

#### **AVERTISSEMENT**

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact: ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

#### LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
<a href="http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\_droi.php">http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\_droi.php</a>
<a href="http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm">http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm</a>





## Développement de nouveaux immunoconjugués pour l'activation directe du complément à la surface de cellules infectées par le VIH

## Rapport de stage de Master 2

Biotechnologies, Microbiologie, Aliment, Nutrition, Environnement

Université de Nancy
Faculté des Sciences et Technologies
Le 7 Juillet 2016

Présenté par Even Bertrand Encadré par Mathieu Amand (PhD, Postdoctoral Fellow)

Laboratoire d'accueil : Luxembourg Institut of Health

Equipe: HIV Clinical and Translational Resarch group, Infectious Diseases Research Unit, Department of infection and immunity

Maitre de stage : Carole Devaux (PhD, Principal Investigator)

Directeur du département : Pr. Markus Ollert



## Remerciements

Je tiens à remercier tout paticulierement Carole Devaux et Mathieu Amand pour m'avoir permis de participer à leur projet mais également pour leur soutien, leur attention et la confiance qu'ils m'ont accordé tout au long de ce stage. Merci Mathieu pour ta patience.

Je remercie également grandement toute l'équipe HIV Clinical and Translational Research ; Gilles Iserentant, Jean Yves Servais, Philipp Adams, Xavier Dervillez pour leur bonne humeur et leur soutien au quotidien.

Merci aussi à Laurence Guillorit et Christine Lambert pour m'avoir m'avoir aidé dans la rédaction de ce rapport.

Je tiens aussi à remercier Stéphanie Kler pour avoir pris le temps de m'expliquer et de m'aider à prendre en main la chromatographie.

Aussi, je remercie les autres stagaires ainsi que les doctorants pour avoir passé de très bons moments ensembles.

#### **Abréviations**

ADN: Acide désoxyribonucléique

ADNc: ADN complémentaire

ARN: Acide ribonucléique

ART: Antiretrovirale therapie

ARV: Antirétroviraux

bnAb: broadly neutralizing antibody

CDC: cytotoxicité directe du complément

CRP: C-réactive protéine

DC: dendritic cell

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

ESCRT: Endosomal sorting complexes

required for transport

FACS: Fluorescence-assisted cell sorting

FPLC: Fast protein liquid chromatography

IRD: Institut de recherché pour le

développement

LB: Lymphocyte B

LPS: Lipopolysaccharide

LRA: Latency reversing agent

LT: Lymphocyte T

MAC: Membrane attack complex

MASP: Mannan-binding lectin serine protease

MBL: Mannose-binding lectin

MFI: Mean fluorescent intensity

MoMuLV: Moloney murine leukemia virus

NK: Natural killer

PM: Poids moléculaire

PMA: Acétate-myristate de phorbol

PBS: Phosphate saline buffer

SIDA : Syndrome de l'immunodéficience

humaine

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate

polyacrylamide gel electrophoresis

scFv: Single-chain variable fragment

TCR: T cell receptor

VIH: Virus de l'immunodéficience humaine

VIS : Virus de l'immunodéficience simien

# Sommaire

Remer	ciements	3
Abrévi	ations	5
Introd	uction	9
l.	Epidémiologie	9
II.	Origine du VIH	11
III.	Pathogenèse	11
a.	Transmission	11
b.	Stades de l'infection	12
IV.	Réponse immunitaire	13
V.	Structure et génome	14
VI.	Cycle réplicatif	15
a.	Attachement	15
b.	Fusion	15
c.	Transcription inverse et intégration	16
d.	Production des protéines virales	16
e.	Assemblage des virions	17
f.	Bourgeonnement	18
g.	Maturation	18
VII.	Traitements anti rétroviraux	19
VIII.	HIV Cure	21
IX.	Stratégie d'activation dirigée du complément	24
Matéri	iel et méthode	31
1.	Culture cellulaire	31

II. Plasmides	31
III. Transfection	33
IV. Production	33
V. Purification	34
Chromatographie par HPLC	34
Gel de polyacrylamide par Sypro	34
VI. Cytométrie en flux	35
Résultats	36
I. Génération du multimère bi-fonctionnel par transfection des cellules HEK-293T	36
II. Sélection des clones	38
III. Purification	40
Chromatographie d'affinité HIS-trap	41
Sypro	43
IV. Activation du complément	44
Discussion	48
Références	50
Résumé	59

## Introduction

## I. Epidémiologie

Depuis sa découverte en 1983 par les Professeurs Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montagnier, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), agent causal du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) a causé 75 millions d'infections et 35 millions de décès, soit une mortalité d'environ cinquante pour cent. En 2015, 36.7 millions de personnes vivaient avec le VIH. La même année, on dénombrait 1.1 millions de décès de maladies liées au SIDA (Figure 1).

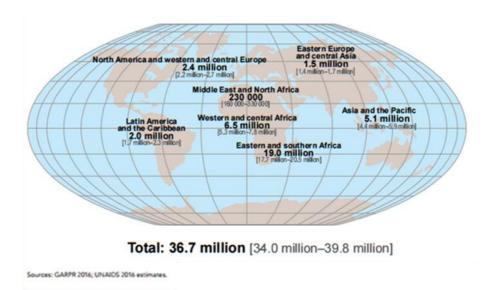


Figure 1 : Nombre de personnes vivant avec le VIH dans le monde, Onusida 2016.

Plus de 90% des nouveaux cas d'infections ont lieu dans les pays en voie de développement et notamment en Afrique subsaharienne ou 1,4 millions de nouveaux cas ont été recensés en 2015. Le nombre d'enfants dans le monde (<15ans) vivant avec le VIH est lui estimé à 1.8 million, avec 150 000 nouveaux cas chaque année pour 100 000 décès. Néanmoins la mise en place et l'évolution de la tri-thérapie antirétrovirale depuis les années 2000 a permis de réduire considérablement le

nombre de décès (Figure 2 et 3). (Rapport mondial : Rapport ONUSIDA sur l'épidémie mondiale de sida 2013, Journée mondiale de lutte contre le sida, Le sida en chiffres 2015) (Figure 2 et 3).

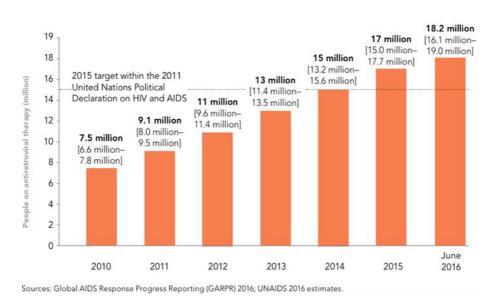


Figure 2 : Nombre de personnes vivant avec le VIH bénéficiant d'un traitement ARV dans le monde, 2010-2016, Onusida.

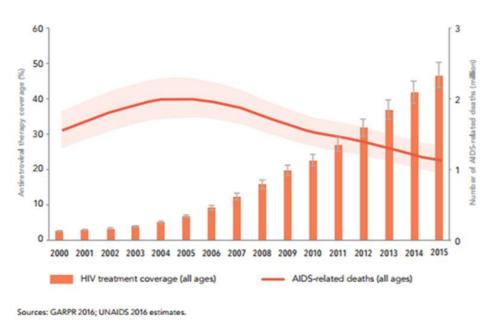


Figure 3 : Couverture thérapeutique antirétrovirale et nombre de décès liés au sida.

## II. Origine du VIH

Il existe deux types de VIH, le VIH-1 et le VIH-2. Ils se différencient par leur origine géographique, l'organisation de leur génome et leur lien de parenté avec le virus de l'immunodéficience simienne (VIS). En effet, le VIH-1 proviendrait de la sous-espèce de chimpanzé *Pan troglodytes troglodytes* (Gao et al., 1999), alors que le VIH-2 du singe *Cercocebus torquatus* (Hirsh et al., 1989). Le VIH-1, plus virulent et infectieux, est responsable de l'épidémie mondiale alors que le VIH-2 se concentre en Afrique de l'Ouest (Nyamweya et al., 2013).

Une étude récente de l'IRD de Montpellier démontre que le virus est apparu à Kinshasa en République démocratique du Congo en 1920. Il se serait propagé grâce au développement des transports, notamment fluviaux. Importé d'Afrique aux Caraïbes, puis des Caraïbes en Amérique du Nord, le VIH fut par la suite découvert en 1983 à Paris sur un patient ayant vécu aux Etats Unis (Faria et al., 2014).

Sur la base des distances génétiques, le VIH-1 a été classé en trois groupes. Le groupe M (Major), majoritaire, le groupe O (Outlier), et le groupe N (Non-M Non-O). Le groupe M comprend 9 sous types (A, B, C, D, E, F, G, H, J, K). Le VIH-1 de sous-type C prédomine largement dans le monde (50 % des cas d'infection). En France, c'est le VIH-1 de sous-type B qui prédomine (Chaillon et al., 2017) alors que les sous-types non-B représentent actuellement 60% des nouvelles infections au VIH-1 (Rapport comité SIDA 2016 Lux online) au Luxembourg.

## III. Pathogenèse

#### a. Transmission

Le VIH se transmet à travers les muqueuses par les fluides corporels comme le sang, le sperme, le liquide pré-séminal, les liquides rectaux, les fluides vaginaux et le lait maternel d'une personne infectée par le VIH. Les voies de transmission principales sont les rapports sexuels à risque (80%),

l'utilisation de matériel d'injection de drogue, les transfusions sanguines et la transmission de la mère à l'enfant (20%) (Cohen et al., 2011). Les fluides corporels doivent cependant contenir une charge virale élevée pour permettre la contamination (Diagnoses of HIV Infection in the United States and Dependent Areas, 2014, volume 26, 123 pages).

#### b. Stades de l'infection

Après l'infection, la maladie se développe en plusieurs étapes : l'infection aiguë est caractérisée par un pic de virémie et l'apparition d'anticorps spécifiques. En parallèle, on observe une chute réversible des LT CD4+ ainsi qu'une augmentation progressive des LT CD8+ cytotoxiques. Cette phase dure généralement 2 à 3 mois.

Durant la phase chronique, la charge virale est basse dans le plasma. C'est une phase généralement asymptomatique. Pendant cette phase, le VIH se réplique et la charge virale augmente lentement. En parallèle, le nombre de LT CD4+ diminue (Figure 4). Un groupe particulier de patients, appelés « elite controllers » est capable de maintenir une charge virale faible avec un taux de LT CD4+ élevé pendant plusieurs années et sans traitement (Brenchley et al., 2004).

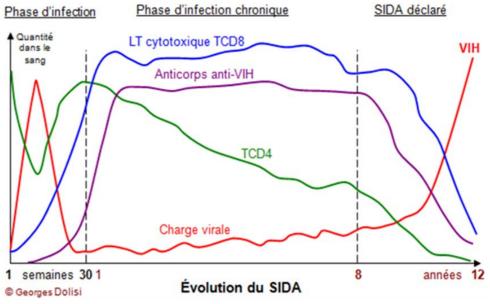


Figure 4: Evolution de l'infection au VIH.

La phase SIDA est déclarée lorsque le taux de LT CD4+ est inférieur à 200/µl. Elle est caractérisée par une immunodéficience sévère, avec une chute concomitante des LT CD8+ et du titre des anticorps. L'individu n'est plus capable de se défendre face aux infections opportunistes qui causent souvent le décès de celui-ci.

## IV. Réponse immunitaire

L'immunité innée fait intervenir essentiellement des cellules NK cytotoxiques, DC phagocytes et présentatrices d'antigène ainsi que des macrophages capables de phagocytose. C'est la première barrière aux infections, celle-ci consiste à éliminer de manière aspécifique l'agent responsable de l'infection, s'en suit une réponse immunitaire adaptative spécifique au pathogène (Bhardwaj et al., 2012).

La réponse cellulaire fait intervenir principalement les LT CD8+ qui peuvent directement éliminer les LT CD4+ infectées par le VIH par lyse cellulaire (Manches et al., 2014). Les LT CD8+ spécifiques de Env et Nef apparaissent en premiers, suivis de ceux spécifiques de Gag et Pol. Le VIH est un virus capable d'accumuler rapidement des mutations, lorsque les mutations ont lieu au niveau des épitopes reconnus par le TCR, cela lui permet d'échapper aux mécanismes cytotoxiques des LT CD8+ (Dennis R. Burton et Lars Hangartner, 2016).

La réponse humorale contre le VIH fait intervenir les LB (Bhardwaj et al., 2012), elle consiste en la production d'anticorps dirigés majoritairement contre gp120 et gp41. L'apparition de ces anticorps se fait 3 à 12 semaines après la contamination. Les patients développent des anticorps neutralisant et non-neutralisant. Ils sont souvent inefficaces étant donné le haut taux de mutation du VIH. Certains patients développent des « broadly neutralizing antibodies » capables d'inhiber l'infection au VIH, notamment en bloquant les processus de fusion. Ces anticorps sont dénommés « broadly » car ils sont capables de reconnaitre une large variété de virus en ciblant des régions conservées de l'enveloppe. Ils sont donc moins sensibles aux mutations du virus (Kwong et al., 2013).

## V. Structure et génome

Le VIH est un Lentivirus de la famille des *Retroviridae*, communément appelé rétrovirus il possède un génome composé d'ARN. Son matériel génétique est protégé par une capside interne et une capside externe, de forme icosaédrique. C'est un virus enveloppé d'une bicouche lipidique d'origine cellulaire dans laquelle deux principales protéines d'origine virale sont présentes sous formes de trimères : gp120 et gp41. Le virus enveloppé mesure environ 100nm (Figure 5).

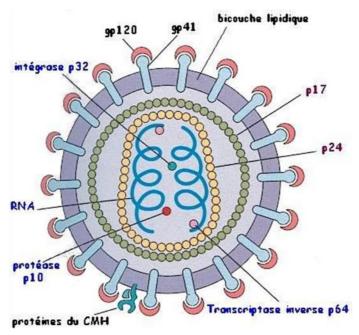


Figure 5 : Représentation schématique de la structure du VIH.

Son génome est composé de deux copies identiques d'ARN simple brin qui s'expriment par le biais de 10 gènes. Les trois principaux sont gag, pol et env. Le gène gag code les protéines des deux capsides (p24 et p17), pol code la transcriptase inverse et l'intégrase (p64 et p32), capables de retro transcrire l'ARN génomique en ADN double brin et de l'intégrer dans le génome humain et env code gp160 un précurseur des deux protéines de l'enveloppe (gp120 et gp41).

Les 7 autres gènes : tat, rev, nef, vif, vpr, vpu et asp codent pour des protéines régulatrices.

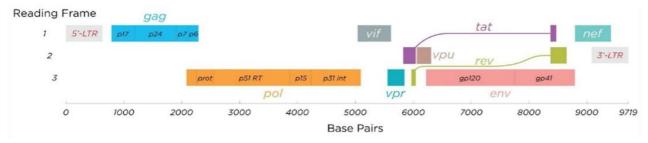


Figure 6 : Structure génomique du VIH.

## VI. Cycle réplicatif

#### a. Attachement

Le premier contact entre le virus et la cellule cible est relativement aspécifique, la charge négative des protéines de surface de la cellule entraîne le virus à la surface de celle-ci (Saphire, et al., 2001). La liaison spécifique entre la membrane cellulaire et la membrane du VIH se fait entre les protéines gp120 et gp41 présentes sous forme de trimères (Merk, et al., 2013) et les récepteurs membranaires des cellules permissives, les protéines CD4 des lymphocytes T ainsi que les co-récepteurs CXCR4 et CCR5. L'emploi préférentiel de l'un ou l'autre des corécepteurs détermine l'affinité des souches virales (X4, R5 ou X4R5) (Björndal, et al., 1997), qui infectent respectivement les cellules exprimant CCR5 et/ou CXCR4. Certaines chimiokines se liant aux corécepteurs CXCR4 et CCR5 peuvent inhiber l'entrée du VIH par compétition avec gp120 pour l'attachement aux corécepteurs. Elles sont notamment sécrétées par les lymphocytes T CD8+ et les macrophages (Cocchi, et al., 1996).

#### b. Fusion

Gp120 se lie au récepteur CD4, ce qui provoque le réarrangement de la boucle V1 et V2 de gp120, le réarrangement et l'exposition de la boucle V3 (Wilen, et al., 2012). Après l'exposition à la boucle V3, le complexe CD4-gp120 est capable d'interagir avec CCR5 et CXCR4. Le peptide de fusion gp41 peut s'insérer dans la membrane cellulaire et former un complexe de fusion à six hélices

(Markosyan, et al., 2009, Buzon et al., 2010). Il entraîne l'insertion de l'ARN viral et des enzymes dans le cytoplasme cellulaire à travers le pore de fusion (Sattentau, 1992, Hung, et al., 1999, Dettin, et al., 2003, Blumenthal et al., 2012) (Figure 7).

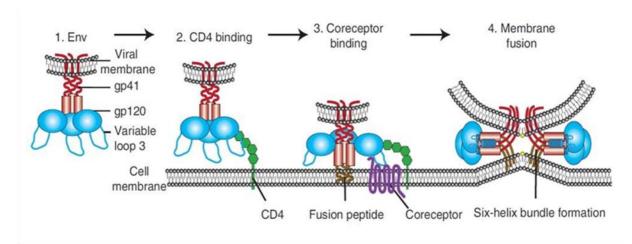


Figure 7: Processus d'attachement et de fusion du VIH.

#### c. Transcription inverse et intégration

Après la fusion, l'ARN viral est rétro-transcrit en ADN double brin complémentaire (ADNc) par la reverse transcriptase par l'intermédiaire d'un hybride ADN/ARN qui peut être dégradé par la RNaseH (Gao, et al., 2001.), il est ensuite transformé en ADN double brin. L'ADNc double brin est intégré au génome de l'hôte par une intégrase (p32) (Delelis, et al., 2008, Hu, et al., 2012). Dans certains cas, l'ADN viral ne s'intègre pas dans le noyau, il y a alors trois possibilités. La première consiste en la ligature des deux extrémités de l'ADN viral pour former un cercle contenant deux LTR, la seconde entraîne une recombinaison homologue du génome viral formant un cercle avec un seul LTR, la troisième implique que l'ADN pro viral demeure sous forme linéaire (Yuntao Wu, 2004, Maertens et al. 2010).

#### d. Production des protéines virales

Après son intégration, sous l'impulsion de divers stimulus (présentation antigénique, certaines cytokines) l'ADN proviral est transcrit en ARN messager et exporté vers le cytoplasme. L'ARN

messager est ensuite traduit en protéines virales par les ribosomes. Ces protéines virales s'accumulent dans le cytoplasme avant de s'assembler en virions (Figure 8).

Dans de rares cas, la cellule cible infectée est à l'état de repos. A l'état de repos, ces cellules ne produisent pas ou peu de protéines virales. Cet état d'infection non productif est réversible et dénommé latence. Il constitue un mécanisme de formation de réservoirs et d'évasion du virus au système immunitaire. Ces cellules latentes peuvent survivre pendant des décennies (Rasmussen, et al., 2011).

#### e. Assemblage des virions

L'assemblage de nouveaux virions du VIH se produit à la surface de la membrane de la cellule hôte grâce à la protéine Gag (Meng, et al., 2013). La protéine Gag est composée de 6 domaines: de matrice (MA), de capside (CA), de nucléocapside (NC), de protéine P6 et de deux domaines du peptide « spacer » (SP1 et SP2) (Henderson, et al., 1992).

Les domaines CA, SP1 et NC facilitent les contacts Gag-Gag, le domaine NC fixe les ARN viraux, le domaine MA permet l'association de Gag à la membrane cellulaire interne (Bryant, et al., 1990). Les protéines Gag-Gag et Gag-Pol forment une couche sur la membrane interne de la cellule et deviennent une particule sphérique. Le domaine P6 peut recruter d'autres protéines Vpr, Vif et Nef nécessaires au bourgeonnement (Gottlinger, et al., 1991). Indépendamment de la protéine Gag, gp160 de l'enveloppe virale se fixe à la membrane cellulaire en ancrant son domaine transmembranaire gp41 (Checkley et al., 2011). D'autres composants comme des ARN sont emballés dans les nouveaux virions (Cen, et al., 2002, Keene, et al., 2010) (Figure 8).

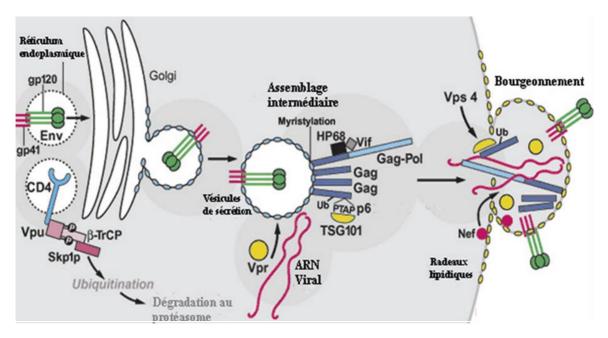


Figure 8 : Processus de production et d'assemblage des protéines virales en virions.

#### f. Bourgeonnement

Une fois que le nouveau virion est assemblé sur la membrane interne de la cellule, il se détache en emportant une partie de la bicouche lipidique. Cette étape est médiée par les complexes de tri endosomial requis pour les voies de transport (ESCRT) (Meng, et al., 2013). Les facteurs ESCRT sont capables de faciliter la déformation et la fission de la membrane cytoplasmique. La protéine Gag via son domaine P6 interagit directement avec ces complexes pour le processus de bourgeonnement (McCullough, et al., 2013).

#### g. Maturation

La maturation du VIH commence dès le processus de bourgeonnement. Il est initié par un clivage protéolytique des complexes Gag-Gag et Gag-Pol, qui génère la matrice et les protéines de la capside, la nucléocapside, la protéine P6, la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase. Ces protéines sont réarrangées pour créer un virion mature, qui est capable d'infecter d'autres cellules (Konnyu, et al., 2013) (Figure 9).

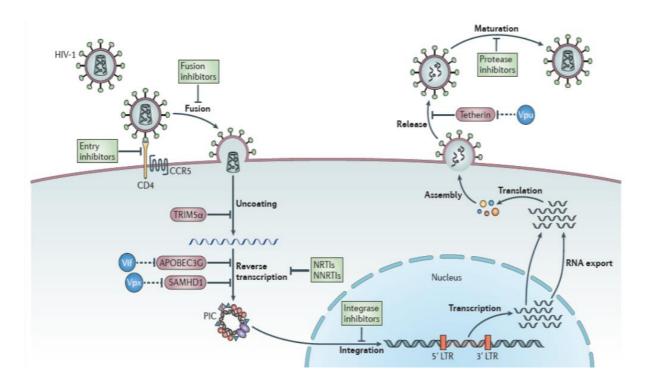


Figure 9 : Les différentes étapes du cycle de réplication du VIH, des cibles potentielles d'inhibition.

#### VII. Traitements anti rétroviraux

La thérapie antirétrovirale (ART) a vu son efficacité augmenter depuis les années 1990 passant de la mono à la bi puis la tri-thérapie. Cette combinaison thérapeutique réduit efficacement l'apparition de résistances par rapport aux monothérapies et entraine moins d'effets secondaires. La majorité des patients en Europe de l'Ouest bénéficient d'un traitement sous forme d'une seule pilule, en une prise par jour, ce qui les soulage d'une prise de traitement lourd, à plusieurs cachets, deux fois par jour mise en place il y a près de 30 ans (Nokes, et al., 1997). Les traitements actuels consistent en la prescription d'un traitement antirétroviral combinant 3 thérapies antirétrovirales, afin d'inhiber différentes étapes du cycle de réplication virale (Kortagere, 2012). Ce sont essentiellement des inhibiteurs de la transcriptase inverse (NRTIs), de la protéase (PIs), ou de l'intégrase (INIs) (Figure 10).

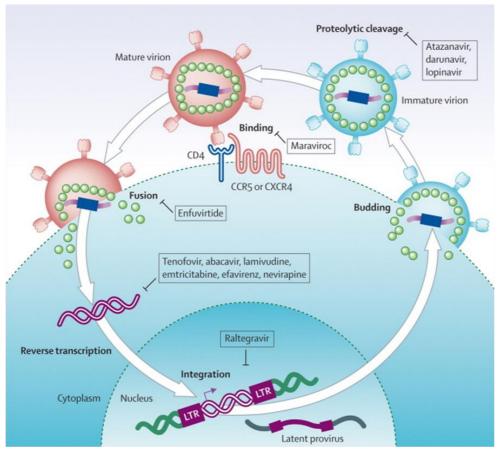


Figure 10 : Etapes de réplication du VIH et cible des antiviraux.

Les inhibiteurs d'entrée (inhibiteur de fusion et de liaison au corécepteur CCR5) représentent une nouvelle gamme pour les patients en échec au traitement de première ligne. Les inhibiteurs de maturation sont actuellement en phase d'étude clinique. Le virus étant sujet à de nombreuses mutations, ses protéines sont très variables et l'apparition de résistances aux traitements peut s'observer sur 20% des patients traités, en particulier si les patients ne prennent pas le traitement correctement (Fikkert, et al., 2004). Même si l'ART a significativement réduit la morbidité et la mortalité de l'infection au VIH, seule, elle ne permet pas l'éradication du virus en raison de la persistance de la réplication et de l'existence de réservoirs.

#### VIII. HIV Cure

La thérapie antivirale actuelle a radicalement changé les résultats cliniques et la qualité de vie des patients infectés par le VIH. Néanmoins, il y a un besoin urgent pour le développement d'une cure étant donné que le traitement ART n'éradique pas les réservoirs du VIH. De plus, lors de l'interruption du traitement, le système immunitaire ne contrôle pas efficacement la réplication virale qui ré émerge à partir des cellules infectées de manière latentes. Ces limitations condamnent les patients à suivre ce traitement ART toute leur vie. Les stratégies de guérison de l'infection au VIH-1 peuvent être divisées en deux grandes catégories : les stratégies d'éradication du virus, c'est-à-dire l'élimination de tous les réservoirs, et les stratégies de cure fonctionnelle, en d'autres mots, le contrôle du virus par le système immunitaire sans élimination totale des réservoirs (AE Cillo, et al., 2016).

Le manque d'immunité et l'immunodéficience peut cependant limiter ce modèle dans certains cas. Il existe un sous-groupe dans lequel le virus et l'immunodéficience sont contrôlés naturellement, ce sont les « elite controler » ou les patients « post-treatment controler » comme la cohorte VISCONTI. La littérature récente montre que l'immunité exceptionnelle des « elite controler » n'est généralement pas liée à un défaut du virus mais aux facteurs génétiques de l'hôte permettant une immunité cellulaire robuste pour contrôler la réplication du virus et ses réservoirs. A long terme, cette immunité pourrait représenter un bon modèle pour un traitement thérapeutique ou vaccinal (Autran B., et al, 2011).

La découverte des bNAbs dirigés contre l'enveloppe du VIH-1 est une piste intéressante, mais la production des anticorps de type bNAb par vaccination thérapeutique reste difficile en raison de la maturation et de l'affinité requise pour obtenir les bNAbs à aussi large spectre. Cependant, la perfusion passive d'un bNAb ou d'un cocktail de bNAbs pourrait s'avérer être une approche d'un traitement fonctionnel sans ART. (L'étude A5342 du Groupe d'essais cliniques sur le sida (ACTG)).

Le seul exemple vivant d' « HIV cure » ou d'éradication du virus, est celui de Timothy Ray Brown, le « patient de Berlin » (Brown TR. 2015), dont le système immunitaire infecté par le VIH a été remplacé par une transplantation de cellules souches hématopoïétiques allogéniques avec celui d'un patient qui était résistant au VIH-1 à la suite d'une mutation du gène CCR5D32. Même dans le cas d'un remplacement presque complet du système immunitaire du receveur, l'éradication du virus n'est pas garantie, les patients de Boston qui ont subi une transplantation de cellules souches hématopoïétiques allogéniques avec des donneurs de CCR5 de type sauvage ont connu un rebond viral malgré la persistance de <0,001% de cellules hôtes dans le sang périphérique (Williams, et al., 2014, Henrich T et al., HIV-1 rebound following allogeneic stem cell transplantation and treatment interruption. 21st Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, abstract 144LB, 2014). Ce type de transplantation allogénique a une morbidité et une mortalité élevée et n'est donc pas adaptée à ceux qui n'ont pas de malignité hématologique potentiellement mortelle.

La modification du génome dans les cellules T CD4 + ou les cellules souches hématopoïétiques (Bilal, et al., 2015) en associant les endonucléases dites « en doigts de zinc » pour éliminer le gène de CCR5 et ainsi inhibant le processus de fusion du VIH-1 (Tebas et al. 2014) a été évaluée. Des questions subsistent quant à l'efficacité de l'approche CCRC5 knock-out, à savoir la proportion de cellules qui doivent être modifiées pour prévenir le rebond viral et si le virus CXCR4-tropique émerge dans le temps. En conséquence, la plupart des stratégies visant à guérir l'infection par le VIH-1 se sont concentrées sur la réalisation d'un traitement fonctionnel.

Une stratégie dans l'élimination du virus dite de « shock and kill » associe un traitement anti-latence pour induire la réactivation de l'expression du VIH dans des cellules infectées latentes et leur destruction spécifique par la réponse immunitaire associée à l'ART pour contrôler les virus libres. Les stimulants de provirus actuels ne permettent pas néanmoins d'éliminer les cellules latentes infectées par le VIH. De nouveaux agents seront nécessaires pour tuer spécifiquement ces cellules après la réactivation des provirus. Les anticorps neutralisants montrent une force précieuse dans la neutralisation du VIH-1 et étaient jusqu'à présent l'intervention thérapeutique la plus puissante vers un traitement définitif (Rajeev Gautam, et al., 2016, Marina Caskey, et al., 2016). Des stratégies immunothérapeutiques efficaces consisteraient à améliorer l'immunogénicité des cellules infectées par le virus, tout en provoquant une réponse immunitaire locale et spécifique de l'hôte ainsi q'une cytotoxicité cellulaire directe (Figure 11).

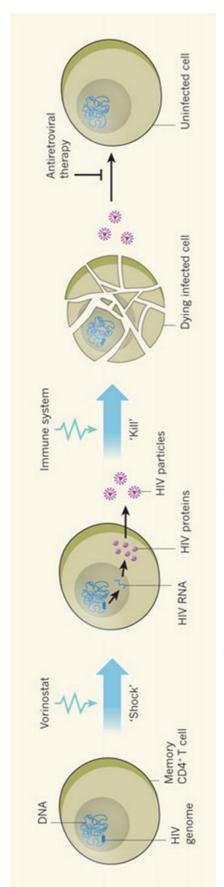


Figure 11 : Stratégie de "shock and kill" pour l'élimination des cellules latentes.

## IX. Stratégie d'activation dirigée du complément

La lyse des cellules infectées par le VIH via l'activation du complément est une approche intéressante et novatrice. En effet, la cytotoxicité dirigée par le complément (CDC) se fait de manière quasi instantanée et évite l'échappement immunitaire du virus qui se produit souvent dans les immunothérapies humorales. Le complément est un ancien bras de l'immunité innée qui (i) marque les cibles pour la clairance immunitaire et la lyse, (ii) déclenche des réactions inflammatoires, et (iii) guide la réponse immunitaire adaptative subséquente.

Les voies menant à l'activation du complément sur la membrane de la surface de la cellule pathogène sont divisées en trois voies distinctes définies par leur mode de reconnaissance des agents pathogènes.

L'activation par la voie classique est initiée par la fixation de C1q à CH2 du fragment Fc des immunoglobulines IgG1, IgG2, et IgG3 et le domaine CH4 des immunoglobulines IgM.

Cette activation fait intervenir un complexe composé de trois protéines : la protéine de reconnaissance, C1q, qui est associée à deux serines estérases C1r et C1s. Cette fixation entraîne l'auto-activation de C1r, qui clive et active ainsi C1s. Le composant C1s activé clive alors le composant C4 présent dans le plasma en un petit fragment C4a sous forme libre et un fragment majeur C4b, qui se fixe alors de façon covalente à la surface-cible de l'activation.

Le composant C2, circulant dans le plasma s'associe au C4b et est clivé par C1s en un fragment C2a, qui reste associé à C4b, et un fragment C2b sous forme libre.

Le complexe C4b2a appelé C3 convertase a la capacité de cliver C3.

La voie des lectines est activée par les structures carbohydrates des micro-organismes. Il existe une similitude avec la voie classique. La protéine de reconnaissance est ici la protéine MBL (Mannan Binding Lectin) et est associée à des sérines estérases appelées MASP 1, 2 et 3 (Mannan-Associated Serine Protease) qui présentent une forte homologie avec C1s et C1r. Une fois activées, les MASP acquièrent la capacité de cliver les protéines C4 et C2 et participent à la formation d'une C3 convertase, C4b2a, identique à celle formée à l'issue d'une activation par la voie classique.

La voie alterne est activée par des substances d'origine bactérienne telles que le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram négatives, par des bactéries Gram positives, des virus ou des cellules infectées ou transformées. Les interactions des protéines de la voie alterne aboutissent à la formation de la C3 convertase alterne.

L'assemblage de la C3 convertase alterne commence avec l'association d'une molécule de C3b avec le Facteur B. Cette association permet au facteur B d'être clivé par une sérine protéase circulant sous forme active dans le plasma, le Facteur D qui produit les fragments Ba et Bb. Le fragment Ba s'exclut du complexe tandis que le fragment Bb reste associé à C3b et acquiert une activité enzymatique. Le complexe C3bBb est la C3 convertase de la voie alterne capable de catalyser le clivage de C3 en C3b de façon absolument identique au clivage réalisé par le complexe C4b2a. La C3 convertase alterne est un complexe enzymatique très labile qui peut être stabilisé en s'associant avec la Properdine.

Le premier dépôt covalent de C3b se fait de façon aléatoire mais cette voie d'activation est capable d'une auto-amplification qui est très importante pour la reconnaissance et l'élimination des pathogènes en l'absence d'anticorps spécifiques.

L'activation du complément doit être étroitement contrôlée pour éviter d'endommager le tissu hôte. Il existe des régulateurs de l'activation du complément à la fois libre et à la surface des cellules cibles, l'inhibiteur de C1 (C1-inh) inhibe les protéases C1r et C1s, et la liaison au mannan lectine associée serine protease-2(MASP2). C3b et C4b sont inactivés par le facteur I de serine protéase liée à la surface CD46 et récepteur de complément 1 (CR1) ou facteur H de liaison C4C4b des protéines (C4bBP).

Les C3 convertases sont inhibées par des régulateurs comme CD55 et CR1 et C4BP libre ainsi que facteur H (Figure 12).

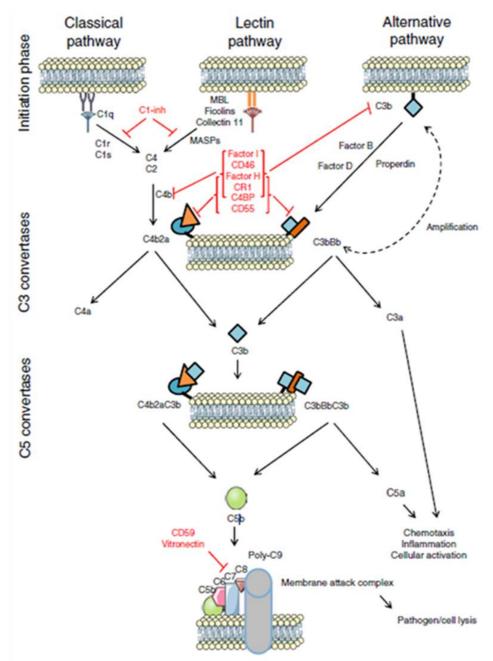
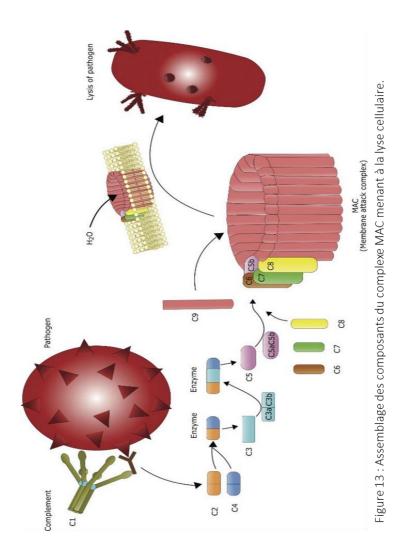


Figure 12 : Les 3 voies du système du complément menant à la formation du complexe MAC.

CD59 régule négativement la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC) en empêchant la polymérisation en C9. La vitronectine inhibe également la formation du MAC en l'empêchant de s'insérer dans la membrane cellulaire (Simon Freeley, et al., 2016) (Figure 13).



La stratégie d'activation du complément est une piste intéressante pour la lyse des cellules latentes infectées par le VIH-1 si elle cible de manière spécifique ces cellules pour y induire la lyse par la voie du système du complément.

Afin d'assembler plusieurs fonctions à la surface de cellules cibles et d'activer le complément, laprotéine de structure C4bp a été utilisée pour ses propriétés multimérisantes. La partie C-terminale de la C4bp possède la capacité de se multimériser spontanément par formation de ponts disulfure interchaines dans le réticulum formant ainsi 7 chaines alpha et 1 chaine béta (Figure 14).

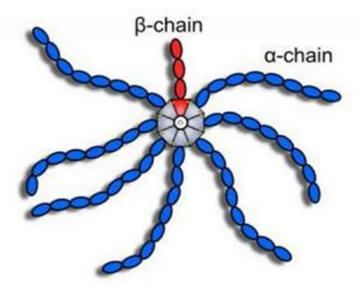


Figure 14 : Structure schématique de la C4bp.

Une partie scFv d'un bNAb anti gp120, appelé PGT121 (Julien, J. P. et al. D. 2013) suivi d'un tag HIS est greffé à la partie C-terminale de la C4bp alpha. En parallèle, un fragment FHR4 activateur du complément suivi d'un tag FLAG est lui aussi greffé à la partie C-terminale de la C4bp alpha (Figure 15).

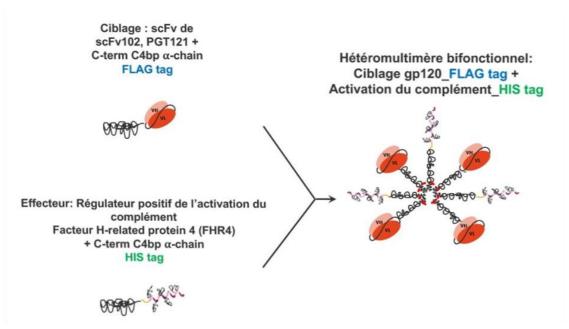


Figure 15 : Création d'un hétéromultimère par greffe d'une fonction de ciblage et d'une partie effectrice a une protéine de srtucutre C4bp.

La co-transfection des cellules HEK avec les deux plasmides codant pour ces protéines recombinantes permet la production d'un héteromultimère bi fonctionnel capable de cibler les cellules exprimant gp120, et induisant la lyse par activation du système complément à leur surface. Cette stratégie peut être couplée à une stratégie utilisant des agents d'inversion de la latence « latency reversing agent » (LRA) pour cibler les réservoirs, en réactivant l'expression de gp120 dans les cellules latentes, on parle alors de « shock and kill » stratégie (Figure 16).

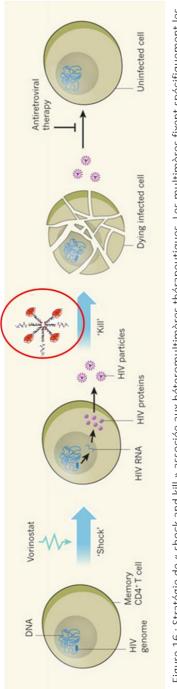


Figure 16 : Stratégie de « shock and kill » associée aux héteromultimères thérapeutiques. Les multimères fixent spécifiquement les cellules infectées avec PGT121 et amplifient la voie du système du complément avec FHR4.

Cette technologie permettant de diriger la cytotoxicité dirigée par le complément (CDC) grâce à un fragment FHR4 présent sur les multimètres multifonctionnels et a été validée et brevetée dans un modèle de lyses ce cellules tumorales (Dervillez, et al, 2016., Pleisseria, et al., 2016). Au cours de ce travail, nous avons généré, par transfection de cellules eucaryotes, des héteromultimères comprenant les fonctions ciblage anti-gp120 et activatrice du complément. Une sélection clonale a permis de sélectionner les meilleurs candidats. Ces candidats ont été produits et purifiés par chromatographie d'affinité. Leur capacité à activer l'activation du complément à la surface de cellules cible a ensuite été testée.

## Matériel et méthode

#### I. Culture cellulaire

La lignée cellulaire adhérente FLY dérive de la lignée de fibrosarcome HT1080. Ces cellules expriment les gènes gag et pol du virus de la leucémie murine de Moloney (MoMuLV) (Cosset et al., 1995). La lignée cellulaire adhérente FLYgp120 dérive de la lignée FLY. Ces cellules sont transfectées avec un vecteur permettant l'expression du gène env de HIV-1 ainsi que d'un gène de résistance à la puromycine. Ces cellules expriment à leur surface l'enveloppe de HIV-1 et produisent des pseudos particules virales avec un noyau viral de MoMuLV et une enveloppe de HIV-1. (Siegert, et al., 2005). Ces deux lignées sont cultivées en milieu DMEM à 4.5 g/L de glucose complémenté de 10% FBS,

2mM de L-glutamine et 100 U/ml d'antibiotique PEN-STREP. Le milieu de culture des FLYgp120 est additionné de 5ug/ul de puromycine afin de sélectionner les cellules transfectées.

Les cellules HEK-293T (ATCC® CRL-3216™) sont des cellules de rein embryonnaire humain (Human Embryonic Kidney). Ce sont des cellules adhérentes utilisées notamment pour la transfection. Elles sont cultivées en milieu DMEM à 4.5 g/L de glucose complémenté de 10% FBS, 2mM de L-glutamine et 100 U/ml d'antibiotique PEN-STREP.

Toutes les lignées sont maintenues en culture à 37°C sous une atmosphère enrichie en 5% de CO2.

#### II. Plasmides

Le pEF-IRES est un plasmide bi-cistronique permettant l'expression de protéines recombinantes (Figure 1a, 1b). Il est composé de (i) un site de clonage multiple (SCM) contenant : un peptide signal, d'une cassette codant pour la protéine FHR4 ou pour le fragment Fv à chaîne simple de l'anticorps PGT121 , du gène codant les 58 acides aminés de la partie non-SCR C-terminale de la chaîne α de la C4b binding protein (C4bp) (Réf. UniProt nºP04003) et d'un poly-6xHis ou Flag tag en C-terminal, de (ii) un site de recrutement du ribosome IRES (Internal Ribosome Entry Site) permettant le démarrage

de la traduction d'un ARN messager et (iii) un gène codant la puromycine pour la sélection de clônes. La partie non-SCR C-terminale de la chaine  $\alpha$  de la C4bp permet la multimérisation par la formation de ponts disulfures interchaînes entre deux cystéines. Le poly-6xHis tag permet la purification de la protéine recombinante sur colonne de HisTrap<sup>TM</sup> excel (GE Healthcare) (Figure 17).

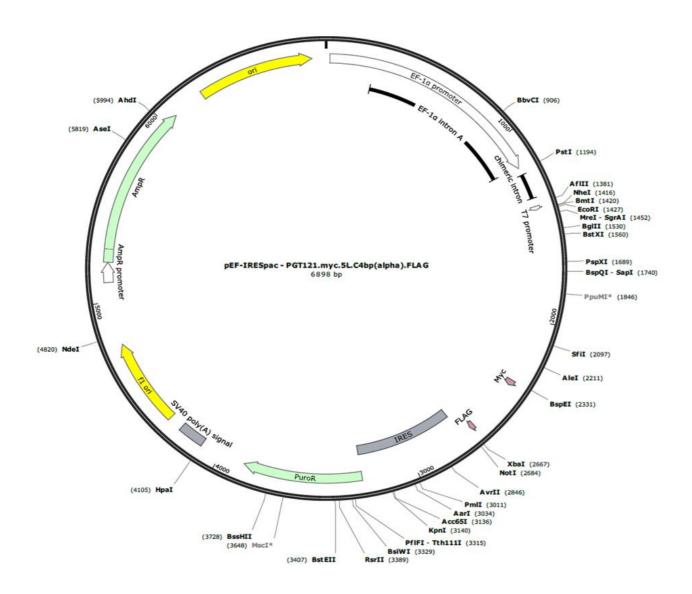


Figure 17 : pEF IRES, exemple du plasmide contenant le séquence codant PGT121 taggée FLAG.

#### III. Transfection

Un jour avant la transfection, 1,4.10<sup>6</sup> cellules HEK293T sont ensemencées dans un puit d'une plaque 6 puits dans 4mL de milieu complet. Le lendemain, les cellules sont sevrées pendant 2h dans 2,5ml de milieu sans sérum OPTIMEM. La transfection est réalisée avec le kit Lipofectamine® 2000 & PLUS™ Reagent de chez Invitrogen selon le protocole Lipofectamine® 2000 & PLUS™ DNA Transfection Reagents Protocol. En bref, 4ug de plasmides prédilués dans 100ul d'OPTIMEM sont mélangés avec 10ul de LIPOFECTAMINE prédilué dans 90 µl d'OPTIMEM. Le mélange est incubé 20 minutes à température ambiante. Les complexes DNA − lipides sont ensuite déposés sur les cellules HEK293T sevrées. Après une incubation de 4-6 heures, 2 ml de milieu complet est ajouté dans le puit. Les cellules sont ensuite incubées 48 -72h à 37°C. Après 48 − 72h d'incubation, le milieu complet est remplacé par du milieu complet additionné de Puromycin (20µg/ml) afin de sélectionner les cellules correctement transfectées et exprimant les gènes d'intérêt.

#### IV. Production

Afin de produire les héteromultimères scFv PGT121/FHR4, les cellules HEK293T transfectées sont cultivées dans des boites de culture de 175cm² en présence de milieu DMEM à 4.5 g/L de glucose complémenté de 10% de FBS, 2mM de L-glutamine, 100 U/ml d'antibiotique PEN-STREP et Puromycin (20ug/ml) (milieu complet) à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO2. A partir d'une culture entre 70 et 90% de confluence les cellules sont passées en Opti-MEM (milieu sans sérum). Apres 72 – 96 heures de culture, le surnageant est récupéré et centrifugé à 2000tr/min 2min, filtré de façon stérile à 0,22μm et conservé à 4°C.

#### V. Purification

#### **Chromatographie par HPLC**

La purification se fait par chromatographie FPLC (fast protein liquid chromatography) avec une colonne d'affinité HisTrap™ excel 1 ou 5ml pour la rétention ainsi qu'un tampon A (tampon phosphate 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,2) pour le lavage et un tampon B (tampon phosphate 20 mM, NaCl 500 mM, 500 mM Imidazole, pH 7,2) pour l'élution par compétition avec l'imidazole. Elle se fait en plusieurs étapes (i) le chargement de la protéine : la production est passée en boucle sur la colonne à raison de 2ml/min pendant 72h minimum, (ii) suivant le protocole pré défini : le tampon A est relié à la pompe A1 et le tampon B est relié à la pompe B1 ce qui permet d'ajuster les débits en fonction de la concentration d'imidazole souhaitée, la colonne passe d'abord par 1ml/min pendant 20 min à 50mM d'imidazole , puis 0.5ml/min pendant 20 min à 250mM d'imidazole. Ces deux étapes permettent d'éliminer les protéines fixées de manière aspécifique. La dernière étape d'élution se fait à 0.5ml/min pendant 20 min à 1000mM d'imidazole. Une pause est effectuée « over night » à cette étape dès l'apparition d'un pic pour concentrer un maximum la protéine éluée. Le protocole est relancé le lendemain, la collecte se fait sur des fractions de 1ml pour la phase à 250mM et 0.5ml pour la phase à 1000mM (Table 1, Fig1). La conservation du multimère dans l'imidazole se fait à 4°C.

#### Gel de polyacrylamide par Sypro

Le colorant SYPRO® Ruby (Thermo Fisher) est utilisé pour la coloration des protéines après électrophorèse sur gel de sulfate de dodécylate de sodium et de polyacrylamide (SDS-PAGE), nous utilisons des gels préfabriqués Mini-PROTEAN® TGX ™ (Bio-Rad).

La préparation des échantillons se fait à partir de 10µl de protéine purifiées mélangé à 3.3ul de tampon Laemmli 4X (Bio-Rad). La migration se fait à 0,33mA constant pour un gel dans du tampon de MES 1X (Bio rad) jusque bonne séparation des différentes formes du multimère. Le marquage se fait par Sypro Ruby (Thermo Fisher).

Une fois l'électrophorèse terminée, le gel est incubé 1h dans deux solutions de fixation composées de 50% de méthanol et 7% d'acide acétique, 2h dans SYPRO Ruby Stain et 1h dans une solution de lavage composée de 10% de méthanol et 7% d'acide acétique.

La révélation se fait avec « Typhoon 9410 » de chez GE Healthcare Life Sciences.

## VI. Cytométrie en flux

La fixation des hétéromultimères sur les cellules cibles ainsi que l'activation du complément sont quantifiés par cytométrie en flux. Le multimère est incubé avec 120 000 cellules par puit en microplaque 96 puits 30min à 4°C sous agitation. Si l'on veut mesurer l'activation du complément, les cellules sont ensuite incubées dans 50µl de solution de « Gelatin veronal buffer » GVB++ (0.3 mM CaCl2, 141 mM NaCl, 1 mM MgCl2, 0.1% gelatin, 1.8 mM sodium barbital and 3.1 mM barbituric acid, pH 7.3-7.4) contenant 25% de sérum humain décomplémenté (incubation 30 min à 56°C) et non décomplémenté 30min à température ambiante sous agitation. Cette dernière étape n'est pas nécessaire si l'on mesure simplement la fixation du multimére aux cellules cibles. Les cellules sont ensuite incubées avec un anticorps primaire IgG Rabbit anti His pour marquer le HIS tag associé au construct codant pour FHR4 du multimère, un anticorps IgG Goat anti Flag pour marquer le Flag tag associé au construct codant pour scFv PGT121 du multimère et IgG Mouse anti C3b pour marquer le dépôt de C3b à la surface des cellules et un IgG Mouse anti C5b9 pour mettre en évidence la formation du MAC. Les anticorps primaires sont incubés dans 100ul à 125ng/puits 30min à 4°C sous agitation. Un lavage des cellules est nécessaire entre chaque étape utilisant un Ac pour éliminer le bruit de fond, avec 150ul de FACS buffer (PBS, 5% FBS)/ puits. Les cellules sont incubées avec un anticorps secondaire IgG Mouse anti IgG Rabbit qui est marqué par le fluorochrome PE, un anticorps IgG Donkey anti IgG Goat qui est marqué par le fluorochrome Alexa 647 et un anticorps Goat anti Mouse marqué par le fluorochrome APC à raison de 125ng/puits. Les cellules sont conservées dans 100ul de FACS buffer à 4°C en attendant la lecture avec un cytomètre Fortessa, BD. Les résultats sont analysés avec le programme KALUZA.

## Résultats

# I. Génération du multimère bi-fonctionnel par transfection des cellules HEK-293T

Les deux plasmides bi-cistroniques permettant l'expression des fonctions i) PGT121-C4bpalpha-FLAG pour le ciblage anti-gp120 et ii) FHR4-C4bpalpha-HIS pour l'activation du complément sont cotransfectés dans des cellules HEK-293T. Dans un premier temps, la présence de l'hétéromultimère est testée. Trois jours après transfection, le surnageant de transfection est incubé avec des cellules FLYgp120 exprimant la protéine cible, gp120. La fixation du multimère à la surface des cellules FLYgp120 est révélée par l'utilisation d'anticorps anti-HIS et anti-FLAG. Les anticorps secondaires de détection sont respectivement marquée par les fluorochromes PE et APC. Les cellules FLYgp120 marquées sont ensuite analysées par cytométrie en flux. La mean fluoresence intensity (MFI) PE représente la densité globale de la fonction FHR4-C4bpalpha-HIS et la MFI APC représente la densité globale de la fonction PGT121-C4bpalpha-FLAG fixés à la surface des cellules FLYgp120. La MFI PE (HIS) et APC (FLAG) sont respectivement de 24,33 et 13.96 pour le contrôle négatif PBS et de 137 et 122.24 pour le surnageant de co-transfection indiquant la présence des deux fonctions dans le surnageant (Figure 1.a.).

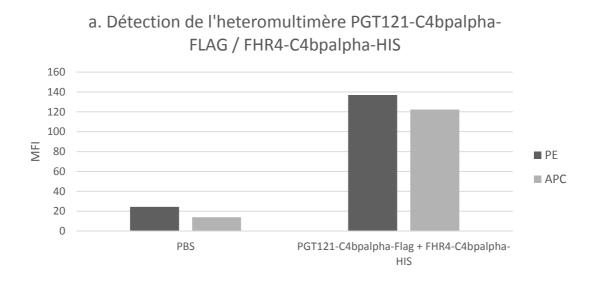
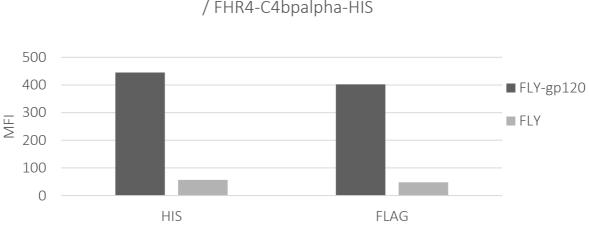


Figure 1 a. Détection de l'hétéromultimère PGT121-C4bpalpha-FLAG/FHR4-C4bpalpha-HIS par cytométrie en flux à la surface de cellules cibles FLYgp120.

De plus, la fonction FHR4-C4bpalpha-HIS n'ayant pas de fonction de liaison aux cellules FLYgp120, sa détection à leur surface confirme que les deux fonctions sont bien assemblées au sein d'hétéromultimères bi-fonctionnels. Dans un deuxième temps, nous avons évalué la spécificité de fixation de l'hétéromultimère en incubant le surnageant de transfection avec des cellules FLYgp120 et FLY, qui respectivement expriment et n'expriment pas la protéine cible. L'analyse par cytométrie en flux indique que les hétéromultimère fixent spécifiquement les cellules exprimant gp120 (Figure 1.b).



b. Spécificité de l'hétéromultimère PGT121-C4bpalpha-FLAG / FHR4-C4bpalpha-HIS

1b. Capacité de fixation de l'hétéromultimère à la surface de cellules FLYgp120 et FLY.

#### II. Sélection des clones

Après co-transfection des plasmides, les cellules HEK293T sont cultivées dans un milieu contenant de la puromycine afin de ne sélectionner que les cellules transfectées. Les cellules HEK293T exprimant le gène de résistance à la puromycine prolifèrent en formant des petits amas de cellules. Théoriquement, chaque amas cellulaire dérive d'une seule cellule parente. A ce stade, chaque clone exprime une quantité différente de multimère. Dans le but d'optimiser la production de multimère

et d'établir une lignée stable, nous procédons à une sélection clonale en deux étape. Comme les cellules HEK293T sont faiblement adhérentes, des amas cellulaires sont prélevés de manière stérile par pipetage et placés dans une plaque 96 puits. Après plusieurs jours de prolifération, les surnageants des puits dans lesquels les cellules ont proliférées sont testés en dose-réponse sur cellules FLYgp120 et analysés par cytométrie en flux.

Parmi les surnageant testés, ceux des clones D3, E4, F3 et F6 présentent une MFI anti-HIS PE supérieure à celle du bulk de transfection (Figure 2).

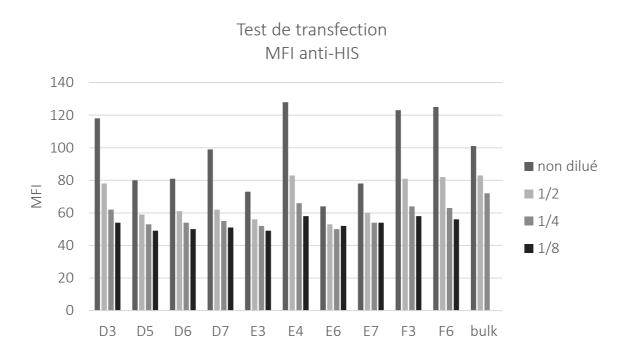


Figure 2 : Détection du tag HIS de l'hétéromultimère PGT121-C4bpalpha-FLAG/FHR4-C4bpalpha-HIS des surnageants de transfection en dose réponse par cytométrie en flux à la surface de cellules cibles FLYgp120.

Les surnageants des clones D3, E7 et F3 présentent une MFI anti-FLAG APC supérieure à celle du bulk de transfection (Figure 3).

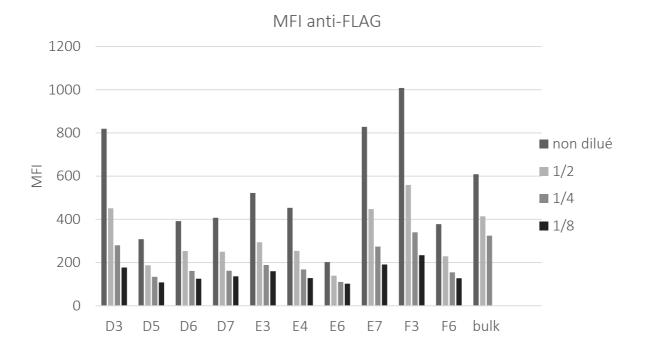


Figure 3 : Détection du tag FLAG de l'hétéromultimère PGT121-C4bpalpha-FLAG/FHR4-C4bpalpha-HIS des surnageants de transfection en dose réponse par cytométrie en flux à la surface de cellules cibles FLYgp120.

Leur nom correspond à leur emplacement sur la plaque 96 puits. Sur base de ces résultats, nous avons choisi de travailler avec le clone F3.

Dans un deuxième temps, le clone F3 a été amplifié et soumis à un tri cellulaire par cytométrie en flux. Les cellules sont trypsinisées et mises en suspension. Le cell sorting avec le FACS Aria permet de déposer théoriquement une seule cellule par puits d'une plaque 96 puits. Après plusieurs jours d'incubation et de prolifération, les surnageants des puits dans lequel les cellules ont proliférées sont testés sur cellules FLYgp120 et analysés par cytométrie en flux. La figure 4 présente les MFI anti-HIS et anti-FLAG des meilleurs sous-clones issus du cell sorting. Le clone F3.4E9 a été sélectionné et amplifié pour les expériences ultérieures.

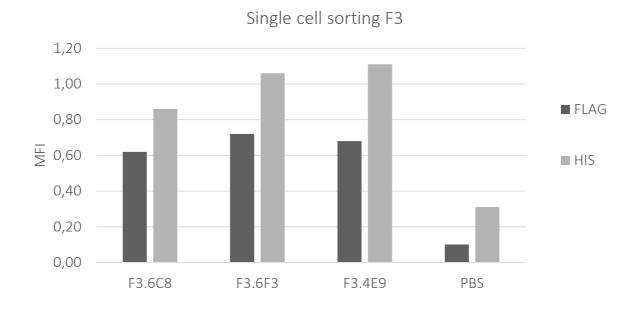


Figure 4 : Détection d'heteromultimere PGT121-C4bpalpha-FLAG/FHR4-C4bpalpha-HIS sous clone de F3 issus d'un cell sorting à la surface des cellules cibles FLYgp120.

#### III. Purification

#### Chromatographie d'affinité HIS-trap

L'héteromultimère bi-fonctionnel comprend un poly-6xHis tag qui permet la purification de la protéine recombinante par chromatographie d'affinité. Le surnageant de production en OPTI-MEM est récupéré et centrifugé à 2000tr/min 2min, filtré de façon stérile à 0,22µm et passé sur colonne de HisTrap™ excel (GE Healthcare). La figure 5 est un chromatogramme de la purification de la production du clone F3.4E9 sélectionné précédemment, les fractions sont sélectionnées selon le pic d'UV (en bleu) représentatif de la quantité de protéines éluées. En rose le pH constant de 7,4 et en rouge la conductivité qui augmente selon la concentration en sels et en imidazole, elle permet de suivre dans quelle fraction se trouve la concentration d'imidazole souhaitée. Le pic de protéines (1) représente toutes les protéines pouvant être présentes dans le milieu de production, celles-ci n'étant pas fixées à la colonne, elles sont tout de suite éliminées. A la fin de cette étape la colonne

est vidée de ses protéines aspécifiques, se fait alors le zéro baseline (2), cela consiste à remettre à zéro les UV. L'étape de lavage à 250 mM d'imidazole arrive immédiatement après, un pic étendu allant jusqu'à 0.040 d'UV est relevé, cela représente les protéines peu spécifiques comme des multimères ayant peu de fonctions FHR4-C4bpalpha-HIS ou des protéines fixées de manière aspécifique. Durant la phase à 1 M, une pause est effectuée pendant la nuit pour que la colonne baigne dans la solution d'imidazole et que les fractions suivantes soient concentrées en multimères (5 et 6). Ici une pause de 30 min supplémentaire est effectuée car toute les protéines n'étaient pas encore éluées, celle-ci se termine en (7). Les fractions couvrant les pics (5) et (6) sont récupérées.

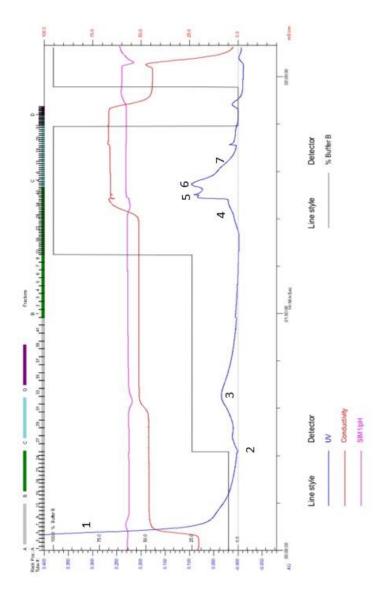


Figure 5 : Chromatogramme de la purification de l'heteromultimère PGT121-C4bpalpha-FLAG/FHR4-C4bpalpha-HIS sous clone F3.4E9. 1 : Elution des protéines aspécifiques, 2 : zéro baseline, 3 : élution des protéines peu spécifique à 250 mM d'imidazole, 4 : élution des protéines spécifiques à 1M d'imidazole, 5 et 6: pic de protéines suite à la pause overnight et 30 min dans l'imidazole, 7 : Fin du pic de protéines.

### **Sypro**

Le gel de polyacrylamide est utilisé pour séparer des protéines selon leur poids moléculaires par électrophorèse. Le Sypro Rubis permet de les révéler. Cette analyse permet de vérifier l'absence de contaminants ainsi que les différentes formes de multimère présentes. En effet, étant donné que la C4bpalpha se multimérise pour former un multimère à 7 chaines alpha, lorsque l'on co-transfecte des cellules avec deux plasmides codant pour des protéines recombinantes associées à la C4bp, la proportion relative des deux fonctions peut varier. Dans notre cas, les chaines PGT121-C4bpalpha-FLAG et FHR4-C4bpalpha-HIS font environ 35 et 120 kDa respectivement. Dès lors, selon la proportion relative de PGT121-C4bpalpha-FLAG et FHR4-C4bpalpha-HIS qui s'associent pour former des multimères, le poids moléculaire (PM) apparent diffère. Les multimères de plus haut PM sont ceux comportant une plus grande proportion de FHR4-C4bpalpha-HIS.

La figure 6 représente les fractions sélectionnées du F3.4E9 purifié par chromatographie (B40 à C9) correspondant au pic visible sur le chromatogramme (Figure 5). On y observe l'apparition progressive de bandes correspondantes aux multimères que l'on ne voit presque pas dans l'input, ce qui veut dire que la concentration de la purification a fonctionné. Aucune autre bande n'est visible sur le gel, aucun contaminant n'est présent. Ces fractions peuvent être testées en cytométrie pour confirmer la présence et l'activité des multimères. (Figure 6).

Ce type de mise en evidence des protéines est apsécifique, des Western blot ont tout de même éte réalisés avec des anticorps spécifiques et ont démontré que les bandes situées à cette hauteur du gel (environ 265 kDa) sont bien les multimères.

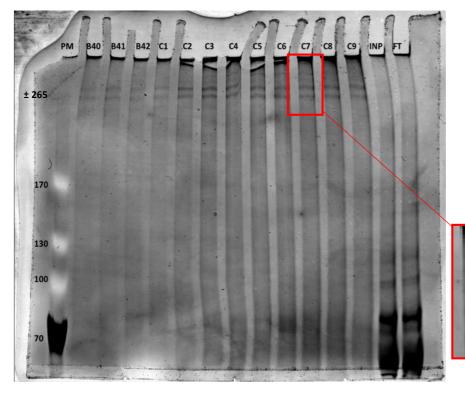


Figure 6 : Coloration par Sypro de l'hétéromultimère PGT121-C4bpalphalpha-FLAG/FHR4-C4bpalpha-HIS F3.4E9 purifié suite à un SDS-PAGE. On y distingue ici 4 bandes correspondant à 4 formes du multimère. Le poids moléculaire est en KDa.

# IV. Activation du complément

Pour mettre en évidence la fonction activatrice du complément, le multimère est testé en cytométrie de flux. En bref, les cellules cibles sont incubées avec le multimère puis en présence de sérum humain comprenant les facteurs nécessaires à l'activation du complément. On détecte ensuite le tag HIS et le dépôt de C3b à la surface des cellules cibles grâce à des anticorps spécifiques. Rappelons que l'une des premières étapes de la lyse cellulaire du au système du complément est le dépôt de C3b qui va mener à la formation du complexe MAC.

La figure 7 représente une étude de l'activation du complément en dose réponse du multimère F3.4E9 purifié.

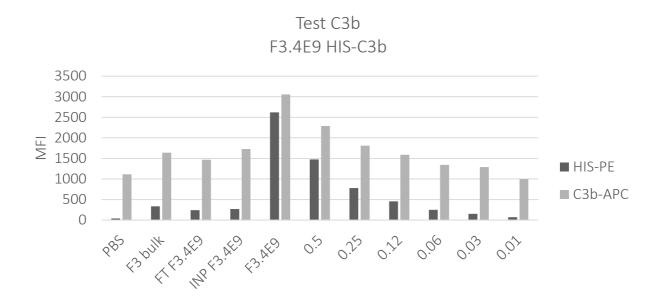


Figure 7 : Détection du multimère PGT121-C4bpalpha-FLAG/FHR4-C4bpalpha-HIS en concomitance avec le dépôt de C3b à la surface des cellules cibles FLYgp120. F3.4E9 initial est à 10ug/ml puis dilution en série.

Les différentes fractions de chromatographie ont été poolées, le multimère a été concentré sur colonne AMICON (cut off 10 kDa) et dosé à 0.2 ug/ul. On y observe tout d'abord un contrôle négatif PBS positif en C3b alors que négatif en HIS, en effet il a été décrit que la protéine gp120 est capable d'activer modérément le système du complément. Le bulk, l'input et le flow throught son très comparables an terme de déposition du C3b. On observe néanmoins que l'input est un peu plus chargé en multimère que le flowthrough. Le chargement sur la colonne d'affinité semble donc être incomplet. La petite quantité de multimère dans le bulk, l'input et le flowthrough permettent d'augmenter la déposition de C3b faiblement à la surface des cellules cibles. Enfin le pool de F3.4E9 purifié et concentré répond bien à une dose réponse. La condition à 10 ug/ml de multimère permet de multiplier par 3 l'activation du complément à la surface des cellules cibles par rapport à la condition PBS qui représente l'activation par gp120. Il est important de noter qu'a la plus forte concentration, le multimère ne sature pas les cellules cibles.

Dans un second temps, nous avons évalué si cette augmentation de la déposition de C3b à la surface des cellules cibles était suffisante pour induire la formation du MAC. La formation du MAC peut être visualisée en cytométrie en flux grâce à l'anticorps anti-C5b9. La formation du complexe MAC provoque la lyse cellulaire. Ce système initié par C3b nécessite toujours du sérum humain, le test

est donc effectué sur sérum complémenté et dé-complémenté (chauffé 30 min à 56°C) pour détruire les facteurs du complément et mettre en évidence ce mécanisme seul comme responsable du dépôt de C5b9.

Les figures 8 et 9 sont respectivement la mise en évidence du multimère sur la surface des cellules cibles par marquage HIS-PE et que le dépôt de C5b9 par marquage APC. Pour cette expérience, le multimère F3.4E9 a été incubé à la surface des cellules cibles à une concentration de 20 ug/ml.

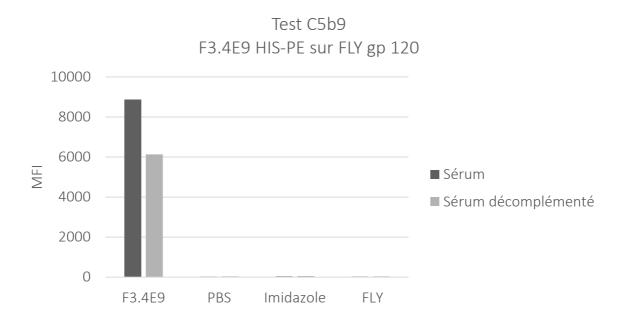


Figure 8 : Détection de l'heteromultimère PGT121-C4bpalpha-FLAG/FHR4-C4bpalpha-HIS à la surface des cellules cibles FLYgp120 en présence de sérum ou de sérum décomplémenté.

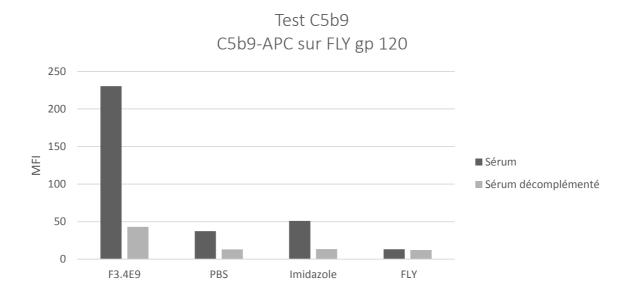


Figure 9 : Détection du dépôt de C5b9 (complexe MAC) à la surface des cellules cibles FLYgp120 en présence et en absence de multimère, en sérum ou sérum décomplémenté.

Le multimère est capable d'induire la formation du MAC à la surface des cellules cibles en présence de sérum complémenté. Logiquement, en condition sérum décomplémenté, on observe une réduction drastique de la MFI C5b9. Le contrôle PBS indique une légère déposition de C5b9, qui correspond à l'activation spontanée du complément induite par gp120. Aucun dépôt de multimère ni de C5b9 n'est visible à la surface des cellules FLY n'exprimant pas gp120 confirmant bien la spécificité d'action du multimère.

Cette expérience met clairement en évidence la capacité du multimère à activer le système du complément jusqu'à la formation du complexe MAC.

# **Discussion**

Le système du complément est une défense efficace contre les pathogènes, ce bras de l'immmunité innée voit son importance mise à profit, à nouveau, dans de nombreuses therapies (Ghebrehiwet, B., 2016).

En effet, ce système est composé de 3 voies d'activation qui conduisent toutes à la lyse cellulaire par le dépôt de C3b et la formation du complexe MAC. L'avantage d'utiliser cette voie dans une stratégie thérapeutique est que l'activation du complément se fait presque instantanément en contraste avec les mécanismes adaptatifs du système immunitaire. La cytotoxicité dépendante du complément doit tout de même être dirigée spécifiquement pour éviter tout dommage aux cellules de l'hôte et permettre l'élimination de la cible sans altérer des cellules saines.

Dans ce projet nous avons montré qu'un hétéromultimère bifonctionnel PGT121-C4bpalpha-FLAG/FHR4-C4bpalpha-HIS est capable d'activer le complément et d'induire le dépôt de C3b ainsi que la formation de MAC de manière spécifique à la surface de leurs cellules cibles exprimant gp120 en présence de sérum humain. L'effet de cytotoxicité directe (CDC) à l'encontre des cellules FLYgp120 par le multimère F3.4E9 reste encore à démontrer, en effet la lyse cellulaire spécifique n'a pas encore été mise en évidence bien que le complexe de lyse MAC soit présent. Cependant, le modèle cellulaire FLYgp120 n'est peut-être pas le plus adéquat pour démonter la CDC induite par un multimère en faible densité à la surface des cellulesEn effet, le modèle cellulaire utilisé FLYgp120 est une lignée cellulaire exprimant abondamment gp120 (Siegert, et al., 2005). Nous avons montré, notamment dans les tests en dose réponse, que les multimères ne saturent jamais ces cellules, ce qui ne permet pas d'évaluer l'activité maximale du multimère. Ainsi, les quantités de multimères requises pour saturer les sites de la gp-120 ne sont pas suffisants pour entrainer un dépôt maximal de C3b et la formation de MAC. C'est pourquoi nous n'avons pas testé la CDC dans ce modèle. La proténe gp120 présente à la surface des cellules infectées est capable d'activer le complément au niveau basal (Süsal C., et al., 1994), mais nous augmentons uniquement par 3 cette activation avec le multimère. D'autre part, les cellules FLYgp120 proviennent d'un fibrosarcome humain. Elles expriment une quantité élevée de mCRP. Les mCRP inhibent l'activité du complément et donc l'activité du multimère. Ainsi, elles vont inhiber ensuite la formation de C5b9 et la formation consécutive de MAC qui limitera la CDC.

Un modèle plus relevant dans notre cas pourrait être celui de la lignée U1. En effet, cette lignée monocytaires provenant d'un lymphome histiocytaire humain est infectée par le VIH. C'est un modèle cellulaire de latence car l'expression de gp120 dans ces cellules est inductible par l'acétatemyristate de phorbol ou PMA, composant organique diffusant à travers la membrane qui active directement les protéines kinases. De plus, étant d'origine lymphoide, cette lignée exprime moins de mCRP. L'heteromultimère F3.4E9 pourrait être testé sur ces cellules U1 (Roger J. Pomerantz., 1990). et ce modèle représentera au mieux le modèle schock and kill après induction de la réplication par des latency reversing agents. Une autre limitation de notre modèle est que le multimère F3.4E9 est un multimère de basse valence FHR4, il présente un ratio FHR4/PGT121 inférieur à celui d'autre clones identifiés lors des étapes de sélection. Dans de précédents travaux, il a été démontré que les multimères de haute valence FHR4 sont plus efficaces pour induire l'activation du complément à la surfaces des cellules cible (Dervillez, et al, 2016., Pleisseria, et al., 2016). Cependant, notre choix s'est porté sur ce candidat car la quantité de multimère produite par les clones de haute valence FHR4 était encore plus faible que celle des multimères basse valence FHR4.

Finalement, au vu de ces résultats et de travaux antérieurs, il pourrait être intéressant de créer des hétéromultimères PGT121-C4bpβ-HA/FHR4-C4bpα-HIS. En effet, ceci permettrait d'obtenir des multimères de valence FHR4 maximale comportant 7 fonctions FHR4 et une fonction PGT121. Cela permettrait également d'éviter les étapes d'optimisation des valences. Nos résultats préliminaires montrent qu'il est possible d'obtenir de tels multimères en grande quantité. La quantité produite par les cellules transfectées étant trop faible actuellement, des optimisations sont en cours, notamment en transfectant des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) optimisées pour la production de protéines recombinantes.

En conclusion, au cours de ce travail, nous avons démontré que nos multimères activent le dépôt de C3b et la formation de C5b9 à la surface de cellules exprimant gp120. Les perspectives de ce travail sont maintenant d'optimiser les étapes de production des multimères avec soit (1) la technique de transfection par les cellules CHO (2) la construction d'un autre peptide signal qui pourrait améliorer la sécrétion des multimères avec le même plasmide (3) le choix d'un autre plasmide.

# Références

Rapport mondial : Rapport ONUSIDA sur l'épidémie mondiale de sida 2013, Journée mondiale de lutte contre le sida, Le sida en chiffres 2015

Rapport comité SIDA 2016 Lux online

Diagnoses of HIV Infection in the United States and Dependent Areas, 2014, volume 26, 123 pages L'étude A5342 du Groupe d'essais cliniques sur le sida (ACTG)

Henrich T et al., HIV-1 rebound following allogeneic stem cell transplantation and treatment interruption. 21st Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, abstract 144LB, 2014

Autran, B., Descours, B., Avettand-Fenoel, V., & Rouzioux, C. (2011). Elite controllers as a model of functional cure. Curr Opin HIV AIDS, 6(3), 181-187. doi:10.1097/COH.0b013e328345a328

Biancotto, A., Grivel, J. C., Gondois-Rey, F., Bettendroffer, L., Vigne, R., Brown, S., . . . Hirsch, I. (2004). Dual role of prostratin in inhibition of infection and reactivation of human immunodeficiency virus from latency in primary blood lymphocytes and lymphoid tissue. J Virol, 78(19), 10507-10515. doi:10.1128/JVI.78.19.10507-10515.2004

Bilal, M. Y., Vacaflores, A., & Houtman, J. C. (2015). Optimization of methods for the genetic modification of human T cells. Immunol Cell Biol, 93(10), 896-908. doi:10.1038/icb.2015.59

Bjorndal, A., Deng, H., Jansson, M., Fiore, J. R., Colognesi, C., Karlsson, A., . . . Fenyo, E. M. (1997). Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. J Virol, 71(10), 7478-7487.

Blumenthal, R., Durell, S., & Viard, M. (2012). HIV entry and envelope glycoprotein-mediated fusion. J Biol Chem, 287(49), 40841-40849. doi:10.1074/jbc.R112.406272

Brenchley, J. M., Hill, B. J., Ambrozak, D. R., Price, D. A., Guenaga, F. J., Casazza, J. P., . . . Koup, R. A. (2004). T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis. J Virol, 78(3), 1160-1168.

Brown, T. R. (2015). I am the Berlin patient: a personal reflection. AIDS Res Hum Retroviruses, 31(1), 2-3. doi:10.1089/AID.2014.0224

Bryant, M., & Ratner, L. (1990). Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. Proc Natl Acad Sci U S A, 87(2), 523-527.

Burton, D. R., & Hangartner, L. (2016). Broadly Neutralizing Antibodies to HIV and Their Role in Vaccine Design. Annu Rev Immunol, 34, 635-659. doi:10.1146/annurev-immunol-041015-055515

Buzon, V., Natrajan, G., Schibli, D., Campelo, F., Kozlov, M. M., & Weissenhorn, W. (2010). Crystal structure of HIV-1 gp41 including both fusion peptide and membrane proximal external regions. PLoS Pathog, 6(5), e1000880. doi:10.1371/journal.ppat.1000880

Carr, A., Workman, C., Smith, D. E., Hoy, J., Hudson, J., Doong, N., . . . Mitochondrial Toxicity Study, G. (2002). Abacavir substitution for nucleoside analogs in patients with HIV lipoatrophy: a randomized trial. JAMA, 288(2), 207-215.

Caskey, M., Klein, F., & Nussenzweig, M. C. (2016). Broadly Neutralizing Antibodies for HIV-1 Prevention or Immunotherapy. N Engl J Med, 375(21), 2019-2021. doi:10.1056/NEJMp1613362

Cen, S., Javanbakht, H., Kim, S., Shiba, K., Craven, R., Rein, A., . . . Kleiman, L. (2002). Retrovirus-specific packaging of aminoacyl-tRNA synthetases with cognate primer tRNAs. J Virol, 76(24), 13111-13115.

Chaillon, A., Essat, A., Frange, P., Smith, D. M., Delaugerre, C., Barin, F., . . . on behalf the, A. P. C. S. (2017). Spatiotemporal dynamics of HIV-1 transmission in France (1999-2014) and impact of targeted prevention strategies. Retrovirology, 14(1), 15. doi:10.1186/s12977-017-0339-4

Checkley, M. A., Luttge, B. G., & Freed, E. O. (2011). HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. J Mol Biol, 410(4), 582-608. doi:10.1016/j.jmb.2011.04.042

Cillo, A. R., & Mellors, J. W. (2016). Which therapeutic strategy will achieve a cure for HIV-1? Curr Opin Virol, 18, 14-19. doi:10.1016/j.coviro.2016.02.001

Cocchi, F., DeVico, A. L., Garzino-Demo, A., Cara, A., Gallo, R. C., & Lusso, P. (1996). The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. Nat Med, 2(11), 1244-1247.

Cocchi, F., Devico, A. L., Garzino-Demo, A., Lusso, P., & Gallo, R. C. (1996). Response: Role of beta-Chemokines in Suppressing HIV Replication. Science, 274(5291), 1394-1395. doi:10.1126/science.274.5291.1394

Cohen, M. S., Chen, Y. Q., McCauley, M., Gamble, T., Hosseinipour, M. C., Kumarasamy, N., . . . Team, H. S. (2011). Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. N Engl J Med, 365(6), 493-505. doi:10.1056/NEJMoa1105243

Cosset, F. L., Takeuchi, Y., Battini, J. L., Weiss, R. A., & Collins, M. K. (1995). High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. J Virol, 69(12), 7430-7436.

Delelis, O., Carayon, K., Saib, A., Deprez, E., & Mouscadet, J. F. (2008). Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase. Retrovirology, 5, 114. doi:10.1186/1742-4690-5-114

Dettin, M., Ferranti, P., Scarinci, C., Picariello, G., & Di Bello, C. (2003). Is the V3 loop involved in HIV binding to CD4? Biochemistry, 42(30), 9007-9012. doi:10.1021/bi0340696

Drechsler, H., & Powderly, W. G. (2002). Switching effective antiretroviral therapy: a review. Clin Infect Dis, 35(10), 1219-1230. doi:10.1086/343050

Eller, M. A., Opollo, M. S., Liu, M., Redd, A. D., Eller, L. A., Kityo, C., . . . Robb, M. L. (2015). HIV Type 1 Disease Progression to AIDS and Death in a Rural Ugandan Cohort Is Primarily Dependent on Viral Load Despite Variable Subtype and T-Cell Immune Activation Levels. J Infect Dis, 211(10), 1574-1584. doi:10.1093/infdis/jiu646

Faria, N. R., Rambaut, A., Suchard, M. A., Baele, G., Bedford, T., Ward, M. J., . . . Lemey, P. (2014). HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. Science, 346(6205), 56-61. doi:10.1126/science.1256739

Fikkert, V., Hombrouck, A., Van Remoortel, B., De Maeyer, M., Pannecouque, C., De Clercq, E., . . . Witvrouw, M. (2004). Multiple mutations in human immunodeficiency virus-1 integrase confer resistance to the clinical trial drug S-1360. AIDS, 18(15), 2019-2028.

Freeley, S., Kemper, C., & Le Friec, G. (2016). The "ins and outs" of complement-driven immune responses. Immunol Rev, 274(1), 16-32. doi:10.1111/imr.12472

Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F., . . . Hahn, B. H. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. Nature, 397(6718), 436-441. doi:10.1038/17130

Gao, H. Q., Sarafianos, S. G., Arnold, E., & Hughes, S. H. (2001). RNase H cleavage of the 5' end of the human immunodeficiency virus type 1 genome. J Virol, 75(23), 11874-11880. doi:10.1128/JVI.75.23.11874-11880.2001

Gautam, R., Nishimura, Y., Pegu, A., Nason, M. C., Klein, F., Gazumyan, A., . . . Martin, M. A. (2016). A single injection of anti-HIV-1 antibodies protects against repeated SHIV challenges. Nature, 533(7601), 105-109. doi:10.1038/nature17677

Ghebrehiwet, B. (2016). The complement system: an evolution in progress. F1000Res, 5, 2840. doi:10.12688/f1000research.10065.1

Gottlinger, H. G., Dorfman, T., Sodroski, J. G., & Haseltine, W. A. (1991). Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. Proc Natl Acad Sci U S A, 88(8), 3195-3199.

He, G., & Margolis, D. M. (2002). Counterregulation of chromatin deacetylation and histone deacetylase occupancy at the integrated promoter of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the HIV-1 repressor YY1 and HIV-1 activator Tat. Mol Cell Biol, 22(9), 2965-2973.

Henderson, L. E., Bowers, M. A., Sowder, R. C., 2nd, Serabyn, S. A., Johnson, D. G., Bess, J. W., Jr., . . . Fenselau, C. (1992). Gag proteins of the highly replicative MN strain of human immunodeficiency virus type 1: posttranslational modifications, proteolytic processings, and complete amino acid sequences. J Virol, 66(4), 1856-1865.

Hirsch, V. M., Olmsted, R. A., Murphey-Corb, M., Purcell, R. H., & Johnson, P. R. (1989). An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. Nature, 339(6223), 389-392. doi:10.1038/339389a0

Hu, W. S., & Hughes, S. H. (2012). HIV-1 reverse transcription. Cold Spring Harb Perspect Med, 2(10). doi:10.1101/cshperspect.a006882

Hung, C. S., Vander Heyden, N., & Ratner, L. (1999). Analysis of the critical domain in the V3 loop of human immunodeficiency virus type 1 gp120 involved in CCR5 utilization. J Virol, 73(10), 8216-8226.

Julien, J. P., Sok, D., Khayat, R., Lee, J. H., Doores, K. J., Walker, L. M., . . . Wilson, I. A. (2013). Broadly neutralizing antibody PGT121 allosterically modulates CD4 binding via recognition of the HIV-1 gp120 V3 base and multiple surrounding glycans. PLoS Pathog, 9(5), e1003342. doi:10.1371/journal.ppat.1003342

Keene, S. E., King, S. R., & Telesnitsky, A. (2010). 7SL RNA is retained in HIV-1 minimal virus-like particles as an S-domain fragment. J Virol, 84(18), 9070-9077. doi:10.1128/JVI.00714-10

Kobayashi, M., Yoshinaga, T., Seki, T., Wakasa-Morimoto, C., Brown, K. W., Ferris, R., . . . Fujiwara, T. (2011). In Vitro antiretroviral properties of S/GSK1349572, a next-generation HIV integrase inhibitor. Antimicrob Agents Chemother, 55(2), 813-821. doi:10.1128/AAC.01209-10

Konnyu, B., Sadiq, S. K., Turanyi, T., Hirmondo, R., Muller, B., Krausslich, H. G., . . . Muller, V. (2013). Gag-Pol processing during HIV-1 virion maturation: a systems biology approach. PLoS Comput Biol, 9(6), e1003103. doi:10.1371/journal.pcbi.1003103

Kortagere, S., Madani, N., Mankowski, M. K., Schon, A., Zentner, I., Swaminathan, G., . . . Smith, A. B., 3rd. (2012). Inhibiting early-stage events in HIV-1 replication by small-molecule targeting of the HIV-1 capsid. J Virol, 86(16), 8472-8481. doi:10.1128/JVI.05006-11

Kwong, P. D., Mascola, J. R., & Nabel, G. J. (2013). Broadly neutralizing antibodies and the search for an HIV-1 vaccine: the end of the beginning. Nat Rev Immunol, 13(9), 693-701. doi:10.1038/nri3516 Liao, H. X., Lynch, R., Zhou, T., Gao, F., Alam, S. M., Boyd, S. D., . . . Haynes, B. F. (2013). Co-evolution of a broadly neutralizing HIV-1 antibody and founder virus. Nature, 496(7446), 469-476. doi:10.1038/nature12053

Maertens, G. N., Hare, S., & Cherepanov, P. (2010). The mechanism of retroviral integration from X-ray structures of its key intermediates. Nature, 468(7321), 326-329. doi:10.1038/nature09517

Manches, O., Frleta, D., & Bhardwaj, N. (2014). Dendritic cells in progression and pathology of HIV infection. Trends Immunol, 35(3), 114-122. doi:10.1016/j.it.2013.10.003

Markosyan, R. M., Leung, M. Y., & Cohen, F. S. (2009). The six-helix bundle of human immunodeficiency virus Env controls pore formation and enlargement and is initiated at residues proximal to the hairpin turn. J Virol, 83(19), 10048-10057. doi:10.1128/JVI.00316-09

Matalon, S., Rasmussen, T. A., & Dinarello, C. A. (2011). Histone deacetylase inhibitors for purging HIV-1 from the latent reservoir. Mol Med, 17(5-6), 466-472. doi:10.2119/molmed.2011.00076

McCoy, L. E., & Burton, D. R. (2017). Identification and specificity of broadly neutralizing antibodies against HIV. Immunol Rev, 275(1), 11-20. doi:10.1111/imr.12484

McCullough, J., Colf, L. A., & Sundquist, W. I. (2013). Membrane fission reactions of the mammalian ESCRT pathway. Annu Rev Biochem, 82, 663-692. doi:10.1146/annurev-biochem-072909-101058

Meng, B., & Lever, A. M. (2013). Wrapping up the bad news: HIV assembly and release. Retrovirology, 10, 5. doi:10.1186/1742-4690-10-5

Merk, A., & Subramaniam, S. (2013). HIV-1 envelope glycoprotein structure. Curr Opin Struct Biol, 23(2), 268-276. doi:10.1016/j.sbi.2013.03.007

Miller, E. A., Spadaccia, M. R., O'Brien, M. P., Rolnitzky, L., Sabado, R., Manches, O., . . . Bhardwaj, N. (2012). Plasma factors during chronic HIV-1 infection impair IL-12 secretion by myeloid dendritic cells via a virus-independent pathway. J Acquir Immune Defic Syndr, 61(5), 535-544. doi:10.1097/QAI.0b013e31826afbce

Miller, E. A., Spadaccia, M. R., O'Brien, M. P., Rolnitzky, L., Sabado, R., Manches, O., . . . Bhardwaj, N. (2012). Plasma factors during chronic HIV-1 infection impair IL-12 secretion by myeloid dendritic cells via a virus-independent pathway. J Acquir Immune Defic Syndr, 61(5), 535-544. doi:10.1097/QAI.0b013e31826afbce

Nokes, K. M., & Stein, G. L. (1997). Addressing human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome in advanced practice nursing education. J Prof Nurs, 13(5), 294-299.

Nowotny, M., Gaidamakov, S. A., Ghirlando, R., Cerritelli, S. M., Crouch, R. J., & Yang, W. (2007). Structure of human RNase H1 complexed with an RNA/DNA hybrid: insight into HIV reverse transcription. Mol Cell, 28(2), 264-276. doi:10.1016/j.molcel.2007.08.015

Nyamweya, S., Hegedus, A., Jaye, A., Rowland-Jones, S., Flanagan, K. L., & Macallan, D. C. (2013). Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. Rev Med Virol, 23(4), 221-240. doi:10.1002/rmv.1739

Pomerantz, R. J., Trono, D., Feinberg, M. B., & Baltimore, D. (1990). Cells nonproductively infected with HIV-1 exhibit an aberrant pattern of viral RNA expression: a molecular model for latency. Cell, 61(7), 1271-1276.

Saphire, A. C., Bobardt, M. D., Zhang, Z., David, G., & Gallay, P. A. (2001). Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages. J Virol, 75(19), 9187-9200. doi:10.1128/JVI.75.19.9187-9200.2001

Sattentau, Q. J. (1992). CD4 activation of HIV fusion. Int J Cell Cloning, 10(6), 323-332. doi:10.1002/stem.5530100603

Siegert, S., Thaler, S., Wagner, R., & Schnierle, B. S. (2005). Assessment of HIV-1 entry inhibitors by MLV/HIV-1 pseudotyped vectors. AIDS Res Ther, 2, 7. doi:10.1186/1742-6405-2-7

Siegert, S., Thaler, S., Wagner, R., & Schnierle, B. S. (2005). Assessment of HIV-1 entry inhibitors by MLV/HIV-1 pseudotyped vectors. AIDS Res Ther, 2, 7. doi:10.1186/1742-6405-2-7

Susal, C., Kirschfink, M., Kropelin, M., Daniel, V., & Opelz, G. (1994). Complement activation by recombinant HIV-1 glycoprotein gp120. J Immunol, 152(12), 6028-6034.

Tebas, P., Stein, D., Tang, W. W., Frank, I., Wang, S. Q., Lee, G., . . . June, C. H. (2014). Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. N Engl J Med, 370(10), 901-910. doi:10.1056/NEJMoa1300662

Wilen, C. B., Tilton, J. C., & Doms, R. W. (2012). HIV: cell binding and entry. Cold Spring Harb Perspect Med, 2(8). doi:10.1101/cshperspect.a006866

Wilen, C. B., Tilton, J. C., & Doms, R. W. (2012). Molecular mechanisms of HIV entry. Adv Exp Med Biol, 726, 223-242. doi:10.1007/978-1-4614-0980-9\_10

Williams, J. P., Hurst, J., Stohr, W., Robinson, N., Brown, H., Fisher, M., . . . Investigators, S. P. (2014). HIV-1 DNA predicts disease progression and post-treatment virological control. Elife, 3, e03821. doi:10.7554/eLife.03821

Wu, Y. (2004). HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA. Retrovirology, 1, 13. doi:10.1186/1742-4690-1-1

Résumé

L'une des principales barrières à l'éradication du VIH est la présence de réservoirs viraux latents chez

les patients infectés. Dans ce contexte, le LIH travaille à une stratégie de « shock and kill » en ciblant

les cellules latentes infectées par le VIH par des hétéromultimères capable d'activer la formation de

MAC à leur surface et d'induire leur lyse cellulaire (CDC). Cette immunothérapie innovante a été

testée au cours de ce travail sur des cellules FLYgp120 avec des multimères exprimant un anticorps

anti-gp120 (PGT121) et le regulateur positif de C3b, complement factor H-related protein 4 (FHR4).

Les multimères ont été produits par transfection de cellules HEK293 et purifiés par chromatographie

d'affinité sur colonne HIS trap. Les tests réalisés ont permis de démontrer l'efficacité des multimères

à induire un dépôt de C3b et à former du C5b9, composant majeur de la CDC, à la surface des cellules

fly-gp120. La production des multimères haute valence FHR4 reste maintenant à optimiser afin

d'obtenir une lyse cellulaire efficace dans des modèles cellulaires de latence.

Mots clés: CDC, VIH, hétéromultimère, réservoirs, SIDA

One of the main barriers to HIV eradication is the presence of latent viral reservoirs in infected

patients. In this context, the LIH is working on a "shock and kill" strategy by targeting latent cells

infected by HIV with heteromultimerrs able to activate the MAC to their surface and induce their cell

lysis. In the current work, this innovative immunotherapy has been tested on FLYgp120 cells with

multimers expressing a scFv antigp120 antibody and the positive regulator of C3b, complement

factor H-related protein 4 (FHR4). Multimers have been produced by transfection of HEK293 cells

and purified by affinity chromatography on column HIStrap. The tests performed pointed out the

potency of multimers to induce a C3b deposit and form C5b9, a critical component of CDC, to the

surface of flygp120 cells. High valency FHR4 multimers production remains now to be improved in

order to obtain an efficient CDC in cellular models of latency:

Key words: CDC, HIV, heteromultimers, AIDS