]) on a rolling wheel. Beads were then washed as follows: twice with low-pH washing buffer (0.1 M sodium acetate, 0.5 M NaCl [pH 5.2]), twice with high-pH washing buffer (0.1 M Tris, 0.5 M NaCl [pH 8.8]), twice with low-pH washing buffer, and twice with PBS. After additional PBS washes, 1 mg of purified IgGs in PBS was incubated with 400 μl of gp140-coupled beads overnight at 4°C on a rolling wheel. Beads were placed in 10-ml chromatography columns (Poly-Prep; Bio-Rad) and washed 10 times with 10 ml of PBS. Antibodies were eluted by addition of 0.5 ml of 0.1 M glycine-HCl (pH 3) and immediately pH neutralized with 1 M Tris base (pH 8) (50 μl per fraction).

High-binding 96-well enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plates (Costar) were coated overnight with 125 ng/well of purified YU2 gp140 and IIIB p24 proteins (no. 12028; NIH AIDS Reagent Program). After washing with 0.05% Tween-PBS, plates were blocked for 2 h with 2% bovine serum albumin (BSA)–1 μM EDTA–0.05% Tween-PBS (blocking buffer) and then incubated for 2 h with gp140-immunopurified IgG antibodies (250 ng/well in PBS) and seven consecutive 1:3 dilutions in PBS. After washings, plates were revealed by addition of goat horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-human IgG antibodies (1 μg/ml final in blocking solution; Immunology Jackson ImmunoResearch) and HRP chromogenic substrate (ABTS [2,2′-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] solution; Euromedex). Experiments were performed with a HydroSpeed microplate washer and a Sunrise microplate absorbance reader (Tecan Männedorf), with optical density measurements made at 405 nm (OD_{405}).

Endothelial cell monolayer formation and monitoring. Transwell inserts (6.5 mm, 0.4-μm pore polyester membrane; Costar, Corning, Kennebunk, ME) were treated first for 45 min with Cultrex rat collagen I (150 μg/ml in PBS, R&D Systems; Bio-Techne) and then for 45 min with 50 μg/ml fibronectin from bovine plasma in PBS (Sigma-Aldrich) and seeded with 2×10^4 hCMEC/D3 cells. Apical media were changed after 6 days of culture. hCMEC/D3 monolayer formation was routinely monitored by measuring the transendothelial electrical resistance (TEER) at the apical and basolateral poles using an epithelial volt-ohm meter (Millicell ERS-2 system). TEER values of hCMEC/D3-containing inserts, obtained after subtraction of values from inserts alone, were multiplied by 0.3 cm^2 (surface area of the Transwell) to generate a TEER value in ohms per square centimeter. Paracellular permeability of the hCMEC/D3 endothelium was estimated by measuring the transit of 40-kDa fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled DEAE-dextran (Molecular Probes) as previously described (22, 52). The quantity of DEAE-dextran molecules diffusing into the basolateral compartment was determined using a fluorescence plate reader (Enspire; Perkin Elmer), and permeability coefficients were calculated as previously described (53). The expression of adhesion proteins (tight and adherence junctions) was determined by confocal microscopy. Cells were grown on thick glass slides 12 mm in diameter (0.13 to 0.17 mm; Slabor) for 7 days. Slides were successively fixed for 10 min with 4% and 1% paraformaldehyde for zonula occludens-1 (ZO-1) and vascular endothelial-cadherin (VE-cadherin) staining or for 1 min with methanol-acetone for junctional adhesion molecule A (JAM-A) and then washed with PBS. Following cell permeabilization with 0.05% saponin (Sigma) in PBS–1% bovine serum albumin (BSA)–0.01% (wt/vol) sodium azide buffer, immunostainings were performed using 1:50-diluted anti-VE-cadherin antibody clone F-8, 1:50-diluted anti-JAM-A antibody clone J10.4 (Santa

Downloaded from http://mbio.asm.org/ on October 20, 2020 at INSTITUT PASTEUR-Bibliotheque

Cruz Biotechnology), 1:50-diluted anti-ZO-1 antibody clone 1A12 (Invitrogen), and 1:100-diluted AF647-conjugated goat anti-mouse IgG antibodies (Thermo Fisher Scientific). Slides were washed three times with PBS between antibody incubations and mounted using DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindole)-Fluoromount-G (Southern Biotech) before observation. Images were acquired with a TCS SP5 fluorescence microscope (Leica Microsystems) with a 63× oil objective with a numerical aperture of 1.4 at the PBI platform (Institut Pasteur).

HIV-1 endothelial cell transcytosis assay. hCMEC/D3 cell monolayer transwells with TEER values from 150 to 300 Ω/cm^2 8 days postculture were used for the transcytosis assay. HIV-1 viruses (5 ng of p24 HIV-1 cell-free NLAD8, NL4.3, or NL-ΔEnv virions in 160 μl [final volume]) were incubated for 1 h at 37°C with purified recombinant antibodies (66.67 nM final concentration, unless specified otherwise), antibody cocktails, or gp140-immunopurified IgG fractions (6.67 nM final concentration), and mixtures were added to the cell monolayers. In each experiment, HIV-1 virions were also added to inserts with and without hCMEC/D3 cells. After 4 h of incubation at 37°C (or 16 h prior to infectivity testing), media were collected from both upper and lower compartments. Each condition was tested in triplicate or quadruplicate. HIV-1 p24 amount was determined for each transwell with an HIV-1 p24 antigen capture assay (Advanced Bioscience Laboratories, Rockville, MD), using two different dilutions of the basal medium. The percentage of transcytosis as normalized percentage of input was calculated following the formula $([p24]_{sample}/[p24]_{Ctl}) \times 100$ (where Ctl is control).

Confocal microscopy analysis of HIV-1 intra-endothelial cell migration. hCMEC/D3 cells (1.5×10^5) were cultivated on coverslips (12 mm) for 8 days to achieve optimal confluence. NL4.3-Gag-eGFP viruses (100 ng p24) (49) were incubated for 1 h at 37°C with mGO53 (isotype negative control), 5-25, or 3BNC117 IgGs (66.67 nM final concentration). Mixtures were then applied to the cell monolayers for 4 h at 37°C. After washings with PBS, cells were fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde and then with 1% paraformaldehyde before washes in PBS and storage at 4°C. The intracellular immunostaining was performed after permeabilization of the cells with 0.05% saponin (Sigma) in PBS–1% BSA–0.01% (wt/vol) sodium azide buffer. The following antibodies were used for the detection of cellular junctions and bNAbs: VE-cadherin clone F-8 (1:50; Santa Cruz Biotechnology) and AF647-conjugated goat anti-human IgG (1:400; Thermo Fisher Scientific). Secondary antibody was labeled with Cy3-conjugated goat anti-mouse IgG1 (1:400; Jackson Immunoresearch). Between steps, coverslips were washed three times with PBS and mounted using DAPI–Fluoromount-G (Southern Biotech) before observation. z-stack confocal acquisitions were performed on a Leica TCS SP5 microscope with a HCXPLAPO 63× oil objective, NA 1.4, at the UTechS PBI platform (Imagopole, Institut Pasteur). Channel alignments were performed with 0.1-mm tetraSpeck microspheres (blue, green, orange, and dark red; Thermo Fisher Scientific) to control and correct for the chromatic shift. Data were then analyzed after deconvolution using the object analyzer advanced modules of the Huygens Professional software (v14-10; SVI) at the PBI platform (C2RT, Institut Pasteur). For three-dimensional (3D) reconstitutions, Imaris 64 software (v 9.2.0; Bitplane) was used at the Image Analysis Hub (Institut Pasteur).

***In vitro* HIV-1 infectivity assay.** Infectivity of transcytosed HIV-1 virions in the presence or absence of anti-gp160 or isotypic control IgG antibodies was measured using the TZM-bl cell assay. TZM-bl reporter cells (1×10^4 per well) in full DMEM containing 8 μg/ml of DEAE-dextran were incubated with 200 μl of transcytosed viruses recovered from the basal medium for 48 h at 37°C. In each experiment, wells from transcytosis experiments were tested in triplicate and in parallel with 12.5 mM nevirapine and NLAD8 virus alone (0.05 ng) as controls and incubated with 20 μg/ml of 10-1074 IgG1. After 48 h, cells were lysed, and the assay was developed with the Bright-Glo luciferase assay reagent (Promega). Luminescence signal was measured as

Downloaded from http://mbio.asm.org/ on October 20, 2020 at INSTITUT PASTEUR-Bibliotheque

relative light units (RLU) using the Enspire microplate luminometer (Perkin Elmer). Normalized infectivity per well was calculated by dividing the mean number of RLU by the p24 concentration (in nanograms per milliliter).

Statistics. Percentages of viral transcytosis and posttranscytosis infectivity levels were compared between antibody groups to the "no antibody" control group using Dunn's multiple-comparison test. Percentages of colocalization and overlapping fluorescent events measured by confocal microscopy were compared across groups of antibodies using the Kruskal-Wallis test and the *post hoc* Dunn's multiple-comparison test and using the Mann-Whitney test, respectively. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (v8.1.2, GraphPad Prism Inc.).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the NIH AIDS Reagent Program (Division of AIDS, NIAID, NIH) for contributing reagents. We also thank the UTechS Photonic BioImaging/C2RT supported by the French National Research Agency (ANR-10-INSB-04-01, Investments for the Future), by Conseil de la Région Ile-de-France (Domaine d'Intérêt Majeur DIM1HEALTH), and by Fondation Française pour la Recherche Médicale (Program Grands Equipements), and the Image Analysis Hub/C2RT.

We thank the Agence National de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales (ANRS) for an equipment grant. H.M. received core funding from the Institut Pasteur, the INSERM and the Milieu Intérieur program (ANR-10-LABX-69-01). This work was funded by the European Research Council (ERC)-Seventh Framework Program (ERC-2013-StG 337146), and Gilead Sciences - HIV Cure Grants (no. 00397).

We declare no commercial or financial conflict of interest.

V.L. designed, performed and analyzed the experiments. A.D., F.P., O.S., and P.V.A. contributed to reagents and/or provided technical expertise. H.M. conceived and supervised the study, designed and analyzed the experiments. V.L. and H.M. wrote the manuscript with contributions from all the authors.

REFERENCES

1. Gonzalez-Scarano F, Martin-Garcia J. 2005. The neuropathogenesis of AIDS. Nature Rev Immunol 5:69–81. https://doi.org/10.1038/nri1527.
2. Bertrand L, Cho HJ, Toborek M. 2019. Blood-brain barrier pericytes as a target for HIV-1 infection. Brain 142:502–511. https://doi.org/10.1093/brain/awy339.
3. Lutgen V, Narasipura SD, Barbian HJ, Richards M, Wallace J, Razmpour R, Buzhdygan T, Ramirez SH, Prevedel L, Eugenin EA, Al-Harthi L. 2020. HIV infects astrocytes in vivo and egresses from the brain to the periphery. PLoS Pathog 16:e1008381. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008381.
4. Gray LR, Roche M, Flynn JK, Wesselingh SL, Gorry PR, Churchill MJ. 2014. Is the central nervous system a reservoir of HIV-1? Curr Opin Hiv Aids 9:552–558. https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000108.
5. Saylor D, Dickens AM, Sacktor N, Haughey N, Slusher B, Pletnikov M, Mankowski JL, Brown A, Volsky DJ, McArthur JC. 2016. HIV-associated neurocognitive disorder–pathogenesis and prospects for treatment. Nat Rev Neurol 12:234–248. https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.27.
6. Spudich S, Gonzalez-Scarano F. 2012. HIV-1-related central nervous system disease: current issues in pathogenesis, diagnosis, and treatment. Cold Spring Harb Perspect Med 2:a007120. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007120.
7. Daneman R, Prat A. 2015. The blood-brain barrier. Cold Spring Harb Perspect Biol 7:a020412. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412.
8. Kim KS. 2008. Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier. Nat Rev Microbiol 6:625–634. https://doi.org/10.1038/nrmicro1952.
9. Atluri VS, Hidalgo M, Samikkannu T, Kurapati KR, Jayant RD, Sagar V, Nair MP. 2015. Effect of human immunodeficiency virus on blood-brain barrier integrity and function: an update. Front Cell Neurosci 9:212. https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00212.
10. McRae M. 2016. HIV and viral protein effects on the blood brain barrier. Tissue Barriers 4:e1143543. https://doi.org/10.1080/21688370.2016.1143543.
11. Bobardt MD, Salmon P, Wang L, Esko JD, Gabuzda D, Fiala M, Trono D, Van der Schueren B, David G, Gallay PA. 2004. Contribution of proteoglycans to human immunodeficiency virus type 1 brain invasion. J Virol 78:6567–6584. https://doi.org/10.1128/JVI.78.12.6567-6584.2004.
12. Dohgu S, Ryerse JS, Robinson SM, Banks WA. 2012. Human immunodeficiency virus-1 uses the mannose-6-phosphate receptor to cross the blood-brain barrier. PLoS One 7:e39565. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039565.
13. Mouquet H. 2014. Antibody B cell responses in HIV-1 infection. Trends Immunol 35:549–561. https://doi.org/10.1016/j.it.2014.08.007.
14. Caskey M, Klein F, Nussenzweig MC. 2019. Broadly neutralizing anti-HIV-1 monoclonal antibodies in the clinic. Nat Med 25:547–553. https://doi.org/10.1038/s41591-019-0412-8.
15. Weksler B, Romero IA, Couraud PO. 2013. The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. Fluids Barriers CNS 10:16. https://doi.org/10.1186/2045-8118-10-16.
16. Banks WA, Freed EO, Wolf KM, Robinson SM, Franko M, Kumar VB. 2001. Transport of human immunodeficiency virus type 1 pseudoviruses across the blood-brain barrier: role of envelope proteins and adsorptive endocytosis. J Virol 75:4681–4691. https://doi.org/10.1128/JVI.75.10.4681-4691.2001.
17. Banks WA, Ercal N, Price TO. 2006. The blood-brain barrier in neuroAIDS. Curr Hiv Res 4:259–266. https://doi.org/10.2174/157016206777709447.
18. Weksler BB, Subileau EA, Perriere N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, Tricoire-Leignel H, Nicotra A, Bourdoulous S, Turowski P, Male DK, Roux F, Greenwood J, Romero IA, Couraud PO. 2005. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. FASEB J 19:1872–1874. https://doi.org/10.1096/fj.04-3458fje.
19. Schlachetzki F, Zhu C, Pardridge WM. 2002. Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) at the blood-brain barrier. J Neurochem 81:203–206. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00840.x.
20. Ruano-Salguero JS, Lee KH. 2020. Antibody transcytosis across brain endothelial-like cells occurs nonspecifically and independent of FcRn. Sci Rep 10:3685. https://doi.org/10.1038/s41598-020-60438-z.
21. Urich E, Lazic SE, Molnos J, Wells I, Freskgard PO. 2012. Transcriptional

Downloaded from http://mbio.asm.org/ on October 20, 2020 at INSTITUT PASTEUR-Bibliotheque

profiling of human brain endothelial cells reveals key properties crucial for predictive in vitro blood-brain barrier models. PLoS One 7:e38149. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038149.
22. Lorin V, Malbec M, Eden C, Bruel T, Porrot F, Seaman MS, Schwartz O, Mouquet H. 2017. Broadly neutralizing antibodies suppress post-transcytosis HIV-1 infectivity. Mucosal Immunol 10:814–826. https://doi.org/10.1038/mi.2016.106.
23. Tovanabutra S, Sirijatuphat R, Pham PT, Bonar L, Harbolick EA, Bose M, Song H, Chang D, Oropeza C, O'Sullivan AM, Balinang J, Kroon E, Colby DJ, Sacdalan C, Hellmuth J, Chan P, Prueksakaew P, Pinyakorn S, Jagodzinski LL, Sutthichom D, Pattamaswin S, de Souza M, Gramzinski RA, Kim JH, Michael NL, Robb ML, Phanuphak N, Ananworanich J, Valcour V, Kijak GH, Sanders-Buell E, Spudich S, The MHRP Viral Sequencing Core, RV254/SEARCH 010 Study Team. 2019. Deep sequencing reveals central nervous system compartmentalization in multiple transmitted/founder virus acute HIV-1 infection. Cells 8:902. https://doi.org/10.3390/cells8080902.
24. Stefic K, Chaillon A, Bouvin-Pley M, Moreau A, Braibant M, Bastides F, Gras G, Bernard L, Barin F. 2017. Probing the compartmentalization of HIV-1 in the central nervous system through its neutralization properties. PLoS One 12:e0181680. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181680.
25. Emskoetter T, von Laer D, Veismann S, Ermer M. 1989. Human immunodeficiency virus (HIV)-specific antibodies, neutralizing activity and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) in the cerebrospinal fluid of HIV-infected patients. J Neuroimmunol 24:61–66. https://doi.org/10.1016/0165-5728(89)90099-4.
26. Bruel T, Guivel-Benhassine F, Lorin V, Lortat-Jacob H, Baleux F, Bourdic K, Noël N, Lambotte O, Mouquet H, Schwartz O, Kirchhoff F. 2017. Lack of ADCC breadth of human nonneutralizing anti-HIV-1 antibodies. J Virol 91:e02440-16. https://doi.org/10.1128/JVI.02440-16.
27. von Bredow B, Arias JF, Heyer LN, Moldt B, Le K, Robinson JE, Zolla-Pazner S, Burton DR, Evans DT, Kirchhoff F. 2016. Comparison of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and virus neutralization by HIV-1 Env-specific monoclonal antibodies. J Virol 90:6127–6139. https://doi.org/10.1128/JVI.00347-16.
28. Astronomo RD, Santra S, Ballweber-Fleming L, Westerberg KG, Mach L, Hensley-McBain T, Sutherland L, Mildenberg B, Morton G, Yates NL, Mize GJ, Pollara J, Hladik F, Ochsenbauer C, Denny TN, Warrier R, Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayapan S, Kaewkungwal J, Ferrari G, Shaw GM, Xia SM, Liao HX, Montefiori DC, Tomaras GD, Haynes BF, McElrath JM. 2016. Neutralization takes precedence over IgG or IgA isotype-related functions in mucosal HIV-1 antibody-mediated protection. EBioMedicine 14:97–111. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.11.024.
29. Cheeseman HM, Olejniczak NJ, Rogers PM, Evans AB, King DFL, Ziprin P, Liao HX, Haynes BF, Shattock RJ. 2017. Broadly neutralizing antibodies display potential for prevention of HIV-1 infection of mucosal tissue superior to that of nonneutralizing antibodies. J Virol 91:e01762-16. https://doi.org/10.1128/JVI.01762-16.
30. Bruel T, Guivel-Benhassine F, Amraoui S, Malbec M, Richard L, Bourdic K, Donahue DA, Lorin V, Casartelli N, Noël N, Lambotte O, Mouquet H, Schwartz O. 2016. Elimination of HIV-1-infected cells by broadly neutralizing antibodies. Nat Commun 7:10844. https://doi.org/10.1038/ncomms10844.
31. Lee WS, Kent SJ. 2018. Anti-HIV-1 antibody-dependent cellular cytotoxicity. Curr Opin Hiv AIDS 13:160–166. https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000439.
32. Scheid JF, Mouquet H, Ueberheide B, Diskin R, Klein F, Oliveira TYK, Pietzsch J, Fenyo D, Abadir A, Velinzon K, Hurley A, Myung S, Boulad F, Poignard P, Burton DR, Pereyra F, Ho DD, Walker BD, Seaman MS, Bjorkman PJ, Chait BT, Nussenzweig MC. 2011. Sequence and structural convergence of broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding. Science 333:1633–1637. https://doi.org/10.1126/science.1207227.
33. Huang JH, Kang BH, Ishida E, Zhou TQ, Griesman T, Sheng ZZ, Wu F, Doria-Rose NA, Zhang BS, McKee K, O'Dell S, Chuang GY, Druz A, Georgiev IS, Schramm CA, Zheng AQ, Joyce MG, Asokan M, Ransier A, Darko S, Migueles SA, Bailer RT, Louder MK, Alam SM, Parks R, Kelsoe G, Von Holle T, Haynes BF, Douek DC, Hirsch V, Seaman MS, Shapiro L, Mascola JR, Kwong PD, Connors M. 2016. Identification of a CD4-binding-site antibody to HIV that evolved near-pan neutralization breadth. Immunity 45:1108–1121. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.027.
34. Walker LM, Phogat SK, Chan-Hui PY, Wagner D, Phung P, Goss JL, Wrin T, Simek MD, Fling S, Mitcham JL, Lehrman JK, Priddy FH, Olsen OA, Frey SM, Hammond PW, Kaminsky S, Zamb T, Moyle M, Koff WC, Poignard P, Burton DR, Protocol G Principal Investigators. 2009. Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. Science 326:285–289. https://doi.org/10.1126/science.1178746.
35. Sok D, van Gils MJ, Pauthner M, Julien JP, Saye-Francisco KL, Hsueh J, Briney B, Lee JH, Le KM, Lee PS, Hua Y, Seaman MS, Moore JP, Ward AB, Wilson IA, Sanders RW, Burton DR. 2014. Recombinant HIV envelope trimer selects for quaternary-dependent antibodies targeting the trimer apex. Proc Natl Acad Sci U S A 111:17624–17629. https://doi.org/10.1073/pnas.1415789111.
36. Mouquet H, Scharf L, Euler Z, Liu Y, Eden C, Scheid JF, Halper-Stromberg A, Gnanapragasam PNP, Spencer DIR, Seaman MS, Schuitemaker H, Feizi T, Nussenzweig MC, Bjorkman PJ. 2012. Complex-type N-glycan recognition by potent broadly neutralizing HIV antibodies. Proc Natl Acad Sci U S A 109:E3268–E3277. https://doi.org/10.1073/pnas.1217207109.
37. Pejchal R, Doores KJ, Walker LM, Khayat R, Huang PS, Wang SK, Stanfield RL, Julien JP, Ramos A, Crispin M, Depetris R, Katpally U, Marozsan A, Cupo A, Maloveste S, Liu Y, McBride R, Ito Y, Sanders RW, Ogohara C, Paulson JC, Feizi T, Scanlan CN, Wong CH, Moore JP, Olson WC, Ward AB, Poignard P, Schief WR, Burton DR, Wilson IA. 2011. A potent and broad neutralizing antibody recognizes and penetrates the HIV glycan shield. Science 334:1097–1103. https://doi.org/10.1126/science.1213256.
38. Trkola A, Purtscher M, Muster T, Ballaun C, Buchacher A, Sullivan N, Srinivasan K, Sodroski J, Moore JP, Katinger H. 1996. Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. J Virol 70:1100–1108. https://doi.org/10.1128/JVI.70.2.1100-1108.1996.
39. Falkowska E, Le KM, Ramos A, Doores KJ, Lee JH, Blattner C, Ramirez A, Derking R, van Gils MJ, Liang CH, McBride R, von Bredow B, Shivatare SS, Wu CY, Chan-Hui PY, Liu Y, Feizi T, Zwick MB, Koff WC, Seaman MS, Swiderek K, Moore JP, Evans D, Paulson JC, Wong CH, Ward AB, Wilson IA, Sanders RW, Poignard P, Burton DR. 2014. Broadly neutralizing HIV antibodies define a glycan-dependent epitope on the prefusion conformation of gp41 on cleaved envelope trimers. Immunity 40:657–668. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.009.
40. Huang JH, Ofek G, Laub L, Louder MK, Doria-Rose NA, Longo NS, Imamichi H, Bailer RT, Chakrabarti B, Sharma SK, Alam SM, Wang T, Yang YP, Zhang BS, Migueles SA, Wyatt R, Haynes BF, Kwong PD, Mascola JR, Connors M. 2012. Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. Nature 491:406–412. https://doi.org/10.1038/nature11544.
41. Mouquet H, Klein F, Scheid JF, Warncke M, Pietzsch J, Oliveira TY, Velinzon K, Seaman MS, Nussenzweig MC. 2011. Memory B cell antibodies to HIV-1 gp140 cloned from individuals infected with clade A and B viruses. PLoS One 6:e24078. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024078.
42. Scheid JF, Mouquet H, Feldhahn N, Seaman MS, Velinzon K, Pietzsch J, Ott RG, Anthony RM, Zebroski H, Hurley A, Phogat A, Chakrabarti B, Li Y, Connors M, Pereyra F, Walker BD, Wardemann H, Ho D, Wyatt RT, Mascola JR, Ravetch JV, Nussenzweig MC. 2009. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. Nature 458:636–640. https://doi.org/10.1038/nature07930.
43. Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC. 2003. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. Science 301:1374–1377. https://doi.org/10.1126/science.1086907.
44. Tiller T, Meffre E, Yurasov S, Tsuiji M, Nussenzweig MC, Wardemann H. 2008. Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. J Immunol Methods 329:112–124. https://doi.org/10.1016/j.jim.2007.09.017.
45. Eigenmann DE, Xue G, Kim KS, Moses AV, Hamburger M, Oufir M. 2013. Comparative study of four immortalized human brain capillary endothelial cell lines, hCMEC/D3, hBMEC, TY10, and BB19, and optimization of culture conditions, for an in vitro blood-brain barrier model for drug permeability studies. Fluids Barriers CNS 10:33. https://doi.org/10.1186/2045-8118-10-33.
46. Blanco J, Bosch B, Fernandez-Figueras MT, Barretina J, Clotet B, Este JA. 2004. High level of coreceptor-independent HIV transfer induced by contacts between primary CD4 T cells. J Biol Chem 279:51305–51314. https://doi.org/10.1074/jbc.M408547200.
47. Sourisseau M, Sol-Foulon N, Porrot F, Blanchet F, Schwartz O. 2007.

Downloaded from http://mbio.asm.org/ on October 20, 2020 at INSTITUT PASTEUR-Bibliotheque

Inefficient human immunodeficiency virus replication in mobile lymphocytes. J Virol 81:1000–1012. https://doi.org/10.1128/JVI.01629-06.
48. Sol-Foulon N, Sourisseau M, Porrot F, Thoulouze MI, Trouillet C, Nobile C, Blanchet F, di Bartolo V, Noraz N, Taylor N, Alcover A, Hivroz C, Schwartz O. 2007. ZAP-70 kinase regulates HIV cell-to-cell spread and virological synapse formation. EMBO J 26:516–526. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601509.
49. Casartelli N, Sourisseau M, Feldmann J, Guivel-Benhassine F, Mallet A, Marcelin AG, Guatelli J, Schwartz O. 2010. Tetherin restricts productive HIV-1 cell-to-cell transmission. PLoS Pathog 6:e1000955. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000955.
50. Rudnicka D, Feldmann J, Porrot F, Wietgrefe S, Guadagnini S, Prevost MC, Estaquier J, Haase AT, Sol-Foulon N, Schwartz O. 2009. Simultaneous cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus to multiple targets through polysynapses. J Virol 83:6234–6246. https://doi.org/10.1128/JVI.00282-09.
51. Lorin V, Mouquet H. 2015. Efficient generation of human IgA monoclonal antibodies. J Immunol Methods 422:102–110. https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.04.010.
52. Afonso PV, Ozden S, Cumont MC, Seilhean D, Cartier L, Rezaie P, Mason S, Lambert S, Huerre M, Gessain A, Couraud PO, Pique C, Ceccaldi PE, Romero IA. 2008. Alteration of blood-brain barrier integrity by retroviral infection. PLoS Pathog 4:e1000205. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000205.
53. Dehouck MP, Jolliet-Riant P, Bree F, Fruchart JC, Cecchelli R, Tillement JP. 1992. Drug transfer across the blood-brain barrier: correlation between in vitro and in vivo models. J Neurochem 58:1790–1797. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb10055.x.
54. Prigent J, Lorin V, Kok A, Hieu T, Bourgeau S, Mouquet H. 2016. Scarcity of autoreactive human blood IgA(+) memory B cells. Eur J Immunol 46:2340–2351. https://doi.org/10.1002/eji.201646446.

Downloaded from http://mbio.asm.org/ on October 20, 2020 at INSTITUT PASTEUR-Bibliotheque

ARTICLE 3

N332 Supersite-Targeting Broadly HIV-1 Neutralizing IgA Antibodies from a Viremic Controller

Valérie Lorin[1], Ignacio Fernandez[2], Guillemette Masse-Ranson[3], Mélanie Bouvin-Pley[4], Giulia Girelli-Zubani[3], Luis Molinos-Albert[1], Cyril Planchais[1], Thierry Hieu[1], Oriane Fiquet[3], Timothée Bruel[5], Rogier Sanders[6], Florencia Pereyra[7], Bruce D. Walker[7], Jordan D. Dimitrov[8], Olivier Schwartz[5], Martine Braibant[4], Michel C. Nussenzweig[9], Michael S. Seaman[10], Johannes F. Scheid[9], James Di Santo[3], Félix Rey[2], Hugo Mouquet[1]

1 Laboratoire d'Immunologie Humorale, INSERM U1222, Département d'Immunologie, Institut Pasteur, Paris, France **2** Unité de Virologie Structurale, CNRS UMR3569, Département de Virologie, Institut Pasteur, Paris, France **3** Unité d'Immunité Innée, INSERM U1223, Département d'Immunologie, Institut Pasteur, Paris, France **4** Unité Morphogénèse et antigénicité du VIH et des virus des hépatites, INSERM U1259, Université de Tours, France **5** Unité Virus et Immunité, CNRS URA3015, Département de Virologie, Institut Pasteur, Paris, France **6** Department of Medical Microbiology, Amsterdam Infection & Immunity Institute, Amsterdam UMC, University of Amsterdam, Meibergdreef 9, Amsterdam, 1105AZ, The Netherlands **7** Ragon Institute of Massachusetts General Hospital, Massachusetts Institute of Technology and Harvard, Cambridge, MA, USA **8** Centre de Recherche des Cordeliers, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Sorbonne Université, Université de Paris, Paris, France **9** Laboratory of Molecular Immunology, The Rockefeller University, New York, NY, USA **10** Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, Massachusetts, USA.

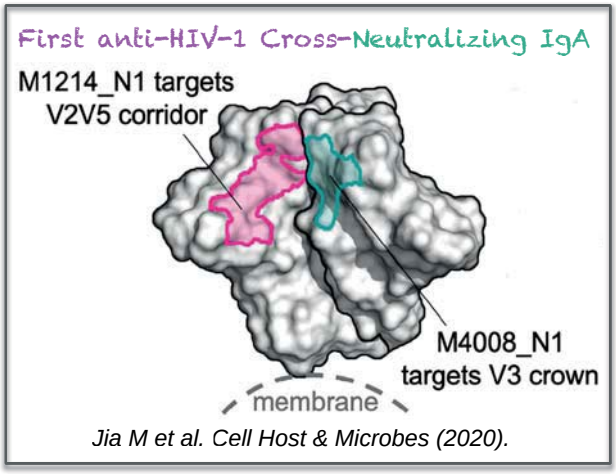
Manuscrit en préparation

L'infection par le VIH-1 est principalement acquise à travers les muqueuses où les IgA sont prédominantes et pourraient être de première importance dans la protection conférée par un vaccin. En effet, les IgA pourraient être impliquées dans la protection des muqueuses contre l'infection chez des sujets hautement exposés au VIH-1 mais qui demeurent séronégatifs (Devito et al., 2000). La présence d'IgA dans les muqueuses peut activer localement des mécanismes immunitaires différents de ceux induits par les IgG tels que (i) l'exclusion de pathogènes dépendante du pIgR ; (ii) l'agrégation des S-IgA ; (iii) des mécanismes effecteurs dépendants du Fc comme l'ADCC ou l'ADCP. Effectivement, les IgA se fixent sur les récepteurs FcαRI exprimés par les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les macrophages tandis que les IgG utilisent les récepteurs FcγR exprimés par les cellules NK, les CD, les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les macrophages (Woof and Russell, 2011) (Heineke and van Egmond, 2017) (Lu et al., 2018). Les S-IgA et les IgG transsudatées concourent à la protection des muqueuses contre le VIH-1.

La stratégie de clonage et d'expression d'anticorps monoclonaux humains à partir de cellules B uniques a été utilisée initialement, pour étudier les mécanismes de tolérance des cellules B dans un contexte physiologique (Wardemann et al., 2003) (Tsuiji et al., 2006) (Tiller et al., 2008) ou dans le contexte de maladies auto-immunes (Yurasov et al., 2005). Elle a ensuite été utilisée pour étudier le répertoire et la réactivité des anticorps exprimés par les cellules B mémoires dirigés contre l'Env chez des individus VIH positif de type *Elite neutralizers* (Scheid et al., 2009) (Mouquet et al., 2011). Associée au choix méticuleux de donneurs Elite, cette technique a permis d'isoler de nombreux bNAbs de classe IgG dont un nombre important d'anticorps dits de seconde génération, beaucoup plus puissants et à spectre de neutralisation plus large que les bNAbs de première génération isolés dans les années 1990 (Mouquet, 2014). L'immunothérapie passive de bNAbs IgG anti-VIH-1 s'est révélée efficace contre l'infection dans des modèles animaux de souris humanisées (Horwitz et al., 2013) et de PNH (Barouch et al., 2013b) (Gautam et al., 2016) (Gautam et al., 2018). Par ailleurs, une diminution importante de la virémie a été observée en clinique chez des sujets infectés suite à l'infusion passive de ces mêmes bNAbs (Caskey et al., 2015) (Lynch et al., 2015) (Caskey et al., 2017) (Caskey et al., 2019).

Ce n'est que très récemment que les premiers anticorps cross-neutralisants IgA anti-VIH-1 ont été décrits (Jia et al., 2020). En effet, deux lignages de bNAbs IgG et IgA ont été identifiés chez deux donneurs infectés. Les représentants IgA ciblent deux épitopes différents sur l'Env, un sur la boucle V3 non dépendant des glycanes (M4008_N1) et l'autre de la boucle V2 à la boucle V5 (M1214_N1) (**Encart ci-après**). Ils présentent une couverture de neutralisation de 42 et 65 %, respectivement. Les bNAbs IgA sont ainsi, naturellement

produits au cours de l'infection à VIH-1 et contribueraient à l'activité neutralisante plasmatique globale (Jia et al., 2020).



Jia M et al. Cell Host & Microbes (2020).

Toutefois, les anticorps de type bNAbs exprimés par les LB mémoires IgA^+ dans le contexte de l'infection à VIH-1 n'avaient pas encore été décrits au démarrage de ce projet. L'objectif de notre travail a été d'identifier et de caractériser au niveau moléculaire, structural et fonctionnel de nouveaux bNAbs anti-VIH-1 d'isotype IgA chez un contrôleur virémique de type *Elite neutralizer*.

Après criblage des IgG et IgA polyclonales sériques de six donneurs Elite pour leur activité de neutralisation, seules les IgA des patients 1 et 7 présentaient une activité neutralisante. Les échantillons cellulaires du patient 1 étant limités, nous avons réalisé les tris de cellules B mémoires spécifiques $CD19^+$ IgG^+/IgA^+ du patient 7 à l'aide de deux sondes de capture par cytométrie en flux : (i) la protéine Env trimérique non clivée de type foldon (gp140-F_{YU2} clade B) et (ii) la protéine Env de type native clivée (BG505 SOSIP.664 gp140) biotinylées. Nous avons ainsi identifié au sein de ce même contrôleur virémique, trois lignages lymphocytaires B de bNAbs 7-107, 7-176 et 7-155. Pour le lignage 7-107, le répertoire anticorps est uniquement composé d'IgA au niveau périphérique, alors qu'il est constitué d'IgG et d'IgA pour le 7-176 et uniquement d'IgG pour le 7-155. Ces trois clonotypes sont composés de différents variants : 10 variants IgA pour 7-107 dont 7-269, 3 variants IgG/IgA pour 7-176 dont 7-157 IgA et 7-155 IgG qui est l'unique représentant. Des analyses géniques ont montré que l'anticorps 7-107 est relativement peu muté par rapport à 7-155 et 7-176 au regard du pourcentage de MS en nucléotides dans la VH avec 8,7 ; 29,5 et 25,1 %, respectivement suggérant que le clonotype 7-107 serait d'apparition plus récente par rapport aux deux autres. Par ailleurs, l'analyse du répertoire cellulaire B par NGS (*Next generation sequencing*) corrèle avec les résultats obtenus par les tris cellulaires « classiques ».

Les anticorps de ces trois clonotypes sont cross-neutralisants : 7-269 IgA, 7-176 IgG et 7-155 IgG présentent une couverture de neutralisation de 41 % sur un panel de 56 virus, 33 % et 29 % sur un panel de 24 virus, respectivement. L'IgA 7-269 neutralise principalement des virus de clade B (61 %) mais aussi à moindre mesure, des virus de clade A (40 %) et de clade C (22 %). De plus, l'anticorps 7-269 IgA neutralise 58,3; 46,7 et 63,6 % des 38 virus de clade B isolés respectivement, durant trois périodes de l'épidémie de SIDA, 1987-1991, 1997-2000 et 2007-2010. L'anticorps 7-269 IgA issu d'un prélèvement de 2010 semble neutraliser plus efficacement les virus contemporains. De plus, en collaboration avec l'unité dirigée par James Di Santo (Institut Pasteur), nous avons montré *in vivo* sur des souris humanisées infectées puis traitées par un traitement cART, qu'une seule injection de 0,5 mg de notre meilleur candidat 7-269 IgA, entraine un délai de rebond chez 37,5 % des animaux comparé à des souris immunisées avec le contrôle isotypique mGO53 IgA, démontrant ainsi sa capacité neutralisante *in vivo*.

Nous avons ensuite montré que les anticorps des trois clonotypes ciblent un épitope au niveau des N-glycanes associés au supersite N332 à la base de la boucle V3 (V3/N332) de la gp120 avec un recouvrement partiel de leurs épitopes respectifs. Nous relatons ici, la première description de l'isolement de trois lignages d'anticorps d'isotypes différents (IgG/IgA) ciblant le même épitope (V3/N332) chez un même contrôleur virémique.

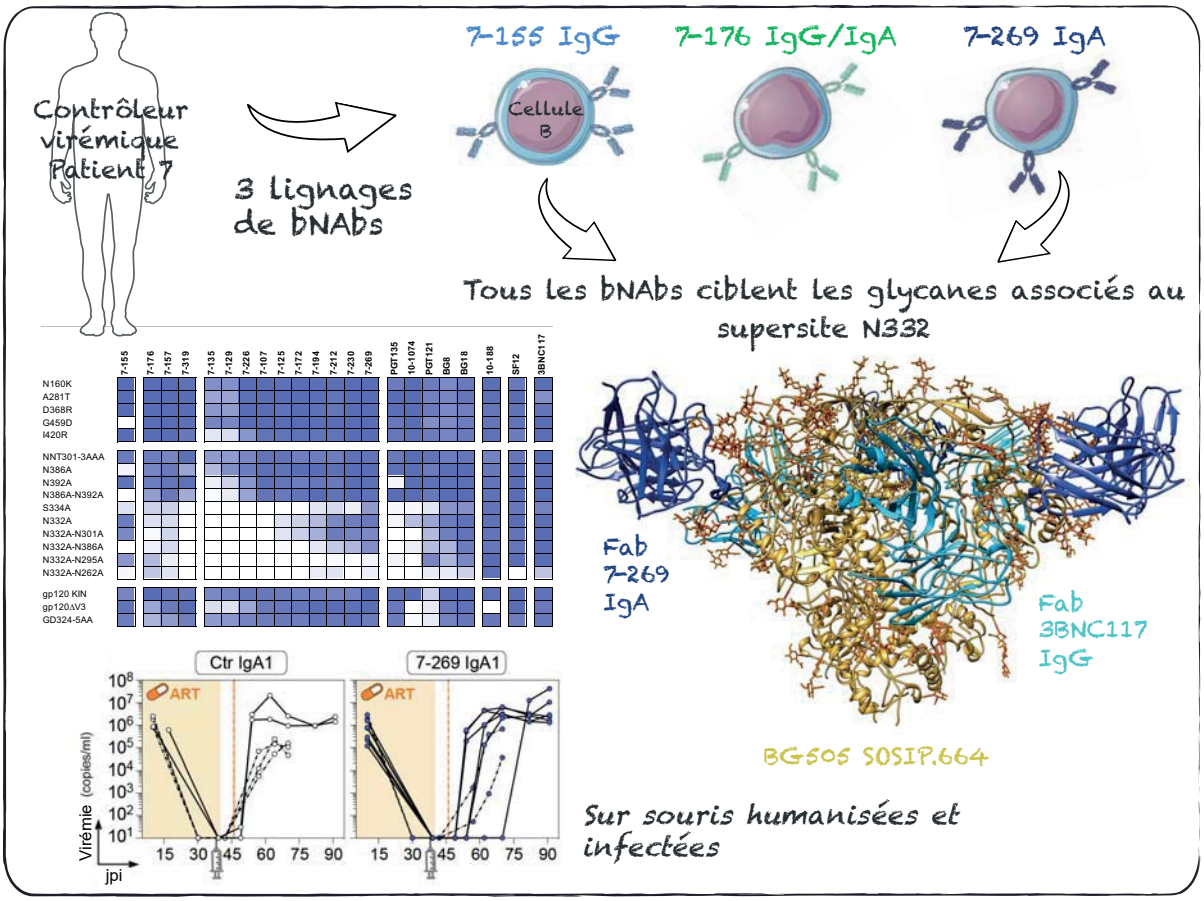
Les analyses structurales réalisées en collaboration avec l'unité dirigée par Félix Rey (Institut Pasteur) ont confirmé la cartographie épitopique avec différentes combinaisons de glycanes environnants pour les interactions des trois clonotypes. En effet, les structures des anticorps 7-269 IgA, 7-155 IgG et 7-176 IgG sous format Fab en complexe avec l'Env trimérique BG505 SOSIP.664 ont été résolues par cryo-EM à 2,9 ; 6,5 et 7,0 Å, respectivement. L'IgA 7-269 interagit principalement avec les N-glycanes en position 332, 295 et de façon plus mineure avec les N-glycanes N262 et N411. Il présente la particularité d'avoir un pont disulfure dans sa boucle CDRH3, ce qui est unique parmi les bNAbs anti-VIH-1 ciblant l'épitope V3/N332. De plus, les IgG 7-155 et 7-176 montrent que les N-glycanes en position 332, 386 et 392 constituent leur site de liaison sur l'épitope V3/N332.

Comme la poly-réactivité est une caractéristique commune des bNAbs IgG anti-VIH-1, nous avons évalué les anticorps sur cellules HEp-2 pour l'auto-réactivité et sur des puces à protéines humaines pour la poly-réactivité. Il s'avère que seul le bNAb 7-176 IgG arbort les caractéristiques d'auto- et de poly-réactivité. De plus, nous avons montré que la réversion vers la configuration germinale de l'anticorps 7-269 IgG (forme non mutée) est à l'origine d'une perte de réactivité vis-à-vis des protéines SOSIP, gp140 et gp120 et d'une diminution de sa capacité de neutralisation par rapport à sa forme mutée originale suggérant que les MS augmentent progressivement l'affinité et l'activité neutralisante des bNAbs.

Enfin, nous avons investigué la caractérisation des propriétés antivirales des IgA anti-VIH-1 indépendantes de la neutralisation. Dans un premier temps, nous avons montré que les anticorps IgA 7-269 et 7-157 anti-VIH-1 ne bloquent pas la transcytose virale à travers les cellules épithéliales de l'endomètre humain (HEC-1) mais qu'ils neutralisent les virions transcytosés. Dans un second temps, des développements technologiques ont été nécessaires pour évaluer les fonctions effectrices de type ADCC et ADCP médiées par le fragment Fc des IgA. D'une part, nous avons développé un test ADCC adapté aux IgA qui remplace les cellules effectrices NK par des polynucléaires neutrophiles ou des monocytes primaires exprimant le FcαRI à leur surface. Dans ces conditions, des résultats préliminaires indiquent que les anticorps IgA 7-269 et 7-157 anti-VIH-1 ne sont pas capables de déclencher l'ADCC de cellules infectées. Au contraire, la mort de cellules infectées par des cellules NK primaires *via* un mécanisme ADCC est observée avec tous les bNAbs IgG (7-107, 7-269, 7-319, 7-157) se fixant fortement aux cellules cibles, excepté avec l'anticorps 7-155. D'autre part, l'utilisation du test ADCP *in vitro* (Ackerman et al., 2011) ne nous a pas permis de conclure sur les capacités des anticorps IgA à déclencher la phagocytose de billes fluorescentes recouvertes de protéine Env gp140 par les cellules monocytaires THP-1 différenciées qui expriment le FcαRI. D'autres investigations sont actuellement en cours pour étayer ces premiers résultats.

Cette étude a permis l'une des premières caractérisations au niveau moléculaire, structural et fonctionnel ainsi qu'une meilleure compréhension des propriétés antivirales des bNAbs d'isotype IgA anti-VIH-1. Ces derniers semblent ainsi, être naturellement produits au cours de l'infection par le VIH-1. Au même titre que les bNAbs IgG, les bNAbs IgA anti-VIH-1 pourraient participer à l'immunité antivirale contre le VIH-1, et jouer un rôle clé dans la protection *in vivo*.

Une première version non finalisée du manuscrit relatif à ce travail est présentée ci-après sans discussion puisque nous n'avons pas encore l'ensemble des résultats. Cependant, ces travaux sont discutés dans la partie discussion générale de la thèse.


Contrôleur virémique Patient 7
3 lignages de bNAbs
7-155 IgG
7-176 IgG/IgA
7-269 IgA
Cellule B
Tous les bNAbs ciblent les glycanes associés au supersite N332
7-155
7-176
7-157
7-319
7-135
7-129
7-226
7-107
7-125
7-172
7-194
7-212
7-230
7-269
PGT135
10-1074
PGT121
BG8
BG18
10-188
SF12
3BNC117
N160K
A281T
D368R
G459D
I420R
NNT301-3AAA
N386A
N392A
N386A-N392A
S334A
N332A
N332A-N301A
N332A-N386A
N332A-N295A
N332A-N262A
gp120 KIN
gp120ΔV3
GD324-5AA
Ctr IgA1
7-269 IgA1
ART
Virémie (copies/ml)
jpi
Fab 7-269 IgA
Fab 3BNC117 IgG
BG505 SOSIP.664
Sur souris humanisées et infectées

N332 Supersite-Targeting Broadly HIV-1 Neutralizing IgA Antibodies from a Viremic Controller

Valérie Lorin[1,2,3,17], Ignacio Fernandez[4,5,17], Guillemette Masse-Ranson[6,7], Mélanie Bouvin-Pley[8], Giulia Girelli-Zubani[6,7], Luis Molinos-Albert[1,2], Cyril Planchais[1,2], Thierry Hieu[1,2], Oriane Fiquet[6,7], Timothée Bruel[9,5], Rogier Sanders[10, 11], Florencia Pereyra[12,13], Bruce D. Walker[12,13], Jordan D. Dimitrov[14], Olivier Schwartz[9,5], Martine Braibant[8], Johannes F. Scheid[15], Michel C. Nussenzweig[15], Michael S. Seaman[16], James Di Santo[6,7], Félix Rey[4,5], Hugo Mouquet[1, 2, 18]*

[1]Laboratory of Humoral Immunology, Department of Immunology, Institut Pasteur, and [2]INSERM U1222, Paris, 75015, France
[3]Université de Paris, Sorbonne Paris Cité, Paris, France
[4]Structural Virology Unit, Department of Virology, Institut Pasteur, and [5]CNRS URA3015, Paris, 75015, France
[6]Innate Immunity Unit, Department of Immunology, Institut Pasteur, and [7]INSERM U1223, Paris, 75015, France
[8]Université François Rabelais, Inserm U966, Tours, France
[9]Virus & Immunity Unit, Department of Virology, Institut Pasteur, Paris, 75015, France
[10]Department of Medical Microbiology, Amsterdam Infection & Immunity Institute, Amsterdam UMC, University of Amsterdam, Amsterdam, 1105AZ, The Netherlands
[11]Department of Microbiology and Immunology, Weill Medical College of Cornell University, New York, NY 10021, USA
[12]Ragon Institute of MGH, MIT, and Harvard, Cambridge, and [13]Partners AIDS Research Center, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Charlestown, MA 02129, USA
[14]Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, Université de Paris, Paris, 75006, France
[15]Laboratory of Molecular Immunology, The Rockefeller University, New York, NY 10065, USA
[16]Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, USA

[17]Co-first authors
[18]Lead contact

*Correspondence: hugo.mouquet@pasteur.fr (H.M.).

Abstract

B-cell lineages of broadly neutralizing antibodies (bNAbs) develop in rare HIV-1-infected individuals by co-evolution with escaping viruses. Decrypting HIV-1 bNAbs' ontogeny aids designing effective vaccine strategies, including the elicitation of IgA bNAbs for a sterilizing mucosal immunity. Here, we characterized IgG and IgA bNAbs from three independent B-cell lineages identified in a viremic controller. Two lineages, 7-155 and 7-107, comprised only IgG^+ or IgA^+ blood memory B cells respectively while the third, 7-176, was made of mixed IgG and IgA members. 7-107-clonotype variant 7-269 was the most active bNAb despite bearing very moderate levels of somatic mutations. 7-269 IgA was able to delay viral rebound *in vivo* in humanized mice, and to neutralize HIV-1 virions crossing the mucosal epithelium *in vitro*. Strikingly, all IgA and IgG bNAbs bound to N332 glycan in the high mannose patch without interacting with the V3 loop. A 2.9 Å-resolution cryo-EM structure of 2-269 IgA Fab-BG505 SOSIP.664 complex revealed major contacts with N332 and N295 glycans, a binding pattern reminiscent of 2G12, and the presence of a germline-encoded intra-CDR_H3 disulfide bond pivotal to the 7-269 neutralizing activity. Cryo-EM structural analyses further showed that despite overlapping with 7-269, 7-155 and 7-176 differed in their binding pattern by interacting mostly with N332 and N386 glycans. Hence, multiple B-cell lineages of potent IgG and IgA bNAbs focused on a unique HIV-1 site of vulnerability can co-develop in HIV-1 viremic controllers.

Introduction

Broadly neutralizing HIV-1 antibodies (bNAbs) develop in rare infected humans, termed Elite neutralizers, as a result a complex co-evolution process with diversifying viruses (Doria-Rose and Landais, 2019; Victora and Mouquet, 2018). Over the past decade, hundreds of bNAbs have been isolated, some of which can protect non-human primates from infection (Nishimura and Martin, 2017), and decrease viremia in infected humans (Caskey et al., 2019). Apart from neutralization, Fc-dependent effector functions of bNAbs contribute to eliminating infected cells *in vivo* (Bournazos et al., 2014; Bruel et al., 2016; Lu et al., 2016), and boosting autologous cellular and humoral immune responses in recipients (Niessl et al., 2020; Schoofs et al., 2019). Hence, bNAbs hold great promises for HIV-1 treatment and prevention by vaccination or passive immunoprophylaxis. bNAbs target a handful of vulnerability sites on the HIV-1 surface envelope glycoprotein gp160: the CD4 binding site (CD4bs), the N-glycan-associated V3 loop and V1/V2 loops, the gp120 “silent face”, the N-glycan-associated gp120/gp41 bridging region, the membrane external proximal region and fusion peptide on gp41 (McCoy, 2018). Epitopes on the N-glycan-associated V3 loop, referred as the N332 supersite or the high-mannose patch, is of particular interest for vaccine design since frequently targeted by various classes of bNAbs (Daniels and Saunders, 2019), which may not required prolonged maturation pathways to be generated (MacLeod et al., 2016).

Until recently, all bNAbs identified were IgG molecules but, genuine IgA bNAbs targeting the V3 loop crown (M4008_N1) and the V5-V2 loop corridor (M1214_N1) have just been described (Jia et al., 2020). However, the contribution of naturally and vaccine-induced anti-gp160 IgA antibodies is poorly understood and still debated (Lopez et al., 2018). IgAs have been proposed to negatively modulate Fc-effector functions of IgG antibodies in viremic subjects and RV144 vaccinees (Ruiz et al., 2016; Tomaras et al., 2013). Still, some non-neutralizing IgAs induced by RV144 vaccination may possess interesting antiviral properties for blocking mucosal transmission (Wills et al., 2018). IgA antibodies are indeed thought to play an important role at mucosal sites for reducing viral infection and spread (Lopez et al.,

2018), despite a potential decreased efficacy compared to IgGs (Astronomo et al., 2016; Cheeseman et al., 2017; Tay et al., 2016). Strikingly, HIV-1 elite controllers develop strong high-affinity IgA responses (Nabi et al., 2017), and cross-clade IgA-mediated seroneutralization has been found in long-term survivors (Planque et al., 2010). Whether IgA bNAbs exist in HIV-1 controllers and promote efficient antiviral effector functions remains unknown. In this study, we provide a detailed molecular and functional characterization of IgA and IgG bNAbs from three distinct B-cell lineages that developed in a viremic controller.

Results

Co-existing IgG and IgA bNAb lineages in HIV-1 controllers

To evaluate the neutralizing capacity of blood IgA antibodies produced by viremic controllers with broad IgG seroneutralization (n=6), serum IgAs were purified and tested *in vitro* against a clade B five-viruses panel. Serum IgGs from all donors had cross-neutralizing activity, but only IgAs from pt1 and pt7 were able to neutralize several strains including tier-2 viruses (**Fig. 1A** and **Fig. S1A**). On broader HIV-1 clade B and cross-clade reference panels (deCamp et al., 2013; Scheid et al., 2011), purified IgGs and IgAs from pt7's serum showed 42% and 33% neutralization coverage (n=24), respectively (**Fig. 1B**). To isolate the IgG and IgA antibodies accountable for the serological neutralization activity, peripheral blood B cells were stained with fluorescently labeled YU2 gp140 foldon (g140-F) or BG505 SOSIP.664 (SOSIP) trimers (**Fig. 1C**). From the 364 Env-binding IgG^+ and IgA^+ memory B cells isolated by single-cell flow cytometric sorting (148 $SOSIP^+$ and 216 YU2 gp140-F^+), we first produced a total of 10 unique SOSIP-captured human monoclonal antibodies by recombinant expression cloning (Prigent et al., 2016; Tiller et al., 2008) (**Fig. S1A** and **Table S1**). All antibodies but one (7-216) bound both SOSIP and g140-F proteins with various reactivity patterns, and recognized mainly gp120 subunit (**Fig. S1B**). Most Env-specific antibodies were non-neutralizing or lacked neutralization activity against tier-2 viruses (**Fig. S1B**). However, representative anti-gp120 antibodies from 3 distinct B-cell lineages displayed cross-neutralizing capacity (**Fig. 1D-F, S1B,** and **Table S1**). 7-107 antibody lineage was the most expanded, and consisted only of IgA-expressing clonal members, while 7-176 clonotype contained both IgG and IgA variants, and 7-155 IgG was the sole antibody variant isolated for the third bNAb lineage (**Fig. 1D,** and **Table S1**). Of note, further members of the 7-107 and 7-176 clonal families were identified among g140-F-captured memory B cells (**Fig. 1D,** and **Table S1**). 7-155 bound equally to SOSIP and g140-F trimers, 7-107 showed a binding preference for SOSIP, whereas 7-176 reacted with high affinity with SOSIP only (**Fig. 1E**). As expected, 7-107- and 7-176-related variants pulled down with g140-F bait (7-269 and 7-319, respectively) displayed increased relative affinity to gp140-F trimers (**Fig. 1E**).

7-176, 7-155 and 7-107 neutralized 42%, 50%, and 58% of the clade B viruses tested (n=6 tier 1, n=6 tier 2) respectively, but were poorly active against cross-clade viral strains (**Fig. 1F,** and **Fig. S1C**). Among gp140-F-captured 7-107 and 7-176 bNAb variants, only 7-269 showed improved neutralizing activity as compared to other clonotype members produced (n=10 total for the 7-107 lineage, **Fig. 1D-G**, and **Fig. S1D**). 7-269 expressed as its native IgA1 sub-class (**Fig. S2A**), had an IgG-equivalent clade B neutralizing profile (**Fig. 1E, Fig. S1D**, and **Fig. S1E**), and was tested against a cross-clade viruses panel. 7-269 IgA neutralized 41.1% of all viruses combined (n=56), with a geometric mean IC_{50} of 0.091 µg/ml (**Fig. 1H**, and **Fig. S1F**). Clade A (40%, n=5), B (61%, n=31) and C (22%, n=9) but not clade CD/D (n=5) and G (n=6) viruses were sensitive to neutralization by 7-269 IgA (**Fig. 1H**, and **Fig. S1F**). Next, we assayed the neutralizing activity of 7-269 IgA against 38 early/transmitted HIV-1 subtype B viruses from three epidemic periods (1987-1991, 1996-2000, and 2006-2010) (Bouvin-Pley et al., 2014). 7-269 IgA showed 55.3% breadth with a geometric mean IC_{50} of 0.146 µg/ml and a comparable neutralization profile across epidemic periods (**Fig. 1I**, and **Fig. S1G**).

7-155 and 7-176-related antibodies are encoded by V_H1-69/J_H6 and IgK (V_K3-15/J_K4and V_K1-5/J_K2, respectively) immunoglobulin genes, and harbor 12-13 amino acid-long CDR_H3 loops and high hypermutation levels (29.5% V_H / 19.3% V_K and 25.1±1.3% V_H / 17.1±5.6% V_K, respectively) (**Fig. 1J,** and **Table S1**). In contrast, 7-107 bNAb variants express V_H3-30/J_H6 (V_K3-15/J_K2) gene rearrangements containing much lower somatic mutation loads (8.7±1.2% V_H / 10.3±1.6% V_K), and possess a long CDR_H3 of 23 amino acids (**Fig. 1J,** and **Table S1**). None of the pt7 bNAb immunoglobulin genes contain nucleotide indels, except 7-176 clonotype members that all exhibit a 3 nucleotides-deletion in their CDR_H2 loop (by Kabat definition). To further identify pt7 bNAb clonal variants, we carried out high-throughput sequencing of immunoglobulin genes separately amplified from IgG^+, and IgA^+ transcripts in blood and bone marrow B-cell compartments, followed by divergence-identity analyses using bNAbs' IgH sequences as references. Consistent with the data from single B-cell sorting, we found clonal variants of 7-155 only in blood and bone marrow IgG^+

cell repertoires with similar proportions, and of 7-176 among both blood and bone marrow IgA- and IgG-expressing cells, the later being predominant (**Fig. 1K**)**.** As expected, most 7-269-related members were detected in blood and bone marrow IgA^+ cell repertoires but surprisingly, we also identified in the pt7 bone marrow library, 3 V_H3-J_H6 IgG sequences out of 4,199 (0.071%) belonging to the 7-107/7-269 clonotype (**Fig. 1K**). Hypermutation level analyses of blood and bone marrow 7-176-related IgH sequences show that IgG^+ cells preceded the emergence of IgA^+ clonal variants (**Fig. 1L**), suggesting a secondary class-switching event (IgM→IgG→IgA) as proposed for the M1214-N1 bNAb lineage (Jia et al., 2020). Conversely, the closest-to-germline 7-269-related IgH sequences were found among bone marrow IgA-expressing cells arguing in favor of an IgM B-cell precursor having directly switched to IgA (**Fig. 1L**), as shown recently for most M4008_N1 IgAs (Jia et al., 2020). Still, 7-269 B-cell precursor seems to have also switched to IgG as very few pt7's bone marrow cells, possibly plasma cells, expressed low mutated 7-269-related IgG sequences (**Fig. 1L**).

Antiviral potential of IgA bNAbs

To evaluate the neutralizing activity of 7-269 IgA *in vivo*, we generated HIV-1-infected humanized mice (hu-mice) by the engraftment of Balb/c $Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}$ (BRG) mice with human $CD34^+$ hematopoietic stem cells and subsequent infection with R5-tropic tier-2 NLAD8 viruses. Infected hu-mice were subjected to anti-retroviral therapy (ART), and once aviremic treated by a single injection of IgA antibodies (~20 mg/kg *per* mouse, 0.5 mg *i.p.*), 24 h prior to ART interruption. Viral rebound kinetics and intensity were assessed longitudinally by Q-PCR quantification of the viremia in animals receiving either 7-269 or non-HIV-1 control (mGO53) IgA1 antibody (**Fig. 2A**). In the control group, all animals (n=5) showed viral rebound within 2 weeks after stopping ART (**Fig. 2A**). In contrast, 37.5% of the mice treated with 7-269 IgA (n=8) experienced a significant delay in viral rebound following ART cessation (*p=0.009*, **Fig. 2A,** and **2B**).

Next, we tested the ability of IgA bNAbs in blocking viral transcytosis across the mucosal epithelium. As previously observed with IgG bNAbs (Lorin et al., 2017), 7-157 and

7-269 IgA antibodies did not inhibit HIV-1 transcytosis through epithelial cell monolayers but neutralize transcytosed virions (**Fig. 2C**). HIV-1 Env IgG antibodies, mainly bNAbs, can exert potent ADCC activity against HIV-1-infected target cells (Bruel et al., 2016). As ADCC pre-requisite, we first examined the binding of pt7 bNAbs to target cells infected with two lab-adapted and three transmitted founder (T/F) viruses. In agreement with our previous work (Bruel et al., 2017), IgG and IgA bNAbs bound well to cells infected with lab-adapted strains but less efficiently T/F-infected cells (**Fig. 2D**, and **2E**). Accordingly, AD8-infected cell killing by primary human NK cells *via* antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) was observed with all pt7 IgG bNAbs binding strongly to target cells, excepted 7-155 (**Fig. 2F**). IgA Fc-effector function data

Reactivity profiling of pt7 IgG and IgA bNAbs

None of the pt7 IgA and IgG bNAbs bound overlapping linear peptides covering the entire cons-clade B gp120-gp41 sequence indicating that they interact with conformational epitopes (**Fig. S2B**). To map the epitopes targeted by pt7 IgG and IgA bNAbs, we first evaluated their binding to a collection of gp120 mutants by ELISA. All antibodies from the 3 bNAb clonotypes (7-155, n=3 for 7-176 and n=10 for 7-107) had decreased or abrogated binding to gp120 carrying the N332A substitution as observed for PGT135, PGT121/10-1074 and BG8/BG18 (**Fig. 3A**). In addition, 7-155 and 7-176 lineage antibodies showed strong and moderate binding dependency on N386-linked glycans, respectively (**Fig. 3A,** and **3B**). Apart from N332 PNGS, gp120-binding experiments also revealed interactions of 7-107/7-269-class antibodies with N295-branched glycans (**Fig. 3A,** and **3B**). In agreement, all cross-clade panel viruses neutralized by 7-269 showed conserved N295 and N332 PNGS, while 73% of the resistant strains contained a PNGS-abrogating substitution at one of the sites (**Fig. S1F**). Consistent with the role of N262 glycan in stabilizing Env (Kong et al., 2015b), all conformation-dependent antibodies showed a drastic binding reduction against gp120 N262A mutant protein (**Fig. 3A**). Thus, it remains unclear whether pt7 antibodies could also interact with the N262 glycan as does indirectly PGT128 (Kong et al., 2015a). In contrast to

PGT121, binding of pt7 bNAbs to a gp120 protein devoid of complex-type N-glycans ($gp120^{kif}$, produced in presence the mannosidase inhibitor kifunensine), was only moderately affected (**Fig. 3A**). Likewise, contrary to PGT121 and 10-1074, pt7 bNAbs still reacted strongly with gp120 deleted from the V3 loop or bearing G324A-D325A substitutions (**Fig. 3A**). Next, we performed competition ELISA experiments with bNAbs of known specificity, many of which to the N332 supersite. As expected, gp120-binding cross-competition was evidenced between pt7 antibodies, and with other N332-targeting bNAbs including PGT135, PGT121/10-1074, 2G12, and BG8/BG18 (**Fig. 3C**). Among pt7 bNAbs, 7-269 showed the strongest competitive potential (**Fig. 3C**). 7-269 used as a competitor substantially decreased the binding of high-mannose patch antibodies from the same donor (7-155 and 7-176), as well as of bNAbs 2G12 and PGT135 but also of SF12, a bNAb directed against the gp120 silent face and known to make major contacts with N295 glycan (Schoofs et al., 2019).

HIV-1 gp160-specific IgG antibodies, including bNAbs to various epitopes, are frequently polyreactive and cross-reactive to self-antigens (Mouquet et al., 2010; Prigent et al., 2018). We thus evaluated the self-reactivity of pt7 bNAbs using HEp-2 cells IFA and human protein microarray immunoblotting. Only 7-176 presented the hallmarks for antibody auto- and poly-reactivity: it bound to HEp-2 cell antigens with a cytoplasmic binding pattern (**Fig. 3D**), displayed high polyreactivity and significant cross-reactivity (Z-scores > 5) to a dozen of human proteins by microarray binding analyses (**Fig. 3E**, and **Table S2**). We next examine the contribution of somatic mutations to the binding and neutralizing activity of 7-269 bNAb. The putative germline precursor (GL) of 7-269 failed to bind Env proteins (**Fig. 3F**) or to neutralize any tier-1 and tier-2 clade B viruses (**Fig. 3G**). Pairing GL IgH with mutated IgL of 7-269 (7-269.IgH^{GL}) did not rescue binding or neutralization but unexpectedly, the hybrid antibody version associating mutated IgH with GL IgL (7-269.IgL^{GL}) retained binding to gp120 but not to SOSIP and gp140-F trimers (**Fig. 3F**). Reverting 7-269 IgL mutations to GL induced a complete lose of neutralization on most viruses, although a weak but detectable neutralizing activity of 7-269.IgL^{GL} against SC422661.8 was observed (**Fig. 3G**).

Structural characterization of the 7-269 IgA epitope

To obtain molecular details of the 7-269 epitope at atomic level, we solved the structure of the BG505 SOSIP.664 Env in complex with 7-269 IgA Fab and 3BNC117 IgG Fab at a 2.9 Å resolution by cryo-electron microscopy (cryo-EM) (**Fig. 4A**). The particles formed by the ternary complex did not present any preferential orientation on cryo-EM grids allowing its reconstruction at a high resolution. Structural analyses of the 7-269 interactions with the SOSIP trimer demonstrated that 7-269 binds the high-mannose patch centered on the N332 glycan in C4 at the vicinity of V3 loop stem. In comparison with other glycan-associated V3 bNAbs (i.e., PGT121, 10-1074 and BG18), 7-269 bound the envelope trimer with a different orientation by approaching it from the side and not from the top (**Fig. 4B**). This orientation, reminiscent of the 2G12 binding (**Fig. 4C**), revealed that 7-269 does not contact the GDIR motif at the base of the V3 loop. The structure also showed that 7-269 epitope is mostly formed by the glycans at N332 and N295, with minor contacts with the gp120 protein and N262 and N411 glycans (**Fig. 4D,** and **4E**). This is consistent with the binding sensitivity of 7-269 to N332A and N295A mutations (**Fig. 3A,** and **3B**). The interactions were predominantly mediated by the 7-269 IgH, and buried a total area of 1800 $Å^2$, as similarly observed for other bNAbs such as 2G12, BG18 and 1-18 (Barnes et al., 2018; Schommers et al., 2020; Seabright et al., 2020). Interfacial residues in 7-269 are located in different structural elements of the antibody although they concentrated in the CDR_H3 loop. Notably, the residues contacting the N332 glycan were on one face, those that contact the N295 glycan on the opposite face, and the few residues interacting with the g120 protein moiety at the CDR_H3 tip, with Y115 contacting all these components being the most distal residue (**Fig. 4F**). Interestingly, potential hydrogen bonds were exclusively formed with glycans N295, N332 and N262 (**Fig. 4G-I**), while 7-269 contacts with the gp120 portion was only mediated by Van der Waals interactions. Since 7-269 is able to penetrate deep into the glycan shield, it contacted residues that form the N295, N332 and N411 glycosylation sequons (N295, N332, S334, N411, D412, S413). It also buried R444 that could form, depending on the pH, a cation-π interaction with H109 residue in the CDR_H3 loop (**Fig. 4J**).

As aforementioned, several segments of 7-269 interacted with gp120 protein, mainly through the IgH that contributed the most to the contact surface (74 % of the BSA). In the 7-269 IgH, the CDR_H3 buried ~ 50% of the total interface area, becoming the most important region interacting with the SOSIP trimer. As most bNAbs targeting glycan-associated variable loops, 7-269 has a long CDR_H3 (23 residues), which instead of a protruding and elongated conformation presented several turns shaping the CDR_H3 as a shamrock or a light bulb filament (**Fig. 4K**). Interestingly, the 7-269 CDR_H3 presented a disulfide bond between C105 and C110, which is a very unusual feature among anti-HIV bNAbs. The only other anti-HIV bNAb reported so far with this characteristic is anti-V1/V2 loops CAP256-VR26.03 (Doria-Rose et al., 2014) (**Fig. 4L**). CAP256-VR26.03 has a very long CDR_H3 (35 residues), and acquired its intra-CDR_H3 disulfide bond as a consequence of the affinity maturation process, correlating with less disorder and adoption of the mature CDR_H3 orientation further away from the IgL. In CAP256-VR26.03, the Cys residues involved in the disulfide bond are located close to the central region of the long protruding CDR_H3 loop, and are separated by 15 residues. Instead, the Cys residues in 7-269 IgH were in the distal region of the loop, towards the tip of the CDRH3, and were separated by 4 residues. Strikingly, these Cys are coded by germline nucleotides of the D_H2-2 segment, and conserved for all other clonal variants of the lineage we isolated by single cell capture (**Fig. 1J**), as well as in the lowest mutated 7-107/7-269 variant found among bone marrow IgA^+ cells (n=4 V_H3-30 nucleotide mutations, 0.013%) (**Fig. 1J, and S**). To examine the contribution of the C105-C110 bond to the activity of 7-269, we produced single and double cysteine-mutant antibodies abrogating its formation (7-269.IgH^{C105A} and 7-269.$IgH^{C105A-C110A}$). 269.IgH^{C105A} and 7-269.$IgH^{C105A-C110A}$ IgG and IgA antibodies exhibited a decreased relative affinity to HIV-1 Env proteins as compared to 7-269 (**Fig. 4M**), which translated into a complete lose of neutralizing activity against 3 out of the 5 viruses tested (**Fig. 4N**). Thus, 7-269 is the first HIV-1 bNAb with a germline-encoded intra-CDR_H3 disulfide bond, which is a key molecular element conferring glycan contacts in the high mannose patch and cross-neutralizing properties.

pt7 bNAbs all target the N332 glycan supersite

To better decipher pt7 bNAbs' cross-competition and delineate 7-155 and 7-176 epitopes, cryo-EM single-particle reconstructions were separately obtained for BG505 SOSIP.664 trimer-7-155 IgG Fab and -7-176 IgG Fab complexes at a resolution of 6.5 Å and 7.0 Å, respectively (**Fig. 5A** and **5B**). Superimposition of 7-155, 7-176 and 7-269 cryo-EM structures showed that all the bNAbs are indeed targeting the same region of the HIV Env, the high-mannose patch centered on N332, providing *per se* a mechanistic explanation for their strong binding competition. Structural analyses also indicated that 7-155 and 7-176 do not interact with the V3 loop GDIR motif, and that their epitopes overlap with the one of 2G12. However, several differences in the binding orientation characterized these antibodies: 7-269 interacted with the V_HV_L axis perpendicular to the SOSIP 3-fold symmetry axis, while for 7-155- and 7-176-SOSIP complexes, the V_HV_L and 3-fold symmetry axis were parallel (**Fig. 5C**). As a consequence, 7-269 was also able to bind the face of the gp120 protomer containing the N295 glycan, whereas the 7-155 and 7-176 epitopes expand between the N332 glycan and the opposite face of gp120 (**Fig. 5C**). Fitting the structure of 7-155 variable regions obtained by homology modeling into the cryo-EM reconstruction suggested that 7-155 might be far away from the N295 glycan but in close proximity to the V1 loop and the N332, N386 and N392 glycans (**Fig. 5D**). Applying the same procedure to 7-176 resulted in a similar model placing the antibody's binding site far from the N295 glycan and close to the N332, N386 and N392 glycans (**Fig. 5D**). This is consistent with the gp120 reactivity of 7-155 and 7-176 being sensitive to N332A and N386A mutations (**Fig. 3A,** and **3B**). In sum, the structural information collected indicates that despite all pt7 bNAbs are directed against the same epitopic region known as high-mannose patch or N332 supersite of vulnerability, they present specific binding angles and glycan recognition patterns.

Methods

Human samples

Samples were obtained as part of the BHUANTIVIH clinical research protocol, which was performed in accordance with and after ethical approval from all the French legislation and regulation authorities. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC), bone marrow mononuclear cells and sera were collected at the laboratory of Molecular Immunology at the Rockefeller University as part of the MNU-0628 protocol, which received ethic approvals from the Institutional Review Board of the Rockefeller University. The BHUANTIVIH protocol received approval from the *Comité Consultatif pour le Traitement de l'Information en matière de Recherche dans le domaine de la Santé* (CCTIRS) on December 12th 2013, the *Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés* (CNIL) on August 8th 2014 and the *Comité de Protection des Personnes de Tours* (CPP Région Centre-Ouest 1) on December 17th 2014. All donors gave written consent to participate in this study. Ethical issues have been monitored by the Ethics Board for European contracts, an *ad hoc* independent Ethics Committee in charge of reviewing periodically sensitive ethical issues in EU funded researches when requested by the EU. Human IgG and IgA antibodies were purified from donors' sera by affinity chromatography using Protein G Sepharose® 4 Fast Flow (GE Healthcare) and peptide M-coupled agarose beads (Invivogen), respectively. Purified serum antibodies were dialyzed against PBS using Slide-A-Lyzer® Cassettes (30K MWCO, Thermo Fisher Scientific).

HIV-1 Env proteins

HIV-1 antigens: for YU2 gp120 mutant proteins, single point mutations were introduced into the pYU-2 gp120 expression vector (gift of J. Sodroski, Harvard Medical School) using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies) following the manufacturer's instructions. Site-directed mutations were verified by DNA sequencing. AviTagged clade B YU2 gp140 (Yang et al., 2000) and BG505 SOSIP.664 (Sok et al., 2014) trimers, YU2 gp120, V3 loop-deleted (ΔV3) (Mouquet et al., 2012), and mutant proteins were

produced by transient transfection of exponentially growing Freestyle™ 293-F suspension cells (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) using polyethylenimine (PEI)-precipitation method, purified by high-performance chromatography using the Ni Sepharose® Excel Resin according to manufacturer's instructions (GE Healthcare), and controlled for purity by SDS-PAGE and NativePAGE gel staining as previously described (Lorin and Mouquet, 2015). High-mannose-only YU2 gp120 protein was produced in HEK293T cells treated with 25 µM kifunensine (Enzo Life Sciences) (Mouquet et al., 2012). Anti-V1-2/glycans PGT145 (Walker et al., 2011) produced and purified as described below was coupled to NHS-activated sepharose™ 4 fast flow gel beads (GE Healthcare) as previously described (Lorin and Mouquet, 2015) using 10 mg of purified IgG *per* 1 ml of beads, and PGT145-coupled resin (4 ml) was then packed in an empty XK16 column between two adaptors after extensive washes with PBS. BG505 SOSIP.664-containing supernatant was loaded at a flow rate of 1 ml/min (both directions) onto the PGT145-coupled resin, which was then washed with 10 CV of buffer (0.5 M NaCl, 20 mM Tris, pH 8.0) at a flow rate of 1 ml/min. BG505 SOSIP.664 proteins were eluted by fractionation with 20 CV of 3 M $MgCl_2$ at a flow rate of 1 ml/min. Protein fractions were pooled, dialyzed against 75 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8.0 (10K MWCO Slide-A-Lyzer® dialysis cassettes, Thermo Fisher Scientific), and concentrated using a Amicon® Ultra-4 centrifugal filter unit (10K MWCO, Millipore). YU2 gp140 and BG505 SOSIP.664 trimers were then purified by size exclusion FPLC-chromatography using an AKTA pure FPLC instrument (GE Healthcare) with a Superdex® 200 increase 10/300 GL column (GE Healthcare) as previously described (Lorin and Mouquet, 2015). Final protein concentrations were measured using a NanoDrop 2000 instrument (Thermo Fisher Scientific). The purity of the Env trimers was evaluated by SDS-PAGE using 4-12% Bis-Tris Novex gels (Life Technologies) in non-reducing and non-denaturing conditions, and by native PAGE using NativePAGE™ Novex® 3-12% Bis-Tris gels followed by in-gel protein silver staining (Siver Stain kit, Thermo scientific). YU2 gp140-F and BG505 SOSIP.664 trimers used for B-cell FACS capture were biotinylated using BirA biotin-protein ligase bulk reaction kit (Avidity, LLC). Purified clade B MN gp41 protein (#12027) and consensus clade B 15-mer

overlapping peptide library (#9480) were provided by the NIH AIDS Reagent Program (Germantown, MD).

Antibody controls

Human HIV-1 antibodies used as reference controls are as follow: anti-V3^{crown} 10-188 (Mouquet et al., 2011); bNAbs 2G12 (Trkola et al., 1996), anti-CD4bs 3BNC117 (Scheid et al., 2011), anti-V3/glycans PGT121, PGT135, 10-1074 and BG8/BG18 (Freund et al., 2017; Mouquet et al., 2012; Walker et al., 2011), and anti-silent face SF12 (Schoofs et al., 2019). Non-HIV-1 antibodies include polyreactive and non-polyreactive antibody ED38 (Meffre et al., 2004) and mGO53 (Wardemann et al., 2003), respectively. Recombinant IgG antibodies were produced by co-transfection of Freestyle™ 293-F cells (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) using PEI-precipitation method as previously described (Lorin and Mouquet, 2015; Tiller et al., 2008), and purified by affinity chromatography using protein G sepharose 4 fast flow beads (GE Healthcare). For competition ELISA experiments, purified antibodies were biotinylated using the EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin kit (Thermo Fisher Scientific).

Single B-cell FACS sorting and expression-cloning of antibodies

Peripheral blood human B cells were isolated from donors' PBMCs by CD19 MACS (Miltenyi Biotec), and stained with LIVE/DEAD fixable dead cell stain kit (Thermo Fisher Scientific). Purified B cells were then incubated for 30 min at 4°C with biotinylated recombinant YU2 gp140-F or BG505 SOSIP.664 trimers (1 µg/ml), washed with 1% FBS-PBS (FACS buffer), and incubated for 30 min at 4°C with a cocktail of mouse anti-human antibodies (CD19 A700 (HIB19), IgG BV786 (G18-145), CD27 PE-CF594 (M-T271) (BD Biosciences), IgA FITC (IS11-8E10, Miltenyi Biotec)), and streptavidin R-PE conjugate (Thermo Fisher Scientific). Stained cells were washed and resuspended in 1mM EDTA FACS buffer. Single S-Env^{+}CD19^{+}IgG^{+}/IgA^{+} B cells were sorted into 96-well PCR plates using a FACS Aria III sorter (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) as previously described (Tiller et al., 2008). Single-cell cDNA synthesis using SuperScript IV reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific)

followed by nested-PCR amplifications of IgH, Igκ and Igλ genes, and sequences analyses for Ig gene features were performed as previously described (Prigent et al., 2016; Scheid et al., 2011; Tiller et al., 2008). For the reversion to germline (GL) of the selected antibodies, sequences were constructed by replacing the mutated V_H-(D_H)-J_H and V_L-J_L gene segments with their GL counterparts as previously described (Mouquet et al., 2012). Purified digested PCR products were cloned into human Igα1-, Igγ1-, Igκ- or Igλ-expressing vectors as previously described (Lorin and Mouquet, 2015; Tiller et al., 2008). Recombinant antibodies were produced by transient co-transfection of Freestyle™ 293-F suspension cells (Thermo Fisher Scientific) using PEI-precipitation method as previously described (Lorin and Mouquet, 2015). Recombinant human IgG and IgA antibodies were purified by affinity chromatography using Protein G Sepharose® 4 Fast Flow (GE Healthcare) and peptide M-coupled agarose beads (Invivogen), respectively. Purified antibodies were dialyzed against PBS. Preparations for *in vivo* infusions were micro-filtered (Ultrafree®-CL devices - 0.1 µm PVDF membrane, Merck-Millipore, Darmstadt, Germany), and checked for endotoxins levels using the ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (GenScript).

High-throughput immunoglobulin repertoire sequencing

Total mRNAs were extracted from PBMC and bone marrow cells using Nucleospin RNA kit and Nucleospin RNA XS kit (Macherey Nagel), respectively. cDNAs were generated from 0.5-1 µg mRNAs using random hexamers (pd(N)6, Roche) and SuperScript IV reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's protocol. IgG and IgA DNA fragments were first amplified from 5 µl of cDNA using 2 U of Platinum™ Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's instructions, with 5'L-VH mix and 3'CγCH1 or 3'CαCH1 primers (Wardemann and Kofer, 2013), with the following PCR cycles: 2 min at 94 °C, 50 x [94 °C for 30 s - 58 °C for 30 s - 72 °C for 1 min], and 72 °C for 5 min. PCR products were gel-purified using the NucleoSpin® Clean-up kit (Macherey Nagel), and subjected to an additional PCR-amplification (5 µl of template) following the aforementioned conditions but with 5'L-VH mix (for 7-155 and 7-176) or 5'L-VH3-30 (for 7-

107/7-269) and 3'IgGint or 3'CαCH1-2 primers (Wardemann and Kofer, 2013), with a final in gel purification step using the NucleoSpin® Clean-up kit. DNA quantification, DNA library preparation and sequencing were performed at the Biomics platform (Institut Pasteur) using Illumina technology. Briefly, DNA librairies were quantified and quality-checked using 5200 Fragment Analyzer System (Agilent Technologies), and then prepared using NEXTflex™ PCR-Free DNA Sequencing Kit (Bioo Scientific) according to manufacturer's instructions (no fragmentation step). DNA fragments were loaded on the flow cell [20% Phix at 12.5 pM and 80% of library pool at 6 pM (v/v)], and sequenced using MiSeq® Reagent Kit v3 (Illumina) and Miseq instrument, which generated 2x300-bp paired-end reads. Forward and reverse reads with 10 overlapping nucleotides minimum were merged using PEAR software (Zhang et al., 2013) with the following parameters: minimum length n = 300, quality threshold q = 20, and minimum length after trimming low-quality parts t = 300. Once merged, sequences were assigned with germline Ig genes using IgBlast (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/), which was also used to remove sequences with low quality features (stop codon, V-gene E-value > 10^{-3}, undefined CDRH3 and FRWs, or subject alignment starts > 9), and database building. CD-HIT clustering program (http://weizhongli-lab.org/cd-hit/) allowed excluding redundant reads (99% identity), and only representative and isotype-checked sequences were then utilized to perform divergence/identity analyses using Needle program (http://embossgui.sourceforge.net/demo/manual/needle.html) to align and compute similarity scores with library sequences trimmed at the end of FRW3 and FRW4 for alignment with V-gene germline and pt7 bNAb reference sequence, respectively (gapopen = 10, gapextent = 0.5). Divergence/identity plots were generated using FlowJo software (v10.3; FlowJo LLC) after transforming for all final sequences in a given library, (x, y) coordinates-containing text file into a FCS format file using DISCit software (Moreau and Bousso, 2014).

ELISAs

ELISAs were performed as previously described (Mouquet et al., 2011; Mouquet et al., 2012). Briefly, high-binding 96-well ELISA plates (Costar, Corning) were coated overnight

with purified Env proteins (125 ng/well in PBS). After washings with 0.05% Tween 20-PBS (PBST), plates were blocked 2 h with 2% BSA, 1mM EDTA-PBST (Blocking solution), washed, and incubated with serially diluted purified serum IgG and recombinant monoclonal antibodies in PBS. For competition ELISAs, BG505 SOSIP.664 protein-coated plates were blocked, washed, incubated for 2 h with biotinylated antibodies (at a concentration 0.33, 3.33, or 6.67 nM) in 1:2 serially diluted solutions of antibody competitors in PBS (IgG concentration starting at 666.7 nM). After washings, plates were revealed by addition of goat HRP-conjugated anti-human IgG or HRP-conjugated streptavidin (0.8 µg/ml final in blocking solution, Immunology Jackson ImmunoReseach) and HRP chromogenic substrate (ABTS solution, Euromedex). Binding of antibodies to overlapping linear peptides was tested using the same procedure as previously described (Mouquet et al., 2011; Mouquet et al., 2012). Experiments were performed using HydroSpeed™ microplate washer and Sunrise™ microplate absorbance reader (Tecan Männedorf), with optical density measurements made at 405 nm (OD_{405nm}). All antibodies were tested in duplicate or triplicate in at least two independent experiments, which included mGO53 negative and appropriate positive controls.

Protein microarrays

All experiments were performed at 4°C using ProtoArray Human Protein Microarrays (Thermo Fisher Scientific). Microarrays were blocked for 1 h in blocking solution (Thermo Fisher), washed and incubated for 1h30 with IgG antibodies at 2.5 µg/ml as previously described (Planchais et al., 2019). After washings, arrays were incubated for 1h30 with AF647-conjugated goat anti-human IgG antibodies (at 1 µg/ml in PBS; Thermo Fisher Scientific), and revealed using GenePix 4000B microarray scanner (Molecular Devices) and GenePix Pro 6.0 software (Molecular Devices) as previously described (Planchais et al., 2019). Fluorescence intensities were quantified using Spotxel® software (SICASYS Software GmbH, Germany), and mean fluorescence intensity (MFI) signals for each antibody (from duplicate protein spots) was plotted against the reference antibody mGO53 (non polyreactive isotype control) using GraphPad Prism software (v8.1.2, GraphPad Prism Inc.). For each

antibody, Z-scores were calculated using ProtoArray® Prospector software (v5.2.3, Thermo Fisher Scientific), and deviation (σ) to the diagonal, and polyreactivity index (PI) values were calculated as previously described (Planchais et al., 2019). Antibodies were defined as polyreactive when PI > 0.21.

HEp-2 cell IFA

Binding of human anti-HBs and control monoclonal IgG antibodies (mGO53 (Wardemann et al., 2003) and ED38 (Meffre et al., 2004)) to HEp-2 cell-expressing autoantigens were analyzed at 100 µg/ml by indirect immunofluorescence assay (IFA) (ANA HEp-2 AeskuSlides®, Aesku.Diagnostics) following the manufacturer's instructions in two independent experiments. IFA sections were examined using the fluorescence microscope Axio Imager 2 (Zeiss, Jena, Germany), and pictures were taken at magnification x 40 with 5000 ms-acquisition using ZEN imaging software (Zen 2.0 blue version, Zeiss) at the Photonic BioImaging platform (Institut Pasteur).

In vitro viral transcytosis assay

Transcytosis assays were performed using the human epithelial HEC-1A cells (ATCC® HTB-112™) cultivated on 0.4 µm polyethylene terephthalate transwell membranes (Millicell®, Millipore), and monitored for the formation of tight monolayers as described previously (Lorin et al., 2017). HIV-1 viruses (10 ng of p24) were incubated v/v for 1 h at 37°C with purified antibodies (66.67 nM final concentration), and mixtures were added onto epithelial cell monolayers at day 6 of culture. As controls, HIV-1 alone was added into inserts with cells (No Ab) and without cells (CTL), which takes into account the proportion of virions not passing through the transwell filter. After 24 h, basal media were collected and their p24 content measured by ELISA (HIV-1 p24 Antigen Capture Assay, Advanced Bioscience Laboratories Inc., Rockville, MD). The percentage of transcytosis was determined using the following formula: (concentration p24 sample / mean concentration p24 CTL)*100. The infectivity of virions transcytosed in the presence or not of antibodies (0.05 ng p24) was measured using

a previously described TZM-bl cells assay (Lorin et al., 2017). Two independent experiments were performed with triplicate transwells, and included non-HIV-1 isotype IgA control mGO53.

HIV-1 in vitro neutralization assay

Pseudoviruses (Bal.26, 6535.3, YU2, RHPA4259.7, SC422661.8, CAAN5342.A2, and PVO.4; Env plasmids obtained from the NIH AIDS reagent program) were prepared by cotransfection of HEK293T cells with pSG3ΔEnv vector using FUGENE-6 transfection reagent (Promega) as previously described (Li et al., 2018; Sarzotti-Kelsoe et al., 2014). Pseudoviruses-containing culture supernatants were harvested 2 days post-transfection and 50% tissue culture infectious dose (TCID50) of each preparation was determined using TZM-bl cells (NIH AIDS Reagent Program) as previously described (Li et al., 2018; Sarzotti-Kelsoe et al., 2014). Neutralization experiments were performed twice and included 10-1074 as a positive control. Neutralization of HIV-1 strains in the cross-clade reference and extended virus panels (deCamp et al., 2013; Scheid et al., 2011) was measured using TZM-bl cells as previously described (Li et al., 2018). The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) values were calculated using GraphPad Prism software (v6.0a, GraphPad Prism Inc., USA) by fitting duplicate values using the 5-parameters sigmoidal dose-response model. Neutralizing activities of 7-269 IgA bNAb against clade B viruses from various infection periods (Bouvin-Pley et al., 2014) was assessed in duplicate using TZM-bl reporter cells. Viruses (1000 TCID50) were incubated for 1h at 37°C with 3-fold serially diluted 7-269 IgA. The virus-IgA mixtures where then used to infect 10000 TZM-bl cells in the presence of 37.5 µg/ml DEAE-dextran. Infection levels were determined after 48h by measuring the luciferase activities of cell lysates as described previously (Bouvin-Pley et al., 2014).

Flow cytometric antibody binding to infected cells

Laboratory-adapted (AD8 and YU2) and T/F (CH058, CH077, and THRO) viruses were produced from infectious molecular clones (NIH AIDS Reagent Program) as previously

described (Bruel et al., 2016; Bruel et al., 2017). CEM-NKR-CCR5 cells (NIH AIDS Reagent Program) were infected with inocula of selected viruses, and adjusted to achieve 10-30% of Gag^+ cells at 48 h post infection (Bruel et al., 2016; Bruel et al., 2017). Infected cells were incubated with IgG and IgA antibodies (at 15 µg/ml) in staining buffer (PBS, 0.5% BSA, 2mM EDTA) for 30 min at 37°C, washed and incubated 30 min at 4°C with AF647-conjugated anti-human IgG antibodies (1:400 dilution; Life technologies) or with mouse anti-human IgA HB200 antibodies (30 µg/ml final) (Lorin and Mouquet, 2015) for 30 min and 1 h at 4°C, respectively. Binding reactions using HB200 were revealed after washings using 1:400-diluted Alexa 647-conjugated goat anti-mouse antibodies (Fisher Scientific) for 30 min at 4°C. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde and stained for intracellular Gag as previously described (Bruel et al., 2016; Bruel et al., 2017). Data were acquired using an Attune Nxt instrument (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) and analyzed using FlowJo software (v10.3; FlowJo LLC).

ADCC assay

The ADCC assay was performed as previously described (Bruel et al., 2016). Briefly, AD8-infected CEM-NKR-CCR5 cells were stained with Far Red DDAO cell tracker (Life technologies, Thermo Fisher Scientific), and incubated for 5 min at room temperature with antibodies in U-bottom 96-well plates (2-5 x 10^4 target cells with 15 µg/ml final concentration). Purified human NK cells were then added (1 CEM-NKR:10 NK), and incubated for 5 h at 37°C, following a brief spin-down to promote cell contacts. Cells were then fixed and stained for intra-cellular Gag as previously described (Bruel et al., 2016). Data were acquired using an Attune Nxt instrument (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) and analyzed using FlowJo software (v10.3; FlowJo LLC). The frequencies of Gag+ cells among Far-Red+ cells were determined. ADCC was calculated using the following formula: 100 x (% of Gag+ target cells plus NK without antibody - % of Gag+ target cells plus effector with antibody) / (% of Gag+ target cells plus NK without antibody).

HIV-1-infected hu-mice

Balb/c $Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}Sirpa^{NOD}$ (BRGS) mice were used as recipients to create hu-mice as previously described (Li et al., 2018; Masse-Ranson et al., 2019). Briefly, newborn pups (3 to 5 days old) received sub-lethal irradiation (3 Gy) and were injected intra-hepatically with 5-10x10^4 $CD34^+CD38^-$ human fetal liver cells. HIV infection was performed with 15 to 20 week old mice. NLAD8 viruses were produced by transfection of HEK-293T cells with pNLAD8 plasmid (HIV-1 NLAD8 molecular clone, NIH AIDS Reagent Program), and titrated on activated PBMCs by the Reed-Muench method using the Alliance HIV-1 p24 ELISA kit (Perkin-Elmer). Hu-mice were inoculated using *ip* injection of 10^5 $TCID_{50}$ HIV_{NLAD8}. Viral RNA was extracted from plasma (25 µl) using QIAamp Viral RNA kit (Qiagen) and plasma viremia was assayed using Retrotransciption (RNA Invitrogen) and linear 15-cycles pre-amplification PCR, followed by a probe-based qPCR (JumpStart, Sigma-Aldrich) using previously described primers, probes and standards (Li et al., 2018; Masse-Ranson et al., 2019). ART in infected mice (oral administration of a 3 drug regimen [72.9 mg/kg Emtricitabine (FTC, Emtriva, Gilead), 72.9 mg/kg Tenofovir disporxyl fumarate (TDF, Viread, Gilead), and 729.17 mg/kg Raltegravir (RAL, Isentress, MSD) *per* day in the water gel delivery system) was initiated at 12 dpi for 3-4 weeks. 7-269 and mGO53 isotype control were administrated *ip* as a single dose of endotoxin-free purified IgA (0.5 mg) during ART regimen, which was stopped 1 day after the antibody injection. FACS analysis on total blood was performed as previously described (Li et al., 2018; Masse-Ranson et al., 2019).

Sample preparation and cryo-elecron microscopy (Cryo-EM)

IgA Fab-expression vector was generated from the original IgG1-expression vector (Tiller et al., 2008) by substituting the entire DNA sequence coding the IgG1 constant region by one stopping at end of the IgA1-C_H1 domain, and followed by an hexa-Histidine (6xHis)-TAG (synthetic DNA fragments, GeneArt, Thermo Fisher Scientific). 7-269 IgH was cloned into the IgA1-Fab, and 7-155, 7-176, 3BNC117 and 35O22 (Huang et al., 2014) IgH into the IgG1-Fab (Mouquet et al., 2012) expression vectors. Recombinant Fab fragments were produced

by transient co-transfection of Freestyle™ 293-F suspension cells (Thermo Fisher Scientific) and purified using Ni-sepahrose® Excel affinity chromatography as described above. Purified protein fractions were dialyzed against DPBS (Gibco). A gene encoding soluble BG505 T332N SOSIP.664 was codon-optimized, synthesized and cloned in pcDNA3.1 (+) with the t-PA signal peptide by Genscript. This construct was transiently transfected in FS293 cells and the secreted Env trimers were isolated from cell supernatants using PGT145 immunoaffinity chromatography by covalently coupling PGT145 IgG to an activated-NHS Sepharose column (GE Healthcare). Env was eluted using 3M $MgCl_2$ and immediately buffer exchanged into SEC buffer (10 mM Tris, 75 mM NaCl, pH 8), followed by a SEC purification on a Superose 6 10/300 column (GE Healthcare). Peak fractions corresponding to SOSIP trimers were pooled and concentrated for immediate use or storage at -80 °C.

Complexes were prepared by incubating overnight, at 4 °C, purified SOSIP with the corresponding Fabs at a 3:1 Fab:gp120 protomer molar ratio. The complexes SOSIP-7-269-3BNC117 and SOSIP-7-176 were further separated by SEC on a Superose6 10/300 column and those fractions containing Env and the Fab were pooled, concentrated and used for sample preparation. These complexes were diluted to 0.6 μM (trimeric complex concentration) with SEC buffer and 3 μL were added to C-flat R2/2 300 mesh copper grids (Electron microscopy Sciences) that had been freshly glow-discharged using an ELMO glow discharge system at 2 mA for 30 s (Cordouan Technologies). Samples were immediately vitrified in 100% liquid ethane using a Mark IV Vitrobot (Thermo Fischer Scientific) by blotting for 4 s with Whatman No. 1 filter paper at 9 °C and 100 % relative humidity, after 30 s waiting time. The complex SOSIP-7155 was not purified by SEC, instead the sample was diluted to 0.45 μM (trimeric Env concentration) after the overnight binding incubation and used for grid preparation as indicated for the other samples.

Cryo-EM data collection, refinement and modeling

Single-particle cryo-EM data of the SOSIP-7-269-3BNC117 complex were collected on a Titan Krios transmission electron microscope (Thermo Fischer Scientific) operating at 300 kV, using the EPU automated image acquisition software (Thermo Fisher Scientific). Movies were collected on a Gatan K3 direct electron detector operating in Counted Super Resolution mode at a nominal magnification of 105,000x (0.85 Å/pixel) using defocus range of -1.0 μm to -3.0 μm. Movies were collected over a 3 s exposure and a total dose of ~45 $e^-/Å^2$. Data for the SOSIP-7155 and SOSIP-7176 complexes were collected on a Glacios electron microscope (Thermo Fisher Scientific) operated at 200 kV and equipped with a Falcon 3EC direct electron detector. Movies were collected on linear mode using a pixel size of 2.0 Å. The defocus range was -1.0 to -3.0 μm and each movie contained 38 frames with a dose of ~60 $e^-/Å^2$, and a 1.67 s exposure time. For the final reconstruction of this complex, the first step consisted on generating the initial coordinates of the 7-269 variable region. This was achieved by using UCSF Chimera to dock a structural-homology model of the antibody into the cryo-EM density of the map obtained by focused refinement on one Fab-gp120 protomer. This model was refined into the EM map using one round of rigid body, morphing and simulated annealing in Phenix. The model was manually built following iterative rounds of real-space and B-factor refinement in Coot and Phenix with secondary structure restraints. The 7-269 variable region structure was then used, along with the SOSIP-3BNC117 structure (PDB: 5V8M), as initial coordinates that were fit into the EM map of the trimeric complex (generated by non-uniform refinement with C3 symmetry on Cryosparc) using UCSF Chimera (https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/). As indicated above, a first round of refinement using rigid body, morphing and simulated annealing in Phenix was followed by manual building, and iterative rounds of real-space and B-factor refinement in Coot and Phenix. Modelling of glycans was achieved by interpreting cryo-EM density at PNGS in Coot. Validation of model coordinates was performed using MolProbity. The V_H and V_L regions were modeled based on structural homology using Phyre2. Superimpositions and figures

were made using UCSF Chimera (https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/). Buried surface areas (BSAs) and potential hydrogen bonds were determined with PDBePISA (https://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa/).

Statistics

Groups of mice treated with 7-269 and control IgA antibodies were compared by a Kaplan-Meier analysis for viral rebound using Log-rank (Mantel-Cox) test. Percentages of transcytosis and post-transcytosis infectivity levels were compared for each bNAb group to the “no antibody” (No Ab) control using Mann-Whitney test. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (v8.1.2, GraphPad Prism Inc.).

Acknowledgements

We are grateful to all participants who consented to be part of this study. We thank Arlene M. Hurley (The Rockefeller University Hospital) and Nathalie Jolly from the Clinical core of the Center for Translational Sciences (CTS, Institut Pasteur) for their assistance on the preparation of the BHUANTIVIH protocol, Sandrine Schmutz and Sophie Novault (UTechS CB, CTS, Institut Pasteur) for their help with single cell sorting, Florence Guivel-Benhassine (Virus & Immunity unit) for virus preparation, and Laurence Ma (Biomics platform, Institut Pasteur) for Illumina sequencing. We thank Natalia T. Freund (Tel Aviv University) and Michel C. Nussenzweig (The Rockefeller University) for kindly providing BG8/BG18 expression vectors; Rogier Sanders (University of Amsterdam), and John P. Moore (Weill Medical College of Cornell University) for kindly providing BG505 SOSIP.664 expression vectors. We also thank the NIH AIDS Reagent Program (Division of AIDS, NIAID, NIH) for contributing to reagents and the Agence National de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales (ANRS) for an equipment grant support. The Biomics platform is supported by France Génomique (ANR-10-INBS-09-09) and IBISA. I.F. and C.P. were recipients of an ANRS post-doctoral fellowship. H.M. received core grants from the Institut Pasteur, the INSERM and the *Milieu Intérieur* Program (ANR-10-LABX-69-01). This work was supported by the European Research Council (ERC) – Seventh Frame-work Program (ERC-2013-StG 337146), and by Gilead Sciences – HIV Cure Grants (#00397).

Author Contributions

H.M. conceived and supervised the study. M.B., J. Di Santo, F.R., and H.M. supervised the experiments. V.L., I.F., G. M-R., M.B-P., G. G-Z., C.P., O.F., J. Dimitrov, M.S.S., and H.M. designed, performed and analyzed the experiments. T.H. carried out bioinformatics analyses. F.P., B.D.W., J.F.S, and M.C.N. provided human samples and personal data. L. M-A., T.B., R.S, and O.S. contributed with key reagents and expertise. V.L. and H.M. wrote the manuscript with contributions from all the authors.

Declaration of Interests

The authors declare no competing interests.

References

Astronomo, R.D., Santra, S., Ballweber-Fleming, L., Westerberg, K.G., Mach, L., Hensley-McBain, T., Sutherland, L., Mildenberg, B., Morton, G., Yates, N.L.*, et al.* (2016). Neutralization Takes Precedence Over IgG or IgA Isotype-related Functions in Mucosal HIV-1 Antibody-mediated Protection. EBioMedicine *14*, 97-111.

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

Bournazos, S., Klein, F., Pietzsch, J., Seaman, M.S., Nussenzweig, M.C., and Ravetch, J.V. (2014). Broadly neutralizing anti-HIV-1 antibodies require Fc effector functions for in vivo activity. Cell *158*, 1243-1253.

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

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

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

Caskey, M., Klein, F., and Nussenzweig, M.C. (2019). Broadly neutralizing anti-HIV-1 monoclonal antibodies in the clinic. Nature medicine *25*, 547-553.

Cheeseman, H.M., Olejniczak, N.J., Rogers, P.M., Evans, A.B., King, D.F.L., Ziprin, P., Liao, H.X., Haynes, B.F., and Shattock, R.J. (2017). Broadly Neutralizing Antibodies Display Potential for Prevention of HIV-1 Infection of Mucosal Tissue Superior to That of Nonneutralizing Antibodies. Journal of virology *91*.

Daniels, C.N., and Saunders, K.O. (2019). Antibody responses to the HIV-1 envelope high mannose patch. Advances in immunology *143*, 11-73.

deCamp, A., Hraber, P., Bailer, R.T., Seaman, M.S., Ochsenbauer, C., Kappes, J., Gottardo, R., Edlefsen, P., Self, S., Tang, H.*, et al.* (2013). Global Panel of HIV-1 Env Reference Strains for Standardized Assessments of Vaccine-Elicited Neutralizing Antibodies. Journal of virology *88*, 2489-2507.

Doria-Rose, N.A., and Landais, E. (2019). Coevolution of HIV-1 and broadly neutralizing antibodies. Current opinion in HIV and AIDS *14*, 286-293.

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

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

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

Jia, M., Liberatore, R.A., Guo, Y., Chan, K.W., Pan, R., Lu, H., Waltari, E., Mittler, E., Chandran, K., Finzi, A.*, et al.* (2020). VSV-Displayed HIV-1 Envelope Identifies Broadly Neutralizing Antibodies Class-Switched to IgG and IgA. Cell host & microbe *27*, 963-975 e965.

Kong, L., Torrents de la Peña, A., Deller, M.C., Garces, F., Sliepen, K., Hua, Y., Stanfield, R.L., Sanders, R.W., and Wilson, I.A. (2015a). Complete epitopes for vaccine design derived from a crystal structure of the broadly neutralizing antibodies PGT128 and 8ANC195 in complex with an HIV-1 Env trimer. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography *71*, 2099-2108.

Kong, L., Wilson, I.A., and Kwong, P.D. (2015b). Crystal structure of a fully glycosylated HIV-1 gp120 core reveals a stabilizing role for the glycan at Asn262. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics *83*, 590-596.

Li, Y., Masse-Ranson, G., Garcia, Z., Bruel, T., Kok, A., Strick-Marchand, H., Jouvion, G., Serafini, N., Lim, A.I., Dusseaux, M.*, et al.* (2018). A human immune system mouse model with robust lymph node development. Nature methods *15*, 623-630.

Lopez, E., Shattock, R.J., Kent, S.J., and Chung, A.W. (2018). The Multifaceted Nature of Immunoglobulin A and Its Complex Role in HIV. AIDS research and human retroviruses *34*, 727-738.

Lorin, V., Malbec, M., Eden, C., Bruel, T., Porrot, F., Seaman, M.S., Schwartz, O., and Mouquet, H. (2017). Broadly neutralizing antibodies suppress post-transcytosis HIV-1 infectivity. Mucosal immunology *10*, 814-826.

Lorin, V., and Mouquet, H. (2015). Efficient generation of human IgA monoclonal antibodies. Journal of immunological methods *422*, 102-110.

Lu, C.L., Murakowski, D.K., Bournazos, S., Schoofs, T., Sarkar, D., Halper-Stromberg, A., Horwitz, J.A., Nogueira, L., Golijanin, J., Gazumyan, A.*, et al.* (2016). Enhanced clearance of HIV-1-infected cells by broadly neutralizing antibodies against HIV-1 in vivo. Science *352*, 1001-1004.

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

Masse-Ranson, G., Dusseaux, M., Fiquet, O., Darche, S., Boussand, M., Li, Y., Lopez-Lastra, S., Legrand, N., Corcuff, E., Toubert, A.*, et al.* (2019). Accelerated thymopoiesis and improved T-cell responses in HLA-A2/-DR2 transgenic BRGS-based human immune system mice. European journal of immunology *49*, 954-965.

McCoy, L.E. (2018). The expanding array of HIV broadly neutralizing antibodies. Retrovirology *15*, 70.

Meffre, E., Schaefer, A., Wardemann, H., Wilson, P., Davis, E., and Nussenzweig, M.C. (2004). Surrogate light chain expressing human peripheral B cells produce self-reactive antibodies. The Journal of experimental medicine *199*, 145-150.

Moreau, H.D., and Bousso, P. (2014). Disc. IntraVital *1*, 27-31.

Mouquet, H., Klein, F., Scheid, J.F., Warncke, M., Pietzsch, J., Oliveira, T.Y., Velinzon, K., Seaman, M.S., and Nussenzweig, M.C. (2011). Memory B Cell Antibodies to HIV-1 gp140 Cloned from Individuals Infected with Clade A and B Viruses. PLoS One *6*, e24078.

Mouquet, H., Scharf, L., Euler, Z., Liu, Y., Eden, C., Scheid, J.F., Halper-Stromberg, A., Gnanapragasam, P.N., Spencer, D.I., Seaman, M.S.*, et al.* (2012). Complex-type N-glycan recognition by potent broadly neutralizing HIV antibodies. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *109*, E3268-3277.

Mouquet, H., Scheid, J.F., Zoller, M.J., Krogsgaard, M., Ott, R.G., Shukair, S., Artyomov, M.N., Pietzsch, J., Connors, M., Pereyra, F.*, et al.* (2010). Polyreactivity increases the apparent affinity of anti-HIV antibodies by heteroligation. Nature *467*, 591-595.

Nabi, R., Moldoveanu, Z., Wei, Q., Golub, E.T., Durkin, H.G., Greenblatt, R.M., Herold, B.C., Nowicki, M.J., Kassaye, S., Cho, M.W.*, et al.* (2017). Differences in serum IgA responses to HIV-1 gp41 in elite controllers compared to viral suppressors on highly active antiretroviral therapy. PLoS One *12*, e0180245.

Niessl, J., Baxter, A.E., Mendoza, P., Jankovic, M., Cohen, Y.Z., Butler, A.L., Lu, C.-L., Dubé, M., Shimeliovich, I., Gruell, H.*, et al.* (2020). Combination anti-HIV-1 antibody therapy is associated with increased virus-specific T cell immunity. Nature medicine *26*, 222-227.

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

Planchais, C., Kok, A., Kanyavuz, A., Lorin, V., Bruel, T., Guivel-Benhassine, F., Rollenske, T., Prigent, J., Hieu, T., Prazuck, T.*, et al.* (2019). HIV-1 Envelope Recognition by Polyreactive and Cross-Reactive Intestinal B Cells. Cell reports *27*, 572-585 e577.

Planque, S., Salas, M., Mitsuda, Y., Sienczyk, M., Escobar, M.A., Mooney, J.P., Morris, M.K., Nishiyama, Y., Ghosh, D., Kumar, A.*, et al.* (2010). Neutralization of genetically diverse HIV-1 strains by IgA antibodies to the gp120-CD4-binding site from long-term survivors of HIV infection. Aids *24*, 875-884.

Prigent, J., Jarossay, A., Planchais, C., Eden, C., Dufloo, J., Kok, A., Lorin, V., Vratskikh, O., Couderc, T., Bruel, T.*, et al.* (2018). Conformational Plasticity in Broadly Neutralizing HIV-1 Antibodies Triggers Polyreactivity. Cell reports *23*, 2568-2581.

Prigent, J., Lorin, V., Kok, A., Hieu, T., Bourgeau, S., and Mouquet, H. (2016). Scarcity of autoreactive human blood IgA(+) memory B cells. European journal of immunology *46*, 2340-2351.

Ruiz, M.J., Ghiglione, Y., Falivene, J., Laufer, N., Holgado, M.P., Socias, M.E., Cahn, P., Sued, O., Giavedoni, L., Salomon, H.*, et al.* (2016). Env-Specific IgA from Viremic HIV-Infected Subjects Compromises Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. Journal of virology *90*, 670-681.

Sarzotti-Kelsoe, M., Daniell, X., Todd, C.A., Bilska, M., Martelli, A., LaBranche, C., Perez, L.G., Ochsenbauer, C., Kappes, J.C., Rountree, W.*, et al.* (2014). Optimization and validation of a neutralizing antibody assay for HIV-1 in A3R5 cells. Journal of immunological methods *409*, 147-160.

Scheid, J.F., Mouquet, H., Ueberheide, B., Diskin, R., Klein, F., Olivera, T.Y., Pietzsch, J., Fenyo, D., Abadir, A., Velinzon, K.*, et al.* (2011). Sequence and Structural Convergence of Broad and Potent HIV Antibodies That Mimic CD4 Binding. Science.

Schommers, P., Gruell, H., Abernathy, M.E., Tran, M.-K., Dingens, A.S., Gristick, H.B., Barnes, C.O., Schoofs, T., Schlotz, M., Vanshylla, K.*, et al.* (2020). Restriction of HIV-1 Escape by a Highly Broad and Potent Neutralizing Antibody. Cell *180*, 471-489.e422.

Schoofs, T., Barnes, C.O., Suh-Toma, N., Golijanin, J., Schommers, P., Gruell, H., West, A.P., Jr., Bach, F., Lee, Y.E., Nogueira, L.*, et al.* (2019). Broad and Potent Neutralizing Antibodies Recognize the Silent Face of the HIV Envelope. Immunity *50*, 1513-1529 e1519.

Seabright, G.E., Cottrell, C.A., van Gils, M.J., D'Addabbo, A., Harvey, D.J., Behrens, A.-J., Allen, J.D., Watanabe, Y., Scaringi, N., Polveroni, T.M.*, et al.* (2020). Networks of HIV-1 Envelope Glycans Maintain Antibody Epitopes in the Face of Glycan Additions and Deletions. Structure *28*, 897-909.e896.

Sok, D., van Gils, M.J., Pauthner, M., Julien, J.P., Saye-Francisco, K.L., Hsueh, J., Briney, B., Lee, J.H., Le, K.M., Lee, P.S.*, et al.* (2014). Recombinant HIV envelope trimer selects for quaternary-dependent antibodies targeting the trimer apex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *111*, 17624-17629.

Tay, M.Z., Liu, P., Williams, L.D., McRaven, M.D., Sawant, S., Gurley, T.C., Xu, T.T., Dennison, S.M., Liao, H.X., Chenine, A.L.*, et al.* (2016). Antibody-Mediated Internalization of Infectious HIV-1 Virions Differs among Antibody Isotypes and Subclasses. PLoS pathogens *12*, e1005817.

Tiller, T., Meffre, E., Yurasov, S., Tsuiji, M., Nussenzweig, M.C., and Wardemann, H. (2008). Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. Journal of immunological methods *329*, 112-124.

Tomaras, G.D., Ferrari, G., Shen, X., Alam, S.M., Liao, H.X., Pollara, J., Bonsignori, M., Moody, M.A., Fong, Y., Chen, X.*, et al.* (2013). Vaccine-induced plasma IgA specific for the C1 region of the HIV-1 envelope blocks binding and effector function of IgG. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *110*, 9019-9024.

Trkola, A., Purtscher, M., Muster, T., Ballaun, C., Buchacher, A., Sullivan, N., Srinivasan, K., Sodroski, J., Moore, J.P., and Katinger, H. (1996). Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. Journal of virology *70*, 1100-1108.

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 Harbor perspectives in biology *10*.

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

Wardemann, H., and Kofer, J. (2013). Expression Cloning of Human B Cell Immunoglobulins. *971*, 93-111.

Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J.W., Meffre, E., and Nussenzweig, M.C. (2003). Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. Science *301*, 1374-1377.

Wills, S., Hwang, K.K., Liu, P., Dennison, S.M., Tay, M.Z., Shen, X., Pollara, J., Lucas, J.T., Parks, R., Rerks-Ngarm, S.*, et al.* (2018). HIV-1-Specific IgA Monoclonal Antibodies from an HIV-1 Vaccinee Mediate Galactosylceramide Blocking and Phagocytosis. Journal of virology *92*.

Yang, X., Farzan, M., Wyatt, R., and Sodroski, J. (2000). Characterization of stable, soluble trimers containing complete ectodomains of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. Journal of virology *74*, 5716-5725.

Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., and Stamatakis, A. (2013). PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. Bioinformatics *30*, 614-620.

Figure Legends

Figure 1. Capture of broadly HIV-1 neutralizing IgG and IgA memory B-cell antibodies.

(A) Radar plots comparing the *in vitro* neutralizing activity of IgG (red) and IgA (blue) antibodies purified from elite neutralizers' sera against a 5 viruses panel.

(B) Table shows the *in vitro* neutralizing activity of purified serum IgG and IgA antibodies against two 12-viruses reference panels.

(C) ELISA graphs (left) and flow-cytometry plots (right) show the binding to BG505 SOSIP. 664 and YU2 foldon-type gp140 (gp140-F) trimers of purified serum IgG/IgA and IgG^+/IgA^+ memory B cells, respectively. OD_{405nm}, optical densities at 405 nm. Means ± SD of duplicate OD_{405nm} values are shown.

(D) Pie charts (left) showing the distribution of unique *vs* clonally expanded clones isolated by flow-cytometric single B-cell sorting (left). Colored slices indicate bNAb clonotypes for which dendrograms (left) show the relationship between clonally related IgH nucleotide sequences.

(E) ELISA graphs comparing the reactivity of the selected HIV-1 bNAbs to recombinant Env proteins. Means ± SD of duplicate OD_{405nm} values are shown.

(F) Heatmap showing the neutralization breadth and potencies of selected anti-gp160 IgG and IgA antibodies as measured in the TZM-bl assay. Grey cells indicate non-tested viruses with 7-319 only.

(G) Heatmap comparing the antibody reactivity to Env proteins and neutralizing potencies of 7-107/2-269 clonal variants.

(H) Neutralization coverage graph of 7-269 IgA bNAb against a panel of 56 viruses as measured in the TZM-bl assay. The *y* axis shows the cumulative frequency of IC_{50} values up to the concentration shown on the *x* axis. The radar plot (upper left corner) shows the frequency distribution of neutralized viruses according to HIV-1 clades.

(I) Coverage neutralization graph (left) comparing the breadth and potency of 7-269 IgA with 10-1074 and PGT121 IgG antibodies (historical data (Bouvin-Pley et al., 2014)) in the TZM-bl assay against a clade B-virus panel (n=38) covering 3 periods of the HIV-1 epidemic. Violin

plots (middle) show neutralization IC_{50} values for individual pseudotyped virus according to the periods of the epidemic. Pie charts (right) indicate the % of neutralized virus by 7-269 *per* period.

(J) Table presenting the immunoglobulin gene characteristics of the 3 bNAb clonotypes.

(K) Plots show divergence/identity analysis of pt7 IgG and IgA heavy chain sequences obtained by Ig-HTS from peripheral blood (B) and bone marrow (BM) mononuclear cells. IgH sequences filtered on bNAb-specific V-J rearrangements (total numbers are shown below the plots) are depicted as function of the identity to bNAb reference sequence (% bNAb-id) and of divergence to inferred germline sequence (% GL-id). Gate numbers indicate the % of bNAb-relative sequences.

(L) Divergence/identity plots showing the overlay of 7-176 and 7-269 sequences from pt7 blood and bone marrow IgA and IgG DNA libraries (left) as shown in (K). Phylogenic tree (right) shows the relationship between 7-269-clonally related IgH nucleotide sequences found by high-throughput sequencing in blood and bone marrow IgA-expressing cells (in dark and light blue, respectively), and the bone marrow IgG repertoire (in light red) as shown in (L, left), and by single B-cell gp160-capture (as shown in (D, blue)) used as reference sequences (in black). Only bone marrow 7-269-related sequences below the cut-off shown in (L, left, dotted line ≤ 4-nucleotide mutations) were included in the phylogenic analyses.

See also **Table S1**, and **Figure S1**, and **S2**.

Figure 2. *In vivo* neutralization and *in vitro* antiviral properties of 7-269 IgA bNAb.

(A) *In vivo* neutralization activity of human 7-269 bNAb in HIV-1 infected HIS mice. Graphs compare HIV-1 plasma viremia in ART-treated BRGSA2DR2 HIS mice receiving one single i.p. injection (0.5 mg) of 7-269 or mGO53 control IgA antibodies 24 h prior to ART interruption.

(B) Kaplan-Meyer analysis of the *in vivo* effect of 7-269 IgA on viral rebound (VR) following ART interruption. Groups were compared using Log-rank (Mantel-Cox) test**. (C)** Dot plots comparing the percent of transcytosis (top) and post-transcytosis infectivity (as RLU, Bottom)

of AD8 and CH058 virions alone (No Ab), in presence of non HIV-1 mGO53 control (Ctr), 7-157 and 7-269 IgA antibodies. Mean values of triplicate values from two independent experiments are shown. Antibody groups were compared to the No Ab group using Mann-Whitney test. *, $p<0.05$ **; $p<0.01$ ***; $p<0.001$.

(D) Heatmap comparing the percent of target cells infected by lab-adapted (AD8, YU2) and T/F (CH058, CH077, THRO) viruses, and bound by selected IgG antibodies ($IgG^{+}Gag^{+}$) as measured by flow cytometry.

(E) Binding of IgA bNAbs to HIV-1-infected cells. Flow cytometric histogram (top left) shows the reactivity of 7-269 IgA antibodies to Gag^{+} infected target cells. Heat map (bottom left) shows the same as in (D) but for IgA antibodies. Graphs (right) show antibody binding titrations to AD8- and CH058-infected cells as measured as % IgA^{+} among Gag^{+} cells by flow cytometry.

(F) ADDC potential of pt7 bNAbs expressed as IgG antibodies against AD8-infecetd target cells. Flow cytometric histogram (left) comparing the % of $FarRed^{+}Gag^{+}$ among infected CEM-NKR cells incubated with 7-269 IgG or non-HIV-1 isotype control (mGO53, IgG^{Ctr}) in presence of human NK cells or not. Histogram (right) comparing the % ADCC of AD8-infected targets incubated with selected IgG antibodies. PGT128 and mGO53 are positive and negative control, respectively. Dots correspond to means of %ADCC values measured in duplicate for each NK-isolated human donors (n=2).

Figure 3. Binding characteristics of co-existing IgG and IgA bNAbs.

(A) Heat map shows the ELISA binding of selected HIV-1 bNAbs to recombinant mutant, kifunensine-treated (gp120-KIN), V3 loop-deleted (gp120ΔV3) gp120 proteins. Color value is proportional to the reactivity level measured as % of binding compared to wild-type gp120.

(B) Representative ELISA graphs (top left) comparing the binding of selected antibodies from each identified bNAb clonotypes to wildtype (WT) and mutant proteins carrying sensitive substitutions. Means ± SD of duplicate OD_{405nm} values are shown. Ribbon diagram showing

the crystal structure of glycosylated gp120 subunit (grey; glycans in orange) (PDB ID 5T3Z), in which putative contacting glycans of prototypical bNAbs are colored in blue.

(C) Competition ELISA graphs (left) comparing the binding of selected biotinylated bNAbs (-bio) in presence of potential bNAb competitors. Means ± SD of duplicate OD_{405nm} values are shown. Heatmap (right) showing competition for gp120 binding of selected HIV-1 bNAbs. Lighter colors indicate stronger inhibition; dark blue indicates no competition.

(D) Binding of selected HIV-1 bNAbs to HEp2-expressing self-antigens as assayed by indirect immunofluorescence assay. Ctr+, positive control; Ctr- and ED38 are negative and low positive control antibodies, respectively. The scale bars represent 40 μM.

(E) Microarray plots showing the reactivity of selected HIV-1 bNAbs to human proteins. Each spot correspond to the z-scores given on a single protein by the reference (Ref: mGO53, y axis) and test antibody (x axis). Red dots indicate immunoreactive proteins (z > 5) presented in Table S3. Frequency histograms in the upper left corner show the log_{10} protein displacement (σ) of the MFI signals for HIV-1 bNAbs compared to non-reactive antibody mGO53. The polyreactivity index (PI) corresponds to the Gaussian mean of all array protein displacements.

(F) ELISA graphs comparing the binding to YU2 gp120 of the selected bNAbs, germline (GL) and mutated-germline hybrid counterparts. Means ± SD of triplicate OD_{405nm} values are shown (Representative of three independent experiments).

(G) *In vitro* neutralizing activity of mutated, germline and hybrid versions of 7-269 bNAb. Dot plot (left) comparing the IC_{50} values for the neutralization of clade B viruses (n=5) as determined in the TZM-bl assay. 10-1074 and 7-269 are positive controls. Neutralization graph (right) show the neutralizing activity of 7-269 and 7-269.IgH^{GL} against SC422661.8. Means ± SD of duplicate IC_{50} values are shown (Representative of three independent experiments).

See also **Table S2.**

Figure 4. Structural analyses of the BG505 SOSIP.664-7-269 IgA Fab complex.

(A) Side-view (left) and top-view (right) of the 2.9 Å single-particle cryo-EM reconstruction of the BG505 SOSIP.664-7-269-3BNC117 complex colored by components (dark gray, gp41; light gray, gp120; blue, 7-269 V_H; light-blue, 7-269 V_L; pink, 3BNC117 Fab; green, N-glycans).

(B) Fitting of different gp120-Fab complexes into the SOSIP-7-269-3BNC117 map showing that the binding site for 7-269 is different from that for previously described anti-glycan-V3 bNAbs. As a reference, the N332 glycan is indicated in green. The PDB codes used were: 5CEZ (PGT121, orange); 5T3Z (10-1074, violet); 6CH7 (BG18, yellow).

(C) Fitting of a 2G12-gp120 protomer (PDB: 6OZC) into the SOSIP-7-269-3BNC117 map highlighting the epitope superimposition between 2G12 (wheat) and 7-269.

(D) Structural model of a SOSIP-7-269 protomer from a front (left) and back (right) view. The N-glycans in contact with the antibody are indicated and highlighted using different shades of green with a coloring scheme that is maintained in all the panels of this figure.

(E) Surface representation of the SOSIP trimer, with the 7-269 epitope highlighted in blue.

(F) Structure of the 7-269 variable region showing the paratope residues as spheres. The side chains in contact with N-glycans are colored according to the scheme in (D), while those in contact with the gp120 protein are indicated in white, and the residue in contact with glycans and gp120 is highlighted in red. Three different views of the antibody are presented to highlight the residues contacting the N332-glycan and the N295-glycan cluster on opposite faces of 7-269.

(G-I) Stick representation of residues forming potential hydrogen bonds (dashed lines) with N295 (G), N332 (H) and N441 (I) glycans.

(J) Stick representation of residues forming Van der Waals interactions between 7-269 and the gp120 protein moiety. Sticks also represent the disulfide bond between C105 and C110 in the CDRH3. For a better clarity, the glycans were not included in this panel.

(K) Structural superimposition of the variable region of different anti-glycan-V3 bNAbs showing the structural differences in CDR_H3 conformations. The PDB codes and colors are as in (B).

(L) Superimposition of 7-269 and CAP256-VR26.03, the only other anti-HIV bNAbs with an intra-CDRH3 disulfide bond (yellow).

(M) ELISA graphs comparing the Env binding of 7-269 and associated CDR_H3 cysteine mutant antibodies. Means ± SD of duplicate OD_{405nm} values are shown (Representative of two independent experiments).

(N) Heatmap comparing the neutralizing activity of of 7-269 and associated CDR_H3 cysteine mutant antibodies as measured in the TZM-bl assay. Representative data of two independent experiments are shown. <, IC_{50} below the depicted value.

Figure 5. Cryo-EM structures of 7-155 and 7-176 in complex with BG505 SOSIP.664 trimer. (A-B) Side-view (top) and top-view (bottom) of the 6.5 Å and 7.0 Å single-particle cryo-EM reconstructions of the BG505 SOSIP.664 Env complexed with the 7-155 Fab (A) and the 7-176 Fab (B). The structure of the SOSIP obtained previously was fitted in the map, along with models of the antibodies to color the different regions.

(C) Overlay of the reconstructions obtained with each of the 3 bNAbs showing the overlap between their respective binding sites. For comparison reasons, the data for the SOSIP-7-269-3BNC117 complexed was reprocessed with a resolution of 7 Å.

(D-E) Homology model of 7-155 (D) and 7-176 (E) variable regions fitted into their respective single-particle reconstructions suggest which glycans are potentially contacted by each antibody. The glycosylated SOSIP model fitted was obtained from the high-resolution structure with 7-269 and some mannose residues were trimmed to avoid clashes with the modelled antibody.

Figure 1

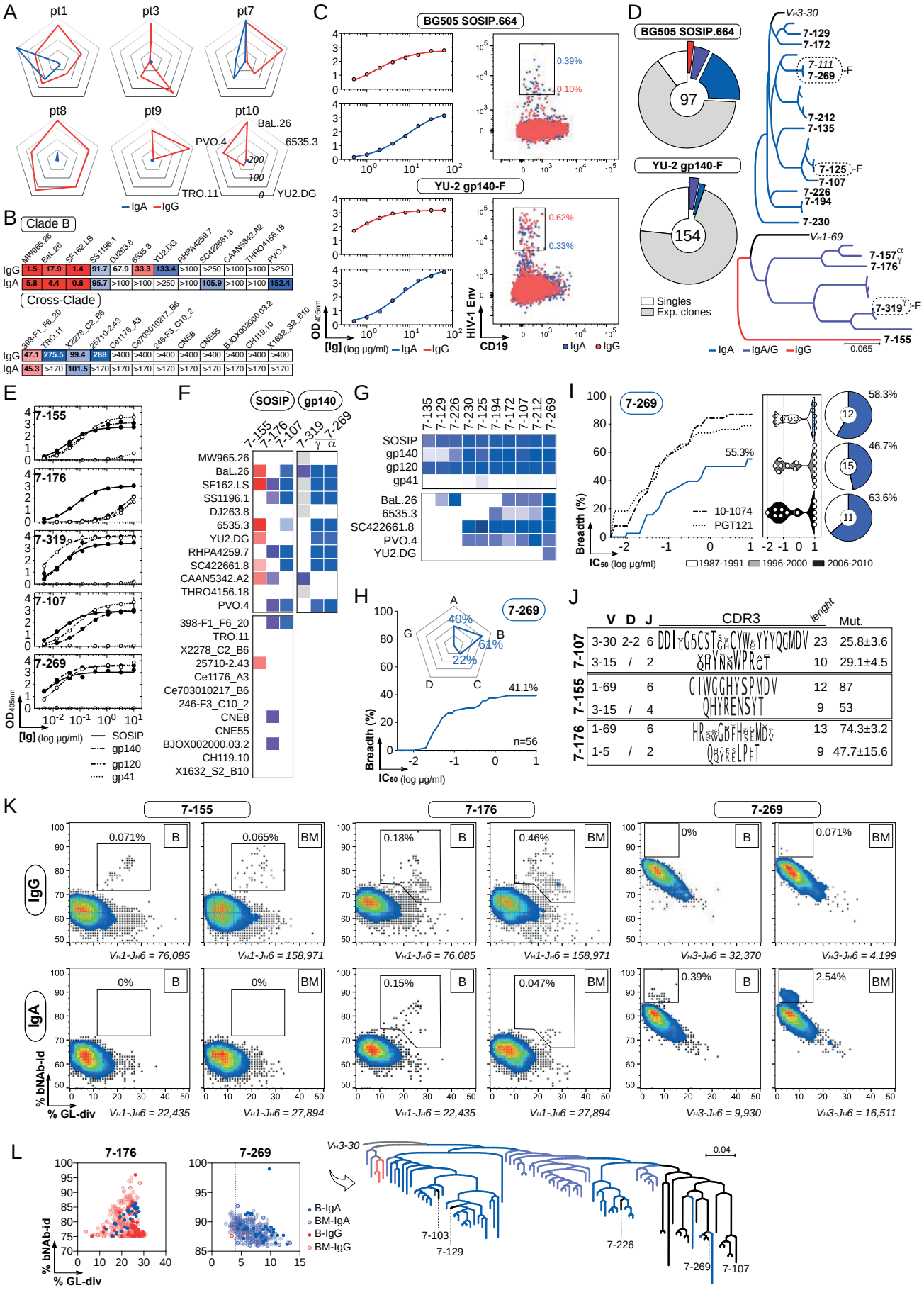

A
pt1
pt3
pt7
pt8
pt9
pt10
BaL.26
PVO.4
6535.3
TRO.11
YU2.DG
IgA
IgG
B
Clade B
Cross-Clade
C
BG505 SOSIP.664
YU-2 gp140-F
0.39%
0.10%
0.62%
0.33%
[Ig] (log µg/ml)
HIV-1 Env
CD19
D
BG505 SOSIP.664
YU-2 gp140-F
97
154
Singles
Exp. clones
VH3-30
7-129
7-172
7-111
7-269
7-212
7-135
7-125
7-107
7-226
7-194
7-230
VH1-69
7-157
7-176
7-319
7-155
0.065
E
7-155
7-176
7-319
7-107
7-269
SOSIP
gp140
gp120
gp41
F
SOSIP
gp140
G
SOSIP
gp140
gp120
gp41
H
7-269
40%
61%
22%
41.1%
n=56
Breadth (%)
I
7-269
55.3%
10-1074
PGT121
58.3%
46.7%
63.6%
1987-1991
1996-2000
2006-2010
J
V D J CDR3 lenght Mut.
7-107
3-30 2-2 6 12 25.8±3.6
3-15 / 2 10 29.1±4.5
7-155
1-69 6 12 87
3-15 / 4 9 53
7-176
1-69 6 13 74.3±3.2
1-5 / 2 9 47.7±15.6
K
7-155
7-176
7-269
IgG
IgA
0.071%
0.065%
0.18%
0.46%
0%
0.071%
0%
0%
0.15%
0.047%
0.39%
2.54%
VH1-JH6 = 76,085
VH1-JH6 = 158,971
VH1-JH6 = 76,085
VH1-JH6 = 158,971
VH3-JH6 = 32,370
VH3-JH6 = 4,199
VH1-JH6 = 22,435
VH1-JH6 = 27,894
VH1-JH6 = 22,435
VH1-JH6 = 27,894
VH3-JH6 = 9,930
VH3-JH6 = 16,511
% bNAb-id
% GL-div
L
7-176
7-269
B-IgA
BM-IgA
B-IgG
BM-IgG
VH3-30
0.04
7-103
7-129
7-226
7-269
7-107

Figure 2

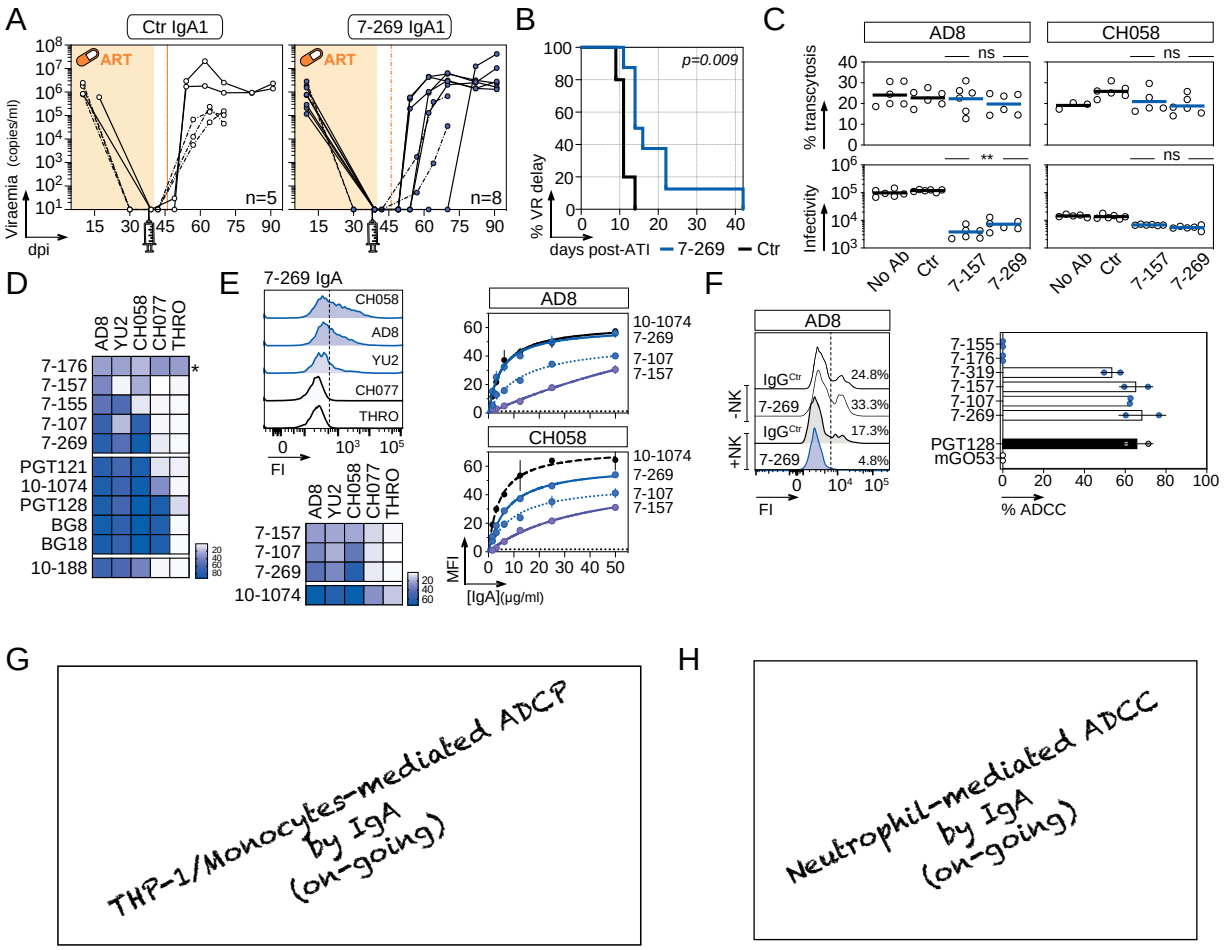

A
Ctr IgA1
7-269 IgA1
ART
Viraemia (copies/ml)
dpi
n=5
n=8
B
p=0.009
% VR delay
days post-ATI
7-269
Ctr
C
AD8
CH058
ns
**
% transcytosis
Infectivity
No Ab
Ctr
7-157
7-269
D
AD8
YU2
CH058
CH077
THRO
7-176
7-157
7-155
7-107
7-269
PGT121
10-1074
PGT128
BG8
BG18
10-188
E
7-269 IgA
FI
MFI
[IgA](µg/ml)
10-1074
7-269
7-107
7-157
F
-NK
+NK
IgGCtr
24.8%
33.3%
17.3%
4.8%
7-155
7-176
7-319
7-157
7-107
7-269
PGT128
mGO53
% ADCC
G
THP-1/Monocytes-mediated ADCP
by IgA
(on-going)
H
Neutrophil-mediated ADCC
by IgA
(on-going)

Figure 3

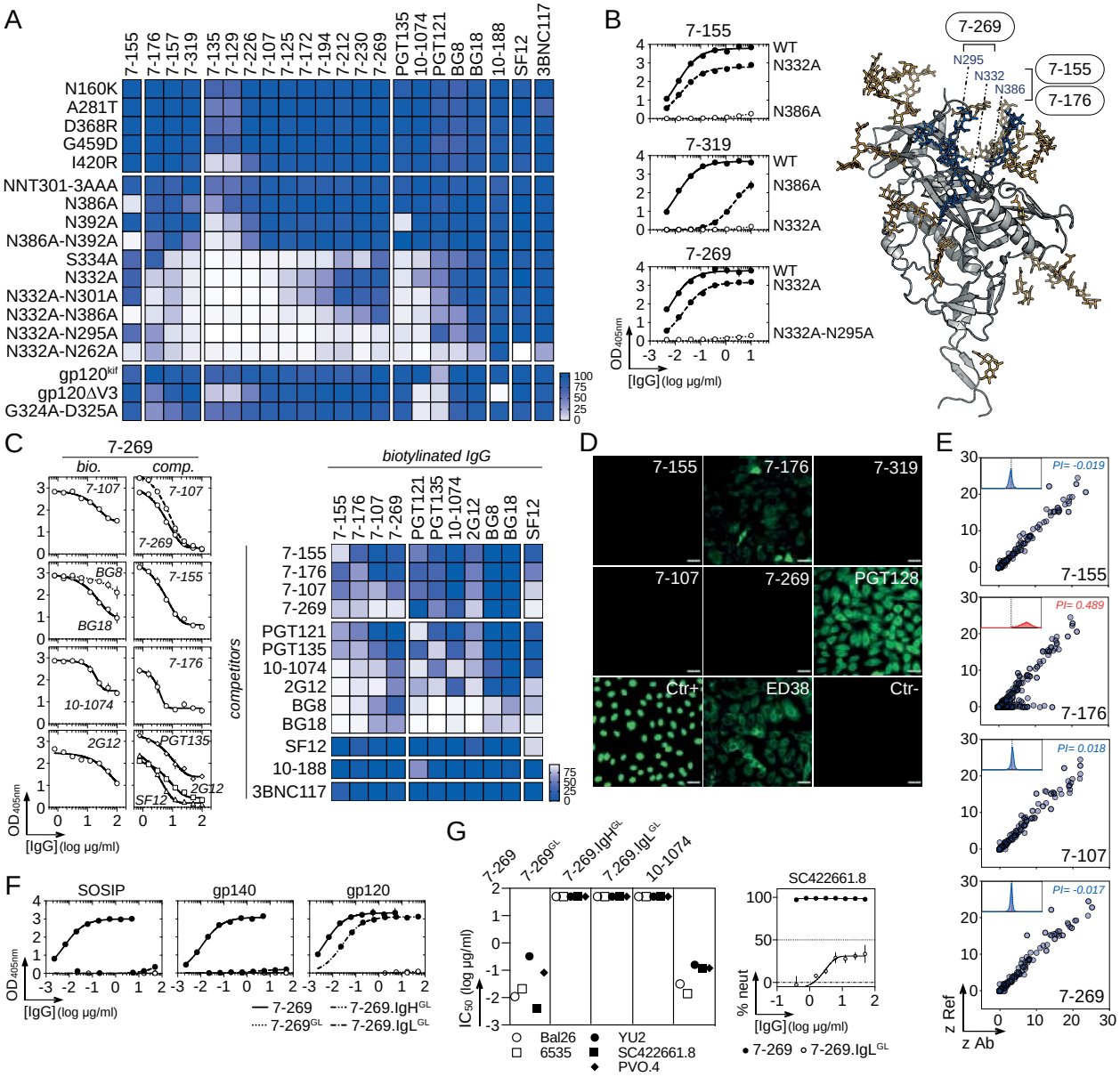

A
7-155
7-176
7-157
7-319
7-135
7-129
7-226
7-107
7-125
7-172
7-194
7-212
7-230
7-269
PGT135
10-1074
PGT121
BG8
BG18
10-188
SF12
3BNC117
N160K
A281T
D368R
G459D
I420R
NNT301-3AAA
N386A
N392A
N386A-N392A
S334A
N332A
N332A-N301A
N332A-N386A
N332A-N295A
N332A-N262A
gp120kif
gp120ΔV3
G324A-D325A
100
75
50
25
0
B
7-155
WT
N332A
N386A
7-319
WT
N386A
N332A
7-269
WT
N332A
N332A-N295A
OD405nm
[IgG] (log µg/ml)
7-269
N295
N332
N386
7-155
7-176
C
7-269
bio.
comp.
7-107
7-269
BG8
BG18
7-155
7-176
10-1074
2G12
PGT135
SF12
OD405nm
[IgG] (log µg/ml)
biotylinated IgG
7-155
7-176
7-107
7-269
PGT121
PGT135
10-1074
2G12
BG8
BG18
SF12
competitors
7-155
7-176
7-107
7-269
PGT121
PGT135
10-1074
2G12
BG8
BG18
SF12
10-188
3BNC117
75
50
25
0
D
7-155
7-176
7-319
7-107
7-269
PGT128
Ctr+
ED38
Ctr-
E
PI= -0.019
7-155
PI= 0.489
7-176
PI= 0.018
7-107
PI= -0.017
7-269
z Ref
z Ab
F
SOSIP
gp140
gp120
OD405nm
[IgG] (log µg/ml)
7-269
7-269GL
7-269.IgHGL
7-269.IgLGL
G
7-269
7-269GL
7-269.IgHGL
7-269.IgLGL
10-1074
IC50 (log µg/ml)
Bal26
6535
YU2
SC422661.8
PVO.4
SC422661.8
% neut
[IgG] (log µg/ml)
7-269
7-269.IgLGL

Figure 4

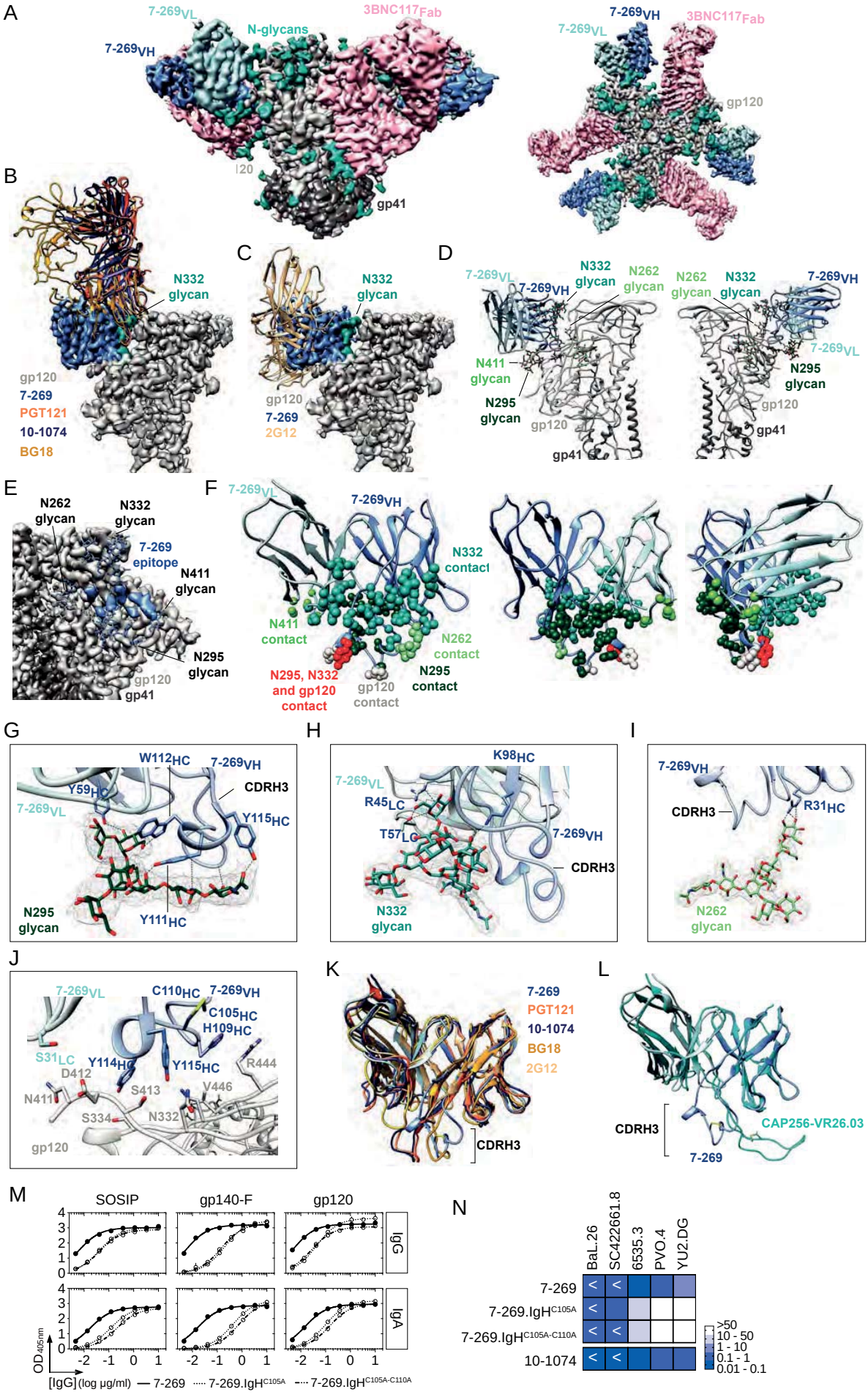
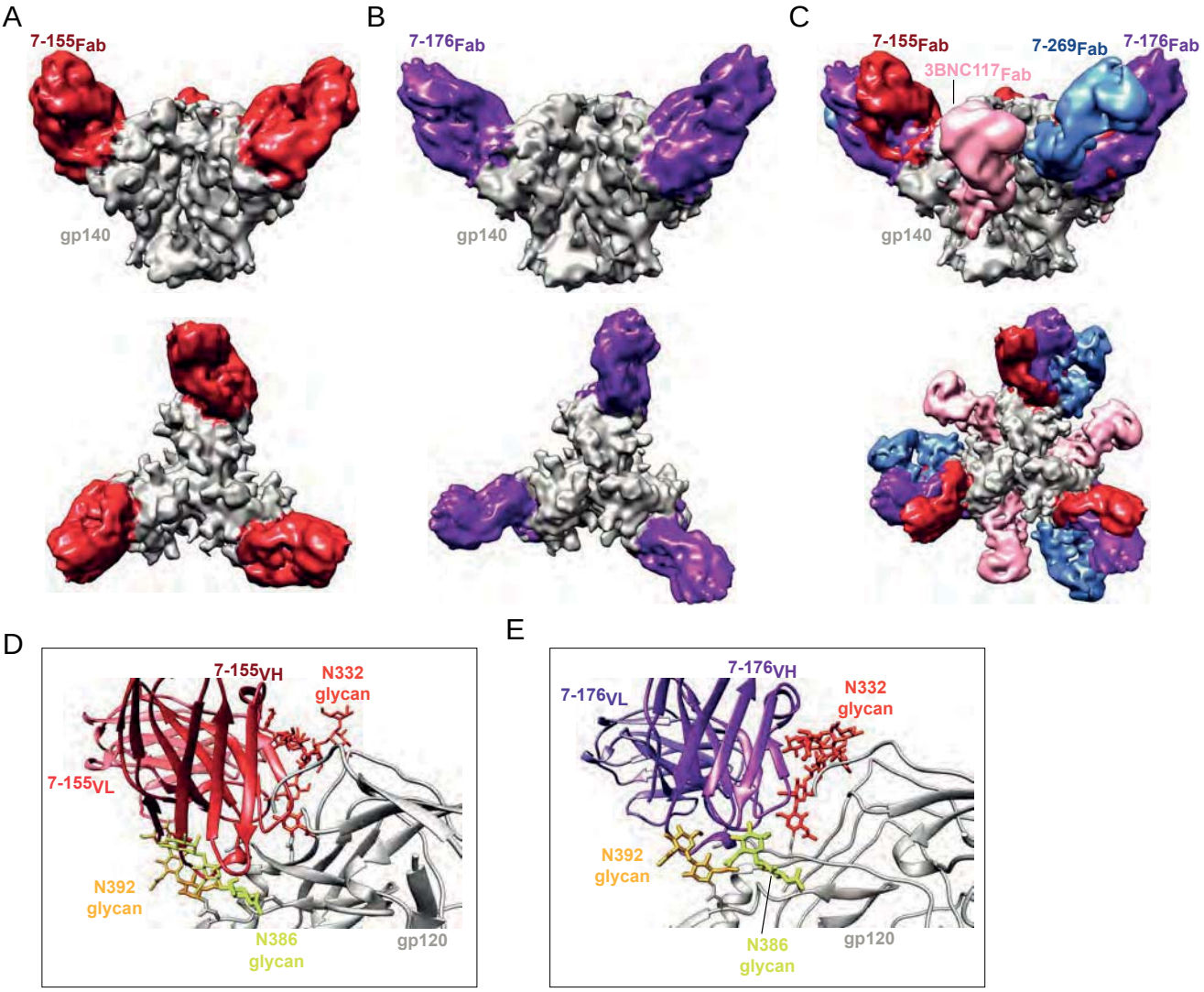

A
7-269VL
3BNC117Fab
N-glycans
7-269VH
gp120
gp41
7-269VH
3BNC117Fab
7-269VL
gp120
B
N332 glycan
gp120
7-269
PGT121
10-1074
BG18
C
N332 glycan
gp120
7-269
2G12
D
7-269VL
7-269VH
N332 glycan
N262 glycan
N411 glycan
N295 glycan
gp120
gp41
N262 glycan
N332 glycan
7-269VH
7-269VL
N295 glycan
gp120
gp41
E
N262 glycan
N332 glycan
7-269 epitope
N411 glycan
N295 glycan
gp120
gp41
F
7-269VL
7-269VH
N332 contact
N411 contact
N262 contact
N295, N332 and gp120 contact
gp120 contact
N295 contact
G
W112HC
7-269VH
CDRH3
Y59HC
7-269VL
Y115HC
N295 glycan
Y111HC
H
K98HC
7-269VL
R45LC
T57LC
7-269VH
CDRH3
N332 glycan
I
7-269VH
CDRH3
R31HC
N262 glycan
J
7-269VL
C110HC
7-269VH
C105HC
H109HC
S31LC
Y114HC
Y115HC
R444
D412
S413
V446
N411
S334
N332
gp120
K
7-269
PGT121
10-1074
BG18
2G12
CDRH3
L
CDRH3
CAP256-VR26.03
7-269
M
SOSIP
gp140-F
gp120
IgG
IgA
OD405nm
[IgG] (log µg/ml)
7-269
7-269.IgHC105A
7-269.IgHC105A-C110A
N
BaL.26
SC422661.8
6535.3
PVO.4
YU2.DG
7-269
7-269.IgHC105A
7-269.IgHC105A-C110A
10-1074
>50
10 - 50
1 - 10
0.1 - 1
0.01 - 0.1

Figure 5


A
7-155Fab
gp140
B
7-176Fab
gp140
C
7-155Fab
7-269Fab
7-176Fab
3BNC117Fab
gp140
D
7-155VH
N332 glycan
7-155VL
N392 glycan
N386 glycan
gp120
E
7-176VH
7-176VL
N332 glycan
N392 glycan
N386 glycan
gp120

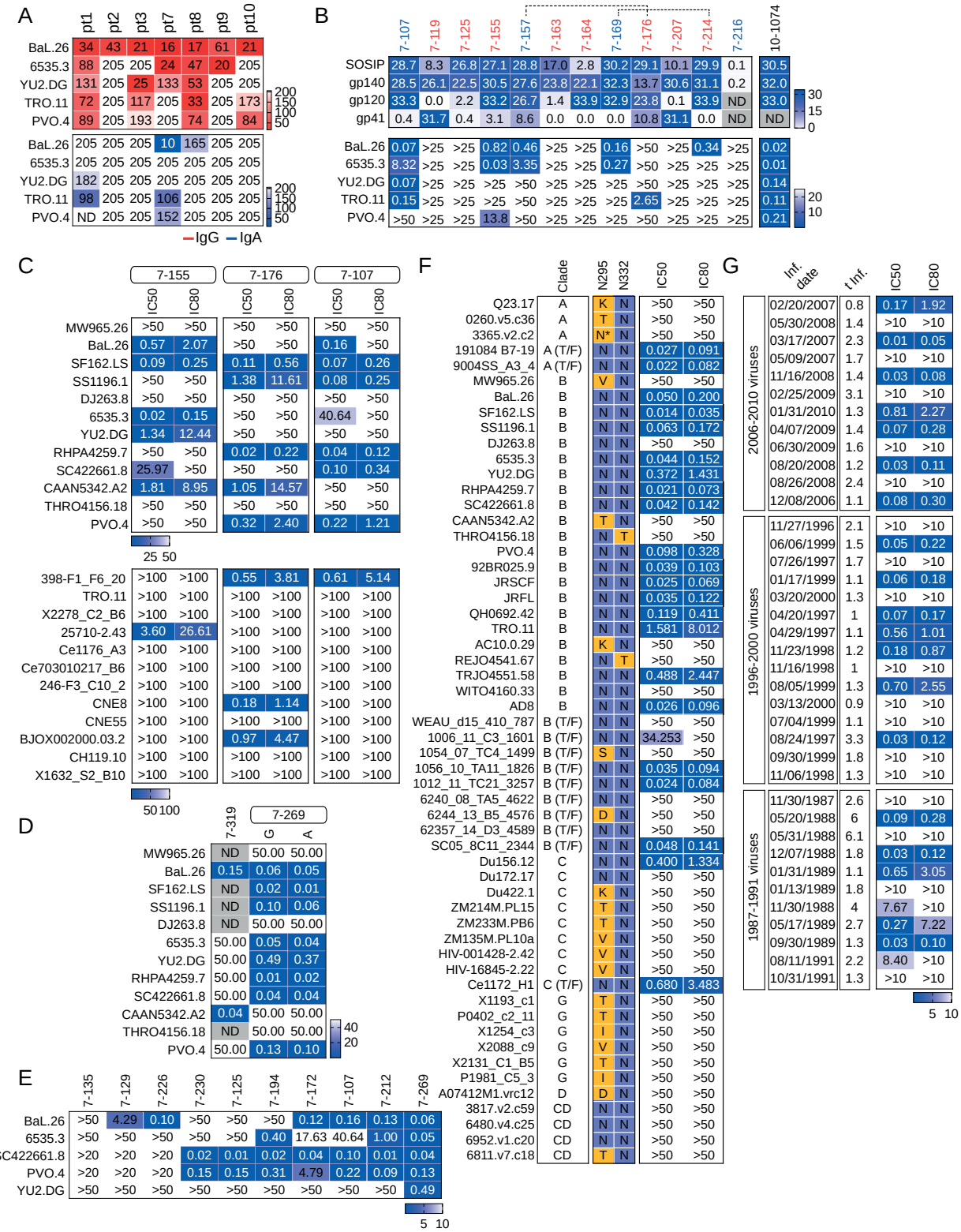


Figure S1. HIV-1 neutralization by pt7 serum and monoclonal antibodies. Related to Figure 1. (A) Table shows the neutralizing activity of IgGs and IgAs purified from pt7's serum against selected clade B viruses (n=5). IC_{50} values (μg/ml) are indicated in the cells center. Darker colors indicate higher potency; white, no neutralization. **(B)** Tables comparing the ELISA binding to HIV-1 Env proteins (top), and neutralizing activity against selected clade B viruses (n=5, bottom) of monoclonal antibodies cloned from pt7 blood IgG^+ (red) and IgA^+ (blue) memory B cells. Darker colors indicate higher Env-reactivity or neutralization potency; white, no binding or neutralization. ELISA AUC and IC_{50} values (μg/ml) are indicated in the cells center. Dotted links indicate clonally-related members. 10-1074 is the positive control. **(C)** Table shows the neutralizing activity of selected antibodies produced as recombinant IgGs against 12-viruses reference panels. IC_{50} and IC_{80} values (μg/ml) are indicated in the the cells center. Darker colors indicate higher potency; while, no neutralization. **(D)** Same as (C) but for clade B viruses only, and 7-319 IgG, 7-107 IgG and IgA antibodies. IC_{50} values (μg/ml) are shown. **(E)** Same as (A) but for 7-107 clonal variants expressed as IgGs. **(F)** Same as (C) but for 7-269 IgA against a cross-clade extended panel (n=56). For each viral strain, amino acids at PNGS N295 and N332 are indicated. **(F)** Same as (E) but with clade B viruses from 3 epidemic periods.

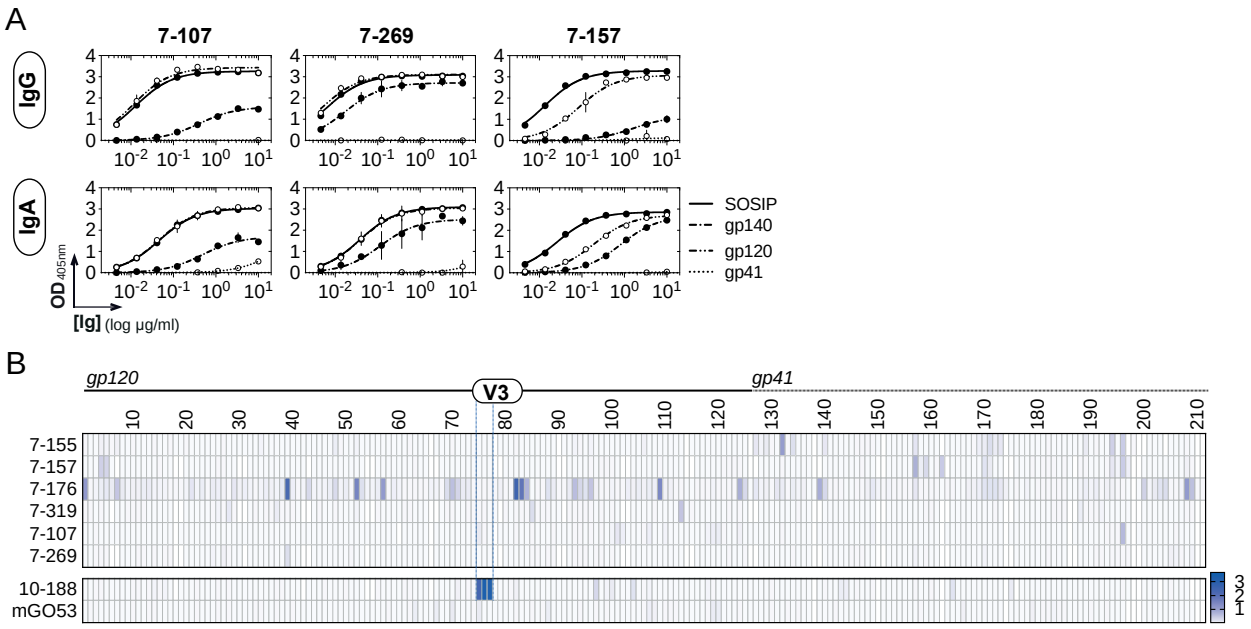


Figure S2. Antibody reactivity profiles of pt7 bNAbs. Related to Figures 1 and 3. (A) ELISA binding analysis comparing the reactivity of pt7 bNAbs expressed as IgG and IgA against HIV-1 Env proteins. Means ± SD of duplicate OD values are shown. **(B)** Heatmap showing the ELISA binding analysis of selected pt7 bNAbs against consensus subtype B overlapping Env peptides. Darker colors indicate higher reactivity (OD values); white, no binding. Non-HIV-1 mGO53 and anti-V3^{crown} 10-188 antibody are negative and positive control, respectively.

Table S1. Immunoglobulin gene repertoire and reactivity of Env-captured human memory B-cell antibodies from pt7. Related to Figure 1.

		IgH											IgL								
						CDRH3				SHM					CDRH3				SHM		
Sorting Bait	mAb #	VH	DH	JH	Subtype	SEQ.	Length	(+)	(-)	GRAVY	n	%	Indel	Vk	Jk	SEQ.	Length	(+)	(-)	GRAVY	n	%	Epitope on
SOSIP	**7-163**	1-24	3-10	6	IGHG1*03	DLLSQKFGELVAGMDV	16	1	3	0,43	42	14,3	/	3-11	4	QQRGIWPLSLT	11	1	0	-0,35	11	4,53	**gp140**
SOSIP	7-154	1-24	3-10	6	IGHG1*03	DLLSQKFGELVAGMDV	16	1	3	0,43	42	14,3	/	3-11	4	QQRGIWPLSLT	11	1	0	-0,35	10	4,12	
gp140F	7-295	1-24	3-10	6	IGHG1*03	DLLSQKFGELVAGMDV	16	1	3	0,43	41	12,0	/	3-11	4	QQRGIWPLSLT	11	1	0	-0,35	16	5,86	
gp140F	7-263	1-24	3-10	6	IGHG1*03	DLLSQKFGELVAGMDV	16	1	3	0,43	38	11,1	/	3-11	4	QQRGIWPLSLT	11	1	0	-0,35	12	4,35	
gp140F	7-246	1-24	3-10	6	IGHG1*03	DLLSQKFGELVAGMDV	16	1	3	0,43	42	12,3	/	3-11	4	QQRGIWPLSLT	11	1	0	-0,35	9	3,26	
gp140F	7-240	1-24	3-10	6	IGHG1*03	DLLSQKFGELVAGMDV	16	1	3	0,43	42	12,3	/	3-11	4	QQRGIWPLSLT	11	1	0	-0,35	10	3,62	
gp140F	7-216	1-24	3-10	6	IGHG1*03	DLLSQKFGELVAGMDV	16	1	3	0,43	40	11,7	/	3-11	4	QQRGIWPLSLT	11	1	0	-0,35	10	3,62	
gp140F	7-175	1-24	3-10	6	IGHG1*03	DLLSQKFGELVAGMDV	16	1	3	0,43	46	13,5	/	3-11	4	QQRGIWPLSLT	11	1	0	-0,35	12	4,35	
gp140F	7-158	1-24	3-10	6	IGHG3*04	DLLSQKFGELVAGMDV	16	1	3	0,43	40	11,7	/	3-11	4	QQRGIWPLSLT	11	1	0	-0,35	10	3,62	
gp140F	7-167	1-24	3-10	6	IGHG1*03	DLLSQKFGELVGGMDV	16	1	3	0,29	41	12,0	/	3-11	4	QQRGIWPLSLT	11	1	0	-0,35	11	3,99	
SOSIP	7-145	1-24	3-10	6	IGHG1*03	DLLSQTFGELVAGMDV	16	0	3	0,63	41	13,9	/	3-11	4	QQRGIWPLSLT	11	1	0	-0,35	13	5,22	
gp140F	7-153	1-24	3-10	6	IGHG3*19	DLLSQTFGELVAGMDV	16	0	3	0,63	41	12,0	/	3-11	4	QQRGIWPLSLT	11	1	0	-0,35	10	3,62	
SOSIP	7-240	1-24	3-10	6	IGHG1*03	DLLTQKFGELVGGMDV	16	1	3	0,29	26	8,8	/	3-11	4	QQRSIWPPSLT	11	1	0	-0,87	11	4,53	
SOSIP	7-111	1-24	3-10	6	IGHG1*03	DLLTQKFGELVGGMDV	16	1	3	0,29	27	8,9	/	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	
SOSIP	7-108	1-24	3-10	6	IGHG1*03	DLLTQKFGELVGGMDV	16	1	3	0,29	27	9,2	/	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	
gp140F	7-205	1-24	3-10	6	IGHG1*03	DLLTQKFGELVGGMDV	16	1	3	0,29	26	7,7	/	3-11	4	QQRSIWPPSLT	11	1	0	-0,87	9	3,26	
gp140F	7-322	1-24	3-10	6	IGHG1*03	DLLTQKFGELVGGMDV	16	1	3	0,29	27	7,9	/	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	
gp140F	7-202	1-46	2-15/2-21	6	IGHA1*01	DDLLTKVAAPDADYYYYGMDV	21	1	5	-0,29	34	9,6	/	3-15	5	QQYDDWLVT	9	0	2	-0,99	12	4,44	
SOSIP	7-156	1-46	3-10	6	IGHG1*03	DGLLSKVATDDADYYYYGMDV	21	1	5	-0,35	40	13,6	/	3-15	5	QQYTDWLVT	9	0	1	-0,68	20	8,23	
gp140F	7-217	1-46	3-10	6	IGHG1*03	DGLLSKVATHDADYYYYGMDV	21	2	4	-0,34	47	13,2	/	3-15	5	QQYSDWLVT	9	0	1	-0,69	15	5,62	
SOSIP	**7-214**	1-46	7-27	6	IGHG1*03	DGLLSKVETPDGDYLYYGMDV	21	1	5	-0,38	53	18,0	/	3-15	5	QQYTDWLVT	9	0	1	-0,68	14	5,76	**gp120**
SOSIP	7-136	1-46	4-17	6	IGHG1*03	DGLLSTVTTPDADYQYYGMDV	21	0	4	-0,33	62	21,1	/	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	
gp140F	7-304	1-46	4-4/4-11/4-23	6	IGHG1*03	EGLLSTATTPDADYLYHGMDV	21	1	4	-0,19	48	13,4	/	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	
SOSIP	7-202	1-46	1-1/1-14/1-20	6	IGHG4*04	EGLLSTATTPDADYYYHGMDV	21	1	4	-0,43	52	17,7	/	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	
SOSIP	7-193	1-46	2-2	6	IGHG1*03	ESLLSTATTPDADLFYFAMDV	21	0	4	0,18	61	20,7	/	3-15	5	QQYSDWQVT	9	0	1	-1,50	40	16,5	
gp140F	7-228	1-46	1-1/1-14/1-20	6	IGHG1*03	ESLLSTATTPDADLYFYGMDV	21	0	4	0,08	63	17,6	/	3-15	5	QQYNDWLVT	9	0	1	-0,99	37	13,9	
gp140F	7-134	1-46	5-5/5-18/3-10	6	IGHA1*01	ESLLSTGTTPDADLFYFGMNV	21	0	3	-0,03	62	17,5	/	3-15	5	QQYSDWLVT	9	0	1	-0,69	44	16,3	
SOSIP	7-203	1-46	3-10	6	IGHA1*01	ESLLSTGTTPDADLYYYGMNV	21	0	3	-0,22	64	21,3	/	3-15	5	QQYSDWLVT	9	0	1	-0,69	44	18,3	
SOSIP	**7-169**	1-46	3-10	6	IGHA1*01	ESLLSTGTTPDADLYYYGMNV	21	0	3	-0,22	64	21,3	/	3-15	5	QQYSDWLVT	9	0	1	-0,69	45	18,5	**gp120**
SOSIP	7-106	1-46	3-10	6	IGHA1*01	ESLLSTGTTPDADLYYYGMNV	21	0	3	-0,22	64	21,3	/	3-15	5	QQYSDWLVT	9	0	1	-0,69	45	18,5	
gp140F	7-203	1-46	3-10	6	IGHA1*01	ESLLSTGTTPDADLYYYGMNV	21	0	3	-0,22	62	17,5	/	3-15	5	QQYSDWLVT	9	0	1	-0,69	44	16,3	
gp140F	7-222	1-46	3-10/4-17	6	IGHG1*03	EGLLSTVTTPDADYQYYGMDV	21	0	4	-0,33	63	17,6	/	3-15	5	QQYTDWLVT	9	0	1	-0,68	37	13,7	
gp140F	7-131	1-46	4-17	6	IGHG1*03	EGLLSTVTTPDADYQYYAMDV	21	0	4	-0,23	63	17,6	/	3-15	5	QQYTDWLVT	9	0	1	-0,68	35	13	
SOSIP	**7-207**	1-69	1-14	1	IGHG1*03	SQCSRTTCLREEFFEV	16	2	3	-0,46	47	16,0	/	1-27	4	QKYDSAPLT	9	1	1	-1,08	24	9,88	**gp41**
SOSIP							0	0	0				/	1-27	4	QKYDSAPLT	9	1	1	-1,08	26	10,7	
SOSIP	7-241	1-69	6-19/6-13	6	IGHG1*03	AALGRRSTWYSGWDFYAMDV	20	2	2	-0,27	31	10,3	/	3-20	2	QQYGTSPLYT	10	0	0	-1,00	18	7,32	
SOSIP	**7-164**	1-69	6-19/6-13/7-27	6	IGHG1*03	APLGRRPTWYEGWDFFGMDV	20	2	3	-0,52	38	12,9	/	3-20	2	QQYAQSPLYT	10	0	0	-1,06	21	8,54	**gp120**
gp140F	7-276	1-69	3-9	1	IGHA1*01	DGFSSSSARYFLH	13	2	1	-0,38	50	15,9	/	1D-12/1-12	4	QQGNTFPLT	9	0	0	-0,81	33	12,6	
SOSIP	7-134	1-69	5-5/5-18/3-9	1	IGHG1*03	DGYSSSSARYLHH	13	3	1	-1,15	50	18,1	/	1D-12/1-12	4	QQGNTFPLT	9	0	0	-0,81	35	15	
gp140F	7-117	1-69	5-5/5-18/3-9	1	IGHG1*03	DGYSSSSARYLLH	13	2	1	-0,62	53	16,8	/	1D-12/1-12	4	QQGNTFPLT	9	0	0	-0,81	36	13,8	
SOSIP	**7-125**	1-69	5-5/5-18	1	IGHG1*03	DGYSSSSGRYFLH	13	2	1	-0,86	52	18,8	/	1D-12/1-12	4	QQAKTFPLT	9	1	0	-0,61	32	12,9	**gp140**
SOSIP	7-138	1-69	2-8/5-24	6	IGHG1*03	GVLERASNWWEGYNFYGLDV	20	1	3	-0,39	51	17,3	/	3-20	1	QHYGTSPLWT	10	1	0	-0,93	21	8,54	
SOSIP	**7-119**	1-69	2-8/5-24	6	IGHG1*03	GVLERASNWWEGYNFYGLDV	20	1	3	-0,39	55	18,6	/	3-20	1	QHYGTSPLWT	10	1	0	-0,93	22	8,94	**gp41**
SOSIP	7-216	4-39	3-10	5/4	IGHA1*01	HDVYYDYWSRSYSTLGFES	19	2	3	-0,94	49	16,5	/	4-1	1	QQYYGSHGGT	10	1	0	-1,55	40	15,2	neg.
SOSIP	7-218	4-39	3-10	5/4	IGHA1*01	HDVYYDYWSRSYSTLGFES	19	2	3	-0,94	49	16,5	/	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	
SOSIP	7-249	1-69		6	IGHG1*03	HRDKGDFHHGMDV	13	5	3	-1,57	74	24,9	1*	3-15	4	QHYESLPFT	9	1	1	-0,89	nd	nd	
SOSIP	**7-176**	1-69	3-10/4-11	6	IGHG1*03	HRDMGDYHHGMDV	13	4	3	-1,44	77	25,9	1*	3-15	4	QHYESLPFT	9	1	1	-0,89	50	17,6	**gp120**
SOSIP	**7-157**	1-69		6	IGHA1*01	HRDRGDFHHGMDV	13	5	3	-1,62	78	27,3	1*	3-15	4	QHYESLPFT	9	1	1	-0,89	62	22,4	**gp120**
SOSIP	7-142	1-69	6-13/7-27	6	IGHG1*03	HRSWGNFHSEMDV	13	3	2	-1,18	71	23,9	1*	3-15	4	QQYKELPLT	9	1	1	-1,16	*nd*	*nd*	
gp140F	**7-319**	1-69	6-13/7-27	6	IGHG1*03	HRSWGNFHSEMDV	13	3	2	-1,18	71	23,9	1*	3-15	4	QQYKELPLT	9	1	1	-1,16	31	11,3	**gp120**
SOSIP	7-152	1-69	5-5/5-18/1-26	6	IGHG1*03	HRVWGDFHSEMDL	13	3	3	-0,83	73	24,6	1*	3-15	4	QQFKELPFT	9	1	1	-0,81	*nd*	*nd*	
gp140F	7-252	1-69	5-5/5-18/1-26	6	IGHG1*03	HRVWGDFHSEMDL	13	3	3	-0,83	72	24,2	1*	3-15	4	QQFKELPFT	9	1	1	-0,81	*nd*	*nd*	
gp140F	7-282	1-69	5-5/5-18/1-26	6	IGHG1*03	HRVWGDFHSEMDL	13	3	3	-0,83	73	24,6	1*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	
gp140F	7-143	1-69	5-24	3	IGHG1*03	HRARGDFHTEMVD	13	4	3	-1,25	80	26,9	1*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	
SOSIP	**7-155**	1-69	2-21	6	IGHG1*03	GIWGGHYSPMDV	12	1	1	-0,16	87	29,5	/	1-5	2	QHYRENSYT	9	2	1	-2,48	53	19,3	**gp120**
SOSIP	7-226	3-30	2-2	6	IGHA1*01	DDIFGDCSTGNCYWFYYYQGMDV	23	0	4	-0,37	23	7,8	/	3-15	2	YHYSNWPRGG	10	2	0	-1,79	30	10,6	**gp120**
SOSIP	7-103	3-30	2-2	6	IGHA2*03	DDIFGDCSTSHCYWLYYYQGMDV	23	1	4	-0,33	18	6,1	/	3-15	2	YHYNNWPRGT	10	2	0	-2,09	*nd*	*nd*	
SOSIP	7-129	3-30	2-2	6	IGHA1*01	DDIFGDCSTSHCYWLYYYQGMDV	23	1	4	-0,33	23	7,8	/	3-15	2	QHYNSWPRAT	10	2	0	-1,82	26	9,2	**gp120**
SOSIP	7-190	3-30	2-2	6	IGHA1*01	DDIFGDCSTSHCYWLYYYQGMDV	23	1	4	-0,33	21	7,1	/	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	
SOSIP	7-230	3-30	2-2	6	IGHA1*01	DDILGDCATGSCYGGSYCQAMDV	23	0	4	0,07	28	9,5	/	3-15	2	QQYTTWPRGS	10	0	0		39	13,7	**gp120**
SOSIP	7-135	3-30	2-2	6	IGHA1*01	DDILGDCSTGFCYWGYYYQGMDV	23	0	4	-0,20	24	8,1	/	3-15	2	QQYNNWPRGT	10	1	0	-2,34	23	8,1	**gp120**
SOSIP	7-172	3-30	2-2	6	IGHA1*01	DDILGDCSTGHCYWGYYYQGMDV	23	1	4	-0,46	19	6,4	/	3-15	2	YHYNNWPRGG	10	2	0	-2,06	28	9,9	**gp120**
gp140F	7-111	3-30	2-2	6	IGHA1*01	DDILGDCSTSHCYWGYYYQGMDV	23	1	4	-0,47	27	9,1	/	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	
gp140F	7-269	3-30	2-2	6	IGHA1*01	DDILGDCSTSHCYWGYYYQGMDV	23	1	4	-0,47	27	9,1	/	3-15	2	YHYNNWPRGS	10	0	0		27	9,5	**gp120**
SOSIP	7-116	3-30	2-2	6	IGHA1*01	DDILGECSTGHCYWDYYYQGMDV	23	1	5	-0,59	26	8,8	/	3-15	2	YHYNNWPRGT	10	2	0	-2,09	*nd*	*nd*	
SOSIP	7-122	3-30	2-2	6	IGHA1*01	DDILGECSTGSCYWDYYYQGMDV	23	0	5	-0,49	26	8,8	/	3-15	2	QHYNHWPRAT	10	3	0	-2,06	*nd*	*nd*	
SOSIP	7-194	3-30	2-2	6	IGHA1*01	DDILGECSTGSCYWDYYYQGMDV	23	0	5	-0,49	26	8,8	/	3-15	2	QHYDHWPRAT	10	3	1	-2,06	28	9,9	**gp120**
SOSIP	7-229	3-30	2-2	6	IGHA1*01	DDILGECSTSHCYWDYYYQGMDV	23	1	5	-0,61	27	9,1	/	3-15	2	YQYNNWPRGT	10	1	0	-2,12	*nd*	*nd*	
SOSIP	7-212	3-30	2-2	6	IGHA1*01	DDILGECSTSHCYWDYYYQGMDV	23	1	5	-0,61	29	9,8	/	3-15	2	YQYNNWPRGT	10	1	0	-2,12	*nd*	*nd*	
SOSIP	7-219	3-30	2-2	6	IGHA1*01	DDILGECSTSHCYWDYYYQGMDV	23	1	5	-0,61	26	8,8	/	3-15	2	YHYNNWPRGT	10	2	0	-2,09	*nd*	*nd*	
SOSIP	7-140	3-30	2-2	6	IGHA1*01	DDIMGDCSTGFCYWEYYYQGMDV	23	0	5	-0,41	31	10,5	/	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	
gp140F	7-125	3-30	2-2	6	IGHA1*01	DDIMGDCSTGFCYWEYYYQGMDV	23	0	5	-0,41	31	10,5	/	3-15	2	QHYNSWPRGT	10	2	0	-2,04	29	10,2	**gp120**
SOSIP	7-247	3-30	2-2	6	IGHA1*01	DDIVGDCSTGFCYWEYYYQGMDV	23	0	5	-0,31	26	8,8	/	3-15	2	QHYNSWPRGT	10	2	0	-2,04	*nd*	*nd*	
SOSIP	7-118	3-30	2-2	6	IGHA1*01	DDIVGDCSTGFCYWEYYYQGMDV	23	0	5	-0,31	26	8,8	/	3-15	2	QHYNSWPRGT	10	2	0	-2,04	*nd*	*nd*	
SOSIP	7-107	3-30	2-2	6	IGHA1*01	DDIVGDCSTGFCYWGYYYQGMDV	23	0	4	-0,18	31	10,5	/	3-15	2	QHYNSWPRAT	10	2	0	-1,82	32	11,3	**gp120**

(-) and (+) indicate the numbers of negatively and positively charged amminoacids in the IgH complementary determining region (CDR3), respectively.
SHM indicate the total number and frequency of somatic hypermutations in the VH and VL Ig genes. 1*: a 3 nucleotide-deltion in the CDRH2.

Table S2. Human proteoarray hits for 7-176 antibody cross-reacivity. Related to Figure 3.

Clone ID	Symbol	Name	Z
IOH5061	STIP1	Stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-organizing protein)	14,7
IOH3861	LGALS1	Lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)	12,5
IOH2983	TTC1	Tetratricopeptide repeat domain 1	11,3
AAF19370.1	LGALS8	Lectin, galactoside-binding, soluble, 8 (galectin 8)	9,5
IOH63001	LGALS3	Lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3)	7,9
IOH21984	BIRC4	Baculoviral IAP repeat-containing 4	7,9
IOH54949	TTC1	Tetratricopeptide repeat domain 1	7,7
IOH56981	STUB1	Homo sapiens, STIP1 homology and U-box containing protein 1, E3 ubiquitin protein ligase (STUB1)	7,2
IOH21690	KCNRG	Potassium channel regulator	7,1
/	/	ssDNA	6,7
IOH3920	LGALS3	Lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3)	6,4
IOH10676	/	Solute carrier family 7, member 6 opposite strand,	6,4
IOH12150	LENG1	Leukocyte receptor cluster (LRC) member 1	6,1
IOH45842	PPIE	Peptidylprolyl isomerase E (cyclophilin E)	5,8
NM_002608.1	PDGFB	Platelet-derived growth factor beta polypeptide (simian sarcoma viral (v-sis) oncogene homolog)	5,7
IOH12329	SERPINB5	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5	5,5

Only cross-reactve proeins giving a Z score > 5 for 7-176 only are listed.

DISCUSSION GENERALE

La transmission du VIH-1 se produit principalement par infection virale de cellules cibles au niveau des muqueuses génito-urinaires ou gastro-intestinales après une exposition sexuelle. Les muqueuses génitales/intestinales constituent donc, les principales portes d'entrée du VIH-1. Après l'événement de contamination, le VIH-1 sous forme libre ou associé aux cellules pénètre à travers la muqueuse et infecte localement les cellules de Langerhans, les CD tissulaires et les LT CD4+. Il se propage dans les ganglions lymphatiques puis se dissémine dans tout l'organisme par voie systémique (Kahn and Walker, 1998). La transcytose est un des mécanismes supposés par lequel le VIH-1 peut traverser les barrières épithéliales après la transmission sexuelle (Frouard et al., 2018) (Gonzalez et al., 2019).

Néanmoins, des anticorps produits localement comme les S-IgA et les IgG transsudatées protègent les tissus muqueux contre les pathogènes. Depuis une vingtaine d'années, le rôle des anticorps anti-VIH-1 provenant à la fois du plasma et des sécrétions muqueuses de patients infectés par le VIH-1 (Alfsen et al., 2001) (Bomsel et al., 1998), ainsi que de manière plus intéressante, de sujets hautement exposés au VIH-1 mais qui demeurent séronégatifs (HESN) (Devito et al., 2000) dans l'inhibition de la transcytose virale *in vitro* a été rapporté. En effet, la présence d'IgA anti-VIH-1 dans le plasma et dans les sécrétions génitales de HESN pourrait être associée à leur protection contre l'infection à VIH-1 (Devito et al., 2000). Des études sur les anticorps monoclonaux humains anti-gp160 dérivés de HESN (Tudor et al., 2009) ou isolés d'individus séropositifs (Shen et al., 2010) (Watkins et al., 2013) ont en effet, montré la capacité de ces anticorps à bloquer la transcytose virale à travers l'épithélium muqueux. Ainsi, des Fab IgA anti-gp41 dérivés de LB des muqueuses vaginales issues de femmes HESN sont capables à la fois, de bloquer la transcytose du VIH-1 à travers les cellules épithéliales *in vitro*, et de neutraliser l'infection de LT CD4+ par un virus à tropisme R5 (Tudor et al., 2009).

La principale question du premier volet de ce travail de thèse a été de savoir si les AN anti-VIH-1 parmi les plus puissants, sont capables d'interférer ou de bloquer la transcytose du VIH-1 à travers les épithéliums muqueux, et donc potentiellement, d'agir sur la transmission sexuelle du virus. Cette question est particulièrement importante dans le contexte de vaccins qui induiraient le développement naturel de bNAbs, soit en prévention chez des individus à risque, soit en traitement au cours de la primo-infection.

Pourquoi évaluer des AN de type bNAbs plutôt que des anticorps non neutralisants (AnN) ? Le rôle protecteur des immunothérapies à base de bNAbs contre l'infection à VIH-1 au niveau des muqueuses a été démontré dans de nombreux travaux utilisant des PNH (Barouch et al., 2013b) (Shingai et al., 2013) (Gautam et al., 2016) (Nishimura et al., 2017).

De plus, l'immunothérapie par infusion passive de ces bNAbs chez l'homme est aussi prometteuse (Caskey et al., 2015) (Ledgerwood et al., 2015) (Lynch et al., 2015) (Caskey et al., 2017). Des données indiquent que les AnN peuvent aussi exercer des fonctions anti-VIH-1 *in vivo* à travers les interactions de leur fragment Fc et des récepteurs FcR exprimés par des cellules des MALT (Horwitz et al., 2017). Dans l'essai clinique RV144, l'efficacité de protection de 31 % a été corrélée à la présence d'AnN IgG ciblant la région V1/V2 de la gp120, responsable d'une réduction du risque d'infection chez les vaccinés selon un mécanisme ADCC (Rerks-Ngarm et al., 2009) (Haynes et al., 2012). Deux études récentes ont comparé la capacité protectrice des bNAbs et des AnN mais capables d'ADCC, sous forme d'IgG1 *versus* IgA2 dans des modèles d'infection du VIH-1 *in vitro*, *ex-vivo* sur des explants humains et *in vivo* dans des PNH après infection d'épreuve intra-rectale par le SHIV (Astronomo et al., 2016) (Cheeseman et al., 2017). Leurs résultats indiquent que les bNAbs confèrent clairement une meilleure protection au niveau muqueux contre le VIH-1 par rapport aux AnN même lorsqu'ils sont testés en combinaison. De plus, les auteurs montrent que les AN d'isotype IgG1 sont plus protecteurs que les IgA2 et que la fonction de l'anticorps la plus importante dans la protection est sa capacité de neutralisation (Astronomo et al., 2016) (Cheeseman et al., 2017).

Dans ce travail, nous avons testé la capacité de bNAbs dits de seconde génération à inhiber la transcytose du VIH-1 dans un système *in vitro* bien établi d'épithélium de l'endomètre humain en utilisant la lignée cellulaire HEC-1A (Bomsel, 1997). Facile à mettre en œuvre après la validation d'un certain nombre de paramètres, ce modèle simple avec un seul type cellulaire ne reflète toutefois pas, la composition pluricellulaire d'une muqueuse comme présente dans les modèles de co-culture ou d'explants humains vaginaux ou rectaux (Frouard et al., 2018). Par ailleurs, le type d'épithélium muqueux est un déterminant important dans le mécanisme de l'infection. C'est en effet, la raison pour laquelle, nous avons aussi testé deux autres lignées cellulaires du colon (Caco-2 et T84). Effectivement, dans un épithélium pluristratifié (vagin, exocol, prépuce, anus), les cellules de Langherans intraépithéliales, les CD sont à priori, les premières cibles du VIH-1 conduisant à sa dissémination sans infection des cellules épithéliales. Ce type de dissémination n'est donc pas applicable dans un épithélium monostratifié simple (endocol, rectum ou tractus gastro-intestinal) où le mucus joue un rôle protecteur supplémentaire (Bomsel et al., 1998) (Carias et al., 2013). Malgré ces limites, ce système d'épithélium muqueux permet d'étudier la transcytose du VIH-1 *in vitro*.

Des réponses IgG et IgA anti-VIH-1 sériques (Nabi et al., 2017) et muqueuses (Mestecky, 2007), bien que plus faibles pour les IgA, se développent chez les individus

infectés (Lopez et al., 2018). Nous avons donc produit les bNAbs sélectionnés sous forme d'anticorps monoclonaux recombinants IgG1 et IgA1/IgA2. Nous avions en effet, développé précédemment, une méthode originale, efficace et rapide pour le clonage, la production et la purification à grande échelle des IgA1/IgA2 (Lorin and Mouquet, 2015). En contraste avec une étude utilisant le bNAb anti-gp41 2F5 (Tudor et al., 2012), nous montrons que l'échange de la région Fc du bNAb de l'IgG vers l'IgA ne modifie pas ou peu leurs affinités vis-à-vis de la gp160, et leurs propriétés antivirales contre l'infection par des VIH-1 libres ou associés aux cellules. Lorsque les bNAbs IgG et IgA sont appliqués avec ou sans virus à la surface de la monocouche de cellules épithéliales, nous observons qu'une fraction similaire d'IgG et d'IgA purifiées est transportée du pôle apical vers le pôle basal. Comme attendu, une petite proportion de virions (3,2 % de l'inoculum viral) est transcytosée à travers les cellules épithéliales HEC-1A *in vitro* (Chomont et al., 2008). Nos résultats montrent que les VIH-1 sauvages et ceux dépourvus de protéine Env sont transférés de manière équivalente dans le compartiment basal. Cela est en faveur d'une transcytose virale indépendante des glycoprotéines d'enveloppe comme démontré par d'autres études utilisant différentes lignées cellulaires (Zheng et al., 2006) (Kinlock et al., 2014). Toutefois, d'autres travaux suggèrent que la gp120 est requise pour la transcytose du VIH-1 à travers les cellules HEC-1A (Bomsel, 1997) (Saidi et al., 2007) (Chomont et al., 2008). Les étapes précoces de la transcytose mettent en jeu des molécules de surface spécifiques du virus et des cellules épithéliales. Les cellules HEC-1A étant CD4 et CCR5 négatives mais exprimant le corécepteur CXCR4, le VIH-1 utilise des récepteurs alternatifs d'attachement tels que le galactosyl-céramide, des molécules d'adhésion (ICAM-1), des lectines de type C (DC-SIGN, récepteurs au mannose) ou les HSPG (Saidi et al., 2007). Bien que, les interactions de la spicule du VIH-1 avec les récepteurs de surface des cellules épithéliales ne semblent pas être nécessaires pour la transcytose des virions, nous nous sommes demandés si les VIH-1 en complexe avec les anticorps pouvaient encore pénétrer et traverser l'épithélium. Nous montrons que de fortes concentrations de divers bNAbs exprimés sous forme d'IgG1, IgA1 ou IgA2 monomériques sont inefficaces pour bloquer la transcytose de virus libres à tropisme R5 et X4, ainsi que de virus relargués par des cellules infectées. Cette observation est en accord avec des travaux précédents qui rapportent l'incapacité des bNAbs non neutralisants et de première génération à inhiber la transcytose virale *in vitro* (Chomont et al., 2008) (Gupta et al., 2013). L'utilisation de virus libres ou associés aux cellules permet d'étudier les mécanismes d'entrée virale *in vitro* mimant la transmission sexuelle du VIH-1 *in vivo via* les sécrétions génitales. Les virions associés aux cellules semblent transcytoser plus efficacement que les virus libres, probablement par la formation de synapses virologiques entre les cellules infectées et les cellules épithéliales (Bomsel, 1997) (Bobardt et al., 2007). Tudor et collaborateurs ont montré que la transcytose de virus libres est 100 fois moins

efficace que celle de cellules infectées, et que l'anticorps 2F5 IgA2 bloque mieux la transcytose que son pendant IgG (Tudor et al., 2012). En outre, nous n'avons pas observé d'effet inhibiteur supérieur des IgA par rapport aux IgG ou même des dIgA1 ou pIgA1 comparé aux mIgA1 comme cela a été précédemment observé avec l'anticorps HGN194 (Watkins et al., 2013). Une autre étude a montré au contraire, que l'anticorps anti-gp41, 2F5 mIgA inhibait plus efficacement la transcytose du VIH-1 à travers un épithélium rectal par rapport à sa forme dimérique (Shen et al., 2010). De plus, les différences structurales entre les deux sous-classes d'IgA pourraient avoir un rôle dans leur capacité protectrice. Ainsi, chez des macaques Rhésus infectés par voie intra-rectale avec le virus chimérique SHIV-1157ipEL-p, l'administration par la même voie, de trois versions de l'anticorps HGN194 (dIgA1, dIgA2 et mIgG1) présentant la même capacité neutralisante, a montré que les dIgA1 induisaient une meilleure protection *in vivo*. Celle-ci est corrélée à une inhibition de la transcytose du virus libre potentiellement liée à une activité de capture virale *in vitro*. En effet, il a été proposé que les dIgA1 pourraient capturer quatre virions alors que les dIgA2 ne pourraient en fixer que deux sur la base de leur distance inter-Fab (Watkins et al., 2013). Dans notre étude, l'inefficacité des bNAbs IgA de seconde génération à diminuer la migration virale transépithéliale contraste avec ce qui a été rapporté dans les travaux déjà publiés utilisant des IgA anti-gp160 isolés de HESN (Tudor et al., 2009) ou des bNAbs de première génération (Mantis et al., 2007) (Shen et al., 2010) (Tudor et al., 2012) (Watkins et al., 2013). Néanmoins, il est important de souligner des différences par rapport (i) aux lignées de cellules épithéliales utilisées ; (ii) aux tests de transcytose *in vitro* ; (iii) aux conditions expérimentales qui pourraient expliquer ces résultats contrastés. Globalement, des différences dans la structure, le transport et les fonctions effectrices médiées par le fragment Fc peuvent influencer le rôle des anticorps IgG et IgA dans les muqueuses au cours de l'infection à VIH-1. De manière importante, aucune évidence mécanistique n'a encore été fournie pour montrer que les dIgA sont capables « d'encager » des virions en constituant de larges agrégats permettant ainsi, le blocage de l'entrée du VIH-1 dans les sites muqueux comme cela a été évoqué par d'autres (Zhou and Ruprecht, 2014). Il est possible cependant, qu'à travers les interactions entre les IgG/IgA anti-VIH-1 et les protéines du mucus (MUC16, mucines sécrétées gélifiantes MUC5AC et 5B) des barrières muqueuses génitales, les complexes anticorps-mucine puissent piéger plus efficacement les virions VIH-1 afin d'augmenter la protection des barrières muqueuses contre la transmission virale (Gunn et al., 2016). Cela bien que les IgG et les IgA soient différemment associées aux divers types de mucus du tractus génital féminin, par exemple (Fahrbach et al., 2013).

Grâce à des analyses de microscopie confocale, nous rapportons que 50-60 % des virions colocalisent avec des bNAbs dans le cytoplasme des cellules épithéliales, et qu'ils se

répartissent sur toute l'épaisseur des cellules. De manière importante, cette observation fournit un argument suggérant que les molécules IgG et IgA anti-gp160 n'interfèrent pas sur la transcytose virale. Nous proposons en effet, que les VIH-1 en complexe avec des immunoglobulines anti-Env de haute affinité ne seraient pas séquestrés à la surface de l'épithélium mais seraient endocytés par les cellules épithéliales pour migrer vers le pôle basal afin d'y être libérés. Toutefois, l'identification des processus moléculaires impliqués dans l'entrée des complexes immuns et le transit demande de plus amples investigations. Néanmoins, il apparaît, d'après nos données, que l'absorption des virions recouverts d'anticorps par les cellules épithéliales n'implique, ni le FcRn qui ne fixe que les IgG, ni le pIgR qui ne fixe que les pIgA ; les récepteurs FcRn et pIgR étant exprimés au pôle apical majoritairement et au pôle basal uniquement des cellules épithéliales HEC-1A, respectivement. Afin de vérifier l'absence d'implication du FcRn dans le transport des IgG, des expériences dans lesquelles le compartiment apical a été placé en milieu acide ou utilisant la bafilomycine A1 (inhibiteur de l'acidification des vésicules d'endocytose) n'ont pas entrainé d'augmentation ou d'altération de la transcytose virale, respectivement (données non montrées).

Après leur translocation à travers les cellules épithéliales, les VIH-1 libres demeurent infectieux (Bomsel, 1997). Bien que les anticorps sont incapables d'inhiber la transcytose virale, les anticorps pourraient cependant, neutraliser directement les particules virales libres et/ou exercer une activité antivirale dépendante du fragment Fc contre les cellules infectées telle que l'ADCC (Haynes et al., 2012) (Duchemin et al., 2018) ou la phagocytose médiée par les macrophages ou les polynucléaires neutrophiles (Sips et al., 2016) (Duchemin et al., 2020), et ainsi potentiellement altérer ou même prévenir la transmission muqueuse du VIH-1. Dans notre étude, les bNAbs peuvent diminuer efficacement l'infectivité des virus transcytosés suggérant que ces anticorps restent associés aux VIH-1 durant le trafic (Gupta et al., 2013) ou qu'ils se fixent aux virions après leur transport vers le pôle basal. Nos résultats montrent des valeurs d'IC_{50} comparables de bNAbs dans un test de neutralisation classique avec des virus pseudotypés et avec des virus transcytosés. En utilisant quatre bNAbs IgG1 de seconde génération dans des modèles humains *ex-vivo* (vaginal et rectal) de transmission sexuelle du VIH-1, il a été montré que la puissance de neutralisation de ces molécules corrèle avec une diminution de la transmission et de la réplication du virus (Scott et al., 2016). L'ensemble de ces observations sont en accord avec d'autres travaux (Astronomo et al., 2016) (Cheeseman et al., 2017), et confortent donc, l'idée que l'une des fonctions anticorps la plus importante dans la protection de la transmission du VIH-1, est sa capacité neutralisante. Ainsi, l'utilisation de bNAbs comme agents virucides non ART pour une application topique pré-exposition pourrait être envisagée pour protéger les muqueuses

à la fois vaginale et anale contre le VIH-1 (Scott et al., 2016). Une étude très récente utilisant des splénocytes infectés par $SHIV_{162.P3}$ comme source de virus a évalué une collection de bNAbs contre la transmission de cellule à cellule *in vitro*. Ces données montrent que le virus associé aux cellules est plus difficile à neutraliser que le virus libre, et que le bNAb 10-1074 est particulièrement efficace pour bloquer la transmission virale inter-cellulaire *in vitro* (Suphaphiphat et al., 2020). *In vivo*, l'administration du bNAb PGT121 avant l'infection d'épreuve de PNH avec des splénocytes infectés par le virus $SHIV_{SF162.P3}$, tous deux infusés par voie sanguine, a montré toutefois, une efficacité partielle contre la transmission de cellule à cellule (Parsons et al., 2017). Le rôle des bNAbs contre la transmission muqueuse du VIH-1 associé à des cellules infectées nécessite d'être examiné avec d'autres molécules que PGT121 (10-1074 par exemple), à la fois sous forme d'IgG et d'IgA. Enfin, de possibles évènements de neutralisation intracellulaire dans des vésicules endosomales ont été précédemment rapportés (Bomsel et al., 1998), mais restent à être plus amplement investigués.

Nos résultats *in vitro* fournissent une explication mécanistique quant à la protection conférée par des titres modestes de bNAbs hautement actifs contre l'infection SHIV dans des macaques après inoculation muqueuse. En effet, suite à l'infusion passive dans la circulation sanguine, les bNAbs IgG diffusent dans le plasma, se distribuent rapidement dans divers tissus incluant les muqueuses, et par des interactions avec le FcRn et/ou par diffusion passive, sont transloqués dans la lumière du tissu muqueux où ils ne bloquent probablement pas la transcytose virale, mais neutralisent les virions infectieux avant leur passage dans l'épithélium. En effet, notre étude montre que les virions complexés aux anticorps anti-Env pénètrent les cellules épithéliales, sont transloqués du pôle apical au pôle basal où ils peuvent y être libérés et que les VIH-1 transcytosés ne sont plus infectieux. A cet égard, l'ingénierie des bNAbs permet d'augmenter l'affinité de l'anticorps pour le FcRn, ce qui entraine un allongement de sa demi-vie (Gaudinski et al., 2018) et par conséquence, son effet protecteur des muqueuses *in vivo*. Les bNAbs VRC01, 10-1074, 3BNC117, N6 et 10E8 en version LS ont été ou sont actuellement testés chez l'homme suite à des résultats très prometteurs dans des modèles précliniques de PNH avec l'allongement de la durée de protection (Ko et al., 2014) (Gautam et al., 2016) (Gautam et al., 2018).

En conclusion, il paraît donc essentiel de comprendre les processus impliqués dans la prévention de la transmission muqueuse du VIH-1 par les bNAbs, afin d'optimiser les immunothérapies à base d'anticorps et de développer de nouvelles stratégies vaccinales. Dans ce contexte, de nombreuses molécules chimiques, protéiques, acides nucléiques ont été étudiées sous forme de gels/films/suppositoires microbicides contre la transmission

muqueuse du VIH-1 (Alexandre et al., 2016). Outre les bNAbs b12, 4E10, VRC01, 2F5 et 2G12 précédemment testés, des gels virucides à base d'un cocktail de bNAbs anti-VIH-1 parmi les plus puissants pour une application topique pré-exposition seraient envisageables, afin de protéger les muqueuses à la fois vaginale et anale contre le VIH-1. De plus, de nouvelles stratégies telles que des vaccins qui induiraient le développement naturel de bNAbs ou l'ingénierie de LB humains exprimant des bNAbs par édition génique CRISPR-Cas9, seraient utilisables, soit en prévention chez des individus à risque, soit en traitement au cours de la primo-infection. Bien que prometteuses aujourd'hui dans des modèles précliniques, elles nécessitent encore des années de recherche et développement pour des applications chez l'homme.

Tout comme les muqueuses, une autre barrière tissulaire est franchie par le VIH-1 très tôt après la primo-infection. En effet, les virions peuvent traverser la BHE et infecter les péricytes (Bertrand et al., 2019), les cellules de la microglie (Cenker et al., 2017), et potentiellement les astrocytes. L'atteinte du SNC survient durant la phase aigüe de la maladie puisque le VIH-1 peut être détecté dans le LCR huit jours après la primo-infection (Davis et al., 1992) ; les désordres neurocognitifs évoluant progressivement au cours de la phase chronique. Dans l'infection à VIH-1, les dysfonctionnements neurocognitifs sont rapportés chez environ 50 % des individus infectés sous cART. Les traitements cART ont quant à eux, très largement contribué à réduire la sévérité des HAND en diminuant fortement la prévalence de la forme la plus sévère (HAD) (Saylor et al., 2016).

Dans ce contexte, nous avons voulu examiner la capacité des bNAbs et des AnN anti-VIH-1 à interférer ou à bloquer le transport par endocytose des virions à travers l'endothélium de la BHE. Contrairement aux muqueuses, cet aspect n'a jamais été investigué à ce jour, ce qui constitue l'originalité de notre travail qui s'appuie cependant, sur une certaine pauvreté bibliographique.

Dans ce second volet de mon travail de thèse, nous avons évalué la capacité de bNAbs dits de seconde génération et d'AnN à inhiber la transcytose du VIH-1 dans un système *in vitro* utilisant des monocouches de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines (hCMEC/D3) (Weksler et al., 2013). Cette lignée cellulaire hCMEC/D3 présente un certain nombre d'avantages. Elle est stable sur une dizaine de passages, se développe correctement sur la membrane des inserts recouverte de collagène de rat et de fibronectine, et reproduit des caractéristiques importantes de la BHE telles que l'expression des protéines de jonction serrées et adhérentes (VE-cadhérine, ZO-1, JAM-A), et une perméabilité restreinte à de très petites molécules (Weksler et al., 2005). Cette lignée

hCMEC/D3 a été utilisée pour étudier les relations hôte-pathogène dans le contexte par exemple, du VIH-1 (Andras and Toborek, 2011) ou de *Cryptococcus neoformans* (Vu et al., 2009). Néanmoins, notre système *in vitro* monocellulaire a la faiblesse de ne pas refléter la composition pluricellulaire de l'unité neurovasculaire incluant les macrophages périvasculaires, les cellules microgliales et les astrocytes (Ivey et al., 2009). De nombreuses cellules endothéliales primaires ou immortalisées isolées de différentes espèces (murine, rat, bovine, porcine, humaine ou dérivée de cellules souches humaines) sont décrites comme modèles de BHE *in vitro* (Helms et al., 2016). De plus, des modèles utilisant la lignée hCMEC/D3 en co- ou tri-culture avec des astrocytes et/ou des péricytes humains ont aussi été développés (Hatherell et al., 2011). Enfin, des modèles *in vivo* utilisant des PNH ou des souris humanisées existent afin d'étudier la pénétration du VIH-1 et l'infection des cellules cibles dans le SNC (Honeycutt et al., 2015). Récemment, une étude a montré que les astrocytes sont infectés *in vivo* de manière productive par le VIH-1 dans deux modèles de souris humanisées. Les astrocytes infectés permettent alors, la propagation virale du cerveau vers les organes périphériques *via* le trafic de LT CD4+ infectés. C'est une communication dynamique qui peut s'effectuer dans les deux sens : cerveau-périphérie et périphérie-cerveau (Lutgen et al., 2020).

Le VIH-1 peut traverser l'endothélium de la BHE par transcytose, même si ce mécanisme n'est pas considéré comme la principale voie de transmission cérébrale du virus. Dans le contexte de VIH-1 libres, nos résultats montrent que la transcytose de virions dépourvus d'enveloppe est moins efficace que celle de virus sauvages (10 % *versus* 15 %, respectivement), indiquant que la gp160 du VIH-1 est partiellement requise pour une transcytose virale optimale à travers la monocouche de cellules endothéliales. Sachant que les cellules hCMEC/D3 sont dépourvues du récepteur conventionnel CD4, mais qu'elles expriment les corécepteurs CCR5 et CXCR4 (Weksler et al., 2005), faiblement le FcRn (Urich et al., 2012), et aussi des récepteurs alternatifs tels que le récepteur mannose-6-phosphate (Dohgu et al., 2012) et les HSPG (Afonso et al., 2008), il est probable que l'interaction de la gp120 avec ces derniers permette l'attachement/l'entrée du virus par endocytose adsorptive comme cela a été démontré dans d'autres travaux (Banks et al., 2001). Par microscopie confocale, nous avons clairement observé que les virions libres rentrent dans les cellules et se répartissent sur toute l'épaisseur des cellules endothéliales suggérant une entrée virale par endocytose comme précédemment démontré (Banks et al., 1998) (Banks et al., 2001). Malgré cela, il serait particulièrement intéressant de visualiser *in vivo* le passage de VIH-1 bioluminescents ou fluorescents dans le cerveau en utilisant des modèles murins ou des larves de poisson zèbre, respectivement. En effet, en utilisant un modèle souris d'encéphalite virale et un virus Sindbis-Luciférase combiné à un système

d'imagerie *in vivo*, il a été possible de documenter la pathogénèse de cet alphavirus sur animaux vigiles (Cook and Griffin, 2003). Bien sûr, le modèle souris a été très largement utilisé avec différentes souches virales pour étudier aussi la neuropathogénèse du VIH-1 (Gorantla et al., 2010) (Jones et al., 2016) (Lutgen et al., 2020). De plus, le modèle du poisson zébre dont la transparence est un atout majeur, s'est avéré très instructif pour l'étude d'infections humaines bactériennes et parasitaires (Gomes and Mostowy, 2020) mais aussi, pour l'étude d'infections virales avec le virus Chikungunya, par exemple (Palha et al., 2013). Cependant, des contraintes de température liées à la réplication du VIH-1 et au développement des larves font qu'il n'y a pas aujourd'hui de modèle d'infection du poisson zèbre par le VIH-1.

Nous avons ensuite testé la capacité des virions en complexe avec des anticorps anti-gp160 de classe IgG à pénétrer et à traverser l'endothélium. De manière surprenante, aucun des bNAbs et des AnN ciblant différents épitopes sur l'Env testés seuls ou en combinaison n'inhibent le transport de virus libres à tropisme R5 (NLAD8) et X4 (NL4.3) à travers la monocouche de cellules hCMEC/D3. Le rôle du récepteur FcRn dans la transcytose d'IgG à travers la BHE reste incertain (Ruano-Salguero and Lee, 2020). Etant donné que le pourcentage de transcytose est comparable entre les virions seuls ainsi que ceux fixés par les anticorps, et que le FcRn est faiblement exprimé par les cellules hCMEC/D3, il est probable que l'endocytose des complexes virus-anticorps n'utilise pas le FcRn comme précédemment montré au niveau muqueux (Lorin et al., 2017). De plus, les monocytes et LT CD4+ infectés agissent comme des véhicules de transport du VIH-1 à travers la BHE, et ils représentent la principale voie de transmission virale dans le SNC (Gonzalez-Scarano and Martin-Garcia, 2005) (Veenstra et al., 2017). Nous avons tenté ici, de reproduire le mécanisme d'entrée du « cheval de Troie » en utilisant des cellules T lymphoblastiques chroniquement infectées (MOLT) par le VIH-1 NL4.3 comme source virale. Là encore, aucun des AN et AnN anti-VIH-1 testés n'inhibent le transport transendothélial des VIH-1 relargués à la surface des MOLT. Toutefois, si les anticorps anti-gp160 peuvent limiter la propre transmigration de cellules infectées par le VIH-1 dans le cerveau est un point important qui reste à déterminer. Enfin, une étude a montré après analyses génétiques des virus compartimentés sanguins (plasma) et cérébraux (LCR), qu'au cours de l'infection aigüe par le VIH-1, un ou plusieurs virus T/F peuvent envahir très tôt le SNC d'individus infectés non traités par cART (Tovanabutra et al., 2019). Nous avons donc testé les bNAbs et les AnN anti-gp160 dans les mêmes conditions que les virions libres en utilisant le virus T/F CH058 (Ochsenbauer et al., 2012). Nous observons que les AN et AnN anti-VIH-1 n'ont pas d'effet sur la transcytose des virions T/F libres. Ici, nous avons utilisé un virus T/F isolé du sang (Ochsenbauer et al., 2012), mais il serait particulièrement intéressant d'utiliser des virus T/F neurotropes isolés de LCR de sujets infectés. Nos expériences pourraient être

reproduites en testant le panel de bNAbs et d'AnN sur ces virus T/F dans le modèle de BHE *in vitro* en utilisant à la fois les cellules hCMEC/D3 mais aussi, des cellules endothélailes primaires puis, d'évaluer le corrélat entre l'infectivité des virus transcytosés et le pouvoir neutralisant des bNAbs. L'activité neutralisante d'un panel de bNAbs contre des virus pseudotypés présentant à leur surface les glycoprotéines d'enveloppe de virus T/F cérébraux et sanguins d'individus infectés a été précédemment mesuré par un test standard de neutralisation sur cellules TZM-bl. Les auteurs ont ainsi observé que les variants viraux du LCR peuvent être plus résistants à la neutralisation par un panel de bNAbs dits de seconde génération que leurs homologues sanguins (Stefic et al., 2017).

Ensuite, nous avons observé par microscopie confocale que 45 et 16 % des virions intracellulaires sont colocalisés avec 3BNC117 (bNAb) et 5-25 (AnN), respectivement. De plus, les VIH-1 seuls, les anticorps seuls et les complexes virus-anticorps entrant dans les cellules endothéliales sont retrouvés dans le cytoplasme, et se répartissent sur toute l'épaisseur des cellules hCMEC/D3. Bien que d'autres ont montré que des VHH (unique domaine variable de la chaîne H) recombinants basiques (point isoélectrique, pI > 9) de 14 et 28 kDa dirigés contre la protéine acide fibrillaire gliale des astrocytes sont capables de traverser la BHE aussi bien *in vitro* à travers les cellules endothéliales hCMEC/D3 que *in vivo* chez des souris (Li et al., 2012b), nous observons que les IgG entières de 150 kDa utilisées ici traversent également l'endothélium. Une étude récente a montré également que des IgG humaines entières (pI 6,6-9,0) ainsi que les fragments Fab (50 kDa, pI 7,5-9,0) et Fc (32 kDa, pI 4,5-6,5) présentent des perméabilités comparables à travers une monocouche de cellules endothéliales cérébrales *in vitro*. Les auteurs concluent que la transcytose à travers la BHE est indépendante du FcRn, mais aurait pour origine un phénomène d'endocytose non spécifique, indépendant de la taille et de la concentration, ce qui confirme nos observations, mais dépendant de la charge des macromolécules (Ruano-Salguero and Lee, 2020). Au contraire, une autre étude indique que la perméabilité des molécules à travers la BHE est dépendante de leur taille (Kutuzov et al., 2018). Afin de compléter nos résultats, il serait intéressant de déterminer le point isoélectique des IgG humaines que nous avons utilisé.

Enfin, nous avons évalué si les VIH-1 transcytosés seuls ou en complexe avec les anticorps sont toujours infectieux. De manière inattendue, nous observons que la capacité infectieuse des virions seuls transcytosés à travers les cellules endothéliales hCMEC/D3 est altérée ; phénomène que nous n'avions pas noté avec les cellules épithéliales humaines des muqueuses HEC-1A, Caco-2 et T84. Une potentielle altération de l'enveloppe virale après passage peut être proposée bien qu'aucune information ne soit disponible dans la littérature. Un test ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) Env sandwich en parallèle à l'ELISA

p24 peuvent être une alternative pour différencier les VIH-1 transcytosés ayant perdu Env de ceux qui sont intacts. De plus, notre étude montre que les bNAbs anti-gp160 sont capables de diminuer l'infectivité des particules virales transcytosées de manière plus prononcée que ne le font les AnN. Ces résultats suggèrent que les bNAbs restent complexés aux VIH-1 durant le transport ou qu'ils peuvent se fixer aux virions libres après transport vers le pôle basal. Comme nous l'avons démontré (Lorin et al., 2017) ainsi que d'autres (Astronomo et al., 2016) (Cheeseman et al., 2017), l'activité neutralisante des bNAbs est la fonction essentielle dans la protection de la transmission du VIH-1 à ses cellules cibles qu'il peut infecter après sa translocation à travers des barrières muqueuses. De manière alternative, les AnN quant à eux, peuvent exercer une activité antivirale de type ADCP ou ADCC *via* leur fragment Fc. Par conséquent, les VIH-1 opsonisés par les AnN pourraient être éliminés par ADCP grâce aux cellules phagocytaires cérébrales, les cellules microgliales, à l'origine potentiellement de la neuroinflammation. De plus, une étude ancienne a montré que des AnN mais capables d'ADCC présents dans le LCR d'individus infectés par le VIH-1 induisent la cytolyse de cellules infectées *in vitro* (Emskoetter et al., 1989).

En conclusion, nos données supportent que le pouvoir neutralisant des bNAbs est capital dans la protection des cellules cérébrales contre l'infection par le VIH-1, malgré leur incapacité à bloquer la migration transendothéliale du virus. Comprendre les processus médiés par les bNAbs et impliqués dans la protection de barrières tissulaires d'importance dans l'infection par le VIH-1 telles que la BHE est par conséquent, essentiel. Ces connaissances se répercuteront sur l'optimisation d'immunothérapies à base d'anticorps et sur le développement de nouvelles stratégies vaccinales telles que des vaccins qui induiraient l'ontogénie naturelle de bNAbs.

Comme mentionné précédemment, le VIH-1 a comme principales portes d'entrée des barrières tissulaires de l'organisme telles que les muqueuses uro-génitales et intestinales où prédominent IgG/IgA et S-IgA, respectivement (Mestecky, 2007). Les réponses IgA contre le VIH-1 chez les sujets infectés sont de l'ordre 100 fois inférieures par rapport aux réponses IgG anti-VIH-1 (Lopez et al., 2018). De plus, la perte accélérée des LT CD4+ durant la phase chronique de l'infection peut limiter la maturation et la commutation de classe vers l'IgA des cellules B ; la protéine Nef (*Negative factor*) inhibant cette dernière (Xu et al., 2009). Enfin, des niveaux élevés d'IgA sériques durant la phase précoce de l'infection traduisant une activation des LB polyclonaux non spécifiques, ainsi qu'une diminution de l'expression du CD89, ont été décrits comme des marqueurs de progression de la maladie (Lopez et al., 2018).

Des IgA anti-VIH-1 ont été documentés. Cependant, leurs rôles sont controversés (Zhou and Ruprecht, 2014). D'une part, comme rôle protecteur, plusieurs travaux ont montré que la présence d'IgA anti-VIH-1 dans les sécrétions génitales des HESN pourrait être associée à leur protection contre l'infection (Devito et al., 2000) (Tudor et al., 2009). Par ailleurs, l'immunisation passive rectale de macaques avec trois versions de l'anticorps HGN194 (dIgA1, dIgA2, IgG1) a montré que les dIgA1 induisent la meilleure protection (83 %) contre une infection d'épreuve intra-rectale par SHIV *in vivo*, alors qu'elle n'est que de 17 et 33 % pour dIgA2 et IgG1, respectivement (Watkins et al., 2013). De plus, des fonctions protectrices telles que l'ADCC, la neutralisation et l'ADCP (Wills et al., 2018) ont été attribuées aux IgA anti-VIH-1 sériques (Lopez et al., 2018). D'autre part, comme conséquences négatives, il a été proposé que la réponse IgA plasmatique contre le VIH-1 induite dans l'essai clinique RV144, serait associée à une augmentation du risque d'acquisition de l'infection (Haynes et al., 2012). Dans ce contexte, des IgA anti-VIH-1 pourraient inhiber la fixation sur l'Env et bloquer l'activité effectrice de type ADCC, des IgG plasmatiques induits par le vaccin (Tomaras et al., 2013). Cependant, une analyse plus précise a indiqué que les IgA circulantes induites par le vaccin RV144 pourraient être des représentants d'autres mécanismes pouvant moduler l'efficacité vaccinale (Chung et al., 2015). Premièrement, les niveaux d'IgG anti-VIH-1 et les ratios IgG/IgA corrèlent avec les réponses ADCC mais pas les niveaux d'IgA. Ainsi, les IgA peuvent interférer avec l'activité ADCC et l'intensité de l'ADCC peut être liée à l'équilibre entre les IgA inhibitrices et les niveaux des sous-types d'IgG (IgG1/IgG3) qui induisent des réponses ADCC anti-VIH-1 plus efficaces (Tomaras et al., 2013) (Chung et al., 2014) (Ruiz et al., 2016). Deuxièmement, la stimulation virale soutenue qui se produit chez les patients progresseurs mais pas chez les *Elite controllers* peut favoriser des altérations dans la nature biophysique et fonctionelle des IgA et/ou des récepteurs IgA (CD89) (Ruiz et al., 2016) (Lopez et al., 2018). D'ailleurs, une étude récente a montré que les anticorps anti-gp41 2F5-IgA2 peuvent coopérer (plutôt que concurrencer) avec les anticorps 2F5-IgG1 pour augmenter la lyse de cellules cibles par ADCC *in vitro* (Duchemin et al., 2018).

De rares individus chroniquement infectés appelés « *Elite neutralizers* » développent une réponse anticorps très largement neutralisante de type bNAbs contre le VIH-1 après un long et complexe processus de maturation d'affinité. Jusqu'à très récemment, tous les bNAbs anti-VIH-1 isolés étaient des IgG. Ces bNAbs IgG ont montré leurs efficacités prophylactique et/ou thérapeutique contre l'infection par le VIH-1 à des niveaux préclinique et clinique (Caskey et al., 2019) (Grobben et al., 2019). Au contraire, le répertoire, la réactivité et les activités fonctionnelles des anticorps exprimés par les LB mémoires IgA^+ au cours de l'infection par le VIH-1 ont été très peu explorés. Ce n'est que très récemment que les

premiers bNAbs IgA anti-VIH-1 ont été décrits (Jia et al., 2020). Cette étude relate l'identification de deux lignages de bNAbs IgG et IgA chez deux donneurs infectés par le VIH-1. Les représentants IgA ciblent deux épitopes différents sur la sous-unité gp120 de l'Env : l'un sur la boucle V3 non dépendant des glycanes (l'anticorps M4008_N1) et le second ciblant un épitope de la boucle V2 à la boucle V5 (l'anticorps M1214_N1). Ils présentent une couverture de neutralisation de 42 et 65 %, respectivement (Jia et al., 2020). Dans ce travail, outre la neutralisation, la caractérisation fonctionnelle et les capacités de protection *in vivo* de ces nouveaux anticorps n'ont pas été abordées.

Dans la dernière partie de mon travail de thèse, nous avons identifié et caractérisé de nouveaux bNAbs anti-VIH-1 d'isotype IgA chez un sujet chroniquement infecté afin de mieux comprendre la contribution des IgA dans les réponses immunitaires médiées par les anticorps contre le VIH-1.

Pour cette étude, nous avons utilisé deux sondes de capture par cytométrie en flux : (i) la protéine Env trimérique non clivée gp140 de type foldon (gp140-F_{YU2} de clade B) et (ii) la protéine Env de type « native » clivée BG505 SOSIP.664 gp140 biotinylées (Mouquet et al., 2012) (Sok et al., 2014b) (Freund et al., 2017) pour réaliser les tris de cellules B mémoires spécifiques $CD19^+$ IgG^+/IgA^+ du patient 7 dont les IgG et les IgA polyclonales présentaient une activité cross-neutralisante. Nous ne disposons pas de beaucoup d'informations à ce jour sur le patient 7, excepté qu'il s'agit d'un contrôleur virémique d'origine caucasienne, et que les prélèvements utilisés dans cette étude datent de 2010. La date présumée d'infection, la prise et l'arrêt éventuel d'un traitement cART sont des informations que nous allons bien sûr collecter. Nous avons ainsi identifié chez ce patient, trois lignages lymphocytaires B de bNAbs : 7-107, 7-176 et 7-155. Pour le lignage 7-107 et ses variants dont 7-269, le répertoire anticorps est uniquement composé d'IgA au niveau périphérique, alors qu'il est constitué d'IgG et d'IgA pour le 7-176 et uniquement d'IgG pour le 7-155. Ces trois clonotypes sont composés de différents variants dont certains ont également été produits : 10 variants IgA pour 7-107/7-269, 3 variants IgG/IgA pour 7-176 dont 7-157 IgA et 7-155 IgG qui est l'unique représentant que nous avons isolé. D'autres études décrivent également, l'identification de plusieurs lignages de bNAbs IgG ciblant différents sites de vulnérabilité du VIH-1 chez un même individu contrôleur du VIH-1 (Wibmer et al., 2013) (Freund et al., 2017). Tandis, qu'une seule étude décrit à ce jour, l'isolement de deux bNAbs IgA ou IgA cross-neutralisants chez deux sujets chroniquement infectés par un VIH-1 de clade B (Jia et al., 2020). Chez les *elite* et les *viremic controllers*, la réponse humorale soutenue par l'aide efficace des LT CD4 +, est un acteur clé dans le contrôle naturel de l'infection. Certains éléments expliqueraient ce contrôle : (i) la préservation des

populations de cellules B mémoires spécifiques du VIH-1 chez les *elite controllers* ; (ii) l'aide des T_{FH} dans le maintien des LB mémoires chez les *elite controllers* ; (iii) la neutralisation des virus autologues contemporains chez certains de ces contrôleurs ; (iv) l'augmentation de la fréquence des anticorps anti-Gag chez les *elite controllers* ; (v) l'importance de l'isotype de l'anticorps ; les IgG1/IgG3 étant capables de se fixer avec une forte affinité aux FcγR présentent de fortes activités antivirales (ADCC, ADCP, ADCDC) ; (vi) le changement du profil de glycosylation des IgG anti-VIH-1 vers des glycoformes agalactosylées, afucosylées, asialylées chez les *elite controllers* ; ces glycoformes étant assosiées à de fonctions antivirales plus efficaces médiées par les FcR ; (vii) la polyfonctionnalité des réponses effectrices des anticorps chez les *elite controllers* (Moris et al., 2019).

Les anticorps de ces trois clonotypes sont cross-neutralisants : 7-269 IgA, 7-176 IgG et 7-155 IgG présentent une couverture de neutralisation de 41 % (sur un panel de 56 virus), 33 % et 29 % (sur un panel de 24 virus), respectivement. L'IgA 7-269 neutralise principalement des virus de clade B (61 %), mais aussi à moindre mesure, des virus de clade A (40 %) et de clade C (22 %). A titre de comparaison, les bNAbs IgA décrits M4008_N1 et M1214_N1 présentent une couverture de neutralisation de 42 et 65 %, respectivement, sur un panel de 120 virus avec une IC_{50} < 50 µg/ml (Jia et al., 2020). Il serait donc intéressant de tester l'anticorps 7-269 IgA sur un panel plus étendu de virus. De plus, l'anticorps 7-269 IgA neutralise 58,3; 46,7 et 63,6 % des 38 virus de sous-type B isolés respectivement, durant trois périodes de l'épidémie 1987-1991, 1997-2000 et 2007-2010. L'anticorps 7-269 IgA issu d'un prélèvement de 2010 semble neutraliser plus efficacement les virus contemporains. Une étude qui a comparé les variants viraux de patients ayant été infectés au cours des périodes 1985-1989 et 2003-2006 de l'épidémie de SIDA conclue que les souches de VIH-1 circulantes sont plus résistantes à la neutralisation par les anticorps IgG au cours du temps. L'augmentation de la longueur des boucles variables (en particulier, la boucle V1) ainsi que du nombre de sites potentiels de glycosylation sur la gp120 expliqueraient cette résistance à la neutralisation (Bunnik et al., 2010). D'autres études plus récentes ont aussi observé qu'une diversification continue des VIH-1 de sous-type B (1987-2010, (Bouvin-Pley et al., 2013) (Bouvin-Pley et al., 2014) (Mouquet et al., 2012)) ou de T/F de clade CRF02_AG (1997-2012, (Stefic et al., 2019)) au cours du temps est associée à une résistance croissante aux AN.

Les bNAbs anti-VIH-1 présentent des caractéristiques inhabituelles telles qu'un taux élevé de MS dans les gènes des régions VH et VL, une longue CDRH3 et un niveau élevé de poly-/auto-réactivité (Moore, 2018) (Roskin et al., 2020). Au niveau des IgH, les familles géniques sont *VH3-30* pour 7-107/7-269 IgA et *VH1-69* pour 7-176 IgG et 7-155 IgG. Au niveau des IgL, les familles géniques sont *VK3-15* pour 7-107/7-269 et 7-155 et *VK1-5* pour

7-176. A titre de comparaison, les familles géniques IgH et IgL de M4008_N1 et M1214_N1 sont *VH1-69*/*VK1-5* et *VH3-66*/*VL2-11*, respectivement (Jia et al., 2020). Il a été décrit que les familles de gènes VH1 puis VH3 sont les plus fréquemment utilisées parmi les anticorps IgG anti-VIH-1, ce que nous confirmons (Li et al., 2012a). Néanmoins, les AN V3/N332 semblent utiliser préférentiellement les gènes de la famille VH4 (Daniels and Saunders, 2019). Par contre, au sujet des anticorps IgA anti-VIH-1, aucune donnée de la littérature n'existe pour étayer nos observations, qui tendent cependant à être similaires à leurs homologues IgG. De plus, l'anticorps 7-107 (8,7 % VH) est environ trois fois moins muté que les bNAbs 7-155 (29,5 % VH) et 7-176 (25,1 % VH) suggérant que (i) le clonotype 7-107/7-269 serait apparu après les deux autres ; (ii) les clonotypes 7-155 et 7-176 étant plus mutés, plus maturés seraient eux, plus précoces dans l'infection. Il est possible de présumer que le traitement d'un échantillon de PBMC du patient 7 collecté aujourd'hui (soit dix ans après) permettrait d'isoler des anticorps 7-107/7-269 présentant un taux de MS plus important faisant suite à une meilleure maturation d'affinité et de sélection des anticorps dans les CG. Cependant, plusieurs questions se posent et nécessitent de plus amples investigations : (i) Est-ce la coopération des lignages de cellules B 7-155 (IgG) et 7-176 (IgG/IgA) préexistants qui a conduit à l'émergence du bNAb 7-107/7-269 (IgA) comme cela a été observé dans d'autres travaux (Liao et al., 2013) (Gao et al., 2014) (Bonsignori et al., 2017a) ? Quels ont été les stimuli dans les OLS des muqueuses qui ont permis l'émergence de ce clonotype qui n'est composé que d'IgA ? Peut-on avancer l'hypothèse que le clonotype 7-155 IgG serait apparu en premier suivi du 7-176 IgG/IgA qui aurait lui-même évolué vers le clonotype 7-107/7-269 IgA en se basant sur le nombre de MS et sur l'isotype ?

Les longueurs des CDRH3 et CDRL3 des anticorps du clonotype 7-107 IgA sont de 23 et 10 résidus, respectivement. Elles sont donc comparables à celles des deux bNAbs IgA décrits (M4008_N1/M1214_N1) avec 17/18 et 9/11 acides aminés, respectivement (Jia et al., 2020). Contrairement à 7-107, 7-155 et 7-176 présentent des CDRH3 plus courtes (12 et 13 acides aminés, respectivement) par rapport à la longueur moyenne de 18-24 résidus des CDRH3 des bNAbs ciblant l'épitope V3/N332 (Daniels and Saunders, 2019). De plus, la longueur des CDRL3 de nos bNAbs (9 résidus pour 7-155 et 7-176 et 10 résidus pour 7-107) est du même ordre que celle des CDRL3 des bNAbs V3/N332 avec 8-12 acides aminés (Daniels and Saunders, 2019).

Nous avons observé que seul le bNAb 7-176 IgG arbort les caractéristiques de l'auto- et de la poly-réactivité sur cellules HEp-2 et sur puces à protéines humaines, respectivement. La poly-réactivité est une caractéristique commune des bNAbs anti-VIH-1 et une fraction importante d'entre eux (57 %) sont poly-réactifs (Prigent et al., 2018). Il semblerait que les bNAbs poly-réactifs possèdent un avantage sélectif dans la réponse immune contre le VIH-1 puisque la fréquence de poly-réactivité des anticorps anti-VIH-1

isolés des compartiments cellulaires B mémoires chez les donneurs infectés est de 65 à 75 % (Mouquet et al., 2010) (Scheid et al., 2011), alors qu'elle n'est que de 23 % pour les LB mémoires des donneurs sains (Tiller et al., 2007). Il a été proposé que l'auto- et/ou la poly-réactivité de certains bNAbs contribuent au développement de l'activité largement neutralisante (Haynes et al., 2005) (Liao et al., 2013) (Prigent et al., 2018). Nous montrons par ailleurs, que la réversion vers la configuration germinale c'est-à-dire non mutée de l'anticorps 7-269 IgG est à l'origine d'une perte à la fois, de réactivité vis-à-vis des protéines SOSIP, gp140 et gp120, et de sa capacité de neutralisation par rapport à la forme mutée originale de l'anticorps. Ces données indiquent que la maturation d'affinité *via* l'incorporation de MS dans les gènes d'Ig de 7-269 est indispensable à son activité neutralisante tel que cela a été précédemment montré (Scheid et al., 2009) (Mouquet et al., 2010). En fait, les MS augmentent progressivement l'affinité et l'activité neutralisante des bNAbs. Cette relation MS-neutralisation a été démontrée au cours de la coévolution virus-AN de manière longitudinale au cours de l'infection à VIH-1 (Liao et al., 2013) (Wibmer et al., 2013) (Doria-Rose et al., 2014) (Doria-Rose et al., 2016) (Bonsignori et al., 2017a). En effet, ces études illustrent bien le fait que l'apparition de virus qui échappent à la reconnaissance des anticorps en mutant l'épitope ciblé, précède le développement de nouveaux clones d'anticorps dont le spectre de neutralisation s'élargit progressivement par l'introduction de MS durant les cycles itératifs de maturation d'affinité et de sélection dans les CG (Victora and Mouquet, 2018).

Les séquences des bNAbs 7-107, 7-155 et 7-176 ont été utilisées en référence pour identifier d'autres membres de chaque lignage à partir des séquences obtenues par NGS (*Next generation sequencing*). L'analyse du répertoire cellulaire B par NGS à partir d'échantillons de moelle osseuse et de PBMC du patient 7 montre que le lignage 7-107/7-269 est composé uniquement d'IgA au niveau périphérique, alors qu'il est constitué d'IgG et d'IgA pour le 7-176 et uniquement d'IgG pour le 7-155, ce qui confirme les résultats obtenus par tri cellulaire « classique ». L'étude de Jia et collaborateurs vient aussi apporter des informations supplémentaires sur les cellules B mémoires IgA^+ dans le contexte de l'infection par le VIH-1 chez deux donneurs chroniquement infectés qui ont développé des réponses immunes de type bNAb IgA (Jia et al., 2020). L'analyse du répertoire cellulaire B par NGS a montré que les deux lignages de bNAbs ont commuté à la fois en IgG et IgA selon des mécanismes de commutation de classe directs et indirects, ce qui a permis la génération des transcripts IgA. Une commutation de classe directe IgM vers IgG aurait permis l'établissement des lignages N4008_N1 IgG2 et N1214_N1 IgG1 desquels les transcripts IgA seraient apparus par commutation de classe secondaire IgG vers IgA à partir de membres clonalement apparentés N4008_N1.3 IgG2 vers IgA2 et N1214_N1.2 IgG1 vers IgA1 ou IgA2

en fonction de l'organisation des gènes dans le locus humain *IGH*. Un environnement local chez ces donneurs aurait favorisé la commutation de classe vers l'IgA (Jia et al., 2020). La proportion des donneurs possédant des bNAbs IgA reste à déterminer et requiert une recherche plus systématique des cellules B mémoires IgA^+ anti-VIH-1 et d'anticorps IgA cross-neutralisants.

La cartographie épitopique des bNAbs du patient 7 montre que les trois clonotypes ciblent des épitopes au niveau des N-glycanes associés au supersite N332 à la base de la boucle V3 (V3/N332) de la gp120, avec un recouvrement partiel de leurs épitopes respectifs. Seul l'anticorps 7-176 reconnait un épitope très dépendant de la structure quaternaire. De plus, les anticorps 7-155 et 7-176 IgG se fixent aux N-glycanes en position 386 et l'anticorps 7-107/7-269 IgA développe des interactions avec les N-glycanes en position 295. Il est à noter que l'IgA M1214_N1 ciblant l'épitope allant de la boucle V2 à la boucle V5 sur l'Env établit aussi des contacts avec les glycanes en position N386 (Jia et al., 2020). D'autres bNAbs ciblant le supersite V3/N332 impliquent également les glycanes sur l'asparagine N295 [2G12 (Scanlan et al., 2002), PGT135 (Kong et al., 2013) et PGT128 (Lee et al., 2015a)] et N386 [PGT135 et BG18 (Freund et al., 2017)]. De plus, des bNAbs ciblant la face « silencieuse » de l'Env comme VRC-PG05 (Zhou et al., 2018) et SF5/12 (Schoofs et al., 2019) interagissent avec les glycanes du N295. Les deux IgA décrites par Jia et collaborateurs ciblent quant à elles, deux autres épitopes que le V3/N332 : M4008_N1 sur la boucle V3 non dépendant des glycanes et M1214_N1 sur un épitope allongé allant de la boucle V2 jusqu'à la boucle V5 (Jia et al., 2020). Les IgA, tout comme les IgG ciblent des épitopes divers sur les glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 dont certains pourraient constituer de nouveaux sites de vulnérabilité.

Il est important de souligner qu'un seul individu infecté peut développer des bNAbs de différentes spécificités contribuant ainsi à une plus large couverture de neutralisation au niveau plasmatique (Tomaras et al., 2011). D'autres travaux ont montré la présence de bNAbs chez un même sujet ciblant : un épitope conformationnel sur les boucles V1/V2 et le CD4bs (Bonsignori et al., 2012) ; le CD4bs et les N-glycanes associés à la boucle V2 (Wibmer et al., 2013) ; le CD4bs, les boucles V1/V2 et le patch de glycanes de la région N332 (Freund et al., 2017). Cependant, nous faisons ici, la première description de l'identification de trois lignages d'anticorps d'isotypes différents (IgG/IgA) ciblant le même supersite épitopique (V3/N332) chez un même donneur infecté et contrôlant l'infection.

Les analyses structurales des bNAbs isolés du patient 7 ont en effet, permis de confirmer que les trois clonotypes ciblent bien l'épitope V3/N332, mais avec différentes combinaisons de glycanes environnants pour leurs interactions. En effet, la structure de l'anticorps 7-269 sous format Fab IgA en complexe avec l'enveloppe virale trimérique BG505

SOSIP.664 a pu être définie par cryo-EM à une résolution de 2,9 Å. L'IgA 7-269 interagit principalement avec les N-glycanes en position 332, 295 et de façon plus mineure avec les N-glycanes N262 et N411. Il présente la particularité d'avoir un pont disulfure dans sa boucle CDRH3 en position C105-C110, ce qui est unique parmi les bNAbs anti-VIH-1 ciblant l'épitope V3/N332. Seul un pont disulfure intra-CDRH3 dans le bNAb CAP256-VRC26 anti-VIH-1 ciblant les boucles V1/V2 a été rapporté (Doria-Rose et al., 2014). Nous confirmons que l'abrogation du pont disulfure par mutagénèse dirigée annule complètement le pouvoir neutralisant du bNAb 7-269, comme cela a été démontré pour le bNAb CAP256-VRC26 (Doria-Rose et al., 2014). Nous pouvons souligner ici, que trois bNAbs ciblant l'épitope conservé E2 du virus de l'hépatite C présentent aussi cette particularité (Flyak et al., 2018). Ce n'est donc pas une caractéristique singulière des anticorps anti-VIH-1 Env. Quel pourrait être le rôle fonctionnel d'une CDRH3 stabilisée par un pont disulfure ? Les auteurs indiquent qu'elle est nécessaire pour la fixation optimale du bNAb à la protéine E2 et pour la neutralisation. D'une part, cette étude montre que ces trois bNAbs utilisent différentes orientations pour permettre à la CDRH3 stabilisée de reconnaître le même épitope, ce qui témoigne de la plasticité du paratope. D'autre part, il semblerait que les deux bNAbs isolés d'individus ayant spontanément résolu l'infection, jouent un rôle direct dans la clairance de l'infection (Flyak et al., 2018). Dans notre étude, nous avons aussi obtenu les structures des bNAbs 7-155 et 7-176 sous format Fab IgG à une résolution de 6,5 et 7,0 Å, respectivement. Les données structurales indiquent qu'ils se fixent tous les deux aux N-glycanes en position 332, 386 et 392 de l'épitope V3/N332. Globalement, les N-glycanes N262, N295 et N411 sont proches du N332 tandis que, les N-glycanes N386 et N392 sont plus éloignés obligeant les anticorps à faire des contacts plus extensifs (Seabright et al., 2019).

Bien que de nombreux travaux aient caractérisé les propriétés effectrices d'IgG anti-VIH-1 neutralisants ou non, peu ou pas d'études fonctionnelles portent sur des IgA anti-VIH-1 « naturels » ou utilisent alors, des bNAbs IgG artificiellement convertis en bNAbs IgA. Nos bNAbs IgA recombinants produits chez cet individu en phase chronique de l'infection, rendent possible l'étude des fonctions antivirales et protectrices en condition « naturelle » afin de les comparer à celles des bNAbs IgG précédemment étudiés. En premier lieu, nous montrons que les anticorps 7-269 et 7-157 IgA anti-VIH-1 ne bloquent pas la transcytose virale à travers les cellules épithéliales de l'endomètre humain (HEC-1) mais qu'ils neutralisent les virions transcytosés comme nous l'avons précédemment observé avec les bNAbs IgG/IgA (Lorin et al., 2017) et les AnN IgG/IgA (Planchais et al., 2019) muqueux.

A côté de leur capacité neutralisante, les bNAbs mais aussi les AnN anti-VIH-1 peuvent possèder des fonctions effectrices qui jouent un rôle important dans la protection contre l'infection *in vivo* (Ackerman et al., 2012) (Burton and Mascola, 2015). Parmi ces

fonctions effectrices médiées par le fragment Fc de l'anticorps, l'ADCC et l'ADCP ont été largement investiguées. D'une part, plusieurs études ont évalué la capacité de bNAbs (Bruel et al., 2016) et d'AnN (Haynes et al., 2012) (Bruel et al., 2017) de sous-classe IgG1 à se fixer sur des cellules infectées et à médier une activité ADCC dépendante des cellules NK. En utilisant un test ADCC adapté aux IgA qui remplace les cellules effectrices NK par des polynucléaires neutrophiles ou des monocytes primaires exprimant le FcαRI à leur surface, des résultats préliminaires indiquent que les anticorps 7-269 et 7-157 IgA anti-VIH-1 n'ont pas la capacité de déclencher l'ADCC de cellules infectées. En parallèle, nous avons évalué la capacité des bNAbs IgG du patient 7 (7-107, 7-269, 7-319, 7-157, 7-176 et 7-155) à se fixer sur des cellules infectées et à déclencher une activité ADCC dépendante, soit des cellules NK, soit des polynucléaires neutrophiles ou des monocytes qui expriment les FcγR. Nous observons que la mort des cellules infectées par des cellules NK primaires *via* un mécanisme ADCC est déclenchée avec tous les bNAbs IgG se fixant fortement aux cellules cibles, excepté avec 7-155. Au contraire, nous n'observons pas d'ADCC lorsque les cellules NK sont remplacées par des polynucléaires neutrophiles ou des monocytes primaires avec le même panel d'anticorps IgG. De plus amples investigations sont nécessaires afin d'expliquer ces observations préliminaires impliquant les IgA, le type de cellules infectées et/ou les polynucléaires neutrophiles/monocytes primaires. De manière contrastée, une étude récente a montré que le bNAb anti-gp41 2F5-IgA2 déclenche l'ADCC seul et coopère avec son pendant IgG, 2F5-IgG1 pour augmenter la lyse de cellules infectées par des monocytes primaires exprimant FcγR et FcαRI (Duchemin et al., 2018). Nous envisageons également, d'évaluer les interactions entre les bNAbs IgG et IgA du patient 7 au regard de leurs fonctions effectrices. D'autre part, plusieurs travaux relatent les capacités d'anticorps IgG anti-VIH-1 à déclencher l'ADCP (Sips et al., 2016) (Musich et al., 2017). L'utilisation du test ADCP *in vitro* (Ackerman et al., 2011) utilisant les cellules THP-1 (lignée monocytaire) ne nous a pas permis de conclure sur les capacités de nos anticorps IgA à déclencher la phagocytose de billes fluorescentes recouvertes de protéine Env gp140. Au contraire, ce système employé par d'autres a montré que les IgA (IgA1 et IgA2) anti-VIH-1 sont capables d'induire la phagocytose de VIH-1 fluorescents, de billes fluorescentes recouvertes de protéine Env gp140 ou de peptide gp41 ou de LT CD4+ infectés (cellules cibles) par les THP-1, des monocytes ou des polynucléaires neutrophiles primaires (cellules effectrices) *via* le FcαRI (Wills et al., 2018) (Duchemin et al., 2020). Nos résultats sur les fonctions effectrices des bNAbs IgA étant très préliminaires, d'autres combinaisons de cellules cibles/cellules effectrices doivent être investiguées en utilisant des cellules infectées (cellules cibles) et des monocytes ou neutrophiles primaires (cellules effectrices).

Enfin, nous avons montré sur des souris humanisées infectées puis traitées par cART, qu'une seule injection de 0,5 mg de l'anticorps 7-269 IgA monomérique par voie intrapéritonéale entraine un délai de rebond chez 37,5 % des animaux comparé à des souris contrôles, démontrant ainsi sa capacité neutralisante *in vivo*. Ces résultats prometteurs chez la souris humanisée pourraient déboucher sur l'évaluation de l'efficacité de l'IgA 7-269 dans des modèles d'infection muqueuse chez le PNH. En effet, plusieurs travaux ont montré l'efficacité des IgA dans la protection muqueuse contre l'acquisition du VIH-1 dans des modèles de souris (Hur et al., 2012) ou de PNH (Bomsel et al., 2011) (Watkins et al., 2013) (Astronomo et al., 2016).

De nombreuses évidences obtenues par des études précliniques (Barouch et al., 2013b) (Gautam et al., 2016) et cliniques (Caskey et al., 2015) (Lynch et al., 2015) (Caskey et al., 2017) indiquent qu'un vaccin protecteur contre le VIH-1 devrait idéalement induire des anticorps de type bNAbs actifs contre la plupart des quasi-espèces de VIH-1. Bien que dans l'essai clinique RV144, des IgA anti-VIH-1 pouvaient à prori, inhiber la fixation sur l'enveloppe virale et bloquer l'activité effectrice des IgG plasmatiques induits par le vaccin (Tomaras et al., 2013), plusieurs travaux convergent vers de nouvelles stratégies vaccinales combinant à la fois des IgG et des IgA anti-VIH-1 pour la protection contre l'infection par le VIH-1. Ainsi, par exemple, l'induction par vaccination d'IgA et d'IgG ayant des activités fonctionnelles complémentaires ou coopérantes médiées par leur fragment Fc (Duchemin et al., 2018) ou de réponses IgA et IgG neutralisantes et/ou d'activités effectrices (ADCC) au niveau muqueux (Bomsel et al., 2011) ou de réponses IgA muqueuses et IgG systémiques (Sholukh et al., 2015). Dans ce dernier cas, l'immunisation passive systémique de l'anticorps HGN194 IgG1 seule ou en combinaison avec HGN194 dIgA2 par voie rectale à des macaques a montré une protection complète des PNH ayant reçu les deux anticorps par voies sanguine et rectale, alors que ceux infusés avec l'IgG1 seul ont tous été infectés après inoculation intra-rectale avec une forte dose de SHIV. Le concept de « défense en profondeur » se déclinerait ainsi : premièrement, les virions infectants seraient exposés aux S-IgA à la surface muqueuse. Les S-IgA pourraient se fixer aux virions, prévenir la transcytose à travers la barrière épithéliale ou les neutraliser. Si certaines particules virales libres arrivaient à pénétrer le mucus et l'épithélium, elles seraient alors neutralisées par les IgG circulantes (Sholukh et al., 2015).

Enfin, au regard des données décrivant l'induction d'effets vaccinaux par l'immunothérapie à base de bNAbs IgG anti-VIH-1 chez des PNH (Barouch et al., 2013b) et chez l'homme (Schoofs et al., 2016), la question intéressante à aborder serait donc : les bNAbs IgA anti-VIH-1 (7-269 IgA1 par exemple) sont-ils capables d'induire un effet vaccinal ? Il est connu que les IgA sont capables d'induire des fonctions effectrices telles que l'ADCC (Duchemin et al., 2018) ou l'ADCP (Duchemin et al., 2020) dépendantes des

interactions Fc/FcαRI. De plus, les complexes immuns formés par les IgA se fixent avec une forte avidité aux FcαRI (Heineke and van Egmond, 2017) (Hansen et al., 2019) (Gayet et al., 2020). Cependant, des investigations sont nécessaires pour savoir si la reconnaissance des complexes immuns (dIgA/pIgA-VIH-1 ou IgA-cellules infectées) *via* les FcαRI exprimés à la surface de CPA comme les CD peut stimuler des réponses immunes cellulaires et humorales de l'hôte afin d'induire une immunité protectrice à long terme dans des modèles animaux et chez l'homme.

En conclusion, cette étude a permis l'une des premières caractérisations au niveau moléculaire, structural et fonctionnel de nouveaux bNAbs de classes IgA et IgG anti-VIH-1 chez un patient virémique contrôlant l'infection. Bien que rarement recherchés, les bNAbs IgA sont naturellement produits au cours de l'infection par le VIH-1. Au même titre que les bNAbs IgG, les bNAbs IgA anti-VIH-1 pourraient contribuer de manière efficace à l'immunité antivirale contre le VIH-1 et jouer un rôle essentiel dans la protection *in vivo*.

Les perspectives envisageables pour ce travail sur les IgA bNAbs sont nombreuses. Tout d'abord, concernant le patient 7, la possibilité d'obtenir un second prélèvement soit dix ans après celui que nous venons d'analyser, serait une précieuse opportunité afin de comprendre comment les trois clonotypes ont évolué au cours de l'infection et en particulier, le clonotype 7-107/7-269 IgA en terme de nombre de MS, de l'élargissement des activités neutralisantes et de mettre en évidence l'apparition éventuelle d'autres bNAbs IgA. De plus, à plus large échelle, il serait particulièrement intéressant : (i) d'évaluer les activités séroneutralisantes d'IgA polyclonales d'autres donneurs de type Elite en se basant sur celles des IgG ; (ii) de caractériser les bNAbs IgA des donneurs sélectionnés au niveau moléculaire, fonctionnel et structural, comme nous l'avons fait ici pour le patient 7 ; (iii) d'étudier la génèse de ces molécules IgA par la coévolution AN-VIH-1 grâce à l'obtention pour un même donneur, de prélèvements longitudinaux très tôt dans la primo-infection puis à différents temps au cours l'infection par le VIH-1, ce qui n'a jamais été réalisé à ce jour ; (iv) de scruter l'évolution des lignages IgA pour mettre en évidence une éventuelle coopération de lignages IgG/IgA.

CONCLUSION

Au cours de ces travaux, nous avons entrepris d'étudier et d'essayer de comprendre les mécanismes d'action par lesquels les bNAbs dits de seconde génération IgG et IgA sont capables d'interférer ou de bloquer la transmission et/ou la propagation du VIH-1.

Les muqueuses génitales et intestinales constituent les principales portes d'entrée du VIH-1. Plusieurs mécanismes d'action des anticorps ont été décrits tels que la neutralisation, le blocage de la transcytose virale, la capture de virus ou encore, l'effet des complexes anticorps-mucine pour piéger les virions. Nos investigations en utilisant des bNAbs de seconde génération d'isotypes IgG et IgA dans un modèle simple d'épithélium de l'endomètre humain ont montré qu'un des mécanismes probables par lequel les bNAbs préviennent la transmission de l'infection serait qu'ils ne bloquent pas le transport du virus à travers les cellules épithéliales génitales, mais qu'ils neutralisent les virions transcytosés en diminuant fortement leur infectivité. Tout comme les muqueuses, la barrière méningo-encéphalique est franchie par le VIH-1 très tôt durant la phase aigüe de la maladie, engendrant progressivement des désordres neurocognitifs chez 50 % des individus infectés sous traitements antirétroviraux. Notre travail original en utilisant des bNAbs de seconde génération et des anticorps peu ou pas neutralisants de classe IgG dans un modèle simple d'endothélium cérébral, décrit pour la première fois, le rôle clé de la neutralisation par les anticorps anti-enveloppe virale dans la protection contre l'invasion cérébrale par le VIH-1, malgré leur incapacité à bloquer la migration transendothéliale du virus. Globalement, ces travaux mettent en lumière le caractère essentiel de la capacité neutralisante parmi le large éventail des propriétés antivirales dont disposent les anticorps, pour prévenir la transmission et la dissémination du VIH-1.

Bien que de nombreux bNAbs IgG dits de première et de seconde générations ciblant les sept sites de vulnérabilité du VIH-1 ont été isolés de sujets *Elite neutralizers* et caractérisés au niveau moléculaire, structural et fonctionnel, ce n'est que très dernièrement, que les premiers bNAbs IgA anti-VIH-1 isolés chez deux donneurs chroniquement infectés, ont été décrits. Le caractère novateur de notre travail portant sur les bNAbs de type IgA est l'isolement chez un même contrôleur virémique, de trois lignages lymphocytaires B IgA^+ et/ou IgG^+ qui ciblent les N-glycanes associés au supersite N332. Cette étude permet ainsi, de mieux comprendre au niveau moléculaire, structural et fonctionnel, les cibles et les mécanismes antiviraux des IgA cross-neutralisants anti-VIH-1 au cours de l'infection.

Après près de quarante années d'intensives recherches pour mettre au point un vaccin efficace contre le VIH-1, de nombreuses évidences précliniques et cliniques indiquent qu'un vaccin protecteur contre le VIH-1 devrait induire des anticorps de type bNAbs. Les données issues de ce travail de thèse amènent des informations nouvelles d'importance sur les processus impliqués dans la prévention de la transmission/propagation du VIH-1, et sur

les réponses humorales IgA de type bNAbs au cours de l'infection par le VIH-1 qui confortent le développement de nouvelles stragégies vaccinales à base de bNAbs IgG et/ou IgA contre le VIH-1.

BIBLIOGRAPHIE

Abbott, R.K., Lee, J.H., Menis, S., Skog, P., Rossi, M., Ota, T., Kulp, D.W., Bhullar, D., Kalyuzhniy, O., Havenar-Daughton, C.*, et al.* (2018). Precursor Frequency and Affinity Determine B Cell Competitive Fitness in Germinal Centers, Tested with Germline-Targeting HIV Vaccine Immunogens. Immunity *48*, 133-146 e136.

Abela, I.A., Kadelka, C., and Trkola, A. (2019). Correlates of broadly neutralizing antibody development. Current opinion in HIV and AIDS *14*, 279-285.

Abreu, M.T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. Nature reviews Immunology *10*, 131-144.

Ackerman, M.E., Dugast, A.S., and Alter, G. (2012). Emerging concepts on the role of innate immunity in the prevention and control of HIV infection. Annual review of medicine *63*, 113-130.

Ackerman, M.E., Moldt, B., Wyatt, R.T., Dugast, A.S., McAndrew, E., Tsoukas, S., Jost, S., Berger, C.T., Sciaranghella, G., Liu, Q.*, et al.* (2011). A robust, high-throughput assay to determine the phagocytic activity of clinical antibody samples. Journal of immunological methods *366*, 8-19.

Afonso, P.V., Ozden, S., Cumont, M.C., Seilhean, D., Cartier, L., Rezaie, P., Mason, S., Lambert, S., Huerre, M., Gessain, A.*, et al.* (2008). Alteration of blood-brain barrier integrity by retroviral infection. PLoS pathogens *4*, e1000205.

Alexandre, K.B., Mufhandu, H.T., London, G.M., Chakauya, E., and Khati, M. (2016). Progress and Perspectives on HIV-1 microbicide development. Virology *497*, 69-80.

Alfsen, A., Iniguez, P., Bouguyon, E., and Bomsel, M. (2001). Secretory IgA specific for a conserved epitope on gp41 envelope glycoprotein inhibits epithelial transcytosis of HIV-1. Journal of immunology *166*, 6257-6265.

Allen, C.D., Okada, T., and Cyster, J.G. (2007). Germinal-center organization and cellular dynamics. Immunity *27*, 190-202.

Andras, I.E., and Toborek, M. (2011). HIV-1-induced alterations of claudin-5 expression at the blood-brain barrier level. Methods in molecular biology *762*, 355-370.

Antinori, A., Arendt, G., Becker, J.T., Brew, B.J., Byrd, D.A., Cherner, M., Clifford, D.B., Cinque, P., Epstein, L.G., Goodkin, K.*, et al.* (2007). Updated research nosology for HIV-associated neurocognitive disorders. Neurology *69*, 1789-1799.

Armbruster, C., Stiegler, G.M., Vcelar, B.A., Jager, W., Koller, U., Jilch, R., Ammann, C.G., Pruenster, M., Stoiber, H., and Katinger, H.W. (2004). Passive immunization with the anti-HIV-1 human monoclonal antibody (hMAb) 4E10 and the hMAb combination 4E10/2F5/2G12. The Journal of antimicrobial chemotherapy *54*, 915-920.

Arnold, J.N., Wormald, M.R., Sim, R.B., Rudd, P.M., and Dwek, R.A. (2007). The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. Annual review of immunology *25*, 21-50.

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

Asokan, M., Rudicell, R.S., Louder, M., McKee, K., O'Dell, S., Stewart-Jones, G., Wang, K., Xu, L., Chen, X., Choe, M.*, et al.* (2015). Bispecific Antibodies Targeting Different Epitopes on the HIV-1 Envelope Exhibit Broad and Potent Neutralization. Journal of virology *89*, 12501-12512.

Astronomo, R.D., Santra, S., Ballweber-Fleming, L., Westerberg, K.G., Mach, L., Hensley-McBain, T., Sutherland, L., Mildenberg, B., Morton, G., Yates, N.L.*, et al.* (2016). Neutralization Takes Precedence Over IgG or IgA Isotype-related Functions in Mucosal HIV-1 Antibody-mediated Protection. EBioMedicine *14*, 97-111.

Atluri, V.S., Hidalgo, M., Samikkannu, T., Kurapati, K.R., Jayant, R.D., Sagar, V., and Nair, M.P. (2015). Effect of human immunodeficiency virus on blood-brain barrier integrity and function: an update. Frontiers in cellular neuroscience *9*, 212.

Banks, W.A., Akerstrom, V., and Kastin, A.J. (1998). Adsorptive endocytosis mediates the passage of HIV-1 across the blood-brain barrier: evidence for a post-internalization coreceptor. Journal of cell science *111 (Pt 4)*, 533-540.

Banks, W.A., Freed, E.O., Wolf, K.M., Robinson, S.M., Franko, M., and Kumar, V.B. (2001). Transport of human immunodeficiency virus type 1 pseudoviruses across the blood-brain barrier: role of envelope proteins and adsorptive endocytosis. Journal of virology *75*, 4681-4691.

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

Bar-On, Y., Gruell, H., Schoofs, T., Pai, J.A., Nogueira, L., Butler, A.L., Millard, K., Lehmann, C., Suarez, I., Oliveira, T.Y.*, et al.* (2018). Safety and antiviral activity of combination HIV-1 broadly neutralizing antibodies in viremic individuals. Nature medicine *24*, 1701-1707.

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

Barnes, C.O., Gristick, H.B., Freund, N.T., Escolano, A., Lyubimov, A.Y., Hartweger, H., West, A.P., Jr., Cohen, A.E., Nussenzweig, M.C., and Bjorkman, P.J. (2018). Structural characterization of a highly-potent V3-glycan broadly neutralizing antibody bound to natively-glycosylated HIV-1 envelope. Nature communications *9*, 1251.

Barouch, D.H., Stephenson, K.E., Borducchi, E.N., Smith, K., Stanley, K., McNally, A.G., Liu, J., Abbink, P., Maxfield, L.F., Seaman, M.S.*, et al.* (2013a). Protective efficacy of a global HIV-1 mosaic vaccine against heterologous SHIV challenges in rhesus monkeys. Cell *155*, 531-539.

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

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.

Barrios, Y., Jirholt, P., and Ohlin, M. (2004). Length of the antibody heavy chain complementarity determining region 3 as a specificity-determining factor. Journal of molecular recognition : JMR *17*, 332-338.

Bbosa, N., Kaleebu, P., and Ssemwanga, D. (2019). HIV subtype diversity worldwide. Current opinion in HIV and AIDS *14*, 153-160.

Bednar, M.M., Sturdevant, C.B., Tompkins, L.A., Arrildt, K.T., Dukhovlinova, E., Kincer, L.P., and Swanstrom, R. (2015). Compartmentalization, Viral Evolution, and Viral Latency of HIV in the CNS. Current HIV/AIDS reports *12*, 262-271.

Benckert, J., Schmolka, N., Kreschel, C., Zoller, M.J., Sturm, A., Wiedenmann, B., and Wardemann, H. (2011). The majority of intestinal IgA+ and IgG+ plasmablasts in the human gut are antigen-specific. The Journal of clinical investigation *121*, 1946-1955.

Beretta, M., and Mouquet, H. (2019). [CRISPR-Cas9 editing of HIV-1 neutralizing human B cells]. Medecine sciences : M/S *35*, 993-996.

Berger, E.A., Murphy, P.M., and Farber, J.M. (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. Annual review of immunology *17*, 657-700.

Bertrand, L., Cho, H.J., and Toborek, M. (2019). Blood-brain barrier pericytes as a target for HIV-1 infection. Brain : a journal of neurology *142*, 502-511.

Bhardwaj, N., Hladik, F., and Moir, S. (2012). The immune response to HIV, pp. poster by Nature Reviews Immunology and Stemcell Technologies.

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

Blue, C.E., Spiller, O.B., and Blackbourn, D.J. (2004). The relevance of complement to virus biology. Virology *319*, 176-184.

Bobardt, M.D., Chatterji, U., Selvarajah, S., Van der Schueren, B., David, G., Kahn, B., and Gallay, P.A. (2007). Cell-free human immunodeficiency virus type 1 transcytosis through primary genital epithelial cells. Journal of virology *81*, 395-405.

Bomsel, M. (1997). Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. Nature medicine *3*, 42-47.

Bomsel, M., and Alfsen, A. (2003). Entry of viruses through the epithelial barrier: pathogenic trickery. Nature reviews Molecular cell biology *4*, 57-68.

Bomsel, M., Heyman, M., Hocini, H., Lagaye, S., Belec, L., Dupont, C., and Desgranges, C. (1998). Intracellular neutralization of HIV transcytosis across tight epithelial barriers by anti-HIV envelope protein dIgA or IgM. Immunity *9*, 277-287.

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.

Bonsignori, M., Hwang, K.K., Chen, X., Tsao, C.Y., Morris, L., Gray, E., Marshall, D.J., Crump, J.A., Kapiga, S.H., Sam, N.E.*, et al.* (2011). Analysis of a clonal lineage of HIV-1 envelope V2/V3 conformational epitope-specific broadly neutralizing antibodies and their inferred unmutated common ancestors. Journal of virology *85*, 9998-10009.

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

Bonsignori, M., Liao, H.X., Gao, F., Williams, W.B., Alam, S.M., Montefiori, D.C., and Haynes, B.F. (2017b). Antibody-virus co-evolution in HIV infection: paths for HIV vaccine development. Immunological reviews *275*, 145-160.

Bonsignori, M., Montefiori, D.C., Wu, X., Chen, X., Hwang, K.K., Tsao, C.Y., Kozink, D.M., Parks, R.J., Tomaras, G.D., Crump, J.A.*, et al.* (2012). Two distinct broadly neutralizing antibody specificities of different clonal lineages in a single HIV-1-infected donor: implications for vaccine design. Journal of virology *86*, 4688-4692.

Bournazos, S., Klein, F., Pietzsch, J., Seaman, M.S., Nussenzweig, M.C., and Ravetch, J.V. (2014). Broadly neutralizing anti-HIV-1 antibodies require Fc effector functions for in vivo activity. Cell *158*, 1243-1253.

Bouvin-Pley, M., Morgand, M., Meyer, L., Goujard, C., Moreau, A., Mouquet, H., Nussenzweig, M., Pace, C., Ho, D., Bjorkman, P.J.*, et al.* (2014). Drift of the HIV-1 Envelope Glycoprotein gp120 toward Increased Neutralization Resistance over the Course of the Epidemic: a Comprehensive Study Using the Most Potent and Broadly Neutralizing Monoclonal Antibodies. Journal of virology *88*, 13910.

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

Brandtzaeg, P. (2009). Mucosal Immunity: Induction, Dissemination, and Effector Functions. Scandinavian Journal of Immunology *70*, 505-515.

Brandtzaeg, P. (2013). Secretory IgA: Designed for Anti-Microbial Defense. Frontiers in immunology *4*, 222.

Brandtzaeg, P., and Johansen, F.E. (2005). Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. Immunological reviews *206*, 32-63.

Brandtzaeg, P., Kiyono, H., Pabst, R., and Russell, M.W. (2008). Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. Mucosal immunology *1*, 31-37.

Breitfeld, P.P., Harris, J.M., and Mostov, K.E. (1989). Postendocytotic sorting of the ligand for the polymeric immunoglobulin receptor in Madin-Darby canine kidney cells. The Journal of cell biology *109*, 475-486.

Brena, S., Cabezas-Olcoz, J., Moragues, M.D., Fernandez de Larrinoa, I., Dominguez, A., Quindos, G., and Ponton, J. (2011). Fungicidal monoclonal antibody C7 interferes with iron acquisition in Candida albicans. Antimicrobial agents and chemotherapy *55*, 3156-3163.

Briney, B., Sok, D., Jardine, J.G., Kulp, D.W., Skog, P., Menis, S., Jacak, R., Kalyuzhniy, O., de Val, N., Sesterhenn, F.*, et al.* (2016). Tailored Immunogens Direct Affinity Maturation toward HIV Neutralizing Antibodies. Cell *166*, 1459-1470 e1411.

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

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

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

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

Burton, D.R., and Mascola, J.R. (2015). Antibody responses to envelope glycoproteins in HIV-1 infection. Nature immunology *16*, 571-576.

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

Caffrey, M. (2011). HIV envelope: challenges and opportunities for development of entry inhibitors. Trends in microbiology *19*, 191-197.

Campbell, E.M., and Hope, T.J. (2015). HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. Nature reviews Microbiology *13*, 471-483.

Cao, J., Sullivan, N., Desjardin, E., Parolin, C., Robinson, J., Wyatt, R., and Sodroski, J. (1997). Replication and neutralization of human immunodeficiency virus type 1 lacking the V1 and V2 variable loops of the gp120 envelope glycoprotein. Journal of virology *71*, 9808-9812.

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

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

Carias, A.M., McCoombe, S., McRaven, M., Anderson, M., Galloway, N., Vandergrift, N., Fought, A.J., Lurain, J., Duplantis, M., Veazey, R.S.*, et al.* (2013). Defining the interaction of HIV-1 with the mucosal barriers of the female reproductive tract. Journal of virology *87*, 11388-11400.

Casadevall, A., and Pirofski, L.A. (2011). A new synthesis for antibody-mediated immunity. Nature immunology *13*, 21-28.

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

Caskey, M., Klein, F., and Nussenzweig, M.C. (2019). Broadly neutralizing anti-HIV-1 monoclonal antibodies in the clinic. Nature medicine *25*, 547-553.

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

Cavarelli, M., Foglieni, C., Rescigno, M., and Scarlatti, G. (2013). R5 HIV-1 envelope attracts dendritic cells to cross the human intestinal epithelium and sample luminal virions via engagement of the CCR5. EMBO molecular medicine *5*, 776-794.

Cenker, J.J., Stultz, R.D., and McDonald, D. (2017). Brain Microglial Cells Are Highly Susceptible to HIV-1 Infection and Spread. AIDS research and human retroviruses *33*, 1155-1165.

Cerutti, A. (2008). The regulation of IgA class switching. Nature reviews Immunology *8*, 421-434.

Chaillon, A., Gianella, S., Wertheim, J.O., Richman, D.D., Mehta, S.R., and Smith, D.M. (2014). HIV migration between blood and cerebrospinal fluid or semen over time. The Journal of infectious diseases *209*, 1642-1652.

Chaix, M.L., Descamps, D., Wirden, M., Bocket, L., Delaugerre, C., Tamalet, C., Schneider, V., Izopet, J., Masquelier, B., Rouzioux, C*., et al.* (2009). Stable frequency of HIV-1 transmitted drug resistance in patients at the time of primary infection over 1996-2006 in France. Aids *23*, 717-724.

Chaix, M.L., Seng, R., Frange, P., Tran, L., Avettand-Fenoel, V., Ghosn, J., Reynes, J., Yazdanpanah, Y., Raffi, F., Goujard, C*., et al.* (2013). Increasing HIV-1 non-B subtype primary infections in patients in France and effect of HIV subtypes on virological and immunological responses to combined antiretroviral therapy. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America *56*, 880-887.

Chaudhuri, J., and Alt, F.W. (2004). Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. Nature reviews Immunology *4*, 541-552.

Checkley, M.A., Luttge, B.G., and Freed, E.O. (2011). HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. Journal of molecular biology *410*, 582-608.

Cheeseman, H.M., Olejniczak, N.J., Rogers, P.M., Evans, A.B., King, D.F.L., Ziprin, P., Liao, H.X., Haynes, B.F., and Shattock, R.J. (2017). Broadly Neutralizing Antibodies Display Potential for Prevention of HIV-1 Infection of Mucosal Tissue Superior to That of Nonneutralizing Antibodies. Journal of virology *91*.

Chen, K., and Cerutti, A. (2010). New insights into the enigma of immunoglobulin D. Immunological reviews *237*, 160-179.

Chomont, N., Hocini, H., Gody, J.C., Bouhlal, H., Becquart, P., Krief-Bouillet, C., Kazatchkine, M., and Belec, L. (2008). Neutralizing monoclonal antibodies to human immunodeficiency virus type 1 do not inhibit viral transcytosis through mucosal epithelial cells. Virology *370*, 246-254.

Chung, A.W., Ghebremichael, M., Robinson, H., Brown, E., Choi, I., Lane, S., Dugast, A.-S., Schoen, M.K., Rolland, M., Suscovich, T.J*., et al.* (2014). Polyfunctional Fc-Effector Profiles Mediated by IgG Subclass Selection Distinguish RV144 and VAX003 Vaccines. Science translational medicine *6*, 228ra238.

Chung, A.W., Kumar, M.P., Arnold, K.B., Yu, W.H., Schoen, M.K., Dunphy, L.J., Suscovich, T.J., Frahm, N., Linde, C., Mahan, A.E*., et al.* (2015). Dissecting Polyclonal Vaccine-Induced Humoral Immunity against HIV Using Systems Serology. Cell *163*, 988-998.

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

Clifford, D.B., and Ances, B.M. (2013). HIV-associated neurocognitive disorder. The Lancet Infectious diseases *13*, 976-986.

Cohen, M.S., Shaw, G.M., McMichael, A.J., and Haynes, B.F. (2011). Acute HIV-1 Infection. The New England journal of medicine *364*, 1943-1954.

Cohen, Y.Z., Lorenzi, J.C.C., Krassnig, L., Barton, J.P., Burke, L., Pai, J., Lu, C.L., Mendoza, P., Oliveira, T.Y., Sleckman, C*., et al.* (2018). Relationship between latent and rebound viruses in a clinical trial of anti-HIV-1 antibody 3BNC117. The Journal of experimental medicine *215*, 2311-2324.

Conley, M.E., and Delacroix, D.L. (1987). Intravascular and mucosal immunoglobulin A: two separate but related systems of immune defense? Annals of internal medicine *106*, 892-899.

Connell, B.J., and Lortat-Jacob, H. (2013). Human immunodeficiency virus and heparan sulfate: from attachment to entry inhibition. Frontiers in immunology *4*, 385.

Connolly, S.E., Thanassi, D.G., and Benach, J.L. (2004). Generation of a complement-independent bactericidal IgM against a relapsing fever Borrelia. Journal of immunology *172*, 1191-1197.

Connor, R.I., Sheridan, K.E., Ceradini, D., Choe, S., and Landau, N.R. (1997). Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. The Journal of experimental medicine *185*, 621-628.

Cook, S.H., and Griffin, D.E. (2003). Luciferase imaging of a neurotropic viral infection in intact animals. Journal of virology *77*, 5333-5338.

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

Cromer, D., Grimm, A.J., Schlub, T.E., Mak, J., and Davenport, M.P. (2016). Estimating the in-vivo HIV template switching and recombination rate. Aids *30*, 185-192.

Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). Annual review of immunology *29*, 621-663.

da Silva, R.C., Segat, L., and Crovella, S. (2011). Role of DC-SIGN and L-SIGN receptors in HIV-1 vertical transmission. Human immunology *72*, 305-311.

Daniels, C.N., and Saunders, K.O. (2019). Antibody responses to the HIV-1 envelope high mannose patch. Advances in immunology *143*, 11-73.

Davis, L.E., Hjelle, B.L., Miller, V.E., Palmer, D.L., Llewellyn, A.L., Merlin, T.L., Young, S.A., Mills, R.G., Wachsman, W., and Wiley, C.A. (1992). Early viral brain invasion in iatrogenic human immunodeficiency virus infection. Neurology *42*, 1736-1739.

de Taeye, S.W., Go, E.P., Sliepen, K., de la Pena, A.T., Badal, K., Medina-Ramirez, M., Lee, W.H., Desaire, H., Wilson, I.A., Moore, J.P.*, et al.* (2019). Stabilization of the V2 loop improves the presentation of V2 loop-associated broadly neutralizing antibody epitopes on HIV-1 envelope trimers. The Journal of biological chemistry *294*, 5616-5631.

Deeks, S.G., Lewin, S.R., and Havlir, D.V. (2013). The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. Lancet *382*, 1525-1533.

Deeks, S.G., Overbaugh, J., Phillips, A., and Buchbinder, S. (2015). HIV infection. Nature reviews Disease primers *1*, 15035.

Devito, C., Broliden, K., Kaul, R., Svensson, L., Johansen, K., Kiama, P., Kimani, J., Lopalco, L., Piconi, S., Bwayo, J.J.*, et al.* (2000). Mucosal and plasma IgA from HIV-1-exposed uninfected individuals inhibit HIV-1 transcytosis across human epithelial cells. Journal of immunology *165*, 5170-5176.

Dickens, D., Radisch, S., and Pirmohamed, M. (2016). Drug Transporters at the Blood-brain barrier. In Drug Transporters, G. Nicholls, and K. Youdim, eds. (Royal Society of Chemistry), pp. 151-183.

Diebolder, C.A., Beurskens, F.J., de Jong, R.N., Koning, R.I., Strumane, K., Lindorfer, M.A., Voorhorst, M., Ugurlar, D., Rosati, S., Heck, A.J.*, et al.* (2014). Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. Science *343*, 1260-1263.

DiLillo, D.J., Tan, G.S., Palese, P., and Ravetch, J.V. (2014). Broadly neutralizing hemagglutinin stalk-specific antibodies require FcgammaR interactions for protection against influenza virus in vivo. Nature medicine *20*, 143-151.

Ding, X., Diaz, L.A., Fairley, J.A., Giudice, G.J., and Liu, Z. (1999). The anti-desmoglein 1 autoantibodies in pemphigus vulgaris sera are pathogenic. The Journal of investigative dermatology *112*, 739-743.

Dohgu, S., Ryerse, J.S., Robinson, S.M., and Banks, W.A. (2012). Human immunodeficiency virus-1 uses the mannose-6-phosphate receptor to cross the blood-brain barrier. PloS one *7*, e39565.

Doria-Rose, N.A., Bhiman, J.N., Roark, R.S., Schramm, C.A., Gorman, J., Chuang, G.Y., Pancera, M., Cale, E.M., Ernandes, M.J., Louder, M.K.*, et al.* (2016). New Member of the V1V2-Directed CAP256-VRC26 Lineage That Shows Increased Breadth and Exceptional Potency. Journal of virology *90*, 76-91.

Doria-Rose, N.A., Georgiev, I., O'Dell, S., Chuang, G.Y., Staupe, R.P., McLellan, J.S., Gorman, J., Pancera, M., Bonsignori, M., Haynes, B.F.*, et al.* (2012). A short segment of the HIV-1 gp120 V1/V2 region is a major determinant of resistance to V1/V2 neutralizing antibodies. Journal of virology *86*, 8319-8323.

Doria-Rose, N.A., Klein, R.M., Daniels, M.G., O'Dell, S., Nason, M., Lapedes, A., Bhattacharya, T., Migueles, S.A., Wyatt, R.T., Korber, B.T.*, et al.* (2010). Breadth of human immunodeficiency virus-specific neutralizing activity in sera: clustering analysis and association with clinical variables. Journal of virology *84*, 1631-1636.

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

Dosenovic, P., Kara, E.E., Pettersson, A.K., McGuire, A.T., Gray, M., Hartweger, H., Thientosapol, E.S., Stamatatos, L., and Nussenzweig, M.C. (2018). Anti-HIV-1 B cell responses are dependent on B cell precursor frequency and antigen-binding affinity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *115*, 4743-4748.

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

Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science *346*, 1258096.

Duchemin, M., Khamassi, M., Xu, L., Tudor, D., and Bomsel, M. (2018). IgA Targeting Human Immunodeficiency Virus-1 Envelope gp41 Triggers Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Cross-Clade and Cooperates with gp41-Specific IgG to Increase Cell Lysis. Frontiers in immunology *9*, 244.

Duchemin, M., Tudor, D., Cottignies-Calamarte, A., and Bomsel, M. (2020). Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis of HIV-1-Infected Cells Is Efficiently Triggered by IgA Targeting HIV-1 Envelope Subunit gp41. Frontiers in immunology *11*, 1141.

Dufloo, J., Bruel, T., and Schwartz, O. (2018). HIV-1 cell-to-cell transmission and broadly neutralizing antibodies. Retrovirology *15*, 51.

Dufloo, J., Guivel-Benhassine, F., Buchrieser, J., Lorin, V., Grzelak, L., Dupouy, E., Mestrallet, G., Bourdic, K., Lambotte, O., Mouquet, H.*, et al.* (2020). Anti-HIV-1 antibodies trigger non-lytic complement deposition on infected cells. EMBO reports *21*, e49351.

Dunkelberger, J.R., and Song, W.C. (2010). Complement and its role in innate and adaptive immune responses. Cell research *20*, 34-50.

Edinger, A.L., Mankowski, J.L., Doranz, B.J., Margulies, B.J., Lee, B., Rucker, J., Sharron, M., Hoffman, T.L., Berson, J.F., Zink, M.C.*, et al.* (1997). CD4-independent, CCR5-dependent infection of brain capillary endothelial cells by a neurovirulent simian immunodeficiency virus strain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *94*, 14742-14747.

Emskoetter, T., von Laer, D., Veismann, S., and Ermer, M. (1989). Human immunodeficiency virus (HIV)-specific antibodies, neutralizing activity and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) in the cerebrospinal fluid of HIV-infected patients. Journal of neuroimmunology *24*, 61-66.

Escolano, A., Gristick, H.B., Abernathy, M.E., Merkenschlager, J., Gautam, R., Oliveira, T.Y., Pai, J., West, A.P., Jr., Barnes, C.O., Cohen, A.A.*, et al.* (2019). Immunization expands B cells specific to HIV-1 V3 glycan in mice and macaques. Nature *570*, 468-473.

Escolano, A., Steichen, J.M., Dosenovic, P., Kulp, D.W., Golijanin, J., Sok, D., Freund, N.T., Gitlin, A.D., Oliveira, T., Araki, T.*, et al.* (2016). Sequential Immunization Elicits Broadly Neutralizing Anti-HIV-1 Antibodies in Ig Knockin Mice. Cell *166*, 1445-1458 e1412.

Eugenin, E.A., and Berman, J.W. (2007). Gap junctions mediate human immunodeficiency virus-bystander killing in astrocytes. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *27*, 12844-12850.

Eugenin, E.A., and Berman, J.W. (2012). Mechanisms of viral and cell entry into the central nervous system. In The neurology of AIDS. Gendelman, HE., Grant, I., Everall, IP., Fox, HS., Gelbard, HA., Lipton, SA. Swindells, S (Oxford University Press), pp. 231-242.

Euler, Z., and Schuitemaker, H. (2012). Cross-reactive broadly neutralizing antibodies: timing is everything. Frontiers in immunology *3*, 215.

Euler, Z., van Gils, M.J., Bunnik, E.M., Phung, P., Schweighardt, B., Wrin, T., and Schuitemaker, H. (2010). Cross-reactive neutralizing humoral immunity does not protect from HIV type 1 disease progression. The Journal of infectious diseases *201*, 1045-1053.

Fahrbach, K.M., Malykhina, O., Stieh, D.J., and Hope, T.J. (2013). Differential binding of IgG and IgA to mucus of the female reproductive tract. PloS one *8*, e76176.

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.

Fanibunda, S.E., Modi, D.N., Gokral, J.S., and Bandivdekar, A.H. (2011). HIV gp120 binds to mannose receptor on vaginal epithelial cells and induces production of matrix metalloproteinases. PloS one *6*, e28014.

Finlay, W.J., and Almagro, J.C. (2012). Natural and man-made V-gene repertoires for antibody discovery. Frontiers in immunology *3*, 342.

Fischer, W., Ganusov, V.V., Giorgi, E.E., Hraber, P.T., Keele, B.F., Leitner, T., Han, C.S., Gleasner, C.D., Green, L., Lo, C.C.*, et al.* (2010). Transmission of single HIV-1 genomes and dynamics of early immune escape revealed by ultra-deep sequencing. PloS one *5*, e12303.

Flyak, A.I., Ruiz, S., Colbert, M.D., Luong, T., Crowe, J.E., Jr., Bailey, J.R., and Bjorkman, P.J. (2018). HCV Broadly Neutralizing Antibodies Use a CDRH3 Disulfide Motif to Recognize an E2 Glycoprotein Site that Can Be Targeted for Vaccine Design. Cell host & microbe *24*, 703-716 e703.

Foley, B.T., and (2017). HIV and SIV Evolution in Shapshak. P et al (eds) Global Virology II - HIV and NeuroAIDS (Springer New York, NY).

Freed, E.O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. Nature reviews Microbiology *13*, 484-496.

Freeman, E.E., Weiss, H.A., Glynn, J.R., Cross, P.L., Whitworth, J.A., and Hayes, R.J. (2006). Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. Aids *20*, 73-83.

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

Frouard, J., Le Tortorec, A., and Dejucq-Rainsford, N. (2018). In vitro models for deciphering the mechanisms underlying the sexual transmission of viruses at the mucosal level. Virology *515*, 1-10.

Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B.*, et al.* (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. Science *224*, 500-503.

Ganusov, V.V., Goonetilleke, N., Liu, M.K., Ferrari, G., Shaw, G.M., McMichael, A.J., Borrow, P., Korber, B.T., and Perelson, A.S. (2011). Fitness costs and diversity of the cytotoxic T lymphocyte (CTL) response determine the rate of CTL escape during acute and chronic phases of HIV infection. Journal of virology *85*, 10518-10528.

Gao, F., Bonsignori, M., Liao, H.X., Kumar, A., Xia, S.M., Lu, X., Cai, F., Hwang, K.K., Song, H., Zhou, T.*, et al.* (2014). Cooperation of B cell lineages in induction of HIV-1-broadly neutralizing antibodies. Cell *158*, 481-491.

Gaudinski, M.R., Coates, E.E., Houser, K.V., Chen, G.L., Yamshchikov, G., Saunders, J.G., Holman, L.A., Gordon, I., Plummer, S., Hendel, C.S.*, et al.* (2018). Safety and pharmacokinetics of the Fc-modified HIV-1 human monoclonal antibody VRC01LS: A Phase 1 open-label clinical trial in healthy adults. PLoS medicine *15*, e1002493.

Gautam, R., Nishimura, Y., Gaughan, N., Gazumyan, A., Schoofs, T., Buckler-White, A., Seaman, M.S., Swihart, B.J., Follmann, D.A., Nussenzweig, M.C.*, et al.* (2018). A single injection of crystallizable fragment domain-modified antibodies elicits durable protection from SHIV infection. Nature medicine *24*, 610-616.

Gautam, R., Nishimura, Y., Pegu, A., Nason, M.C., Klein, F., Gazumyan, A., Golijanin, J., Buckler-White, A., Sadjadpour, R., Wang, K.*, et al.* (2016). A single injection of anti-HIV-1 antibodies protects against repeated SHIV challenges. Nature *533*, 105-109.

Gayet, R., Michaud, E., Nicoli, F., Chanut, B., Paul, M., Rochereau, N., Guillon, C., He, Z., Papagno, L., Bioley, G.*, et al.* (2020). Impact of IgA isoforms on their ability to activate dendritic cells and to prime T cells. European journal of immunology.

Gomes, M.C., and Mostowy, S. (2020). The Case for Modeling Human Infection in Zebrafish. Trends in microbiology *28*, 10-18.

Gonzalez, S.M., Aguilar-Jimenez, W., Su, R.C., and Rugeles, M.T. (2019). Mucosa: Key Interactions Determining Sexual Transmission of the HIV Infection. Frontiers in immunology *10*, 144.

Gonzalez-Scarano, F., and Martin-Garcia, J. (2005). The neuropathogenesis of AIDS. Nature reviews Immunology *5*, 69-81.

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

Gorantla, S., Makarov, E., Finke-Dwyer, J., Castanedo, A., Holguin, A., Gebhart, C.L., Gendelman, H.E., and Poluektova, L. (2010). Links between progressive HIV-1 infection of humanized mice and viral neuropathogenesis. Am J Pathol *177*, 2938-2949.

Gray, E.S., Madiga, M.C., Hermanus, T., Moore, P.L., Wibmer, C.K., Tumba, N.L., Werner, L., Mlisana, K., Sibeko, S., Williamson, C.*, et al.* (2011). The neutralization breadth of HIV-1 develops incrementally over four years and is associated with CD4+ T cell decline and high viral load during acute infection. Journal of virology *85*, 4828-4840.

Greenberg, A.S., Avila, D., Hughes, M., Hughes, A., McKinney, E.C., and Flajnik, M.F. (1995). A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. Nature *374*, 168-173.

Gristick, H.B., von Boehmer, L., West, A.P., Jr., Schamber, M., Gazumyan, A., Golijanin, J., Seaman, M.S., Fatkenheuer, G., Klein, F., Nussenzweig, M.C.*, et al.* (2016). Natively glycosylated HIV-1 Env structure reveals new mode for antibody recognition of the CD4-binding site. Nature structural & molecular biology *23*, 906-915.

Grobben, M., Stuart, R.A., and van Gils, M.J. (2019). The potential of engineered antibodies for HIV-1 therapy and cure. Current opinion in virology *38*, 70-80.

Group, I.S.S., Lundgren, J.D., Babiker, A.G., Gordin, F., Emery, S., Grund, B., Sharma, S., Avihingsanon, A., Cooper, D.A., Fatkenheuer, G.*, et al.* (2015). Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. The New England journal of medicine *373*, 795-807.

Gruell, H., and Klein, F. (2018). Antibody-mediated prevention and treatment of HIV-1 infection. Retrovirology *15*, 73.

Gunn, B., Schneider, J., Shansab, M., Bastian, A.R., Fahrbach, K., Smith, A.t., Mahan, A., Karim, M., Licht, A., Zvonar, I.*, et al.* (2016). Enhanced binding of antibodies generated during chronic HIV infection to mucus component MUC16. Mucosal immunology *9*, 1549-1558.

Gupta, S., Gach, J.S., Becerra, J.C., Phan, T.B., Pudney, J., Moldoveanu, Z., Joseph, S.B., Landucci, G., Supnet, M.J., Ping, L.H.*, et al.* (2013). The Neonatal Fc receptor (FcRn) enhances human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transcytosis across epithelial cells. PLoS pathogens *9*, e1003776.

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.

Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E.B., Bendahman, N., and Hamers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. Nature *363*, 446-448.

Hangartner, L., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (2006). Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum. Nature Reviews Immunology *6*, 231-243.

Hansen, I.S., Baeten, D.L.P., and den Dunnen, J. (2019). The inflammatory function of human IgA. Cellular and molecular life sciences : CMLS *76*, 1041-1055.

Hartweger, H., McGuire, A.T., Horning, M., Taylor, J.J., Dosenovic, P., Yost, D., Gazumyan, A., Seaman, M.S., Stamatatos, L., Jankovic, M.*, et al.* (2019). HIV-specific humoral immune responses by CRISPR/Cas9-edited B cells. The Journal of experimental medicine *216*, 1301-1310.

Hatherell, K., Couraud, P.O., Romero, I.A., Weksler, B., and Pilkington, G.J. (2011). Development of a three-dimensional, all-human in vitro model of the blood-brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models. Journal of neuroscience methods *199*, 223-229.

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

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

He, B., Xu, W., Santini, P.A., Polydorides, A.D., Chiu, A., Estrella, J., Shan, M., Chadburn, A., Villanacci, V., Plebani, A.*, et al.* (2007). Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. Immunity *26*, 812-826.

Heineke, M.H., and van Egmond, M. (2017). Immunoglobulin A: magic bullet or Trojan horse? European journal of clinical investigation *47*, 184-192.

Helms, H.C., Abbott, N.J., Burek, M., Cecchelli, R., Couraud, P.O., Deli, M.A., Forster, C., Galla, H.J., Romero, I.A., Shusta, E.V.*, et al.* (2016). In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *36*, 862-890.

Herr, A.B., Ballister, E.R., and Bjorkman, P.J. (2003). Insights into IgA-mediated immune responses from the crystal structures of human FcalphaRI and its complex with IgA1-Fc. Nature *423*, 614-620.

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

Hoffman, T.L., and Doms, R.W. (1999). HIV-1 envelope determinants for cell tropism and chemokine receptor use. Molecular membrane biology *16*, 57-65.

Honeycutt, J.B., Sheridan, P.A., Matsushima, G.K., and Garcia, J.V. (2015). Humanized mouse models for HIV-1 infection of the CNS. Journal of neurovirology *21*, 301-309.

Hong, S., and Banks, W.A. (2015). Role of the immune system in HIV-associated neuroinflammation and neurocognitive implications. Brain, behavior, and immunity *45*, 1-12.

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 e610.

Horwitz, J.A., Halper-Stromberg, A., Mouquet, H., Gitlin, A.D., Tretiakova, A., Eisenreich, T.R., Malbec, M., Gravemann, S., Billerbeck, E., Dorner, M.*, et al.* (2013). HIV-1 suppression and durable control by combining single broadly neutralizing antibodies and antiretroviral drugs in humanized mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *110*, 16538-16543.

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

Huang, J., Kang, B.H., Ishida, E., Zhou, T., Griesman, T., Sheng, Z., Wu, F., Doria-Rose, N.A., Zhang, B., McKee, K.*, et al.* (2016a). Identification of a CD4-Binding-Site Antibody to HIV that Evolved Near-Pan Neutralization Breadth. Immunity *45*, 1108-1121.

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

Huang, J., Ofek, G., Laub, L., Louder, M.K., Doria-Rose, N.A., Longo, N.S., Imamichi, H., Bailer, R.T., Chakrabarti, B., Sharma, S.K.*, et al.* (2012). Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. Nature *491*, 406-412.

Huang, Y., Yu, J., Lanzi, A., Yao, X., Andrews, C.D., Tsai, L., Gajjar, M.R., Sun, M., Seaman, M.S., Padte, N.N., *et al.* (2016b). Engineered Bispecific Antibodies with Exquisite HIV-1-Neutralizing Activity. Cell *165*, 1621-1631.

Hur, E.M., Patel, S.N., Shimizu, S., Rao, D.S., Gnanapragasam, P.N., An, D.S., Yang, L., and Baltimore, D. (2012). Inhibitory effect of HIV-specific neutralizing IgA on mucosal transmission of HIV in humanized mice. Blood *120*, 4571-4582.

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

Irimia, A., Sarkar, A., Stanfield, R.L., and Wilson, I.A. (2016). Crystallographic Identification of Lipid as an Integral Component of the Epitope of HIV Broadly Neutralizing Antibody 4E10. Immunity *44*, 21-31.

Ivey, N.S., MacLean, A.G., and Lackner, A.A. (2009). Acquired immunodeficiency syndrome and the blood-brain barrier. Journal of neurovirology *15*, 111-122.

Jardine, J.G., Ota, T., Sok, D., Pauthner, M., Kulp, D.W., Kalyuzhniy, O., Skog, P.D., Thinnes, T.C., Bhullar, D., Briney, B., *et al.* (2015). HIV-1 VACCINES. Priming a broadly neutralizing antibody response to HIV-1 using a germline-targeting immunogen. Science *349*, 156-161.

Jia, M., Liberatore, R.A., Guo, Y., Chan, K.W., Pan, R., Lu, H., Waltari, E., Mittler, E., Chandran, K., Finzi, A., *et al.* (2020). VSV-Displayed HIV-1 Envelope Identifies Broadly Neutralizing Antibodies Class-Switched to IgG and IgA. Cell host & microbe.

Jones, L.D., Jackson, J.W., and Maggirwar, S.B. (2016). Modeling HIV-1 Induced Neuroinflammation in Mice: Role of Platelets in Mediating Blood-Brain Barrier Dysfunction. PloS one *11*, e0151702-e0151702.

Joos, B., Trkola, A., Kuster, H., Aceto, L., Fischer, M., Stiegler, G., Armbruster, C., Vcelar, B., Katinger, H., and Gunthard, H.F. (2006). Long-term multiple-dose pharmacokinetics of human monoclonal antibodies (MAbs) against human immunodeficiency virus type 1 envelope gp120 (MAb 2G12) and gp41 (MAbs 4E10 and 2F5). Antimicrobial agents and chemotherapy *50*, 1773-1779.

Jordan, C.A., Watkins, B.A., Kufta, C., and Dubois-Dalcq, M. (1991). Infection of brain microglial cells by human immunodeficiency virus type 1 is CD4 dependent. Journal of virology *65*, 736-742.

Julg, B., Pegu, A., Abbink, P., Liu, J., Brinkman, A., Molloy, K., Mojta, S., Chandrashekar, A., Callow, K., Wang, K., *et al.* (2017). Virological Control by the CD4-Binding Site Antibody N6 in Simian-Human Immunodeficiency Virus-Infected Rhesus Monkeys. Journal of virology *91*.

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

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

Kaetzel, C.S. (2007). Mucosal Immune Defense: Immunoglobulin A (Springer, Boston, MA).

Kahn, J.O., and Walker, B.D. (1998). Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. The New England journal of medicine *339*, 33-39.

Kanmogne, G.D., Primeaux, C., and Grammas, P. (2005). HIV-1 gp120 proteins alter tight junction protein expression and brain endothelial cell permeability: implications for the pathogenesis of HIV-associated dementia. Journal of neuropathology and experimental neurology *64*, 498-505.

Karagiannis, S.N., Karagiannis, P., Josephs, D.H., Saul, L., Gilbert, A.E., Upton, N., and Gould, H.J. (2013). Immunoglobulin E and Allergy: Antibodies in Immune Inflammation and Treatment. Microbiology spectrum *1*.

Karris, M.A., and Smith, D.M. (2011). Tissue-specific HIV-1 infection: why it matters. Future virology *6*, 869-882.

Keele, B.F., Giorgi, E.E., Salazar-Gonzalez, J.F., Decker, J.M., Pham, K.T., Salazar, M.G., Sun, C., Grayson, T., Wang, S., Li, H.*, et al.* (2008). Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *105*, 7552-7557.

Khaitan, A., and Unutmaz, D. (2011). Revisiting immune exhaustion during HIV infection. Current HIV/AIDS reports *8*, 4-11.

Kindt, T.J., Goldsby, R.A., and Osborne, B.A. (2007). Immunology, 6th edition edn (W.H. Freeman).

Kinlock, B.L., Wang, Y., Turner, T.M., Wang, C., and Liu, B. (2014). Transcytosis of HIV-1 through vaginal epithelial cells is dependent on trafficking to the endocytic recycling pathway. PloS one *9*, e96760.

Kirchhoff, F. (2013). HIV Life Cycle: Overview, Vol Encyclopedia of AIDS (Springer).

Klasse, P.J. (2014). Neutralization of Virus Infectivity by Antibodies: Old Problems in New Perspectives. Advances in biology *2014*.

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

Klein, J.S., and Bjorkman, P.J. (2010). Few and far between: how HIV may be evading antibody avidity. PLoS pathogens *6*, e1000908.

Ko, S.Y., Pegu, A., Rudicell, R.S., Yang, Z.Y., Joyce, M.G., Chen, X., Wang, K., Bao, S., Kraemer, T.D., Rath, T.*, et al.* (2014). Enhanced neonatal Fc receptor function improves protection against primate SHIV infection. Nature *514*, 642-645.

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

Kong, L., Torrents de la Pena, A., Deller, M.C., Garces, F., Sliepen, K., Hua, Y., Stanfield, R.L., Sanders, R.W., and Wilson, I.A. (2015). Complete epitopes for vaccine design derived from a crystal structure of the broadly neutralizing antibodies PGT128 and 8ANC195 in complex with an HIV-1 Env trimer. Acta crystallographica Section D, Biological crystallography *71*, 2099-2108.

Kong, R., Xu, K., Zhou, T., Acharya, P., Lemmin, T., Liu, K., Ozorowski, G., Soto, C., Taft, J.D., Bailer, R.T.*, et al.* (2016). Fusion peptide of HIV-1 as a site of vulnerability to neutralizing antibody. Science *352*, 828-833.

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

Korber, B., Muldoon, M., Theiler, J., Gao, F., Gupta, R., Lapedes, A., Hahn, B.H., Wolinsky, S., and Bhattacharya, T. (2000). Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. Science *288*, 1789-1796.
Kurosaki, T., Shinohara, H., and Baba, Y. (2010a). B cell signaling and fate decision. Annual review of immunology *28*, 21-55.

Kumar, S., Sarkar, A., Pugach, P., Sanders, R.W., Moore, J.P., Ward, A.B., and Wilson, I.A. (2019). Capturing the inherent structural dynamics of the HIV-1 envelope glycoprotein fusion peptide. Nature communications *10*, 763.

Kurosaki, T., Shinohara, H., and Baba, Y. (2010). B Cell Signaling and Fate Decision. In Annual Review of Immunology, Vol 28, W.E. Paul, D.R. Littman, and W.M. Yokoyama, eds., pp. 21-55.

Kutuzov, N., Flyvbjerg, H., and Lauritzen, M. (2018). Contributions of the glycocalyx, endothelium, and extravascular compartment to the blood–brain barrier. Proceedings of the National Academy of Sciences *115*, E9429.

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.

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

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

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

Lee, J.H., de Val, N., Lyumkis, D., and Ward, A.B. (2015a). Model Building and Refinement of a Natively Glycosylated HIV-1 Env Protein by High-Resolution Cryoelectron Microscopy. Structure *23*, 1943-1951.

Lee, J.H., Leaman, D.P., Kim, A.S., Torrents de la Pena, A., Sliepen, K., Yasmeen, A., Derking, R., Ramos, A., de Taeye, S.W., Ozorowski, G.*, et al.* (2015b). Antibodies to a conformational epitope on gp41 neutralize HIV-1 by destabilizing the Env spike. Nature communications *6*, 8167.

Lemey, P., Pybus, O.G., Rambaut, A., Drummond, A.J., Robertson, D.L., Roques, P., Worobey, M., and Vandamme, A.M. (2004). The molecular population genetics of HIV-1 group O. Genetics *167*, 1059-1068.

Lemey, P., Pybus, O.G., Wang, B., Saksena, N.K., Salemi, M., and Vandamme, A.M. (2003). Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *100*, 6588-6592.

Letendre, S., Marquie-Beck, J., Capparelli, E., Best, B., Clifford, D., Collier, A.C., Gelman, B.B., McArthur, J.C., McCutchan, J.A., Morgello, S.*, et al.* (2008). Validation of the CNS Penetration-Effectiveness rank for quantifying antiretroviral penetration into the central nervous system. Archives of neurology *65*, 65-70.

Li, G., Piampongsant, S., Faria, N.R., Voet, A., Pineda-Pena, A.C., Khouri, R., Lemey, P., Vandamme, A.M., and Theys, K. (2015). An integrated map of HIV genome-wide variation from a population perspective. Retrovirology *12*, 18.

Li, L., Wang, X.H., Banerjee, S., Volsky, B., Williams, C., Virland, D., Nadas, A., Seaman, M.S., Chen, X., Spearman, P.*, et al.* (2012a). Different pattern of immunoglobulin gene usage by HIV-1 compared to non-HIV-1 antibodies derived from the same infected subject. PloS one *7*, e39534.

Li, T., Bourgeois, J.P., Celli, S., Glacial, F., Le Sourd, A.M., Mecheri, S., Weksler, B., Romero, I., Couraud, P.O., Rougeon, F.*, et al.* (2012b). Cell-penetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the blood-brain barrier and specifically recognize astrocytes: application to brain imaging. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *26*, 3969-3979.

Li, Z., Palaniyandi, S., Zeng, R., Tuo, W., Roopenian, D.C., and Zhu, X. (2011). Transfer of IgG in the female genital tract by MHC class I-related neonatal Fc receptor (FcRn) confers protective immunity to vaginal infection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *108*, 4388-4393.

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

Lopez, E., Shattock, R.J., Kent, S.J., and Chung, A.W. (2018). The Multifaceted Nature of Immunoglobulin A and Its Complex Role in HIV. AIDS research and human retroviruses *34*, 727-738.

Lorin, V., Malbec, M., Eden, C., Bruel, T., Porrot, F., Seaman, M.S., Schwartz, O., and Mouquet, H. (2017). Broadly neutralizing antibodies suppress post-transcytosis HIV-1 infectivity. Mucosal immunology *10*, 814-826.

Lorin, V., and Mouquet, H. (2015). Efficient generation of human IgA monoclonal antibodies. Journal of immunological methods *422*, 102-110.

Lu, L.L., Suscovich, T.J., Fortune, S.M., and Alter, G. (2018). Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. Nature reviews Immunology *18*, 46-61.

Lutgen, V., Narasipura, S.D., Barbian, H.J., Richards, M., Wallace, J., Razmpour, R., Buzhdygan, T., Ramirez, S.H., Prevedel, L., Eugenin, E.A.*, et al.* (2020). HIV infects astrocytes in vivo and egresses from the brain to the periphery. PLoS pathogens *16*, e1008381.

Lynch, R.M., Boritz, E., Coates, E.E., DeZure, A., Madden, P., Costner, P., Enama, M.E., Plummer, S., Holman, L., Hendel, C.S.*, et al.* (2015). Virologic effects of broadly neutralizing antibody VRC01 administration during chronic HIV-1 infection. Science translational medicine *7*, 319ra206.

Macpherson, A.J., McCoy, K.D., Johansen, F.E., and Brandtzaeg, P. (2008). The immune geography of IgA induction and function. Mucosal immunology *1*, 11-22.

Malbec, M., Porrot, F., Rua, R., Horwitz, J., Klein, F., Halper-Stromberg, A., Scheid, J.F., Eden, C., Mouquet, H., Nussenzweig, M.C.*, et al.* (2013). Broadly neutralizing antibodies that inhibit HIV-1 cell to cell transmission. The Journal of experimental medicine *210*, 2813-2821.

Mantis, N.J., Palaia, J., Hessell, A.J., Mehta, S., Zhu, Z., Corthesy, B., Neutra, M.R., Burton, D.R., and Janoff, E.N. (2007). Inhibition of HIV-1 infectivity and epithelial cell transfer by human monoclonal IgG and IgA antibodies carrying the b12 V region. Journal of immunology *179*, 3144-3152.

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

Mascola, J.R., Lewis, M.G., Stiegler, G., Harris, D., VanCott, T.C., Hayes, D., Louder, M.K., Brown, C.R., Sapan, C.V., Frankel, S.S.*, et al.* (1999). Protection of Macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. Journal of virology *73*, 4009-4018.

Mayer, K.H., Seaton, K.E., Huang, Y., Grunenberg, N., Isaacs, A., Allen, M., Ledgerwood, J.E., Frank, I., Sobieszczyk, M.E., Baden, L.R.*, et al.* (2017). Safety, pharmacokinetics, and immunological activities of multiple intravenous or subcutaneous doses of an anti-HIV monoclonal antibody, VRC01, administered to HIV-uninfected adults: Results of a phase 1 randomized trial. PLoS medicine *14*, e1002435.

Mazzoli, S., Trabattoni, D., Lo Caputo, S., Piconi, S., Ble, C., Meacci, F., Ruzzante, S., Salvi, A., Semplici, F., Longhi, R.*, et al.* (1997). HIV-specific mucosal and cellular immunity in HIV-seronegative partners of HIV-seropositive individuals. Nature medicine *3*, 1250-1257.

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

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

McRae, M. (2016). HIV and viral protein effects on the blood brain barrier. Tissue barriers *4*, e1143543.

Mehandru, S. (2007). The Gastointestinal Tract in HIV-1 infection: questions, answers, and more questions! The PRN Notebook *12*.

Mendoza, P., Gruell, H., Nogueira, L., Pai, J.A., Butler, A.L., Millard, K., Lehmann, C., Suarez, I., Oliveira, T.Y., Lorenzi, J.C.C.*, et al.* (2018). Combination therapy with anti-HIV-1 antibodies maintains viral suppression. Nature *561*, 479-484.

Mestecky, J. (2007). Humoral immune responses to the human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) in the genital tract compared to other mucosal sites. Journal of reproductive immunology *73*, 86-97.

Migueles, S.A., Sabbaghian, M.S., Shupert, W.L., Bettinotti, M.P., Marincola, F.M., Martino, L., Hallahan, C.W., Selig, S.M., Schwartz, D., Sullivan, J.*, et al.* (2000). HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *97*, 2709-2714.

Mitchison, N.A. (2004). T-cell-B-cell cooperation. Nature reviews Immunology *4*, 308-312.

Miyazawa, M., Lopalco, L., Mazzotta, F., Lo Caputo, S., Veas, F., Clerici, M., and Group, E.S.N.S. (2009). The 'immunologic advantage' of HIV-exposed seronegative individuals. Aids *23*, 161-175.

Moir, S., and Fauci, A.S. (2017). B-cell responses to HIV infection. Immunological reviews *275*, 33-48.

Montefiori, D.C. (2009). Measuring HIV neutralization in a luciferase reporter gene assay. Methods in molecular biology *485*, 395-405.

Moor, K., Diard, M., Sellin, M.E., Felmy, B., Wotzka, S.Y., Toska, A., Bakkeren, E., Arnoldini, M., Bansept, F., Co, A.D.*, et al.* (2017). High-avidity IgA protects the intestine by enchaining growing bacteria. Nature *544*, 498-502.

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

Moris, A., Pereira, M., and Chakrabarti, L. (2019). A role for antibodies in natural HIV control. Current opinion in HIV and AIDS *14*.

Morris, L., Chen, X., Alam, M., Tomaras, G., Zhang, R., Marshall, D.J., Chen, B., Parks, R., Foulger, A., Jaeger, F.*, et al.* (2011). Isolation of a human anti-HIV gp41 membrane proximal region neutralizing antibody by antigen-specific single B cell sorting. PloS one *6*, e23532.

Moses, A.V., Bloom, F.E., Pauza, C.D., and Nelson, J.A. (1993). Human immunodeficiency virus infection of human brain capillary endothelial cells occurs via a CD4/galactosylceramide-independent mechanism. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *90*, 10474-10478.

Mouquet, H. (2014). Antibody B cell responses in HIV-1 infection. Trends in immunology *35*, 549-561.

Mouquet, H., Klein, F., Scheid, J.F., Warncke, M., Pietzsch, J., Oliveira, T.Y., Velinzon, K., Seaman, M.S., and Nussenzweig, M.C. (2011). Memory B cell antibodies to HIV-1 gp140 cloned from individuals infected with clade A and B viruses. PloS one *6*, e24078.

Mouquet, H., and Nussenzweig, M.C. (2012). Polyreactive antibodies in adaptive immune responses to viruses. Cellular and molecular life sciences : CMLS *69*, 1435-1445.

Mouquet, H., Scharf, L., Euler, Z., Liu, Y., Eden, C., Scheid, J.F., Halper-Stromberg, A., Gnanapragasam, P.N., Spencer, D.I., Seaman, M.S.*, et al.* (2012). Complex-type N-glycan recognition by potent broadly neutralizing HIV antibodies. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *109*, E3268-3277.

Mouquet, H., Scheid, J.F., Zoller, M.J., Krogsgaard, M., Ott, R.G., Shukair, S., Artyomov, M.N., Pietzsch, J., Connors, M., Pereyra, F.*, et al.* (2010). Polyreactivity increases the apparent affinity of anti-HIV antibodies by heteroligation. Nature *467*, 591-595.

Murakami, T. (2012). Retroviral env glycoprotein trafficking and incorporation into virions. Molecular biology international *2012*, 682850.

Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. Cell *102*, 553-563.

Murphy, M., Jr, C.A.J., Travers, P., and Walport, M. (2012). Immunobiology.

Musich, T., Li, L., Liu, L., Zolla-Pazner, S., Robert-Guroff, M., and Gorny, M.K. (2017). Monoclonal Antibodies Specific for the V2, V3, CD4-Binding Site, and gp41 of HIV-1 Mediate Phagocytosis in a Dose-Dependent Manner. Journal of virology *91*.

Muster, T., Steindl, F., Purtscher, M., Trkola, A., Klima, A., Himmler, G., Ruker, F., and Katinger, H. (1993). A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. Journal of virology *67*, 6642-6647.

Muyldermans, S. (2013). Nanobodies: natural single-domain antibodies. Annual review of biochemistry *82*, 775-797.

Nabi, R., Moldoveanu, Z., Wei, Q., Golub, E.T., Durkin, H.G., Greenblatt, R.M., Herold, B.C., Nowicki, M.J., Kassaye, S., Cho, M.W.*, et al.* (2017). Differences in serum IgA responses to HIV-1 gp41 in elite controllers compared to viral suppressors on highly active antiretroviral therapy. PloS one *12*, e0180245.

Nakagawa, S., Castro, V., and Toborek, M. (2012). Infection of human pericytes by HIV-1 disrupts the integrity of the blood-brain barrier. Journal of cellular and molecular medicine *16*, 2950-2957.

Naranjo-Gomez, M., and Pelegrin, M. (2019). Vaccinal effect of HIV-1 antibody therapy. Current opinion in HIV and AIDS *14*, 325-333.

Neidleman, J.A., Chen, J.C., Kohgadai, N., Muller, J.A., Laustsen, A., Thavachelvam, K., Jang, K.S., Sturzel, C.M., Jones, J.J., Ochsenbauer, C.*, et al.* (2017). Mucosal stromal fibroblasts markedly enhance HIV infection of CD4+ T cells. PLoS pathogens *13*, e1006163.

Niessen, C.M. (2007). Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. The Journal of investigative dermatology *127*, 2525-2532.

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

Nottet, H.S., Persidsky, Y., Sasseville, V.G., Nukuna, A.N., Bock, P., Zhai, Q.H., Sharer, L.R., McComb, R.D., Swindells, S., Soderland, C.*, et al.* (1996). Mechanisms for the transendothelial migration of HIV-1-infected monocytes into brain. Journal of immunology *156*, 1284-1295.

Ochsenbauer, C., Edmonds, T.G., Ding, H., Keele, B.F., Decker, J., Salazar, M.G., Salazar-Gonzalez, J.F., Shattock, R., Haynes, B.F., Shaw, G.M.*, et al.* (2012). Generation of Transmitted/Founder HIV-1 Infectious Molecular Clones and Characterization of Their Replication Capacity in CD4 T Lymphocytes and Monocyte-Derived Macrophages. Journal of virology *86*, 2715.

Ochsenbein, A.F., and Zinkernagel, R.M. (2000). Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. Immunology Today *21*, 624-630.

Odegard, V.H., and Schatz, D.G. (2006). Targeting of somatic hypermutation. Nature reviews Immunology *6*, 573-583.

Ofek, G., Zirkle, B., Yang, Y., Zhu, Z., McKee, K., Zhang, B., Chuang, G.Y., Georgiev, I.S., O'Dell, S., Doria-Rose, N.*, et al.* (2014). Structural basis for HIV-1 neutralization by 2F5-like antibodies m66 and m66.6. Journal of virology *88*, 2426-2441.

Overbaugh, J., and Morris, L. (2012). The Antibody Response against HIV-1. Cold Spring Harbor perspectives in medicine *2*, a007039.

Pabst, O. (2012). New concepts in the generation and functions of IgA. Nature reviews Immunology *12*, 821-832.

Pace, C.S., Song, R., Ochsenbauer, C., Andrews, C.D., Franco, D., Yu, J., Oren, D.A., Seaman, M.S., and Ho, D.D. (2013). Bispecific antibodies directed to CD4 domain 2 and HIV envelope exhibit exceptional breadth and picomolar potency against HIV-1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *110*, 13540-13545.

Palha, N., Guivel-Benhassine, F., Briolat, V., Lutfalla, G., Sourisseau, M., Ellett, F., Wang, C.-H., Lieschke, G.J., Herbomel, P., Schwartz, O.*, et al.* (2013). Real-time whole-body visualization of Chikungunya Virus infection and host interferon response in zebrafish. PLoS pathogens *9*, e1003619-e1003619.

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.

Panico, M., Bouche, L., Binet, D., O'Connor, M.J., Rahman, D., Pang, P.C., Canis, K., North, S.J., Desrosiers, R.C., Chertova, E.*, et al.* (2016). Mapping the complete glycoproteome of virion-derived HIV-1 gp120 provides insights into broadly neutralizing antibody binding. Scientific reports *6*, 32956.

Parren, P.W., Marx, P.A., Hessell, A.J., Luckay, A., Harouse, J., Cheng-Mayer, C., Moore, J.P., and Burton, D.R. (2001). Antibody protects macaques against vaginal challenge with a pathogenic R5 simian/human immunodeficiency virus at serum levels giving complete neutralization in vitro. Journal of virology *75*, 8340-8347.

Parsons, M.S., Lloyd, S.B., Lee, W.S., Kristensen, A.B., Amarasena, T., Center, R.J., Keele, B.F., Lifson, J.D., LaBranche, C.C., Montefiori, D.*, et al.* (2017). Partial efficacy of a broadly neutralizing antibody against cell-associated SHIV infection. Science translational medicine *9*.

Peeters, M., Aghokeng, A.F., and Delaporte, E. (2010). Genetic diversity among human immunodeficiency virus-1 non-B subtypes in viral load and drug resistance assays. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases *16*, 1525-1531.

Peeters, M., Chaix, M.L., and Delaporte, E. (2008). Phylogénie des SIV et des VIH
Mieux comprendre l'origine des VIH. Medecine/Sciences *24*, 621-628.

Pegu, A., Hessell, A.J., Mascola, J.R., and Haigwood, N.L. (2017). Use of broadly neutralizing antibodies for HIV-1 prevention. Immunological reviews *275*, 296-312.

Pejchal, R., Doores, K.J., Walker, L.M., Khayat, R., Huang, P.S., Wang, S.K., Stanfield, R.L., Julien, J.P., Ramos, A., Crispin, M.*, et al.* (2011). A potent and broad neutralizing antibody recognizes and penetrates the HIV glycan shield. Science *334*, 1097-1103.

Pelegrin, M., Naranjo-Gomez, M., and Piechaczyk, M. (2015). Antiviral Monoclonal Antibodies: Can They Be More Than Simple Neutralizing Agents? Trends in microbiology *23*, 653-665.

Peluso, M.J., Ferretti, F., Peterson, J., Lee, E., Fuchs, D., Boschini, A., Gisslen, M., Angoff, N., Price, R.W., Cinque, P.*, et al.* (2012). Cerebrospinal fluid HIV escape associated with progressive neurologic dysfunction in patients on antiretroviral therapy with well controlled plasma viral load. Aids *26*, 1765-1774.

Peressin, M., Holl, V., and Moog, C. (2014). [Anti-HIV antibodies: multiple antiviral activities]. Medecine sciences : M/S *30*, 69-75.

Perez-Andres, M., Paiva, B., Nieto, W.G., Caraux, A., Schmitz, A., Almeida, J., Vogt, R.F., Jr., Marti, G.E., Rawstron, A.C., Van Zelm, M.C.*, et al.* (2010). Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. Cytometry Part B, Clinical cytometry *78 Suppl 1*, S47-60.

Planchais, C., Kök, A., Kanyavuz, A., Lorin, V., Bruel, T., Guivel-Benhassine, F., Rollenske, T., Prigent, J., Hieu, T., Prazuck, T.*, et al.* (2019). HIV-1 Envelope Recognition by Polyreactive and Cross-Reactive Intestinal B Cells. Cell reports *27*, 572-585.e577.

Plaut, A.G., Wistar, R., Jr., and Capra, J.D. (1974). Differential susceptibility of human IgA immunoglobulins to streptococcal IgA protease. The Journal of clinical investigation *54*, 1295-1300.

Price, R.W., Brew, B., Sidtis, J., Rosenblum, M., Scheck, A.C., and Cleary, P. (1988). The brain in AIDS: central nervous system HIV-1 infection and AIDS dementia complex. Science *239*, 586-592.

Price, R.W., Spudich, S.S., Peterson, J., Joseph, S., Fuchs, D., Zetterberg, H., Gisslen, M., and Swanstrom, R. (2014). Evolving character of chronic central nervous system HIV infection. Seminars in neurology *34*, 7-13.

Prigent, J., Jarossay, A., Planchais, C., Eden, C., Dufloo, J., Kok, A., Lorin, V., Vratskikh, O., Couderc, T., Bruel, T.*, et al.* (2018). Conformational Plasticity in Broadly Neutralizing HIV-1 Antibodies Triggers Polyreactivity. Cell reports *23*, 2568-2581.

Purtscher, M., Trkola, A., Gruber, G., Buchacher, A., Predl, R., Steindl, F., Tauer, C., Berger, R., Barrett, N., Jungbauer, A.*, et al.* (1994). A broadly neutralizing human monoclonal antibody against gp41 of human immunodeficiency virus type 1. AIDS research and human retroviruses *10*, 1651-1658.

Rambaut, A., Posada, D., Crandall, K.A., and Holmes, E.C. (2004). The causes and consequences of HIV evolution. Nature reviews Genetics *5*, 52-61.

Rantalainen, K., Berndsen, Z.T., Murrell, S., Cao, L., Omorodion, O., Torres, J.L., Wu, M., Umotoy, J., Copps, J., Poignard, P.*, et al.* (2018). Co-evolution of HIV Envelope and Apex-Targeting Neutralizing Antibody Lineage Provides Benchmarks for Vaccine Design. Cell reports *23*, 3249-3261.

Rao, M., Peachman, K.K., Kim, J., Gao, G., Alving, C.R., Michael, N.L., and Rao, V.B. (2013). HIV-1 variable loop 2 and its importance in HIV-1 infection and vaccine development. Current HIV research *11*, 427-438.

Reh, L., Magnus, C., Schanz, M., Weber, J., Uhr, T., Rusert, P., and Trkola, A. (2015). Capacity of Broadly Neutralizing Antibodies to Inhibit HIV-1 Cell-Cell Transmission Is Strain- and Epitope-Dependent. PLoS pathogens *11*, e1004966.

Rerks-Ngarm, S., Pitisuttithum, P., Nitayaphan, S., Kaewkungwal, J., Chiu, J., Paris, R., Premsri, N., Namwat, C., de Souza, M., Adams, E.*, et al.* (2009). Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. The New England journal of medicine *361*, 2209-2220.

Richards, J.O., Karki, S., Lazar, G.A., Chen, H., Dang, W., and Desjarlais, J.R. (2008). Optimization of antibody binding to FcgammaRIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. Molecular cancer therapeutics *7*, 2517-2527.

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

Roitt, I.M., Brostoff, J., and Male, D.K. (1985). Immunité spécifique et immunité naturelle. In Immunologie fondamentale et aplliquée, MEDSI, ed., pp. 1.1-1.5.

Rojas, R., and Apodaca, G. (2002). Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. Nature reviews Molecular cell biology *3*, 944-955.

Roskin, K.M., Jackson, K.J.L., Lee, J.Y., Hoh, R.A., Joshi, S.A., Hwang, K.K., Bonsignori, M., Pedroza-Pacheco, I., Liao, H.X., Moody, M.A.*, et al.* (2020). Aberrant B cell repertoire selection associated with HIV neutralizing antibody breadth. Nature immunology *21*, 199-209.

Ross, T.M., and Cullen, B.R. (1998). The ability of HIV type 1 to use CCR-3 as a coreceptor is controlled by envelope V1/V2 sequences acting in conjunction with a CCR-5 tropic V3 loop. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *95*, 7682-7686.

Ruano-Salguero, J.S., and Lee, K.H. (2020). Antibody transcytosis across brain endothelial-like cells occurs nonspecifically and independent of FcRn. Scientific reports *10*, 3685.

Ruiz, M.J., Ghiglione, Y., Falivene, J., Laufer, N., Holgado, M.P., Socías, M.E., Cahn, P., Sued, O., Giavedoni, L., Salomón, H.*, et al.* (2016). Env-Specific IgA from Viremic HIV-Infected Subjects Compromises Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. Journal of virology *90*, 670.

Ruprecht, C.R., Krarup, A., Reynell, L., Mann, A.M., Brandenberg, O.F., Berlinger, L., Abela, I.A., Regoes, R.R., Gunthard, H.F., Rusert, P.*, et al.* (2011). MPER-specific antibodies induce gp120 shedding and irreversibly neutralize HIV-1. The Journal of experimental medicine *208*, 439-454.

Saidi, H., Magri, G., Nasreddine, N., Requena, M., and Belec, L. (2007). R5- and X4-HIV-1 use differentially the endometrial epithelial cells HEC-1A to ensure their own spread: implication for mechanisms of sexual transmission. Virology *358*, 55-68.

Salle, B., Brochard, P., Bourry, O., Mannioui, A., Andrieu, T., Prevot, S., Dejucq-Rainsford, N., Dereuddre-Bosquet, N., and Le Grand, R. (2010). Infection of macaques after vaginal exposure to cell-associated simian immunodeficiency virus. The Journal of infectious diseases *202*, 337-344.

Sampathkumar, R., Shadabi, E., and Luo, M. (2012). Interplay between HIV-1 and Host Genetic Variation: A Snapshot into Its Impact on AIDS and Therapy Response. Advances in virology *2012*, 508967.

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.

Saylor, D., Dickens, A.M., Sacktor, N., Haughey, N., Slusher, B., Pletnikov, M., Mankowski, J.L., Brown, A., Volsky, D.J., and McArthur, J.C. (2016). HIV-associated neurocognitive disorder--pathogenesis and prospects for treatment. Nature reviews Neurology *12*, 234-248.

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

Scharf, L., Scheid, J.F., Lee, J.H., West, A.P., Jr., Chen, C., Gao, H., Gnanapragasam, P.N., Mares, R., Seaman, M.S., Ward, A.B.*, et al.* (2014). Antibody 8ANC195 reveals a site of broad vulnerability on the HIV-1 envelope spike. Cell reports *7*, 785-795.

Scharf, L., Wang, H., Gao, H., Chen, S., McDowall, A.W., and Bjorkman, P.J. (2015). Broadly Neutralizing Antibody 8ANC195 Recognizes Closed and Open States of HIV-1 Env. Cell *162*, 1379-1390.

Scheid, J.F., Horwitz, J.A., Bar-On, Y., Kreider, E.F., Lu, C.L., Lorenzi, J.C., Feldmann, A., Braunschweig, M., Nogueira, L., Oliveira, T.*, et al.* (2016). HIV-1 antibody 3BNC117 suppresses viral rebound in humans during treatment interruption. Nature *535*, 556-560.

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.

Scheid, J.F., Mouquet, H., Ueberheide, B., Diskin, R., Klein, F., Oliveira, T.Y., Pietzsch, J., Fenyo, D., Abadir, A., Velinzon, K.*, et al.* (2011). Sequence and structural convergence of broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding. Science *333*, 1633-1637.

Schommers, P., Gruell, H., Abernathy, M.E., Tran, M.K., Dingens, A.S., Gristick, H.B., Barnes, C.O., Schoofs, T., Schlotz, M., Vanshylla, K.*, et al.* (2020). Restriction of HIV-1 Escape by a Highly Broad and Potent Neutralizing Antibody. Cell *180*, 471-489 e422.

Schoofs, T., Barnes, C.O., Suh-Toma, N., Golijanin, J., Schommers, P., Gruell, H., West, A.P., Jr., Bach, F., Lee, Y.E., Nogueira, L.*, et al.* (2019). Broad and Potent Neutralizing Antibodies Recognize the Silent Face of the HIV Envelope. Immunity *50*, 1513-1529 e1519.

Schoofs, T., Klein, F., Braunschweig, M., Kreider, E.F., Feldmann, A., Nogueira, L., Oliveira, T., Lorenzi, J.C., Parrish, E.H., Learn, G.H.*, et al.* (2016). HIV-1 therapy with monoclonal antibody 3BNC117 elicits host immune responses against HIV-1. Science *352*, 997-1001.

Schroeder, H.W., Jr., and Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. Journal of Allergy and Clinical Immunology *125*, S41-S52.

Schroeder, S., Kaufman, J.D., Grunwald, M., Walla, P.J., Lakomek, N.A., and Wingfield, P.T. (2018). HIV-1 gp41 transmembrane oligomerization monitored by FRET and FCS. FEBS letters *592*, 939-948.

Scott, Y.M., Park, S.Y., and Dezzutti, C.S. (2016). Broadly Neutralizing Anti-HIV Antibodies Prevent HIV Infection of Mucosal Tissue Ex Vivo. Antimicrobial agents and chemotherapy *60*, 904-912.

Seabright, G.E., Doores, K.J., Burton, D.R., and Crispin, M. (2019). Protein and Glycan Mimicry in HIV Vaccine Design. Journal of molecular biology *431*, 2223-2247.

Seaman, M.S., Janes, H., Hawkins, N., Grandpre, L.E., Devoy, C., Giri, A., Coffey, R.T., Harris, L., Wood, B., Daniels, M.G.*, et al.* (2010). Tiered categorization of a diverse panel of HIV-1 Env pseudoviruses for assessment of neutralizing antibodies. Journal of virology *84*, 1439-1452.

Sela-Culang, I., Kunik, V., and Ofran, Y. (2013). The structural basis of antibody-antigen recognition. Frontiers in immunology *4*, 302.

Shaik, M.M., Peng, H., Lu, J., Rits-Volloch, S., Xu, C., Liao, M., and Chen, B. (2019). Structural basis of coreceptor recognition by HIV-1 envelope spike. Nature *565*, 318-323.

Sharp, P.M., and Hahn, B.H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. Cold Spring Harbor perspectives in medicine *1*, a006841.

Shen, R., Drelichman, E.R., Bimczok, D., Ochsenbauer, C., Kappes, J.C., Cannon, J.A., Tudor, D., Bomsel, M., Smythies, L.E., and Smith, P.D. (2010). GP41-specific antibody blocks cell-free HIV type 1 transcytosis through human rectal mucosa and model colonic epithelium. Journal of immunology *184*, 3648-3655.

Shingai, M., Nishimura, Y., Klein, F., Mouquet, H., Donau, O.K., Plishka, R., Buckler-White, A., Seaman, M., Piatak, M., Jr., Lifson, J.D.*, et al.* (2013). Antibody-mediated immunotherapy of macaques chronically infected with SHIV suppresses viraemia. Nature *503*, 277-280.

Sholukh, A.M., Watkins, J.D., Vyas, H.K., Gupta, S., Lakhashe, S.K., Thorat, S., Zhou, M., Hemashettar, G., Bachler, B.C., Forthal, D.N.*, et al.* (2015). Defense-in-depth by mucosally administered anti-HIV dimeric IgA2 and systemic IgG1 mAbs: complete protection of rhesus monkeys from mucosal SHIV challenge. Vaccine *33*, 2086-2095.

Simek, M.D., Rida, W., Priddy, F.H., Pung, P., Carrow, E., Laufer, D.S., Lehrman, J.K., Boaz, M., Tarragona-Fiol, T., Miiro, G.*, et al.* (2009). Human immunodeficiency virus type 1 elite neutralizers: individuals with broad and potent neutralizing activity identified by using a high-throughput neutralization assay together with an analytical selection algorithm. Journal of virology *83*, 7337-7348.

Simonich, C.A., Williams, K.L., Verkerke, H.P., Williams, J.A., Nduati, R., Lee, K.K., and Overbaugh, J. (2016). HIV-1 Neutralizing Antibodies with Limited Hypermutation from an Infant. Cell *166*, 77-87.

Sips, M., Krykbaeva, M., Diefenbach, T.J., Ghebremichael, M., Bowman, B.A., Dugast, A.S., Boesch, A.W., Streeck, H., Kwon, D.S., Ackerman, M.E.*, et al.* (2016). Fc receptor-mediated phagocytosis in tissues as a potent mechanism for preventive and therapeutic HIV vaccine strategies. Mucosal immunology *9*, 1584-1595.

Slifka, M.K. (2004). Immunological memory to viral infection. Current opinion in immunology *16*, 443-450.

Smith, P., DiLillo, D.J., Bournazos, S., Li, F., and Ravetch, J.V. (2012). Mouse model recapitulating human Fcgamma receptor structural and functional diversity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *109*, 6181-6186.

Sok, D., Doores, K.J., Briney, B., Le, K.M., Saye-Francisco, K.L., Ramos, A., Kulp, D.W., Julien, J.P., Menis, S., Wickramasinghe, L.*, et al.* (2014a). Promiscuous glycan site recognition by antibodies to the high-mannose patch of gp120 broadens neutralization of HIV. Science translational medicine *6*, 236ra263.

Sok, D., van Gils, M.J., Pauthner, M., Julien, J.P., Saye-Francisco, K.L., Hsueh, J., Briney, B., Lee, J.H., Le, K.M., Lee, P.S.*, et al.* (2014b). Recombinant HIV envelope trimer selects for quaternary-dependent antibodies targeting the trimer apex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *111*, 17624-17629.

Stefic, K., and Barin, F. (2019). Central nervous system compartmentalization of HIV, an interesting model of viral evolution: from theory to clinical implications. Virologie *23*, 359-371.

Stefic, K., Bouvin-Pley, M., Essat, A., Visdeloup, C., Moreau, A., Goujard, C., Chaix, M.-L., Braibant, M., Meyer, L., and Barin, F. (2019). Sensitivity to Broadly Neutralizing Antibodies of Recently Transmitted HIV-1 Clade CRF02_AG Viruses with a Focus on Evolution over Time. Journal of virology *93*, e01492-01418.

Stefic, K., Chaillon, A., Bouvin-Pley, M., Moreau, A., Braibant, M., Bastides, F., Gras, G., Bernard, L., and Barin, F. (2017). Probing the compartmentalization of HIV-1 in the central nervous system through its neutralization properties. PloS one *12*, e0181680.

Steinhardt, J.J., Guenaga, J., Turner, H.L., McKee, K., Louder, M.K., O'Dell, S., Chiang, C.I., Lei, L., Galkin, A., Andrianov, A.K.*, et al.* (2018). Rational design of a trispecific antibody targeting the HIV-1 Env with elevated anti-viral activity. Nature communications *9*, 877.

Stiegler, G., Kunert, R., Purtscher, M., Wolbank, S., Voglauer, R., Steindl, F., and Katinger, H. (2001). A potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. AIDS research and human retroviruses *17*, 1757-1765.

Stoddard, E., Cannon, G., Ni, H., Kariko, K., Capodici, J., Malamud, D., and Weissman, D. (2007). gp340 expressed on human genital epithelia binds HIV-1 envelope protein and facilitates viral transmission. Journal of immunology *179*, 3126-3132.

Suphaphiphat, K., Tolazzi, M., Hua, S., Desjardins, D., Lorin, V., Dereuddre-Bosquet, N., Mouquet, H., Scarlatti, G., Grand, R.L., and Cavarelli, M. (2020). Broadly neutralizing antibodies potently inhibit cell-to-cell transmission of semen leukocyte-derived SHIV162P3. EBioMedicine *57*, 102842.

Swain, S.L., McKinstry, K.K., and Strutt, T.M. (2012). Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses. Nature Reviews Immunology *12*, 136-148.

Tarlinton, D., and Good-Jacobson, K. (2013). Diversity among memory B cells: origin, consequences, and utility. Science *341*, 1205-1211.

Tay, M.Z., Wiehe, K., and Pollara, J. (2019). Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis in Antiviral Immune Responses. Frontiers in immunology *10*, 332.

Tiller, T., Meffre, E., Yurasov, S., Tsuiji, M., Nussenzweig, M.C., and Wardemann, H. (2008). Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. Journal of immunological methods *329*, 112-124.

Tiller, T., Tsuiji, M., Yurasov, S., Velinzon, K., Nussenzweig, M.C., and Wardemann, H. (2007). Autoreactivity in human IgG+ memory B cells. Immunity *26*, 205-213.

Toborek, M., Andras, I.E., Rashid, C.S., Zhong, Y., and Nakagawa, S. (2012). Endothelial cell biology and HIV-1 infection. In The neurology of AIDS. Gendelman, HE., Grant, I., Everall, IP., Fox, HS., Gelbard, HA., Lipton, SA. Swindells, S (Oxford University Press).

Tomaras, G.D., Binley, J.M., Gray, E.S., Crooks, E.T., Osawa, K., Moore, P.L., Tumba, N., Tong, T., Shen, X., Yates, N.L.*, et al.* (2011). Polyclonal B cell responses to conserved neutralization epitopes in a subset of HIV-1-infected individuals. Journal of virology *85*, 11502-11519.

Tomaras, G.D., Ferrari, G., Shen, X., Alam, S.M., Liao, H.X., Pollara, J., Bonsignori, M., Moody, M.A., Fong, Y., Chen, X.*, et al.* (2013). Vaccine-induced plasma IgA specific for the C1 region of the HIV-1 envelope blocks binding and effector function of IgG. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *110*, 9019-9024.

Tomasi, T.B., Jr., and Bienenstock, J. (1968). Secretory immunoglobulins. Advances in immunology *9*, 1-96.

Tomiyama, H., Miwa, K., Shiga, H., Moore, Y.I., Oka, S., Iwamoto, A., Kaneko, Y., and Takiguchi, M. (1997). Evidence of presentation of multiple HIV-1 cytotoxic T lymphocyte epitopes by HLA-B*3501 molecules that are associated with the accelerated progression of AIDS. Journal of immunology *158*, 5026-5034.

Torres, M., and Casadevall, A. (2008). The immunoglobulin constant region contributes to affinity and specificity. Trends in immunology *29*, 91-97.

Tovanabutra, S., Sirijatuphat, R., Pham, P.T., Bonar, L., Harbolick, E.A., Bose, M., Song, H., Chang, D., Oropeza, C., O'Sullivan, A.M.*, et al.* (2019). Deep Sequencing Reveals Central Nervous System Compartmentalization in Multiple Transmitted/Founder Virus Acute HIV-1 Infection. Cells *8*.

Trkola, A., Purtscher, M., Muster, T., Ballaun, C., Buchacher, A., Sullivan, N., Srinivasan, K., Sodroski, J., Moore, J.P., and Katinger, H. (1996). Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. Journal of virology *70*, 1100-1108.

Tsuiji, M., Yurasov, S., Velinzon, K., Thomas, S., Nussenzweig, M.C., and Wardemann, H. (2006). A checkpoint for autoreactivity in human IgM+ memory B cell development. The Journal of experimental medicine *203*, 393-400.

Tudor, D., Derrien, M., Diomede, L., Drillet, A.S., Houimel, M., Moog, C., Reynes, J.M., Lopalco, L., and Bomsel, M. (2009). HIV-1 gp41-specific monoclonal mucosal IgAs derived from highly exposed but IgG-seronegative individuals block HIV-1 epithelial transcytosis and neutralize CD4(+) cell infection: an IgA gene and functional analysis. Mucosal immunology *2*, 412-426.

Tudor, D., Yu, H., Maupetit, J., Drillet, A.S., Bouceba, T., Schwartz-Cornil, I., Lopalco, L., Tuffery, P., and Bomsel, M. (2012). Isotype modulates epitope specificity, affinity, and antiviral activities of anti-HIV-1 human broadly neutralizing 2F5 antibody. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *109*, 12680-12685.

Tugizov, S. (2016). Human immunodeficiency virus-associated disruption of mucosal barriers and its role in HIV transmission and pathogenesis of HIV/AIDS disease. Tissue barriers *4*, e1159276.

UNAIDS (2019). Global report 2019 UNAIDS, pp. 476.

Urich, E., Lazic, S.E., Molnos, J., Wells, I., and Freskgard, P.O. (2012). Transcriptional profiling of human brain endothelial cells reveals key properties crucial for predictive in vitro blood-brain barrier models. PloS one *7*, e38149.

Valcour, V., Chalermchai, T., Sailasuta, N., Marovich, M., Lerdlum, S., Suttichom, D., Suwanwela, N.C., Jagodzinski, L., Michael, N., Spudich, S.*, et al.* (2012). Central nervous system viral invasion and inflammation during acute HIV infection. The Journal of infectious diseases *206*, 275-282.

van Gils, M.J., Bunnik, E.M., Boeser-Nunnink, B.D., Burger, J.A., Terlouw-Klein, M., Verwer, N., and Schuitemaker, H. (2011). Longer V1V2 region with increased number of potential N-linked glycosylation sites in the HIV-1 envelope glycoprotein protects against HIV-specific neutralizing antibodies. Journal of virology *85*, 6986-6995.

van Gils, M.J., van den Kerkhof, T.L., 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. Nature microbiology *2*, 16199.

Van Regenmortel, M.H. (2014). Specificity, polyspecificity, and heterospecificity of antibody-antigen recognition. Journal of molecular recognition : JMR *27*, 627-639.

van't Wout, A.B., Ran, L.J., Kuiken, C.L., Kootstra, N.A., Pals, S.T., and Schuitemaker, H. (1998). Analysis of the temporal relationship between human immunodeficiency virus type 1 quasispecies in sequential blood samples and various organs obtained at autopsy. Journal of virology *72*, 488-496.

VanBlargan, L.A., Goo, L., and Pierson, T.C. (2016). Deconstructing the Antiviral Neutralizing-Antibody Response: Implications for Vaccine Development and Immunity. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR *80*, 989-1010.

Veenstra, M., Leon-Rivera, R., Li, M., Gama, L., Clements, J.E., and Berman, J.W. (2017). Mechanisms of CNS Viral Seeding by HIV(+) CD14(+) CD16(+) Monocytes: Establishment and Reseeding of Viral Reservoirs Contributing to HIV-Associated Neurocognitive Disorders. mBio *8*.

Verkoczy, L., Chen, Y., Bouton-Verville, H., Zhang, J., Diaz, M., Hutchinson, J., Ouyang, Y.B., Alam, S.M., Holl, T.M., Hwang, K.K.*, et al.* (2011). Rescue of HIV-1 broad neutralizing antibody-expressing B cells in 2F5 VH x VL knockin mice reveals multiple tolerance controls. Journal of immunology *187*, 3785-3797.

Veselinovic, M., Neff, C.P., Mulder, L.R., and Akkina, R. (2012). Topical gel formulation of broadly neutralizing anti-HIV-1 monoclonal antibody VRC01 confers protection against HIV-1 vaginal challenge in a humanized mouse model. Virology *432*, 505-510.

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. Annual review of immunology *30*, 429-457.

Villabona-Arenas, C.J., Vidal, N., Guichet, E., Serrano, L., Delaporte, E., Gascuel, O., and Peeters, M. (2016). In-depth analysis of HIV-1 drug resistance mutations in HIV-infected individuals failing first-line regimens in West and Central Africa. Aids *30*, 2577-2589.

Vouldoukis, I., Mazier, D., Moynet, D., Thiolat, D., Malvy, D., and Mossalayi, M.D. (2011). IgE mediates killing of intracellular Toxoplasma gondii by human macrophages through CD23-dependent, interleukin-10 sensitive pathway. PloS one *6*, e18289.

Vu, K., Weksler, B., Romero, I., Couraud, P.O., and Gelli, A. (2009). Immortalized human brain endothelial cell line HCMEC/D3 as a model of the blood-brain barrier facilitates in vitro studies of central nervous system infection by Cryptococcus neoformans. Eukaryotic cell *8*, 1803-1807.

Walker, B.D., and Yu, X.G. (2013). Unravelling the mechanisms of durable control of HIV-1. Nature reviews Immunology *13*, 487-498.

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

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

Wang, H., Barnes, C.O., Yang, Z., Nussenzweig, M.C., and Bjorkman, P.J. (2018a). Partially Open HIV-1 Envelope Structures Exhibit Conformational Changes Relevant for Coreceptor Binding and Fusion. Cell host & microbe *24*, 579-592 e574.

Wang, J., Sen, J., Rong, L., and Caffrey, M. (2008). Role of the HIV gp120 conserved domain 1 in processing and viral entry. The Journal of biological chemistry *283*, 32644-32649.

Wang, X., Mathieu, M., and Brezski, R.J. (2018b). IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions. Protein & cell *9*, 63-73.

Ward, A.B., and Wilson, I.A. (2017). The HIV-1 envelope glycoprotein structure: nailing down a moving target. Immunological reviews *275*, 21-32.

Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J.W., Meffre, E., and Nussenzweig, M.C. (2003). Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. Science *301*, 1374-1377.

Watanabe, Y., Bowden, T.A., Wilson, I.A., and Crispin, M. (2019). Exploitation of glycosylation in enveloped virus pathobiology. Biochimica et biophysica acta General subjects *1863*, 1480-1497.

Watkins, J.D., Sholukh, A.M., Mukhtar, M.M., Siddappa, N.B., Lakhashe, S.K., Kim, M., Reinherz, E.L., Gupta, S., Forthal, D.N., Sattentau, Q.J., *et al.* (2013). Anti-HIV IgA isotypes: differential virion capture and inhibition of transcytosis are linked to prevention of mucosal R5 SHIV transmission. Aids *27*, F13-20.

Watkins, J.D., Siddappa, N.B., Lakhashe, S.K., Humbert, M., Sholukh, A., Hemashettar, G., Wong, Y.L., Yoon, J.K., Wang, W., Novembre, F.J., *et al.* (2011). An anti-HIV-1 V3 loop antibody fully protects cross-clade and elicits T-cell immunity in macaques mucosally challenged with an R5 clade C SHIV. PloS one *6*, e18207.

Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., and Couraud, P.O. (2009). The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. Biochimica et biophysica acta *1788*, 842-857.

Weksler, B., Romero, I.A., and Couraud, P.O. (2013). The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. Fluids and barriers of the CNS *10*, 16.

Weksler, B.B., Subileau, E.A., Perriere, N., Charneau, P., Holloway, K., Leveque, M., Tricoire-Leignel, H., Nicotra, A., Bourdoulous, S., Turowski, P., *et al.* (2005). Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *19*, 1872-1874.

West, A.P., Jr., Diskin, R., Nussenzweig, M.C., and Bjorkman, P.J. (2012). Structural basis for germ-line gene usage of a potent class of antibodies targeting the CD4-binding site of HIV-1 gp120. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *109*, E2083-2090.

Wherry, E.J., and Ahmed, R. (2004). Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. Journal of virology *78*, 5535-5545.

Wibmer, C.K., Bhiman, J.N., Gray, E.S., Tumba, N., Abdool Karim, S.S., Williamson, C., Morris, L., and Moore, P.L. (2013). Viral escape from HIV-1 neutralizing antibodies drives increased plasma neutralization breadth through sequential recognition of multiple epitopes and immunotypes. PLoS pathogens *9*, e1003738.

Wibmer, C.K., Gorman, J., Ozorowski, G., Bhiman, J.N., Sheward, D.J., Elliott, D.H., Rouelle, J., Smira, A., Joyce, M.G., Ndabambi, N., *et al.* (2017). Structure and Recognition of a Novel HIV-1 gp120-gp41 Interface Antibody that Caused MPER Exposure through Viral Escape. PLoS pathogens *13*, e1006074.

Wilen, C.B., Tilton, J.C., and Doms, R.W. (2012). HIV: cell binding and entry. Cold Spring Harbor perspectives in medicine *2*.

Wills, S., Hwang, K.K., Liu, P., Dennison, S.M., Tay, M.Z., Shen, X., Pollara, J., Lucas, J.T., Parks, R., Rerks-Ngarm, S., *et al.* (2018). HIV-1-Specific IgA Monoclonal Antibodies from an HIV-1 Vaccinee Mediate Galactosylceramide Blocking and Phagocytosis. Journal of virology *92*.

Wines, B.D., Willoughby, N., Fraser, J.D., and Hogarth, P.M. (2006). A competitive mechanism for staphylococcal toxin SSL7 inhibiting the leukocyte IgA receptor, Fc alphaRI, is revealed by SSL7 binding at the C alpha2/C alpha3 interface of IgA. The Journal of biological chemistry *281*, 1389-1393.

Woof, J.M., and Kerr, M.A. (2006). The function of immunoglobulin A in immunity. The Journal of pathology *208*, 270-282.

Woof, J.M., and Russell, M.W. (2011). Structure and function relationships in IgA. Mucosal immunology *4*, 590-597.

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

Wu, X., Zhou, T., Zhu, J., Zhang, B., Georgiev, I., Wang, C., Chen, X., Longo, N.S., Louder, M., McKee, K., *et al.* (2011). Focused evolution of HIV-1 neutralizing antibodies revealed by structures and deep sequencing. Science *333*, 1593-1602.

Wyatt, R., Kwong, P.D., Desjardins, E., Sweet, R.W., Robinson, J., Hendrickson, W.A., and Sodroski, J.G. (1998). The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. Nature *393*, 705-711.

Xiong, H., Dolpady, J., Wabl, M., Curotto de Lafaille, M.A., and Lafaille, J.J. (2012). Sequential class switching is required for the generation of high affinity IgE antibodies. The Journal of experimental medicine *209*, 353-364.

Xu, L., Pegu, A., Rao, E., Doria-Rose, N., Beninga, J., McKee, K., Lord, D.M., Wei, R.R., Deng, G., Louder, M.*, et al.* (2017). Trispecific broadly neutralizing HIV antibodies mediate potent SHIV protection in macaques. Science *358*, 85-90.

Xu, W., Santini, P.A., Sullivan, J.S., He, B., Shan, M., Ball, S.C., Dyer, W.B., Ketas, T.J., Chadburn, A., Cohen-Gould, L.*, et al.* (2009). HIV-1 evades virus-specific IgG2 and IgA responses by targeting systemic and intestinal B cells via long-range intercellular conduits. Nature immunology *10*, 1008-1017.

Yano, M., Gohil, S., Coleman, J.R., Manix, C., and Pirofski, L.A. (2011). Antibodies to Streptococcus pneumoniae capsular polysaccharide enhance pneumococcal quorum sensing. mBio *2*.

Yasen, A., Herrera, R., Rosbe, K., Lien, K., and Tugizov, S.M. (2018). HIV internalization into oral and genital epithelial cells by endocytosis and macropinocytosis leads to viral sequestration in the vesicles. Virology *515*, 92-107.

Yu, F., Wen, Y., Wang, J., Gong, Y., Feng, K., Ye, R., Jiang, Y., Zhao, Q., Pan, P., Wu, H.*, et al.* (2018). The Transmission and Evolution of HIV-1 Quasispecies within One Couple: a Follow-up Study based on Next-Generation Sequencing. Scientific reports *8*, 1404.

Yu, L., and Guan, Y. (2014). Immunologic Basis for Long HCDR3s in Broadly Neutralizing Antibodies Against HIV-1. Frontiers in immunology *5*, 250.

Yurasov, S., Wardemann, H., Hammersen, J., Tsuiji, M., Meffre, E., Pascual, V., and Nussenzweig, M.C. (2005). Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. The Journal of experimental medicine *201*, 703-711.

Zajac, A.J., and Harrington, L.E. (2008). Encyclopedia of Virology Vol 3, 3rd edn (Elsevier).

Zhang, M., Gaschen, B., Blay, W., Foley, B., Haigwood, N., Kuiken, C., and Korber, B. (2004). Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. Glycobiology *14*, 1229-1246.

Zheng, J., Xie, Y., Campbell, R., Song, J., Wang, R.Q., Chiu, R., Berenson, J., Razi, M., Massachi, S., Yang, O.O.*, et al.* (2006). gp120-independent HIV infection of cells derived from the female reproductive tract, brain, and colon. Journal of acquired immune deficiency syndromes *43*, 127-136.

Zhou, M., and Ruprecht, R.M. (2014). Are anti-HIV IgAs good guys or bad guys? Retrovirology *11*, 109.

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

Zhou, T., Zheng, A., Baxa, U., Chuang, G.Y., Georgiev, I.S., Kong, R., O'Dell, S., Shahzad-Ul-Hussan, S., Shen, C.H., Tsybovsky, Y.*, et al.* (2018). A Neutralizing Antibody Recognizing Primarily N-Linked Glycan Targets the Silent Face of the HIV Envelope. Immunity *48*, 500-513 e506.

Zhou, T., and Xu, K. (2018). Structural features of broadly neutralizing antibodies and rational design of vaccine. In HIV Vaccines and Cure. The path towards finding an effective cure and vaccine, L. Zhang, and S.R. Lewin, eds. (Singapore: Springer), pp. 73-95.

Zhu, J., and Paul, W.E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. Blood *112*, 1557-1569.

Zhu, P., Liu, J., Bess, J., Jr., Chertova, E., Lifson, J.D., Grise, H., Ofek, G.A., Taylor, K.A., and Roux, K.H. (2006). Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. Nature *441*, 847-852.

Zolla-Pazner, S. (2004). Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. Nature reviews Immunology *4*, 199-210.

Zwick, M.B., Labrijn, A.F., Wang, M., Spenlehauer, C., Saphire, E.O., Binley, J.M., Moore, J.P., Stiegler, G., Katinger, H., Burton, D.R.*, et al.* (2001). Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. Journal of virology *75*, 10892-10905.

ANNEXE

Publications complémentaires durant la période de thèse :

❖ Broadly neutralizing antibodies potently inhibit cell-to-cell transmission of semen leukocyte-derived SHIV163P3.
Suphaphiphat K, Tolazzi M, Hua S, Desjardins D, **Lorin V**, Dereuddre-Bosquet N, Mouquet H, Scarlatti G, Grand RL, Cavarelli M.
EBioMedicine. 2020 Jul;57:102842. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102842. Epub 2020 Jun 30.
PMID: 32619962

❖ Potent human broadly neutralizing antibodies to hepatitis B virus from natural controllers.
Hehle V, Beretta M, Bourgine M, Ait-Goughoulte M, Planchais C, Morisse S, Vesin B, **Lorin V**, Hieu T, Stauffer A, Fiquet O, Dimitrov JD, Michel ML, Ungeheuer MN, Sureau C, Pol S, Di Santo JP, Strick-Marchand H, Pelletier N, Mouquet H.
J Exp Med. 2020 Oct 5;217(10):e20200840. doi: 10.1084/jem.20200840.
PMID: 32579155

❖ Flow Cytometry Analysis of HIV-1 Env Conformations at the Surface if Infected Cells and Virions : Role of Nef, CD4, and SERINC5.
Staropoli I, Dufloo J, Ducher A, Commere PH, Sartori-Rupp A, Novault S, Bruel T, **Lorin V**, Mouquet H, Schwartz O, Casartelli N.
J Virol. 2020 Feb 28;94(6):e01783-19. doi: 10.1128/JVI.01783-19. Print 2020 Feb 28.
PMID: 31852789

❖ Anti-HIV-1 antibodies trigger non-lytic complement deposition on infected cells.
Dufloo J, Guivel-Benhassine F, Buchrieser J, **Lorin V**, Grzelak L, Dupouy E, Mestrallet G, Bourdic K, Lambotte O, Mouquet H, Bruel T, Schwartz O.
EMBO Rep. 2020 Feb 5;21(2):e49351. doi: 10.15252/embr.201949351. Epub 2019 Dec 12.
PMID: 31833228

❖ TLR9 signalling in HCV-associated atypical memory B cells triggers Th1 and rheumatoid factor autoantibody responses.
Comarmond C*, **Lorin V***, Marques C*, Maciejewski-Duval A, Joher N, Planchais C, Touzot M, Biard L, Hieu T, Quiniou V, Desbois AC, Rosenzwajg M, Klatzmann D, Cacoub P, Mouquet H, Saadoun D.
J Hepatol. 2019 Nov;7 1(5):908-919. doi: 10.1016/j.jhep.2019.06.029. Epub 2019 Jul 4.
PMID: 31279905 * Co-first authors

❖ HIV-1 Envelope Recognition by Polyreactive and Cross-Reactive Intestinal B Cells.
Planchais C, Kök A, Kanyavuz A, **Lorin V**, Bruel T, Guivel-Benhassine F, Rollenske T, Prigent J, Hieu T, Prazuck T, Lefrou L, Wardemann H, Schwartz O, Dimitrov JD, Hocqueloux L, Mouquet H.
Cell Rep. 2019 Apr 9;27(2):572-585.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2019.03.032.
PMID: 30970259

❖ Conformational Plasticity in Broadly Neutralizing HIV-1 Antibodies Triggers Polyreactivity.
Prigent J, Jarossay A, Planchais C, Eden C, Dufloo J, Kök A, **Lorin V**, Vratskikh O, Couderc T, Bruel T, Schwartz O, Seaman MS, Ohlenschläger O, Dimitrov JD, Mouquet H.
Cell Rep. 2018 May 29;23(9):2568-2581. doi: 10.1016/j.celrep.2018.04.101.
PMID: 29847789

❖ Early Antiretroviral Therapy Preserves Functional Follicular Helper T and HIV-Specific B Cells in the Gut Mucosa of HIV-1-Infected Individuals.
Planchais C, Hocqueloux L, Ibanez C, Gallien S, Copie C, Surenaud M, Kök A, **Lorin V**, Fusaro M, Delfau-Larue MH, Lefrou L, Prazuck T, Lévy M, Seddiki N, Lelièvre JD, Mouquet H, Lévy Y, Hüe S.
J Immunol. 2018 May 15;200(10):3519-3529. doi: 10.4049/jimmunol.1701615. Epub 2018 Apr 9.
PMID: 29632141

❖ Lack of ADCC Breadth of Human Nonneutralizing Anti-HIV-1 Antibodies.
Bruel T, Guivel-Benhassine F, **Lorin V**, Lortat-Jacob H, Baleux F, Bourdic K, Noël N, Lambotte O, Mouquet H, Schwartz O.
J Virol. 2017 Mar 29;91(8):e02440-16. doi: 10.1128/JVI.02440-16. Print 2017 Apr 15.
PMID: 28122982

❖ Respiratory Syncytial Virus Infects Regulatory B Cells in Human Neonates via Chemokine Receptor CX3CR1 and Promotes Lung Disease Severity.
Zhivaki D, Lemoine S, Lim A, Morva A, Vidalain PO, Schandene L, Casartelli N, Rameix-Welti MA, Hervé PL, Dériaud E, Beitz B, Ripaux-Lefevre M, Miatello J, Lemercier B, **Lorin V**, Descamps D, Fix J, Eléouët JF, Riffault S, Schwartz O, Porcheray F, Mascart F, Mouquet H, Zhang X, Tissières P, Lo-Man R.
Immunity. 2017 Feb 21;46(2):301-314. doi: 10.1016/j.immuni.2017.01.010.
PMID: 28228284

❖ Scarcity of autoreactive human blood IgA+ memory B cells.
Prigent J, **Lorin V**, Kök A, Hieu T, Bourgeau S, Mouquet H.
Eur J Immunol. 2016 Oct;46(10):2340-2351. doi: 10.1002/eji.201646446. Epub 2016 Aug 25.
PMID: 27469325

❖ Efficient generation of human IgA monoclonal antibodies.
Lorin V, Mouquet H.
J Immunol Methods. 2015 Jul;422:102-10. doi: 10.1016/j.jim.2015.04.010. Epub 2015 Apr 22.
PMID: 25910833

Présentations orales et affichées durant la période de thèse :

❖ XVIIIe Journées Francophones de Virologie 2016 (Institut Pasteur). Présentation orale « Les anticorps neutralisants à large spectre suppriment l'infectivité des VIH-1 transcytosés »

❖ Séminaire Club Viro, 15/06/2016, Institut Pasteur, Département de Virologie. Présentation orale « Broadly neutralizing antibodies suppress the infectivity of transcytosed HIV-1 »

❖ IAS Conference on HIV Science 2019 (21-24/07/2019) Mexico City, Mexico. Présentation affichée « Antibody-bound HIV-1 HIV-1 viruses transmigrate through tissue barriers »

❖ Séminaire Science over lunch, 15/11/2019, Institut Pasteur, Département d'Immunologie. Présentation affichée « Antibody-bound HIV-1 HIV-1 viruses transmigrate through tissue barriers »

Journal of Immunological Methods 422 (2015) 102–110

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Immunological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jim

Efficient generation of human IgA monoclonal antibodies

Valérie Lorin, Hugo Mouquet *

Laboratory of Humoral Response to Pathogens, Department of Immunology, Institut Pasteur, Paris, 75015, France
CNRS-URA 1961, Paris, 75015, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 1 April 2015
Accepted 15 April 2015
Available online 22 April 2015

Keywords:
Antibodies
IgA
Transient recombinant expression system
Protein purification
Affinity/size-exclusion chromatography

ABSTRACT

Immunoglobulin A (IgA) is the most abundant antibody isotype produced in humans. IgA antibodies primarily ensure immune protection of mucosal surfaces against invading pathogens, but also circulate and are present in large quantities in blood. IgAs are heterogeneous at a molecular level, with two IgA subtypes and the capacity to form multimers by interacting with the joining (J) chain. Here, we have developed an efficient strategy to rapidly generate human IgA1 and IgA2 monoclonal antibodies in their monomeric and dimeric forms. Recombinant monomeric and dimeric IgA1/IgA2 counterparts of a prototypical IgG1 monoclonal antibody, 10-1074, targeting the HIV-1 envelope protein, were produced in large amounts after expression cloning and transient transfection of 293-F cells. 10-1074 IgAs were FPLC-purified using a novel affinity-based resin engrafted with anti-IgA chimeric Fabs, followed by a monomers/multimers separation using size exclusion-based FPLC. ELISA binding experiments confirmed that the artificial IgA class switching of 10-1074 did not alter its antigen recognition. In summary, our technical approach allows the very efficient production of various forms of purified recombinant human IgA molecules, which are precious tools in dissecting IgA B-cell responses in physiological and pathophysiological conditions, and studying the biology, function and therapeutic potential of IgAs.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Humoral immunity is essential to host protection against human infections, and relies on the phenomenal diversity of antibody molecules, which sense and inactivate pathogens. At mucosal surfaces, antibodies, and more specifically IgA immunoglobulins produced locally by subepithelial plasma cells, play a key role in the protection against toxins, bacteria, viruses and protozoa (Kaetzel, 2007). There are two IgA subclasses in humans, IgA1 and IgA2, which can exist as either monomers or as multimers made of IgA monomeric units polymerized by covalent bounds with the J-chain (principally dimers). IgAs are found in diverse mucosal secretions but are also abundant in serum (2–3 mg/ml) predominantly in the monomeric and IgA1 form (Kaetzel, 2007). On the other hand, mucosal IgAs are mainly present as "secretory IgA" (SIgAs) that are IgA polymers covalently associated with the "secretory component", which corresponds to the extracellular domain of the polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) cleaved away from the surface of epithelial cells (Kaetzel, 2007). Apart from their well-documented role in protecting epithelia from invading pathogens, SIgAs possess additional biological activities; they can act as anti-inflammatory and anti-allergenic molecules, maintain mucosal homeostasis, and regulate intestinal microbiota (Mantis et al., 2011). Surprisingly, the role of circulating serum IgAs is less clear, and should be explored more thoroughly.

In the past 15 years, the use of single cell antibody cloning techniques has enabled the rapid and efficient production of human monoclonal antibodies from different B-cell compartments (Sullivan et al., 2011; Tiller, 2011; Wilson and Andrews, 2012). The molecular and functional characterization of antibodies generated from selected single B-cell sub-populations (captured by flow cytometry or derived from screening of cultured B cells) has provided invaluable insight into the physiological and pathophysiological aspects of humoral immunity in humans (Wardemann and Nussenzweig, 2007; Meffre, 2011; Wilson and Andrews, 2012; Mouquet, 2014). Such studies have: (i) defined B-cell tolerance checkpoints at the transitions between different B-cell developmental stages (Wardemann et al., 2003; Tsuiji et al., 2006; Scheid et al., 2011); (ii) uncovered some of the tolerance mechanisms involved by studying these checkpoints in immunodeficient patients (Ng et al., 2004; Herve et al., 2005; Isnardi et al., 2008; Menard et al., 2011a); (iii) revealed defective tolerance checkpoints in autoimmune diseases (Samuels et al., 2005; Yurasov et al., 2005; Menard et al., 2011a,b); (iv) dissected antibody responses to various pathogens (Wrammert et al., 2008; Scheid et al., 2009; Muellenbeck et al., 2013); (v) identified and characterized broadly neutralizing antiviral antibodies particularly, against HIV-1 (Mouquet, 2014). In fact, probing humoral immunity using single B-cell derived monoclonal antibodies, as both effectors of and surrogates for immune responses, has not only provided invaluable insight into the mechanisms that govern adaptive B-cell responses, but has also contributed to the development of therapeutic and/or vaccine strategies to fight human diseases. However, too few studies have investigated the role IgA-mediated humoral immunity in

* Corresponding author.
E-mail address: hugo.mouquet@pasteur.fr (H. Mouquet).

http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2015.04.010
0022-1759/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

humans (Di Niro et al., 2010, 2012; Benckert et al., 2011), and in none of those, recombinant monoclonals were produced as native IgA antibodies, which definitively restricts certain molecular and functional characterizations.

In order to study IgA biology and IgA B-cell responses in physiological and pathophysiological conditions, we designed an expression cloning-based methodological approach to rapidly produce recombinant human IgA monoclonal antibodies. Expression vectors for human IgA1 and IgA2 compatible with the single B-cell antibody cloning method (Tiller et al., 2008) were created, and used to clone the immunoglobulin variable domain genes of a prototypic antigen-specific antibody, 10-1074, a neutralizing HIV-1 IgG1. Efficient production of purified monomeric and dimeric 10-1074 IgA molecules was made possible by combining a transient transfection-based eukaryotic expression system with fast protein liquid chromatography (FPLC) purification. Human IgA1 and IgA2 were FPLC-purified using a new affinity resin engrafted with anti-IgA chimeric Fabs. Finally, IgA monomers and dimers were separated by FPLC-based size exclusion chromatography.

2. Materials and methods

2.1. Expression vectors and cloning of human IgA monoclonal antibodies

Total RNAs were previously extracted from human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of a healthy donor (Scheid et al., 2011), using TRIzol® reagent (Life Technologies) following manufacturer's instructions. cDNAs were obtained by reverse transcription of RNAs primed with random hexamers (Roche) using SuperScript® III reverse transcriptase (Life technologies) according to the manufacturer's protocol. Primers used to amplify the Fc part of IgA1 and IgA2, and J chain gene products were as follows: *huIgA.Fc sense*, 5′-GCATCCCCGACCAG CCCCAA-3′; *huIgA.Fc antisense*, 5′-GTAGCAGGTGCCGTCCACCT-3′; *huJc sense*, 5′-GGATCCATGAAGAACCATTTGCTT-3′; *huJc antisense*, 5′-GAAT TCTTAGTCAGGATAGCAGGC-3′. Specific gene products were amplified by PCR using 5 μl of cDNAs as template, 250 nM each dNTP, 200 nM each primer and 2.5 U of HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen) in a total reaction volume of 50 μl. PCR conditions comprised one cycle of 94 °C for 5 min, 35 cycles of 94 °C for 30 s, 50 °C (*J chain*) or 57 °C (*IgA Fc*) for 30 s and 72 °C for 50 s (*J chain*) or 2 min (*IgA Fc*), and a final elongation step of 72 °C for 10 min. After electrophoretic separation, PCR products visualized by UV on ethidium bromide-stained agarose gel were purified using NucleoSpin® Extract II kit (Macherey-Nagel). Purified J chain DNA product was directly cloned into pcDNA™3.1/Zeo$^{(+)}$ expression vector (Life technologies) using Bam*HI* and Eco*RI* restrictions sites. Purified IgA Fc DNA products were cloned into pCR® 2.1-TOPO® vector using TOPO TA Cloning® Kit (Life technologies) to allow the selection of either IgA1 or IgA2 Fc DNA inserts. Following bacterial colony screening by PCR and sequencing, plasmid DNA of selected clones were prepared from transformed-DH10β bacteria (New England Biolabs) using NucleoSpin®Plasmid kit (Macherey-Nagel), and used as templates to introduce Sal*I* and Hind*III* restriction sites by PCR using the same conditions as described above with the following primers: Sal*I*-*huIgA.Fc*, 5′-CGTACGGTCGACCACCAGCCCCAAGGTC-3′; Hind*III*-*huIgA.Fc*, 5′-CCAAGCTTTCAGTAGCAGGTGCCGTCCA-3′. Purified PCR products were then cloned into a human Igγ$_1$-expression vector described previously (Tiller et al., 2008) using Sal*I* and Hind*III* restriction sites. This cloning strategy allows for the complete substitution of the DNA fragment coding for the human Fc part of IgG1 by either IgA1 or IgA2, and an easy subsequent cloning of V_H domain DNA segment using Age*I* and Sal*I* restriction sites as previously described for recombinant IgG1 (Tiller et al., 2008). However, it also introduces a Proline to Threonine substitution in position 3 of IgH constant domain 1 (C_H1). All final constructs were isolated from transformed-DH10β bacteria using plasmid PureLink™ plasmid maxiprep kit (Life technologies), sequenced and compared to the original product sequences. For the cloning of anti-HIV antibody 10-1074 (Mouquet et al., 2012), 10-1074 V_H domain gene inserted into the human Igγ$_1$-expressing vector was extracted using Age*I* and Sal*I* enzymatic digestion (New England Biolabs), and cloned after purification into human Igα1- and Igα2-expressing vectors using 0.5 μl of T4 DNA ligase (New England Biolabs). Plasmids were prepared from transformed-DH10β bacteria using plasmid PureLink™ plasmid maxiprep kit (Life Technologies), sequenced and compared to the original product sequences.

2.2. Hybridoma culture and mouse IgG purification

Hybridoma CH-EB6 cells (ATCC® HB-200™) were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 4.5 g/l D-glucose and 4 mM L-glutamine (Life Technologies), supplemented with 10% fetal bovine serum (HyClone™ Thermo Scientific), Antibiotic/Antimycotic (1X) and 1% sodium pyruvate (Life Technologies). HB-200 cell cultures were passaged every 2–3 days to maintain a cell density between 1.0×10^5 and 1.0×10^6 cells/ml. Supernatants were collected and stored at 4 °C after cell debris removal by centrifugation at 4200 rpm for 30 min (4 °C) and 0.2 μm filtration. Mouse IgG1 anti-human IgA antibodies were purified by affinity chromatography using protein G sepharose high performance beads (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. The concentration of each elution fraction was measured using the NanoDrop 2000 instrument (Fisher Scientific). The fractions of interest were pooled, and dialyzed overnight against PBS using Slide-A-Lyzer® dialysis cassettes with a 10 kD molecular weight cutoff (Thermo Scientific).

2.3. Generation of a human IgA-specific chimeric Fab

Total RNAs extraction was performed on 5×10^6 of HB-200 hybridoma cells by TRIzol® reagent (Life Technologies) following the manufacturer's instructions. The quality of isolated total RNAs was checked on an ethidium bromide-stained agarose gel after electrophoretic separation, and their concentration was determined using NanoDrop 2000 instrument (Thermo Scientific). Total RNAs were reverse transcribed in a 50 μl reaction mix containing 5 μg RNAs primed with random hexamers (Roche) using SuperScript® III reverse transcriptase (Life technologies) according to the manufacturer's protocol. Reverse transcription conditions were comprised of successive cycles as follow: 42 °C for 10 min, 25 °C for 10 min, 50 °C for 60 min and 94 °C for 5 min. cDNAs were stored at −20 °C.

Murine IgH and Igκ variable domain genes were amplified by semi-nested (IgH) and nested (Igκ) PCRs using 5 μl of cDNAs as template as previously described (Tiller et al., 2009). PCR products were separated by electrophoresis on an ethidium bromide-stained gel (2% agarose), purified using NucleoSpin® Gel/PCR Clean-up (Macherey-Nagel), and sequenced (Eurofins genomics) using the following primers: Cγ1-231 (5′-GCCCTTGAACTTCTCATTG-3′) and 5′ mVkappa/3′ BsiWI P-mJK mix (Tiller et al., 2009), for IgH and Igκ, respectively. PCR sequences were then compared to germline Ig reference sequences and analyzed using IgBLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast) and IMGT® (http://www.imgt.org).

To allow the cloning of IgH and Igκ DNA fragments into expression vectors, specific PCR amplifications were performed using 5 μl of first PCR products as template, and single gene-specific V and J gene primers including restriction sites as previously described (Tiller et al., 2009): 5′ AgeIP-mVH1S132 (5′-CTGCAACCGGTGTACATTCCGAGGTGCAGCTGCAGG AGTCTGG-3′) and 3′SalIP-mJH02 (Tiller et al., 2009) for IgH, and 5′ AgeIP-mVK10-96 (5′-CTGCAACCGGTGTACATTCCGATATTGTGATGACAC AGACTACATCC-3′) and 3′BsiWI P-mJK01 (Tiller et al., 2009) for Igκ. Purified digested PCR products were cloned into human Igγ$_1$*Fab*- or Igκ-expressing vectors (Wardemann et al., 2003; Mouquet et al., 2012) as previously described (Tiller et al., 2008). Vectors containing HB-200 Igγ$_1$*Fab* and Igκ genes were isolated from transformed-DH10β bacteria (New England Biolabs) using plasmid DNA purification kits (NucleoSpin®Plasmid, Macherey-Nagel), sequenced and compared to the original PCR-product

sequences. Finally, positive bacterial clones were grown in 250 ml of 100 μg/ml ampicillin-containing Luria-Bertani broth cultures, and plasmid DNA purifications were performed using NucleoBond® Xtra Maxi kit (Macherey-Nalgel).

2.4. Production of recombinant proteins by transient transfection

Freestyle™ 293-F suspension cells (Life Technologies) were cultured in EX-CELL® serum free medium (Sigma-Aldrich) supplemented with phenol red sodium salt (5 μg/ml, Sigma), L-glutamine (2×) and 0.2× of penicillin–streptomycin (10,000 U/ml, Life Technologies) (Baldi et al., 2012). 293-F cells were grown in suspension at 37 °C in a humidified 5% CO_2 incubator on a Celltron shaker platform (Infors HT) rotating at 90 rpm (for 3 L culture flasks), 130 rpm (for 1 L culture flasks) or 180 rpm (for 50 ml bioreactors). Twenty-four hours before transfection, cell density was adjusted at 1.5×10^6 cells/ml, and culture grown overnight in the same conditions as mentioned above to reach ~2.5×10^6 cells/ml the day of transfection. Cells were harvested by centrifugation at 1250 rpm for 5 min, and resuspended in fresh FreeStyle™ 293 Expression Medium (Life technologies) without antibiotics at a density of 2.5×10^6 cells/ml.

For the production of IgA-specific chimeric HB-200 (cHB-200) Fabs and 10-1074 monomeric IgAs, 15 μg or 150 μg of each IgH- and IgL-expressing vectors were diluted in pre-warmed FreeStyle™ 293 Expression medium at a final DNA concentration of 0.5 μg/μl, and added to cells (in a 10 ml or 125 ml culture volume, respectively). For the production of 10-1074 dimeric IgAs in the transfection conditions described above, 15 μg (for 10 ml-culture) or 150 μg (for 125 ml-culture) of IgA1 IgH- and IgL-expressing vectors combined with 30 μg or 300 μg of human J chain pcDNA™3.1/Zeo$^{(+)}$ vector were used, respectively. For the production of trimeric gp140 protein, 200 μg of YU2-gp140 pcDNA™3.1/Zeo$^{(+)}$ vector (Yang et al., 2000) was used (for 125 ml-culture). All plasmid DNA purifications were performed using NucleoBond® Xtra Maxi kit (Macherey-Nalgel). The cultures were swirled 5 min on shaker in the culture incubator. Linear polyethylenimine (PEI) (25 kDa, Polysciences) solution (at 1 mg/ml in distilled water and 0.2 μm-filtered) was diluted in FreeStyle™ medium at a final concentration of 0.5 μg/μl and added to the 293-F cell cultures drop by drop. The cultures were grown under agitation in the 37 °C incubator with 5% CO_2. Twenty-four hours post-transfection, cells were diluted 1:1 with EX-CELL® serum free medium, without antibiotics and supplemented with L-glutamine and phenol red sodium salt to obtain a final transfection volume of 20 ml or 250 ml. Transfected cells were cultivated for 5 days after transfection. Supernatants were then harvested, centrifuged at 4200 rpm for 30 min and 0.2 μm-filtered to remove cells debris, before being stored at 4 °C in presence of protease inhibitors (EDTA free tablets, Fisher Scientific). Proteins of human IgA-containing supernatants were separated by SDS-PAGE using 4–12% Bis-Tris Novex gels (Life Technologies) in reducing and non-reducing conditions, and in-gel proteins were silver-stained using Pierce® Silver Stain kit (Thermo Scientific) according to manufacturer's instructions.

2.5. Batch/gravity-flow protein purification

For the purification of YU-2 gp140 protein and cHB-200 Fabs, filtered transfection supernatants (250 ml) were concentrated ~25 times and buffer-exchanged to equilibrium/wash buffer (50 mM Na_2HPO_4, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole; pH 7.4) using Centricon® plus-70 device (Millipore). HisPur Cobalt agarose beads (Thermo Scientific) were washed once with equilibrium/wash buffer. The proteins-containing concentrate in equilibrium/wash buffer (~13 ml) were added to the beads (0.5 ml), and incubated on a rolling wheel for 1 h 30 at room temperature. After centrifugation at 2000 rpm for 10 min (without break), beads were packed into Poly-Prep® chromatography columns (Bio-Rad) equilibrated with equilibrium/wash buffer. After three washes with equilibrium/wash buffer, proteins were eluted in six successive fractions of 500 μl of elution buffer (50 mM Na_2HPO_4, 300 mM NaCl, 150 mM Imidazole; pH 7.4). The protein concentration of each fraction was measured using NanoDrop 2000 instrument (Thermo Scientific), and the fractions of interest were pooled and extensively dialyzed against PBS using Slide-A-Lyzer® dialysis cassettes (Thermo Scientific). Final protein concentrations were determined using NanoDrop 2000.

Human IgA monoclonal antibodies were purified by affinity chromatography using either peptide M-coupled agarose (Invivogen) or cHB-200-coupled sepharose beads. Beads (250 μl) were washed once with 14 ml of PBS, and incubated overnight at 4 °C with 20 ml of IgA-containing supernatants on a rolling wheel. Beads were harvested by centrifugation at 2000 rpm for 10 min without break, placed into a poly-Prep® chromatography column (Bio-Rad) equilibrated with PBS, and washed 3 times with PBS. IgAs were eluted from the resins with five times 400 μl of elution buffer (0.1 M glycine, pH 3.0), and neutralized immediately at pH ~7 by adding 40 μl of 1 M Tris, pH 8.0 solution. The concentration of each elution fractions was measured using the NanoDrop 2000 instrument (Fisher Scientific). The fractions of interest were pooled, and dialyzed overnight against PBS using Slide-A-Lyzer® dialysis cassettes with a 10kD molecular weight cutoff (Thermo Scientific).

The purity of purified proteins was evaluated by SDS-PAGE using 4–12% Bis–Tris Novex gels (Life Technologies) in reducing and non-reducing conditions followed by a Coomassie blue staining as follow: 1 h at room temperature under slow agitation in the staining solution (0.1% R250 Coomassie blue, 45% Ethanol, 10% acetic acid), followed by several washes of 30 min in a destaining solution (25% ethanol, 10% acetic acid). Alternatively, in-gel proteins were silver-stained using Pierce® Silver Stain kit (Thermo Scientific) according to manufacturer's instructions. Image J software was used to perform the relative quantification of in-gel monomeric vs. dimeric IgAs.

2.6. Fabrication of a human IgA-specific affinity chromatography gel matrix

For activation of NHS-activated sepharose™ 4 fast flow gel (GE Healthcare), 4 ml of beads were mixed with 200 ml 1 mM HCl solution, and then washed two times with coupling buffer (0.2 M $NaHCO_3$, 0.5 M NaCl, pH 8.3). For coupling of human IgA-specific ligands to sepharose beads, 40 mg of purified cHB-200 Fabs in coupling buffer (after two successive dialysis cycles), were incubated 3 h at room temperature with NHS-activated beads on a rolling wheel. After centrifugation at 3000 rpm for 3 min, beads were blocked 4 h at 4 °C with blocking buffer (0.5 M ethanolamine, 0.5 M NaCl, pH 8.3) on a rolling wheel. Beads were then extensively washed as follows: twice with low pH washing buffer (0.1 M sodium acetate, 0.5 M NaCl, pH 5.2), twice with high pH washing buffer (0.1 M Tris, 0.5 M NaCl, pH 8.8), twice with low pH washing buffer, twice with PBS (Life Technologies) and twice with 20% ethanol–PBS for conservation at 4 °C. After extensive washes with PBS, cHB-200 Fabs-coupled sepharose beads were packed in an empty XK16 column between two adaptors (GE Healthcare).

2.7. Fast protein liquid chromatography (FPLC)-based protein purification

For all purifications, buffers were filtered on 0.2 μm filters (Nalgene) and degassed before use. The AKTA pure liquid chromatography system (GE Healthcare) was used at room temperature. UV absorbance and conductivity measurements were performed, recorded and analyzed using Unicorn 6.3 software (GE Healthcare).

For large-scale purification of cHB-200 Fabs, transfection supernatants (2×1 L and 1×0.5 L) were diafiltrated against equilibrium/wash buffer (50 mM Na_2HPO_4, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole; pH 7.4), and 10-fold concentrated at 4 °C using a Vivaflow 200 filtration unit (PES membrane, 10 kDa cut-off, Sartorius) coupled to a peristaltic pump. The concentrated diafiltrates (~50 ml and ~100 ml for 0.5 L and 1 L, respectively) were then loaded onto a Hitrap Talon Crude 1 ml-column (GE Healthcare) at a flow rate of 1 ml/min in one direction (up-flow) and in the other (down-flow) using the loading pump of the AKTA pure FPLC instrument. The column

was then washed with 10 column volumes (CV) of equilibrium/wash buffer at a flow rate of 1 ml/min. cHB-200 Fabs were eluted along a linear gradient (17 CV) of elution buffer (50 mM Na_2HPO_4, 300 mM NaCl, 150 mM Imidazole, pH 7.4) at a flow rate of 1 ml/min. For each production, the fractions of interest were pooled and extensively dialyzed against PBS using Slide-A-Lyzer® dialysis cassettes (Thermo Scientific).

For IgA purifications, 0.2 μm-filtered transfection supernatants of monomeric and dimeric 10-1074 IgAs (250 ml) were loaded onto our home made cHB-200 conjugated sepharose matrix at a flow rate of 2 ml/min in both up-flow and down-flow directions. The column was then washed with 10 CV of PBS at a flow rate of 1 ml/min, and IgA antibodies were eluted with 17 CV of elution buffer (0.1 M glycine, pH 3.0) at a flow rate of 1 ml/min. Elution fractions were immediately neutralized at pH ~7 with 1 M Tris, pH 8.0. For each production, the fractions of interest were pooled and extensively dialyzed against PBS using Slide-A-Lyzer® dialysis cassettes (Thermo Scientific).

Prior to the separation of 10-1074 IgA monomers, dimers and multimers by size exclusion FPLC-chromatography, pre-packed GF Hiload 16/600 Superdex 200pg (GE Healthcare) was calibrated using the HMW Gel Filtration Calibration Kit (GE Healthcare) according to manufacturer's instructions. After equilibration of the column with PBS, each concentrated IgA preparation was applied onto the column by manual injection using a 2 ml-loop (GE Healthcare) at a flow rate of 0.3 ml/min. Monomers, dimers and multimers of 10-1074 IgA1 and IgA2 were separated upon an isocratic elution with 1.2 CV of PBS.

The quality/purity of the different purified fractions was evaluated by SDS-PAGE using 4–12% Bis–Tris Novex gels (Life Technologies) in reducing and non-reducing conditions followed by a Coomassie blue staining or silver staining (Siver Stain kit, Thermo Scientific).

2.8. ELISAs

For IgA ELISAs, high-binding 96-well ELISA plates (Costar) were coated overnight with 125 and 250 ng/well of purified anti-human IgA antibody 15D6 (AbD Serotec) and HB-200, respectively. After washing with 0.05% Tween-PBS, plates were blocked for 2 h with 2% BSA, 1 μM EDTA, 0.05% Tween-PBS (blocking buffer), and then incubated for 2 h with IgA-containing culture supernatants or purified IgA controls (12 μg/ml), and seven consecutive 1:2 dilutions in PBS. After washing, the plates were developed by incubation with goat HRP-conjugated anti-human IgA antibodies (Immunology Consultants Laboratory, Inc.) (at 0.5 μg/ml in blocking buffer) for 1 h, and by addition of HRP chromogenic substrate (ABTS solution, Euromedex).

For HIV-1 gp160 binding experiments, high-binding 96-well ELISA plates (Costar) were coated overnight with 0.83 pmol/well of purified 10-1074 IgG1, IgA1 and IgA2 in PBS. After washing with 0.05% Tween-PBS, plates were blocked for 2 h with blocking buffer, and then incubated for 2 h with purified biotinylated YU-2 gp140 protein at 12 μg/ml and seven consecutive 1:3 dilutions in PBS. After washing, the plates were developed by incubation with goat HRP-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoReseach) (at 0.5 μg/ml in blocking buffer) for 30 min, and by addition of HRP chromogenic substrate (ABTS solution, Euromedex). All experiments were performed in triplicate using HydroSpeed™ microplate washer and Sunrise™ microplate absorbance reader (Tecan).

3. Results

3.1. Rapid expression cloning of human IgA monoclonal antibodies

To produce human IgA monoclonal antibodies, we first generated J chain-, Igα1- and Igα2-expression vectors by cloning for each specific product (J chain, IgA1 and IgA2 Fc regions), the corresponding nucleotide fragments were amplified from human PBMC cDNAs (Fig. 1A and B). Igα1- and Igα2-expression vectors were derived from an Igγ1-expression vector, allowing the same efficient and rapid cloning strategy using Age*I* and Sal*I* restriction sites as previously described (Tiller et al., 2008) (Fig. 1B). For recombinant antibody production, we selected a high affinity antibody, 10-1074, specific to the HIV-1 surface envelope protein gp160, formerly expressed in its native IgG1 subclass (Mouquet et al., 2012). 10-1074 IgH variable domain (V_H) gene was cloned into Igα1- and Igα2-expression vectors, which were used with the corresponding Igλ-chain encoding plasmid to co-transfect FreeStyle™ 293-F using the polyethylenimine (PEI)-precipitation method (Boussif et al., 1995) (Thomas and Klibanov, 2003; Baldi et al., 2012). FreeStyle™ 293-F cells were adapted from human embryonic kidney (HEK293) cells to grow in suspension culture at high density in serum-free medium, which allows high-yield production of recombinant proteins (Liu et al., 2008). This eukaryotic expression system also permits the incorporation of proper human post-translational modifications, which is possibly an important parameter considering the role of *O*- and *N*-linked glycans for IgA integrity and function (Hayes et al., 2014). Determination of IgA concentration in culture supernatant after 3 days post-transfection by ELISA showed comparable and high-yield amounts of monomeric 10-1074 IgA1 and IgA2 (average concentration of 59 μg/ml and 71 μg/ml, respectively) (Fig. 1C and D). Kinetic analysis of IgA production in culture supernatants revealed a progressive increase in the quantity of recombinant IgAs produced from day 3 to day 6 (Fig. 1D). Therefore, for further productions, day 5 post-transfection was selected for the harvesting of supernatants prior to IgA purification (with approximately 100 μg/ml for both IgA1 and IgA2). Due to the absence of serum proteins in culture media, protein production could be directly checked on silver-stained gel following the SDS-PAGE separation of loaded transfection supernatants (Fig. 1E). Recombinant 10-1074 IgAs were first purified by batch/flow gravity chromatography using commercially available affinity beads (peptide M-coupled agarose beads), and then rapidly buffer-exchanged to PBS. The purity of purified IgA1 and IgA2 antibodies was confirmed by visualization of the specific protein bands (whole IgA, IgH and IgL bands) on Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel (Fig. 1F). Finally, ELISA binding analyses showed that similarly to their IgG1 counterpart, purified 10-1074 IgA1 and IgA2 antibodies recognize with high affinity YU-2 gp140, a recombinant trimeric form of HIV-1 envelope protein (Fig. 1E), suggesting that antigen recognition of 10-1074 was not modified upon artificial IgA class switching.

3.2. Fab-based affinity chromatography for human IgA antibody purification

To allow an easy scaling-up at affordable cost for IgA purification, we designed a strategy to generate anti-human IgA beads as an alternative to commercially existing products for affinity chromatography (Fig. 2A). More specifically, we envisioned covalently linking anti-human IgA molecules to the surface of sepharose beads. To produce IgA-specific molecules, we made use of a previously isolated hybridoma cell line secreting a mouse anti-human IgA IgG1 antibody, CH-EB6 (also called HB-200) (Kiyotaki et al., 1987). First, we ensured that HB-200 could bind to IgA1/IgA2 purified in PBS (Fig. 2B), and secreted in culture supernatants (data not shown). ELISA experiments showed that purified mouse HB-200 antibodies could capture human IgA1 and IgA2 as efficiently as a commercially available anti-IgA molecule (clone 15D6) (Fig. 2B). To maximize the density of anti-human IgA molecules at beads surface, we decided to reduce the size of the mouse HB-200 IgG1 molecule by generating its Fab counterpart as recombinant fragments. To this end, we amplified the mouse IgH and Igκ variable domains of HB-200 antibody from the original hybridoma cells (Fig. 2C), and cloned the DNA fragments into human Igγ1 Fab and Igκ expression vectors. Histidine-tagged chimeric HB-200 (cHB-200) Fabs were produced by transient transfection of 293-F cells, and purified from culture supernatants by batch/flow gravity chromatography using cobalt-coupled agarose beads (Fig. 2D). Purified cHB-200 Fabs were coupled to sepharose beads (Fig. 2A), and used to purify recombinant IgAs from culture supernatants by batch/flow gravity chromatography. SDS-PAGE gel staining

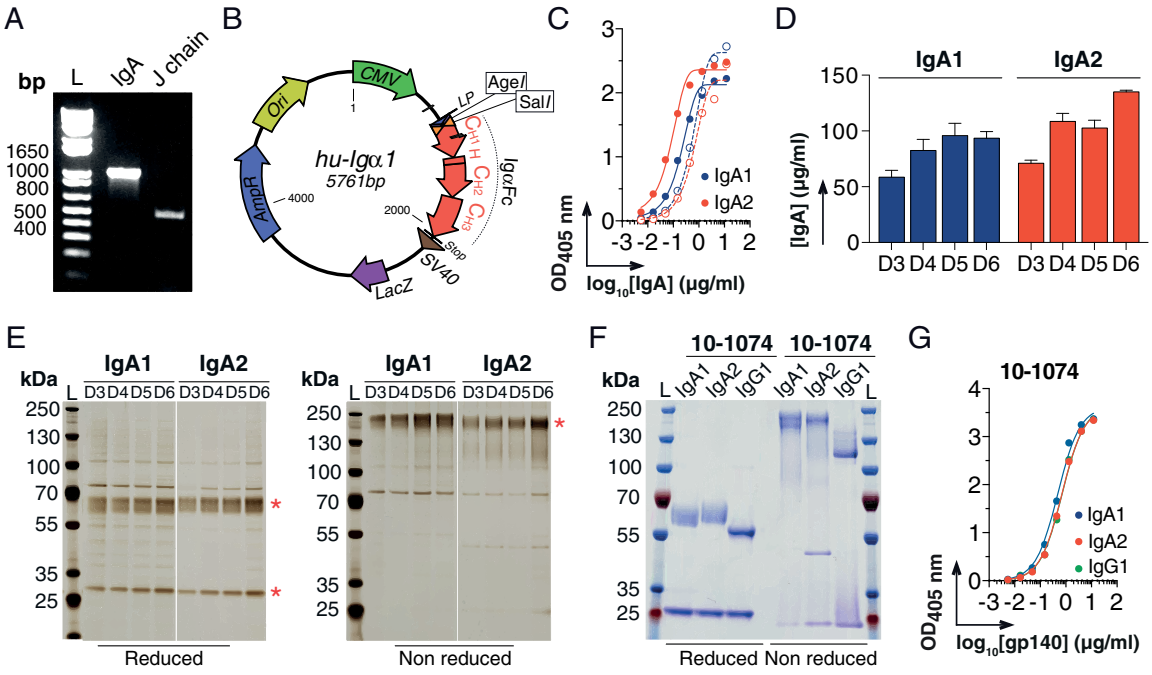


Fig. 1. Expression cloning of human IgA monoclonal antibodies. (A) Ethidium bromide-stained agarose gel under UV light shows PCR amplification products for IgA-Fc and J chain DNA fragments. (B) Schematic map of IgA1 expression vector shown as example. IgA2 expression vector has the same pUC19 backbone as the IgA1 plasmid, but contains the Fc DNA fragment of the human IgA2 (total vector size 5722 bp). CMV, Cytomegalovirus promoter; LP, leader peptide (GenBank DQ407610); AmpR, ampicillin resistance gene. (C) ELISA graph shows binding of 10-1074 IgA1 (blue straight line) and IgA2 (red straight line) in culture supernatants from day 5 post-transfection (diluted at 1:5 and 1:3, respectively) to mouse anti-human IgA antibodies. Dotted lines represent binding of purified IgA1 (blue) and IgA2 (red) used as standards. The *x*-axis shows the concentration of antibody standards (log_{10} µg/ml) required to obtain the ELISA values ($OD_{405\ nm}$) indicated on the *y*-axis. (D) Bar graphs show the kinetics of production for 10-1074 IgA1 (blue) and IgA2 (red) antibodies from day 3 to day 6 (D3-D6) post-transfection. Error bars indicate the SEM of values obtained from two independent experiments. (E) Silver-stained SDS-PAGE gels show IgA1 and Ig2 (in supernatant) produced from day 3 (D3) to day 6 (D6), in reducing (left) and non-reducing conditions (right). Red asterisks indicate whole 10-1074 IgA1/IgA2 antibodies, and their IgH and IgL chain counterparts. (F) Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel shows purified 10-1074 IgA1, IgA2 and IgG1 antibodies, and their IgH and IgL chain counterparts. (G) ELISA analyses comparing the binding of YU-2 gp140 to purified 10-1074 IgA1, IgA2 and IgG1 antibodies. The *x*-axis shows the gp140 concentration (log_{10} µg/ml) required to obtain the ELISA values ($OD_{405\ nm}$) indicated on the *y*-axis. Error bars indicate the SEM for triplicate values.

of purified products allowed visualization of unique protein bands corresponding to the expected molecular weight for whole IgA, IgH and IgL proteins, confirming the purity of the purified material (Fig. 2E). We then estimated the binding capacity of cHB-200 resin (quantity of human IgAs bound *per* ml of beads), and compared it to commercially available peptide M resin. Although both types of matrix had comparable binding capacity, cHB-200 beads captured more efficiently IgA1 than IgA2 (5 mg/ml of beads for IgA1, and 3.4 mg/ml of beads for IgA2) (Fig. 2F). In addition, by performing up to six successive regeneration/purification cycles on the cHB-200 matrix, we confirmed that the binding capacity of the affinity gel was not profoundly modified upon regeneration and re-use. Thus, we concluded that the cHB-200 Fab-based affinity chromatography we developed is an efficient and robust method for human IgA antibody purification. Therefore, we produced larger quantity of cHB-200 Fabs, subsequently FPLC-purified using Cobalt-coupled resin (Fig. 2G), and used to fabricate ~3.5 ml of dry cHB-200 matrix, which would theoretically allow us to purify up to 18 mg and 12 mg of IgA1 and IgA2, respectively.

3.3. Mass production and FPLC purification of monomeric and dimeric IgA antibodies

To allow the assembly of IgA1 (and possibly IgA2) molecules in their dimeric forms, the human J chain gene fragment was cloned into a pcDNA3.1 expression vector. We then transfected small batches of 293-F cells with different ratios of 10-1074 IgA1 vectors/J-chain vector, purified IgAs, and quantified the protein bands corresponding to monomeric and dimeric IgAs by densitometry on silver-stained SDS-PAGE gel (Fig. 3A). We observed an increase in the quantity of dimeric IgAs produced according to the amount of J-chain DNA vector added during 293-F co-transfection (Fig. 3A). For further productions we selected a J-chain/IgA ratio of 2, which resulted in the production of an IgA mixture made of approximately 60% and 40% monomeric and dimeric IgAs, respectively (Fig. 3A). To generate higher amount of monomeric and dimeric 10-1074 IgAs, we transfected 3.1×10^8 293-F cells (250 ml of culture final), and harvested the supernatants 5 days post-transfection for each production (10-1074 mIgA2, mIgA1 and dIgA1). To increase the yield of bound IgAs to the affinity matrix during FPLC-based purification, the supernatants were successively loaded in both direction (bottom-up and top-down) on the chromatography column containing the manually packed 3.5 ml of cHB-200 resin (Fig. 3B). 10-1074 mIgA2, mIgA1 and dIgA1 were then eluted from the resin by low pH (Fig. 3C–E), and the pooled fractions for each IgA molecule were checked on a Coomassie blue-stained gel (Fig. 3F), which confirmed the purity of the expected products.

To only obtain monomeric IgA molecules, purified 10-1074 mIgA1 and mIgA2 fractions were separated by size exclusion FPLC (Fig. 4A and B), and fractions corresponding to the chromatographic peak of monomeric IgAs were pooled. Likewise, dimeric IgA1 molecules were separated from monomers and multimers by size exclusion FPLC (Fig. 4C). The monomers recovered from these fractions were added to the ones harvested from the purification of 10-1074 IgA1 monomers, concentrated and buffer-exchanged to PBS by dialysis. SDS-PAGE gel staining of purified products allowed visualization of unique protein bands corresponding to the expected molecular weight for whole IgA1 and IgA2, confirming the purity of the purified 10-1074 IgA monomers (Fig. 4E). Since the chromatographic peaks for multimers and dimers were not properly separated, fractions of those peaks were checked on a silver-

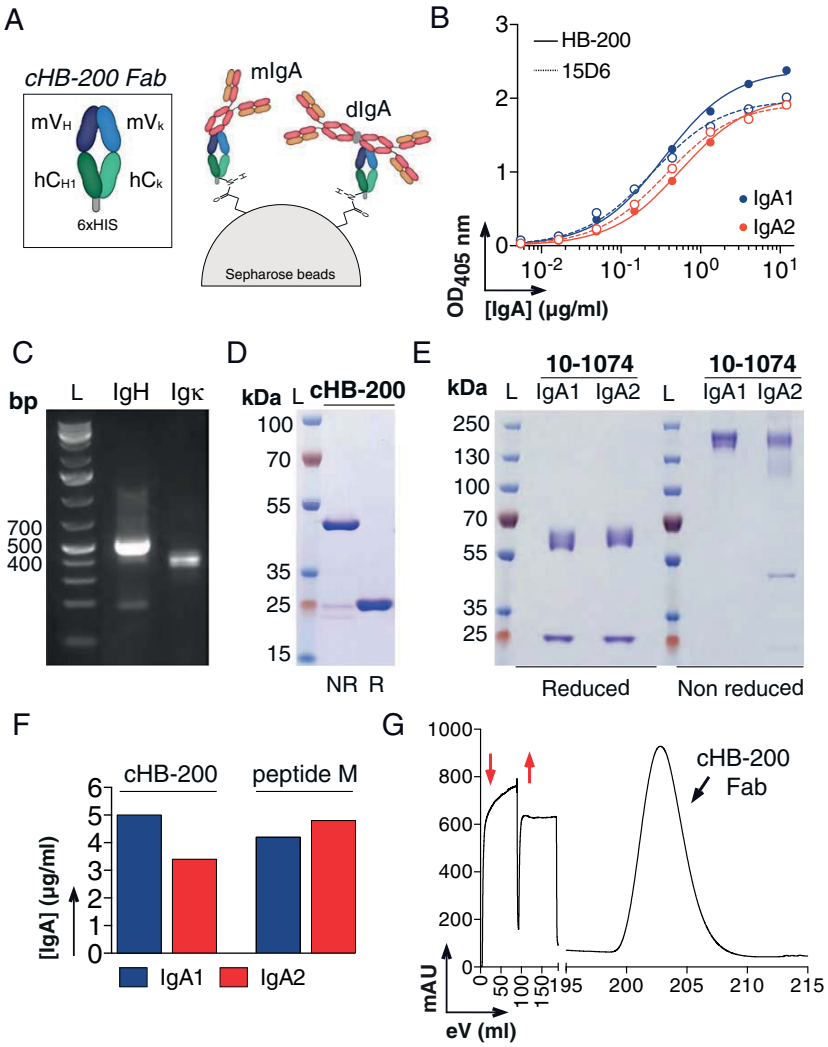


Fig. 2. Purification of human IgA antibodies by Fab-based affinity chromatography. (A) Schematic representation of the chimeric HB-200 Fabs (cHB-200) and cHB-200 coupled resin. cHB-200 is composed of the murine HB-200 antibody variable domains, mV_H and mV_κ, joined to the human IgH constant domain 1 (hC_H1) and IgK constant domain (hC_κ), respectively. A hexa-Histine tag (6× HIS) is linked to the C-terminus of human C_H1 domain. The human IgA-specific resin for affinity purification was prepared by coupling cHB-200 Fabs to N-hydroxysuccinimide (NHS)-activated sepharose beads, resulting in the formation of amide bonds between Fabs and beads. (B) ELISA-based binding analyses of purified 10-1074 IgA1 (blue line) or IgA2 (red line) to anti-IgA monoclonal antibody HB-200 (straight line) and 15D6 (dotted line). The *x* axis shows the IgA antibody concentration (µg/ml) required to obtain the ELISA values ($OD_{405\ nm}$) indicated on the *y* axis. (**C**) Ethidium bromide-stained agarose gel under UV light shows PCR amplification products for HB-200 V_H and V_κ DNA fragments. (D) Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel shows purified cHB-200 Fabs in reducing (R) and non-reducing conditions (NR). (E) Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel shows 10-1074 IgA1 and IgA2 antibodies purified using cHB-200 Fabs-based affinity chromatography, and their IgH and IgL chain counterparts (in reducing condition). (F) Bar graph shows the binding capacity of the cHB-200 coupled affinity resin (quantity of IgA1 and IgA2 purified by ml of beads). (G) The fast protein liquid chromatography (FPLC) chromatogram shows the purification of large amount of cHB-200 Fabs using Cobalt-coupled agarose Hitrap Talon column. The loading steps of the Fabs-containing diafiltrat onto the cobalt column in both directions (red arrows) and the elution peak (920 mAU) are shown on the left and the right side of the graph, respectively. The *x* axis shows the elution volume (eV) required to obtain the values of absorption units at 280 nm (mAU) indicated on the *y* axis.

stained SDS-PAGE gel for selecting the most resoluted ones to be pooled, concentrated and dialyzed (Fig. 4D). Silver-stained gel of the purified products confirmed that although a very small residual amount of polymeric IgAs was still detectable, the dIgA1 fraction mostly contained dimeric 10-1074 IgAs (Fig. 4E). Quantification of the final purified 10-1074 IgAs was performed, and showed the recovery of high amount of pure antibodies as follow: 11.55 mg (added to the 5.63 mg purified from the dIgA1 fraction gives 16.24 mg in total) for mIgA1, 11.18 mg for mIgA2 and 2.40 mg for dIgA1. In other words, using our experimental procedure we could easily generate from 2 L of cell culture, up to 100 mg and 10 mg of purified monomeric and dimeric IgA monoclonal antibodies, respectively.

4. Discussion

In the past decade, the development of methodologies for producing monoclonal antibodies from human B cells has allowed a rapid rise in the isolation and characterization of human antibodies (Tiller, 2011; Wilson and Andrews, 2012). Expression cloning of recombinant monoclonal antibodies from single B cells was originally developed 15 years ago to study level B-cell tolerance in humans at a molecular (Wardemann et al., 2003), and its breakage in autoimmune diseases (Yurasov et al., 2005). In the following years, this powerful methodological approach has been used to investigate normal B-cell antibody repertoire and reactivity in normal and

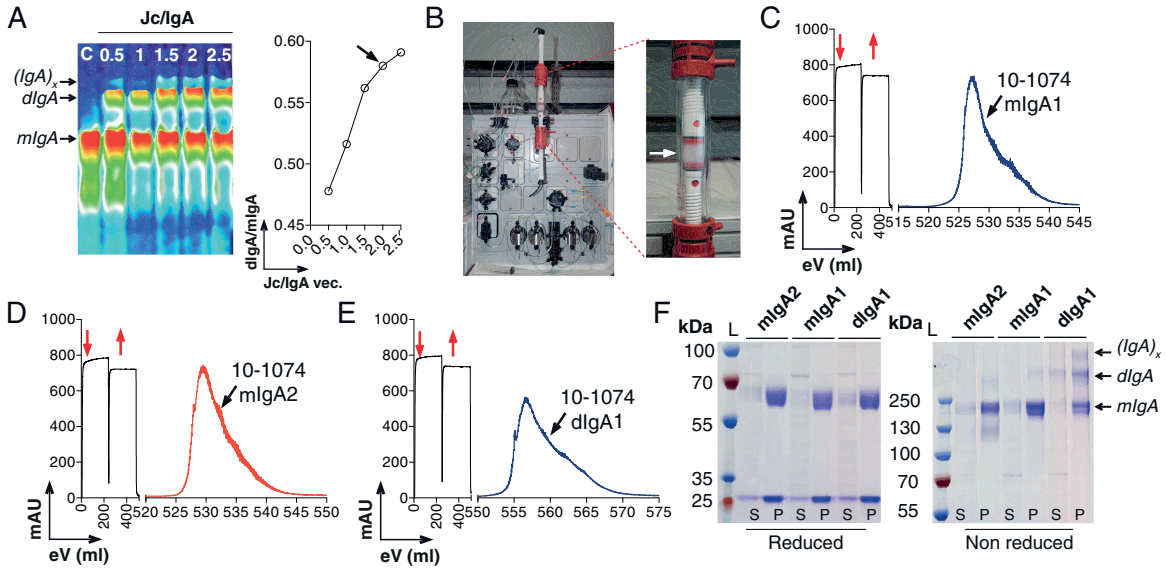


Fig. 3. Large-scale production and FPLC-based affinity purification of human IgA1 and IgA2 monoclonal antibodies. (A) Densitometric analysis of a silver-stained SDS-PAGE gel, in which purified 10-1074 IgA1 products produced in the presence of different amounts of J chain were loaded (left hand-side). Jc/IgA, ratio of Jc / IgA:Igk plasmid DNA used for 293-F transfection. C, purified monomeric IgA1 control. Graph shows the ratio of dimeric (dIgA) vs. monomeric (mIgA) produced according to the Jc/IgA plasmid DNA ratio used during transfection. $(IgA)_x$, multimeric IgA. The arrow indicates the Jc/IgA ratio selected for further experiments. (B) Pictures show the cHB-200 Fabs-coupled resin packed into the XK16 column. (C) FPLC chromatogram shows the purification of a large amount of monomeric 10-1074 IgA1 antibodies using cHB-200 coupled resin. The loading steps of the IgAs-containing supernatant onto the affinity chromatography column in both directions (red arrows) and the elution peak (730 mAU) are shown on the left and the right side of the graph, respectively. The *x* axis shows the elution volume (eV) required to obtain the values of absorption units at 280 nm (mAU) indicated on the *y* axis. (D) Same as (C) but for monomeric 10-1074 IgA2 antibodies (elution peak at 740 mAU). (E) Same as (C) but for dimeric 10-1074 IgA1 antibodies (elution peak at 565 mAU). (F) Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel shows monomeric IgA2 (mIgA2) and monomeric and dimeric 10-1074 IgA1 (mIgA1 and dIgA1) purified (P) using cHB-200 Fabs-based affinity chromatography (right-hand side), and their IgH and IgL chain counterparts (in reducing conditions, right-hand side). The gels also show residual mIgA1, dIgA1 and IgA2 antibodies in supernatants (S) after passage into the affinity column.

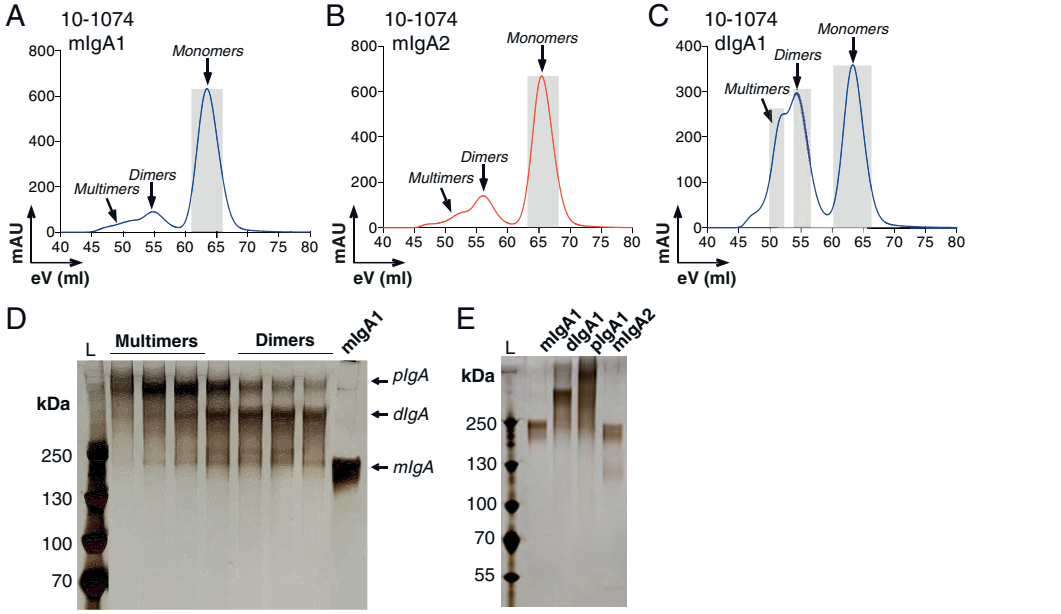


Fig. 4. Separation of monomeric, dimeric and multimeric human IgA antibodies by size exclusion FPLC-based chromatography. (A) FPLC chromatogram shows the protein distribution (IgA monomers, dimers and multimers) of the purified 10-1074 monomeric IgA1 antibody pooled fraction (mIgA1) after size exclusion chromatography (SEC). The *x* axis shows the elution volume (eV) required to obtain the values of absorption units at 280 nm (mAU) indicated on the *y* axis. Gray bars indicate selected fractions. (B) Same as in (A) but the 10-1074 monomeric IgA2 antibody pooled fraction (mIgA2). (C) Same as in (A) but the 10-1074 dimeric IgA1 antibody pooled fraction (mIgA2). (D) Silver-stained SDS-PAGE gel shows the SEC elution fractions selected for pooling to generate final purified dimeric IgA (dIgA) and multimeric/polymeric IgA (pIgA) fractions. mIgA1, purified monomeric IgA1 control. (E) Silver-stained SDS-PAGE gel shows 10-1074 monomeric IgA1 (mIgA1), dimeric IgA1 (dIgA1), multimeric/polymeric IgA1 (pIgA1), and monomeric IgA2 (mIgA2) antibodies in the final purified fractions.

immunodeficient conditions (Ng et al., 2004; Herve et al., 2005; Tsuiji et al., 2006; Tiller et al., 2007; Isnardi et al., 2008; Menard et al., 2011a; Scheid et al., 2011), and to dissect B-cell responses to pathogens and vaccines. Indeed, the capture of antigen-specific single B cells from infected individuals or vaccinees followed by antibody production has allowed the thorough characterization of human monoclonal antibodies targeting pathogens or vaccine antigens (Di Niro et al., 2010; Kaur et al., 2011; Muellenbeck et al., 2013; Mouquet, 2014). Few studies, however, have explored antibody responses mediated by IgAs in a physiologic state (Benckert et al., 2011), in autoimmune diseases (Di Niro et al., 2012), and in response to infectious agents (Di Niro et al., 2010). Recombinant IgA antibodies were produced as recombinant IgGs for practical reasons, which constitute limits for the evaluation of antigen bivalent or tetravalent binding of IgAs, and IgA Fc-mediated effector functions.

In this study, we developed a very efficient expression cloning method to produce large quantities of purified monomeric and dimeric human IgA monoclonal antibodies within a two weeks period (Fig. 5). To facilitate the cloning of IgA V_H and V_L fragments amplified from single RT-PCRs as previously described (Wardemann et al., 2003; Tiller et al., 2008), we designed an IgA expression vector using the same cloning strategy as for IgG production. Transient co-transfection of 293-F cells with IgH and IgL vectors for 5 days (or less) enabled the production of 0.5 to 1 mg per 20 ml of culture in a small bioreactor. Importantly, two orbital shakers, each of them holding up to 64 bioreactors, can fit into a regular cell culture CO_2 incubator. Therefore, one can produce 128 or more recombinant IgA antibodies in a week, which is very advantageous when working in medium to high throughput fashion. Indeed, this approach could be used for the production of several hundreds of IgA monoclonal antibodies following single capture by flow cytometry of IgA-expressing memory B cells and IgA-secreting plasmablasts.

Although different methods have been described to purify both human IgA1 and IgA2 molecules (Sandin et al., 2002; Langley et al., 2005; Beyer et al., 2009; Reinhart et al., 2012; Moldt et al., 2014), some of which are well known and commercially available such as peptide M derived from streptococcal M protein (Sandin et al., 2002) and *Staphylococcus aureus* superantigen-like protein 7 (SSL7) (Langley et al., 2005), we have created a novel, human IgA-specific affinity resin using chimeric anti-IgA Fabs. Our affinity matrix showed similar binding capacity to IgAs compared to what is described for peptide M-coupled beads, which have the highest binding capacity among commercial products, and equivalent robustness in its binding activity over multiple binding/regeneration cycles. Indeed, the use of antigen-specific Fabs as capturing agents offers a wide array of possibilities for the fabrication of affinity gels specific to various antigens. Specific Fab fragments can be easily prepared from native IgG antibodies by papain digestion or generated as recombinant proteins to enable high quantity production as described here. Of note, a similar approach was developed to purify human IgA1 and IgA2 antibodies using camelid single-domain ligands (Reinhart et al., 2012).

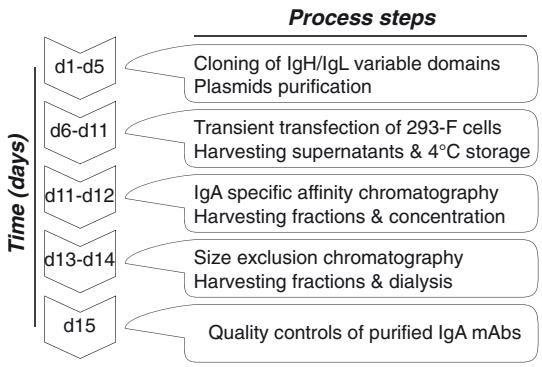


Fig. 5. Schematic diagram summarizing the methodological approach used for the efficient generation of human IgA monoclonal antibodies. Major experimental processes and the respective time periods required for the completion of each step are depicted.

In this study, we also described the production of dimeric IgAs by combining co-transfection IgH/IgL-expressing vectors with a J-chain encoding vector, and two successive rounds of FPLC purification by affinity and size-exclusion chromatography. Although this strategy might not be as efficient as cell lines expressing dimeric IgAs, it has the advantage of being flexible, and allowing for the production and purification of monomeric and dimeric IgAs in quasi-equivalent amounts for numerous candidates. We are currently working on improving the system by generating 293-F cell lines that endogenously express the human J chain at high levels, theoretically permitting the production of dimeric IgAs only by simply co-transfecting with the IgH- and IgL-expressing vectors for the IgA monoclonals of interest.

In summary, we have developed a rapid and efficient method for producing purified human monomeric and dimeric IgA monoclonal antibodies, which relies on the expression cloning of antibody variable genes compatible with the methodology developed earlier by others to generate human antibodies from single B cells (Wardemann et al., 2003; Tiller et al., 2008). This technical approach could be utilized to dissect IgA B-cell responses in humans, thereby facilitating investigations on the biology, function and therapeutic potential of IgAs.

Acknowledgments

We are grateful to Michel C. Nussenzweig (The Rockefeller University) for kindly providing us the cloning vectors for human immunoglobulins and 10-1074 IgG antibody, and to Caroline Eden (Icahn School of Medicine at Mount Sinai) for technical assistance, helpful comments and manuscript editing. We are very grateful to the ANRS (Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les hépatites virales) to have supported the purchase of the FPLC instrument and the two PCR thermocyclers used in this study. We also thank Jean-Philippe Boursier (GE Healthcare) for technical support. This work was supported by the European Research Council (ERC)–Seventh Frame-work Program (ERC-2013-StG 337146). H.M. was supported by the G5 Institut Pasteur Program and the *Milieu Intérieur* Program (ANR-10-LABX-69-01).

References

Baldi, L., Hacker, D.L., Meerschman, C., Wurm, F.M., 2012. Large-scale transfection of mammalian cells. Methods Mol. Biol. 801, 13.
Benckert, J., Schmolka, N., Kreschel, C., Zoller, M.J., Sturm, A., Wiedenmann, B., Wardemann, H., 2011. The majority of intestinal IgA+ and IgG+ plasmablasts in the human gut are antigen-specific. J. Clin. Invest. 121, 1946.
Beyer, T., Lohse, S., Berger, S., Peipp, M., Valerius, T., Dechant, M., 2009. Serum-free production and purification of chimeric IgA antibodies. J. Immunol. Methods 346, 26.
Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J.P., 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92, 7297.
Di Niro, R., Mesin, L., Raki, M., Zheng, N.Y., Lund-Johansen, F., Lundin, K.E., Charpilienne, A., Poncet, D., Wilson, P.C., Sollid, L.M., 2010. Rapid generation of rotavirus-specific human monoclonal antibodies from small-intestinal mucosa. J. Immunol. 185, 5377.
Di Niro, R., Mesin, L., Zheng, N.Y., Stamnaes, J., Morrissey, M., Lee, J.H., Huang, M., Iversen, R., du Pre, M.F., Qiao, S.W., Lundin, K.E., Wilson, P.C., Sollid, L.M., 2012. High abundance of plasma cells secreting transglutaminase 2-specific IgA autoantibodies with limited somatic hypermutation in celiac disease intestinal lesions. Nat. Med. 18, 441.
Hayes, J.M., Cosgrave, E.F., Struwe, W.B., Wormald, M., Davey, G.P., Jefferis, R., Rudd, P.M., 2014. Glycosylation and Fc receptors. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 382, 165.
Herve, M., Xu, K., Ng, Y.S., Wardemann, H., Albesiano, E., Messmer, B.T., Chiorazzi, N., Meffre, E., 2005. Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. J. Clin. Invest. 115, 1636.
Isnardi, I., Ng, Y.S., Srdanovic, I., Motaghedi, R., Rudchenko, S., von Bernuth, H., Zhang, S.Y., Puel, A., Jouanguy, E., Picard, C., Garty, B.Z., Camcioglu, Y., Doffinger, R., Kumararatne, D., Davies, G., Gallin, J.I., Haraguchi, S., Day, N.K., Casanova, J.L., Meffre, E., 2008. IRAK-4- and MyD88-dependent pathways are essential for the removal of developing autoreactive B cells in humans. Immunity 29, 746.
Kaetzel, C.S., 2007. Mucosal Immune Defense: Immunoglobulin A. Springer, New York.
Kaur, K., Sullivan, M., Wilson, P.C., 2011. Targeting B cell responses in universal influenza vaccine design. Trends Immunol. 32, 524.

Kiyotaki, M., Cooper, M.D., Bertoli, L.F., Kearney, J.F., Kubagawa, H., 1987. Monoclonal anti-Id antibodies react with varying proportions of human B lineage cells. J. Immunol. 138, 4150.
Langley, R., Wines, B., Willoughby, N., Basu, I., Proft, T., Fraser, J.D., 2005. The staphylococcal superantigen-like protein 7 binds IgA and complement C5 and inhibits IgA-Fc alpha RI binding and serum killing of bacteria. J. Immunol. 174, 2926.
Liu, C., Dalby, B., Chen, W., Kilzer, J.M., Chiou, H.C., 2008. Transient transfection factors for high-level recombinant protein production in suspension cultured mammalian cells. Mol. Biotechnol. 39, 141.
Mantis, N.J., Rol, N., Corthesy, B., 2011. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. Mucosal Immunol. 4, 603.
Meffre, E., 2011. The establishment of early B cell tolerance in humans: lessons from primary immunodeficiency diseases. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1246, 1.
Menard, L., Saadoun, D., Isnardi, I., Ng, Y.S., Meyers, G., Massad, C., Price, C., Abraham, C., Motaghedi, R., Buckner, J.H., Gregersen, P.K., Meffre, E., 2011a. The PTPN22 allele encoding an R620W variant interferes with the removal of developing autoreactive B cells in humans. J. Clin. Invest. 121, 3635–3644.
Menard, L., Samuels, J., Ng, Y.S., Meffre, E., 2011b. Inflammation-independent defective early B cell tolerance checkpoints in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 63, 1237.
Moldt, B., Saye-Francisco, K., Schultz, N., Burton, D.R., Hessell, A.J., 2014. Simplifying the synthesis of SIgA: combination of dIgA and rhSC using affinity chromatography. Methods 65, 127.
Mouquet, H., 2014. Antibody B cell responses in HIV-1 infection. Trends Immunol. 35, 549.
Mouquet, H., Scharf, L., Euler, Z., Liu, Y., Eden, C., Scheid, J.F., Halper-Stromberg, A., Gnanapragasam, P.N., Spencer, D.I., Seaman, M.S., Schuitemaker, H., Feizi, T., Nussenzweig, M.C., Bjorkman, P.J., 2012. Complex-type N-glycan recognition by potent broadly neutralizing HIV antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109, E3268.
Muellenbeck, M.F., Ueberheide, B., Amulic, B., Epp, A., Fenyo, D., Busse, C.E., Esen, M., Theisen, M., Mordmuller, B., Wardemann, H., 2013. Atypical and classical memory B cells produce Plasmodium falciparum neutralizing antibodies. J. Exp. Med. 210, 389.
Ng, Y.S., Wardemann, H., Chelnis, J., Cunningham-Rundles, C., Meffre, E., 2004. Bruton's tyrosine kinase is essential for human B cell tolerance. J. Exp. Med. 200, 927.
Reinhart, D., Weik, R., Kunert, R., 2012. Recombinant IgA production: single step affinity purification using camelid ligands and product characterization. J. Immunol. Methods 378, 95.
Samuels, J., Ng, Y.S., Coupillaud, C., Paget, D., Meffre, E., 2005. Impaired early B cell tolerance in patients with rheumatoid arthritis. J. Exp. Med. 201, 1659.
Sandin, C., Linse, S., Areschoug, T., Woof, J.M., Reinholdt, J., Lindahl, G., 2002. Isolation and detection of human IgA using a streptococcal IgA-binding peptide. J. Immunol. 169, 1357.
Scheid, J.F., Mouquet, H., Feldhahn, N., Seaman, M.S., Velinzon, K., Pietzsch, J., Ott, R.G., Anthony, R.M., Zebroski, H., Hurley, A., Phogat, A., Chakrabarti, B., Li, Y., Connors, M., Pereyra, F., Walker, B.D., Wardemann, H., Ho, D., Wyatt, R.T., Mascola, J.R., Ravetch, J.V., Nussenzweig, M.C., 2009. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. Nature 458, 636.
Scheid, J.F., Mouquet, H., Kofer, J., Yurasov, S., Nussenzweig, M.C., Wardemann, H., 2011. Differential regulation of self-reactivity discriminates between IgG+ human circulating memory B cells and bone marrow plasma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 18044–18048.
Sullivan, M., Kaur, K., Pauli, N., Wilson, P.C., 2011. Harnessing the immune system's arsenal: producing human monoclonal antibodies for therapeutics and investigating immune responses. F1000 biology reports. 3 p. 17.
Thomas, M., Klibanov, A.M., 2003. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery. Appl. Microbiol. Biotechnol. 62, 27.
Tiller, T., 2011. Single B cell antibody technologies. N. Biotechnol. 28, 453.
Tiller, T., Tsuiji, M., Yurasov, S., Velinzon, K., Nussenzweig, M.C., Wardemann, H., 2007. Autoreactivity in human IgG+ memory B cells. Immunity 26, 205.
Tiller, T., Meffre, E., Yurasov, S., Tsuiji, M., Nussenzweig, M.C., Wardemann, H., 2008. Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. J. Immunol. Methods 329, 112.
Tiller, T., Busse, C.E., Wardemann, H., 2009. Cloning and expression of murine Ig genes from single B cells. J. Immunol. Methods 350, 183.
Tsuiji, M., Yurasov, S., Velinzon, K., Thomas, S., Nussenzweig, M.C., Wardemann, H., 2006. A checkpoint for autoreactivity in human IgM+ memory B cell development. J. Exp. Med. 203, 393.
Wardemann, H., Nussenzweig, M.C., 2007. B-cell self-tolerance in humans. Adv. Immunol. 95, 83.
Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J.W., Meffre, E., Nussenzweig, M.C., 2003. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. Science (New York, N.Y.) 301, 1374.
Wilson, P.C., Andrews, S.F., 2012. Tools to therapeutically harness the human antibody response. Nat. Rev. Immunol. 12, 709.
Wrammert, J., Smith, K., Miller, J., Langley, W.A., Kokko, K., Larsen, C., Zheng, N.Y., Mays, I., Garman, L., Helms, C., James, J., Air, G.M., Capra, J.D., Ahmed, R., Wilson, P.C., 2008. Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. Nature 453, 667.
Yang, X., Farzan, M., Wyatt, R., Sodroski, J., 2000. Characterization of stable, soluble trimers containing complete ectodomains of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. J. Virol. 74, 5716.
Yurasov, S., Wardemann, H., Hammersen, J., Tsuiji, M., Meffre, E., Pascual, V., Nussenzweig, M.C., 2005. Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. J. Exp. Med. 201, 703.

LORIN Valérie

Identification, caractérisation moléculaire et étude des propriétés fonctionnelles des anticorps neutralisants à large spectre contre le VIH-1

Résumé

Un vaccin efficace contre le VIH-1 devrait induire des anticorps largement neutralisants (bNAbs), actifs contre la plupart des quasi-espèces de VIH-1 qui circulent chez les individus infectés dans le monde. De tels bNAbs sont produits chez 1-2 % des individus chroniquement infectés. Leur administration passive a montré leur efficacité dans des études précliniques et cliniques. Dans ce travail, nous avons cherché à comprendre les mécanismes d'action par lesquels les bNAbs IgG et IgA sont capables d'interférer sur la transmission et la propagation du VIH-1. Deux problématiques de recherche ont été investiguées :

Dans un premier temps, nous avons étudié le rôle des anticorps anti-VIH-1 dans la protection de deux barrières tissulaires d'intérêt dans l'infection par le VIH-1 : l'épithélium du tractus génital féminin et l'endothélium de la barrière hémato-encéphalique. Nos investigations démontrent : (i) qu'un des mécanismes probables par lequel les bNAbs préviennent la transmission de l'infection est qu'ils ne bloquent pas le transport du virus à travers les cellules épithéliales génitales mais qu'ils neutralisent les virions transcytosés ; (ii) le rôle clé de la neutralisation par les anticorps anti-VIH-1 dans la protection contre l'invasion virale du système nerveux central.

Le développement potentiel de lymphocytes B mémoires IgA^+ de type bNAbs au cours de l'infection à VIH-1 a été très peu exploré. Nous avons donc dans un deuxième temps, caractérisé au niveau moléculaire, structural et fonctionnel *in vitro* et *in vivo*, de nouveaux bNAbs anti-VIH-1 de type IgA isolés d'un « contrôleur virémique ». Notre travail démontre que les bNAbs IgA anti-VIH-1 au même titre que les bNAbs IgG pourraient participer de manière efficace à l'immunité anti-VIH-1.

Mots clés : Virus de l'Immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1), Anticorps largement neutralisants anti-VIH-1 (bNAbs), IgG, IgA, Transcytose, Barrières tissulaires.

Abstract

Effective vaccines in preventing HIV-1 infection should induce broadly neutralizing antibodies (bNAbs), active against most of the HIV-1 quasispecies circulating in infected individuals worldwide. Such bNAbs are developed in 1-2% of infected individuals. Their passive administration has been shown to be effective in preclinical and clinical settings. In this work, we aimed at understanding the mechanisms by which IgG and IgA bNAbs can interfere with the transmission and propagation of HIV-1. Two research avenues have been investigated:

First, the study of the role of anti-HIV-1 antibodies in the protection of two tissue barriers of importance in HIV-1 infection: the epithelium of the female genital tract and the endothelium of the blood-brain barrier. Our investigations demonstrate: (i) that one of the plausible mechanisms by which bNAbs prevent the transmission and the dissemination of HIV-1 is that although they do not block virus transcytosis across genital epithelial cells, they neutralize transcytosed virions; (ii) the crucial role of neutralization by anti-HIV-1 antibodies in the protection against HIV-1 brain invasion despite their inability to inhibit transendothelial viral migration.

Second, the development of bNAbs-like IgA^+ memory B cells in response to HIV-1 infection has been poorly explored. Hence, we have characterized at the molecular, structural and functional level *in vitro* and *in vivo* novel anti-HIV-1 IgA bNAbs isolated from a "viremic controller". Our work demonstrates that like IgG bNAbs, IgA bNAbs likely contribute actively to antiviral immunity against HIV-1 and may therefore, play a key role in the protection.

Keywords: Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), Broadly neutralizing antibodies against HIV-1 (bNAbs), IgG, IgA, Transcytosis, Tissue barriers.