



**HAL**  
open science

# Caractérisation des lymphocytes T CD8+ spécifiques du VIH chez les “ HIV controllers ”

Stéphane Hua

► **To cite this version:**

Stéphane Hua. Caractérisation des lymphocytes T CD8+ spécifiques du VIH chez les “ HIV controllers ”. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA114817 . tel-01191469

**HAL Id: tel-01191469**

**<https://theses.hal.science/tel-01191469>**

Submitted on 2 Sep 2015

**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 PARIS-SUD 11

### ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

*PÔLE : IMMUNOLOGIE ET BIOTHERAPIES*

### DISCIPLINE : Immunologie

ANNÉE 2010 - 2014

SÉRIE DOCTORAT N° 1289

### THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 01/10/2014

par

**Stéphane HUA**

<p><b>Caractérisation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH chez les « HIV controllers »</b></p>
---

**Directeur de thèse :** Alain VENET DR, INSERM (Kremlin Bicêtre)

**Composition du jury :**

<i>Président du jury :</i>	Pierre GALANAUD	Professeur émérite	(Clamart)
<i>Rapporteurs :</i>	Isabelle PELLEGRIN	MD	(Bordeaux)
	Pierre CORBEAU	PU-PH	(Montpellier)
<i>Examineurs :</i>	Guislaine Carcelain	MCU-PH	(Paris)
	Antoine Cheret	MD	(Tourcoing)

# Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury, Pierre Galanaud pour avoir aimablement accepté de présider ce jury de thèse, Isabelle Pellegrin, Pierre Corbeau, Guislaine Carcelain et Antoine Chéret pour avoir accepté de rapporter et d'examiner ce travail.

Je remercie sincèrement Alain Venet, Camille Lécuroux et Martine Sinet pour m'avoir accueilli dans leur équipe, pour avoir pris le temps de m'encadrer et de m'avoir transmis leurs connaissances. Je tiens à les remercier vivement pour la confiance qu'ils m'accordent et je tiens à leur exprimer toute ma reconnaissance. Je souhaite remercier également Marc Tardieu pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

J'aimerais remercier toutes les personnes que j'ai pu croiser au cours de cette aventure et je souhaite remercier les personnes qui ont permis de rendre le laboratoire plus vivant et animé : Kim Martinet, Michele Boniotto, Jordi Miatello, Sandie Gérard, Abdelraouf Damouche, Isabelle Girault, Christophe de Vassoigne, Cédric Lombart, Min Wang, Saida Boudaoud, Gaetane Nocturne, Bineta Ly, Olivier Fogel, Maisa Abdoh, Salma Jaafoura, Nicolas Noel, Christine Bourgeois, Federico Simonetta, Etienne Canoui.

Je tiens à remercier vivement mes parents qui m'ont toujours soutenu et encouragé et je souhaite remercier Aurélie qui a toujours été un soutien pour moi et qui a réussi à me supporter tout du long.

Je tiens à remercier tous les collaborateurs et toutes les personnes qui ont participé à ce travail : Olivier Lambotte, Laurence Meyer, Faroudy Boufassa, Asier Saez Cirion, Gianfranco Pancino, Pierre Versmisse. Je remercie également l'ANRS, le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et Sidaction pour leur soutien financier.

« Success is the ability to go from one failure to another with no loss of enthusiasm »

Sir Winston Churchill

# Table des matières

Abréviations .....	7
La réponse immunitaire T CD8 <sup>+</sup> .....	9
1. Généralités sur le système immunitaire.....	9
1.1. L'immunité naturelle ou innée.....	9
1.2. L'immunité adaptative ou acquise .....	11
2. Genèse des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> .....	12
3. Phase d'activation des lymphocytes T naïfs .....	14
3.1. Différentes voies de présentation antigénique via les molécules du CMH .....	14
3.2. Les signaux d'activation des LT naïfs .....	16
3.2.1. Signal 1 : interactions TCR/CMHpeptide .....	17
3.2.2. Signal 2 : les molécules de costimulation.....	18
3.2.3. Signal 3 : les cytokines proinflammatoires.....	19
3.2.4. Molécules d'activation .....	20
4. Expansion clonale et différenciation des LT naïfs en cellules effectrices.....	23
4.1. Expansion clonale des LT activés.....	23
4.2. Différenciation des LT activés en cellules effectrices .....	23
4.2.1. Cytotoxicité.....	24
4.2.1.1. Induction de la mort cellulaire.....	24
4.2.2. Sécrétion de cytokines et de chimiokines par les cellules effectrices.....	26
4.2.3. Régulation de la différenciation des LT CD8 <sup>+</sup> .....	27
5. Phase de contraction de la réponse T CD8 <sup>+</sup> .....	28
5.1. La voie AICD.....	29
5.2. La voie ACAD .....	29
6. Phase mémoire .....	30
6.1. Genèse des cellules mémoires .....	30
6.1.1. Le modèle de la différenciation asymétrique.....	31
6.1.2. Le modèle de la différenciation linéaire.....	32
6.1.3. Le modèle de la différenciation à potentiel décroissant.....	32
6.2. Hétérogénéité des cellules mémoires .....	32
6.3. Maintien des cellules mémoires.....	33
6.3.1. L'interleukine-15.....	33
6.3.2. L'interleukine-7.....	34

6.3.3.	L'aide des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....	34
6.4.	Fonctions effectrices accrues des cellules mémoires .....	35
6.4.1.	La capacité proliférative .....	35
6.4.2.	La capacité cytotoxique .....	35
6.4.3.	La secretion de cytokines .....	36
Pathogenèse du virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1) responsable du syndrome de		
l'immunodéficience acquise (SIDA) et réponse immunitaire .....		
1.	Découverte de l'agent pathologique.....	37
2.	Epidémiologie .....	38
3.	Présentation du VIH-1 .....	40
3.1.	Evolution de l'infection par le VIH-1 .....	41
3.2.	La primo-infection .....	43
3.3.	La phase asymptomatique .....	45
3.4.	Le stade SIDA.....	45
4.	Déficiences des réponses T CD4 <sup>+</sup> et CD8 <sup>+</sup> .....	45
4.1.	Causes de ces altérations .....	46
4.1.1.	Virus .....	46
4.1.2.	Hyperactivation du système immunitaire .....	46
4.2.	Hyperactivation .....	47
4.2.1.	Causes de cette hyperactivation.....	47
4.2.1.1.	L'action du virus et des protéines virales .....	48
4.2.1.2.	Les infections opportunistes et la réactivation de virus persistants.....	49
4.2.1.3.	La translocation bactérienne au niveau du tractus gastro-intestinal .....	49
4.2.1.4.	Lymphopénie T CD4 <sup>+</sup> cause d'activation .....	50
4.2.2.	Conséquences de cette hyperactivation .....	51
5.	Cas particulier de patients exposés non infectés et LTNP .....	52
5.1.	Présentation des patients exposés non infectés .....	53
5.2.	Le cas particulier des « long term non progressors » et des « HIV controllers » .....	53
5.2.1.	Présentation des LTNP et HIC .....	53
5.2.2.	Hypothèses du contrôle de l'infection par le VIH chez les HIC.....	55
5.2.2.1.	Les variabilités génétiques du virus .....	56
5.2.2.2.	Les facteurs génétiques et de restriction de l'hôte .....	57
5.2.2.3.	La réponse immunitaire innée .....	57
5.2.2.4.	La réponse immunitaire adaptative.....	58

5.2.3.	Forte réponse T CD8 <sup>+</sup> .....	58
5.2.3.1.	Fréquence importante de certains HLA de classe I (B27-B57).....	59
5.2.3.2.	Modèle SIV.....	60
5.2.3.3.	Rôle des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> dans l'inhibition de la réplication virale.....	61
5.2.3.4.	Caractérisation des réponses T CD8 <sup>+</sup> spécifiques du VIH chez les HIC.....	63
5.2.4.	Hétérogénéité de la réponse T CD8 <sup>+</sup> chez les HIC.....	65
	Objectifs du travail de thèse.....	67
	Matériel et Méthodes.....	69
	Résultats.....	75
	Discussions & Perspectives .....	116
	L'activation est nécessaire à une réponse efficace du système immunitaire mais est également délétère même chez les patients HIC .....	117
	Le rôle des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> chez les HIC .....	118
	L'importance des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> chez les HIC .....	120
	L'importance des HLA de classe I dans le contrôle de la réplication virale chez les patients HIC...	121
	Le rôle des facteurs de transcription Eomes et T-bet dans la meilleure réponse T CD8 <sup>+</sup> .....	123
	La stimulation par de faibles doses d'antigène confère une bonne fonctionnalité et semble induire des cellules capables d'inhiber la réplication virale.....	126
	Traitement actuel et possibles rôles des réponses T CD8 <sup>+</sup> dans l'élaboration d'un vaccin .....	128
	Perspectives.....	129
	Bibliographie.....	132

# Abréviations

ABC	ATP-Binding Cassette	DC	Dendritic Cell
Ac	Anticorps	DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
ACAD	Activated T Cells Autonomous cell Death	DISC	Death-Inducing Signaling Complex
ADCC	Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity	EBV	Epstein-Barr Virus
ADN	Acide DésoxyriboNucléique	EC	Elite Controller
AICD	Activation Induced Cell Death	ELISpot	Enzyme-Linked-ImmunoSpot
Ag	Antigène	EMEA	European Medicines Agency
ALT	Asymptomatique à Long Term	Eomes	Eomesodermin
ANRS	Agence National de la Recherches sur le SIDA et les hépatites	FACS	Fluorescent Antibody cell sorting
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA editing Enzyme, Catalytic polypeptide-like	FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
ARN	Acide RiboNucléique	FCRL6	Fc Receptor Like-6
CAF	Cell Antiviral Factor	FDA	Food Drug Administration
CIITA	Class II, major histocompatibility complex TransActivator	GALT	Gut-Associated Lymphoid Tissue
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité	HAART	Highly Active Anti-Retroviral Therapy
CMV	Cytomegalovirus	HCV	Hepatitis C Virus
CNAR	CD8 <sup>+</sup> cell Noncytotoxic Anti-HIV Response	HESN	HIV Exposed but Seronegative
CPAg	Cellule présentatrice d'Antigène	HIC	HIV-Controller
CSW	Cohort of sex workers	HLA	Human Leucocyte Antigen
CTL	Cytolytic T cell	HTLV	Human T-Lymphotropic Virus
		HVEM	HerpesVirus Entry Mediator

IFN	InterFéroN		PMA	Phorbol Myristate Acetate
IgSF	Immunoglobulin Family	Super	PRR	Pattern Recognition Receptor
IL	Interleukine		RANTES	Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted
KIR	Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor			
LAT	Linker of Activation of T cell		RE	Réticulum endoplasmique
LB	Lymphocyte B		SIDA	Syndromed'ImmunoDéficiency Acquire
LCK	Lymphocyte-specific protein tyrosine Kinase		SIV	Simian Immunodeficiency Virus
LPS	Lipopolysaccharide		SR	Strong Responder
LT	Lymphocyte T		TAP	Transporters associated with Antigen Processing
LTNP	Long Term Non Progressor		TCR	T Cell Receptor
MC	Mémoire Central		TLR	Toll Like Receptor
ME	Mémoire Effecteur		TNF	Tumor Necrosis Factor
MIP	Macrophage Inflammatory Protein		TRADD	Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain protein
MTOC	MicroTubule Organizing Center		TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
NK	Natural Killer		VC	Viremic Controller
OMS	Organisation Mondiale de la Santé		VIH	Virus de l'ImmunoDéficiency Humaine
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern		VNP	Virologic Non Progressor
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear cells		WR	Weak Responder
PD-1	Programmed Death-1			
PHA	PhytoHemAgglutinin			
PKC	Protein Kinase C			

# La réponse immunitaire T CD8<sup>+</sup>

## 1. Généralités sur le système immunitaire

L'homme est soumis à de constantes attaques de l'extérieur, principalement des microorganismes comme des bactéries, des parasites, des champignons ou des virus. Il a développé au cours de l'évolution un système immunitaire qui lui permet de contrôler l'invasion et la prolifération de ces agents pathogènes et a investi des ressources considérables pour combattre l'infection. Le système immunitaire a développé des défenses composées d'un ensemble de tissus et de cellules qui permettent d'assurer l'intégrité de l'organisme, la distinction entre le « soi » et le « non soi » et l'élimination de pathogènes. Il agit principalement en trois étapes : (1) l'identification d'une infection, (2) l'élimination ou la neutralisation du pathogène et (3) l'établissement d'une mémoire immunologique face au pathogène et contre de futures infections. Le système immunitaire peut être divisé artificiellement en deux composantes fonctionnelles : l'immunité naturelle ou innée et l'immunité adaptative ou acquise (Figure 1).

### 1.1. L'immunité naturelle ou innée

De manière chronologique, un microbe est confronté à une première ligne de défense, cellulaire et humorale, regroupée sous le terme d'immunité naturelle ou innée [1]. Elle fait intervenir à la fois des barrières physiques, essentiellement les cellules épithéliales, mais également une composante immunitaire.

Les barrières physiques jouent un rôle majeur afin d'empêcher toute infection et en protégeant les organes, les vaisseaux sanguins et le système lymphatique. Différents mécanismes sont mis en jeu comme le pH ou la sécrétion de sébum ou de mucus qui permettent soit d'inhiber la croissance des microorganismes soit de les éliminer.

Cependant, il arrive que certains microorganismes pathogènes parviennent à traverser les barrières physiques et une deuxième ligne de défense de l'immunité innée prend alors le relais : la composante immunitaire. Celle-ci réagit immédiatement après pénétration du pathogène grâce notamment à l'expression de récepteurs (PRR, pattern recognition receptors) permettant la reconnaissance de séquences propres aux microorganismes (PAMP, pathogen-associated molecular pattern) [2]. Les cellules composant cette réponse représentent la principale ligne de défense du système immunitaire inné et regroupent principalement :

\_ des cellules tueuses comme les neutrophiles, les cellules Natural Killers (NK) et les lymphocytes T ,

\_ des phagocytes comme les cellules dendritiques et les macrophages et qui jouent également un rôle prépondérant dans l'induction des réponses de l'immunité adaptative en présentant l'antigène (Ag) aux lymphocytes B et T [3].

De plus, le système immunitaire inné comprend également une composante humorale. Elle est caractérisée par la présence de protéines solubles qui peuvent détruire le pathogène, limiter sa réplication ou bien limiter ses effets cytopathogènes. Elles regroupent à la fois les facteurs du complément qui permettent de marquer de manière covalente un pathogène et de l'éliminer, des peptides antimicrobiens comme les défensines qui lysent directement les membranes cellulaires et aussi des enzymes antimicrobiennes comme le lysozyme.

Cette réponse innée joue un rôle primordial dans la reconnaissance du pathogène et dans son élimination. Elle est présente dès la naissance et est génétiquement héritée. Elle est caractérisée par une réponse rapide et par une reconnaissance et une élimination non spécifique du pathogène.

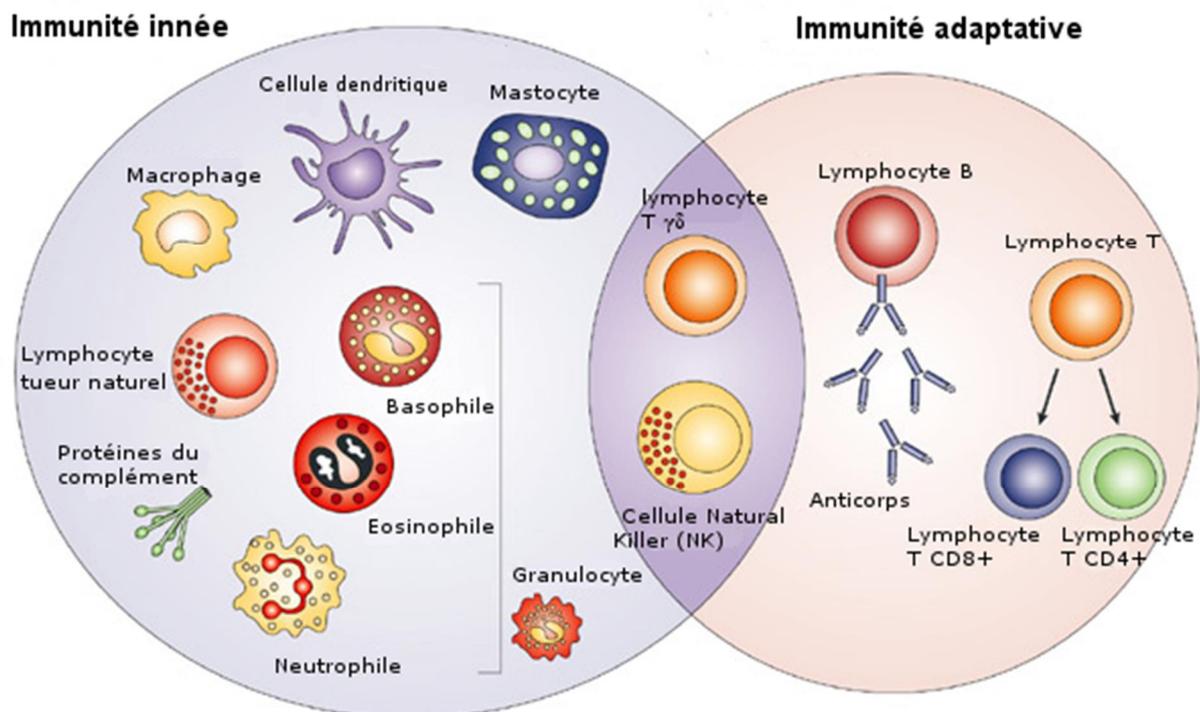


Figure 1 Schéma des cellules appartenant au système immunitaire inné et adaptatif (d'après [4])

## 1.2. L'immunité adaptative ou acquise

Il arrive malgré tout que le système immunitaire inné soit incapable de combattre efficacement certains pathogènes. En effet, les pathogènes parviennent à submerger l'immunité innée par une forte prolifération mais aussi en ayant évolué de manière à pouvoir lui résister ou échapper. La réponse du système immunitaire adaptative se caractérise par une reconnaissance et une réponse spécifique au pathogène présent. Cette reconnaissance spécifique du pathogène se fait par une présentation par les cellules du système immunitaire inné d'un antigène issu du pathogène. La présentation de l'antigène se fait via l'association des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et de l'antigène. Les mécanismes de présentation seront détaillés dans le chapitre 3.1. La plupart des cellules présente les antigènes endogènes via les molécules de CMH de classe I alors que la présentation via les molécules de CMH de classe II est exclusivement faite par des cellules présentatrices d'antigènes (CPAg) qui correspondent aux macrophages, aux cellules dendritiques (DC) et aux lymphocytes B. Les DC sont les cellules spécialisées dans cette présentation antigénique et dans l'induction de l'activation des cellules naïves de l'immunité adaptative : les lymphocytes T  $CD4^+$  et  $CD8^+$  (LT  $CD4^+$  et LT  $CD8^+$ ) et des lymphocytes B (LB). La réponse immune adaptative est alors activée et elle se caractérise par la mise en place de réponses spécifiques au pathogène et à sa destruction [2]. Cette réponse se compose donc de deux branches : la réponse humorale induite par les lymphocytes B et la réponse cellulaire principalement induite par les lymphocytes T  $CD8^+$ .

Le rôle des LT  $CD4^+$  est essentiel à la réponse immune adaptative. L'activation de ces cellules permet une bonne réponse à la fois humorale et cellulaire. En effet, elle joue un rôle prépondérant en permettant d'orienter la réponse immunitaire vers la voie cellulaire et/ou vers la voie humorale. Elle est de plus nécessaire à la formation de cellules mémoires.

La réponse humorale se manifeste par une production d'anticorps par les lymphocytes B qui se sont différenciés en plasmocytes suite à l'activation et à la différenciation des LB. Deux mécanismes d'activation des LB ont été décrits : la voie d'activation lymphocyte T-indépendante et la voie d'activation lymphocyte T-dépendante. La voie d'activation lymphocyte T-dépendante se caractérise par la présence et la différenciation des LT  $CD4^+$  en LT  $CD4^+$  T helper 2 (Th2) ce qui entraîne une sélection clonale B, une activation, une maturation et une amplification des lymphocytes B et à une réponse monoclonale de forte affinité contre l'antigène. La voie d'activation lymphocyte T-indépendante se caractérise par l'absence des LT  $CD4^+$  et par l'absence de sélection clonale B ce qui conduit à une réponse de

faible affinité contre l'antigène. Suite à cette activation, les LB se différencient soit en plasmocytes qui sont spécialisés dans la production d'anticorps spécifiques à l'antigène soit en LB mémoires. Les anticorps jouent un rôle essentiel contre les pathogènes extracellulaires et intracellulaires en se liant spécifiquement au pathogène permettant ainsi de diminuer son effet pathogène et également de l'éliminer.

La réponse cellulaire se manifeste par une expansion et une activation des LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques et une lyse des cellules infectées par ces derniers. Ces mécanismes seront décrits par la suite.

La réponse adaptative se caractérise donc par une réponse forte et spécifique au pathogène et par une mémoire immunologique avec la production de LB et de LT mémoires qui seront activés plus rapidement et efficacement lors d'une seconde infection avec le même pathogène. Nous allons nous intéresser plus en détail aux LT CD8<sup>+</sup>, leur genèse, leur activation et différenciation et leur rôle contre un pathogène.

## **2. Genèse des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>**

Le thymus est l'organe de genèse des LT. Les cellules précurseurs des LT, les progéniteurs lymphoïdes, se développent dans la moelle osseuse et migrent dans le thymus pour continuer leur développement. Les cellules dans le tissu vont être appelées thymocytes. La maturation de ces cellules se fait en permanence au cours de la vie et est primordiale dans l'homéostasie des lymphocytes T. Le thymus constitue un microenvironnement propice à la maturation des thymocytes et est constitué de nombreux types cellulaires comme les CPAg ou les cellules épithéliales thymiques et corticales thymiques [5,6].

La maturation thymique se déroule de façon très précise avec une migration progressive du cortex vers la médulla où les thymocytes subissent à chaque fois une sélection rigoureuse. Les thymocytes vont interagir tout d'abord avec le stroma thymique ce qui déclenche une phase initiale de différenciation vers la lignée T et qui est suivie par une prolifération cellulaire puis ces cellules vont exprimer des molécules de surface spécifiques des cellules T comme le CD2 mais aucun des trois marqueurs de surface qui définissent les cellules T matures, le complexe récepteur T-CD3, et les corécepteurs CD4 et CD8. Ces cellules sont ainsi appelées thymocytes « double négatifs ». Le stade « double négatif » peut être divisé en 4 étapes en fonction de l'expression de 4 molécules de surface : CD44, CD25, Kit et le récepteur SCF. Lors de ces 4 étapes, plusieurs événements vont avoir lieu : (1) le locus du

récepteur de la cellule T va subir des réarrangements des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  pour former et exprimer un récepteur de la cellule T (TCR), (2) une prolifération cellulaire et (3) l'expression des molécules de CD4 et de CD8. Ces thymocytes vont être qualifiés de « double positif ». C'est alors qu'une première sélection des cellules se fait : la sélection positive. Les cellules épithéliales et corticales thymiques et les cellules présentatrices d'antigène vont exprimer à leur surface le complexe CMH/peptide (CMHp) du soi qui est le ligand du TCR. Les thymocytes « doubles positifs » sont programmés pour mourir par apoptose sauf s'ils reçoivent un signal de la part de leur TCR qui inhibera cette mort. La plupart des thymocytes exprime des récepteurs TCR incapables de reconnaître les molécules du CMHp et va donc mourir. En revanche, les thymocytes capables de reconnaître les CMHp vont recevoir le signal de survie via leur TCR. Les thymocytes sélectionnés vont subir une phase de maturation de leur récepteur qui va également être exprimé à une plus forte densité. S'ensuit une deuxième phase de sélection : la sélection négative qui permet d'éliminer la plupart des clones qui répondent aux antigènes du soi. Parallèlement, les cellules vont cesser d'exprimer un des deux marqueurs CD4 ou CD8 devenant ainsi des thymocytes simple positifs [769].

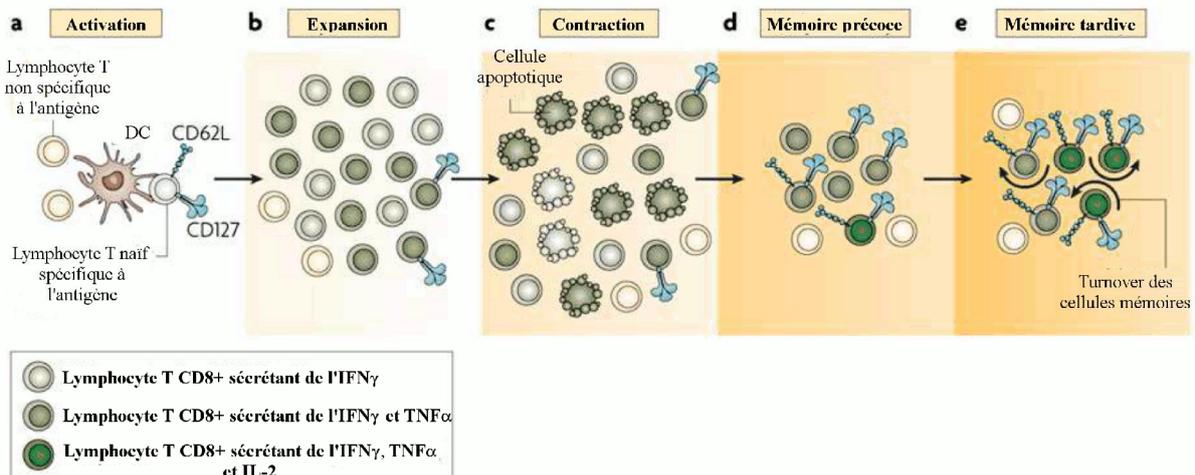
Après cette sélection thymique du répertoire des LT qui permet donc d'éliminer la plupart des clones autoréactifs et de produire des LT naïfs immunocompétents [10], les clones matures rejoignent les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate et plaques de Peyer) et migrent de façon continue d'un organe à un autre jusqu'à la reconnaissance spécifique d'un Ag. C'est au sein des organes lymphoïdes secondaires que les LT CD8<sup>+</sup> naïfs vont être activés par les cellules présentatrices d'antigène, se différencier en cellules effectrices et acquérir des fonctions effectrices et une partie de ces cellules va ensuite se différencier pour former un pool de cellules mémoires capable de répondre plus rapidement et plus efficacement lors d'une réinfection par le même pathogène [11,12].

La réponse primaire d'activation des LT CD8<sup>+</sup> naïfs peut se diviser en 3 parties (Figure 2) :

- \_ une phase d'activation et d'expansion clonale,
- \_ une phase de contraction clonale et
- \_ une phase de maintien des cellules mémoires.

La première phase de la réponse primaire est caractérisée par la présentation spécifique d'un antigène par les CPAg et la reconnaissance spécifique de cet antigène par le LT naïf. Cette première phase est suivie par une phase de division cellulaire où le nombre de LT CD8<sup>+</sup> activés croît de façon exponentielle. Durant cette phase les LT CD8<sup>+</sup> vont se différencier et acquérir des fonctions effectrices comme la cytotoxicité et la capacité à sécréter différentes cytokines. S'ensuit après ces deux phases qui vont induire de fortes réponses immunitaires

une phase de contraction qui est caractérisée par une forte diminution du nombre de LT effecteurs par apoptose et qui est de l'ordre de 90% des LT effecteurs [13,14]. La fraction de la population des LT spécifiques de l'antigène qui est maintenue va se différencier en cellules mémoires [15].



**Figure 2** Schéma de la réponse T CD8<sup>+</sup>, de l'activation des cellules à l'établissement des cellules mémoires (d'après [16]).

### 3. Phase d'activation des lymphocytes T naifs

L'initiation de la réponse immunitaire a lieu dans la zone paracorticale du ganglion, lieu où un LT rencontre une CPAg présentant le complexe CMHp qu'il reconnaît [17-19]. Nous allons nous intéresser dans la partie suivante aux différentes étapes de la phase d'activation au niveau moléculaire et cellulaire.

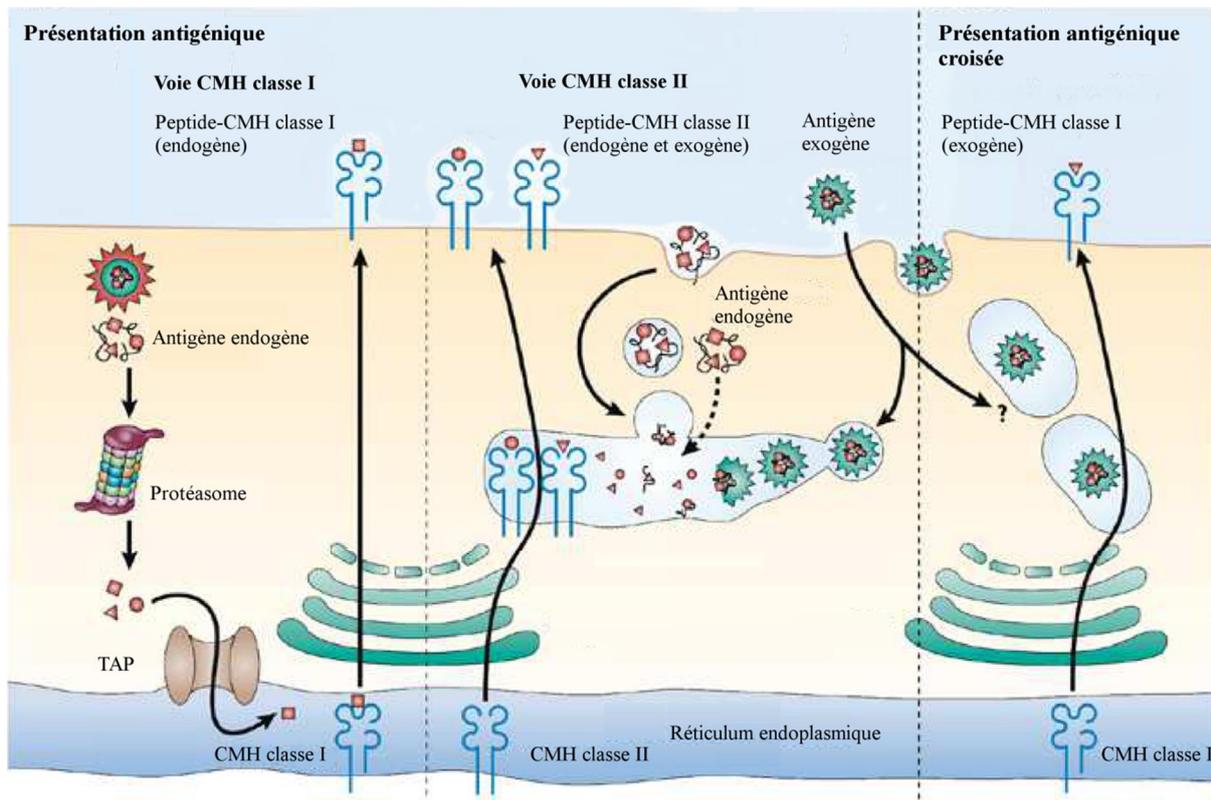
#### 3.1. Différentes voies de présentation antigénique via les molécules du CMH

Les cellules dendritiques jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance des agents pathogènes et dans l'induction des réponses immunitaires spécifiques. Nous allons par la suite définir la DC comme la cellule présentatrice d'antigène.

Les DC vont capturer les antigènes, s'activer et migrer vers les organes lymphoïdes secondaires. Durant cette migration, les DC vont mûrir et acquérir la capacité à présenter efficacement les antigènes phagocytés. La DC mature exprime à sa membrane une densité élevée de molécules de CMH et des molécules de costimulation : CD40, CD80, CD86.

Lorsque les DC arrivent dans les organes lymphoïdes secondaires, elles vont attirer les LT et/ou les LB à l'aide de chemokines et vont présenter l'antigène à ces cellules [20].

Les antigènes une fois capturés suivent des voies intracellulaires dites de présentation pour être découpés en peptides et se lier aux molécules de CMH de classe I ou II. Classiquement on distingue trois types de voies de présentation ou apprêtement de l'antigène par les CPAg (Figure 3).



**Figure 3 Schéma de la présentation antigénique classique et de la présentation antigénique croisée. (d'après [21])**

Comme vu précédemment, les peptides antigéniques issus d'un pathogène intracellulaire (bactéries, virus) ou d'une protéine anormale (antigènes endogènes) sont obtenus après dégradation par le protéasome puis transportés du compartiment cytosolique vers le réticulum endoplasmique (RE) grâce aux protéines de la famille ABC (ATP-Binding Cassette) qui sont appelées transporteurs-1 et -2 associés à l'apprêtement de l'antigène (TAP1 et TAP2). Le CMH de classe I dans le RE est associé à des protéines dites chaperonnes comme la tapasine et permet au complexe de s'associer aux protéines TAP en attente d'un peptide. Lorsqu'un peptide est transporté dans le RE, le peptide se fixe sur les molécules du CMH de classe I et permet une libération du complexe CMHp de ses protéines chaperonnes et sa stabilisation [22,23]. Le complexe ainsi formé est ensuite adressé à la membrane où il pourra stimuler les

lymphocytes cytotoxiques spécifiques de l'antigène après reconnaissance du complexe CMH par le TCR des LT CD8<sup>+</sup>. Les LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (CTL) activés iront par la suite détruire les cellules infectées ou anormales qui présentent le même couple CMH.

Les pathogènes extracellulaires sont eux endocytés ou phagocytés par les APC et dégradés dans des compartiments vésiculaires (lysosomes, phago-lysosomes). Les fragments peptidiques produits ne sont pas transportés vers le RE, mais fixés sur les molécules du CMH de classe II présentes dans ces compartiments. Les complexes CMH de classe II et peptide sont présents à la surface cellulaire et participent à la stimulation des LT CD4<sup>+</sup> helper. Ces lymphocytes organisent par la suite une réponse immune à médiation cellulaire et/ou humorale contre le pathogène reconnu.

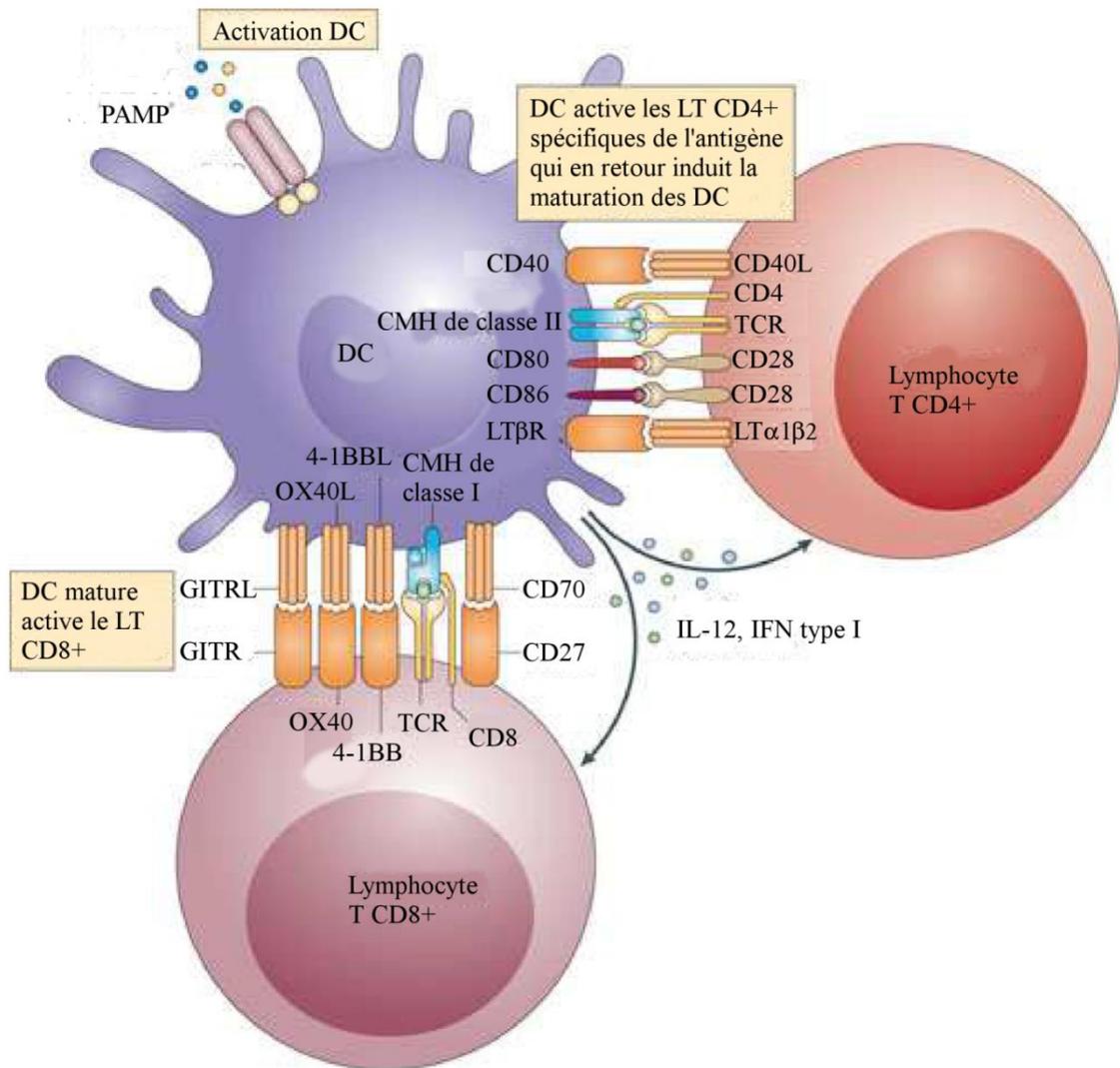
Il existe également une troisième voie de présentation : la présentation antigénique croisée. Certaines DC sont capables également de présenter des antigènes exogènes aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Les mécanismes précis de cette voie sont pour le moment sujets à débat. Il existe plusieurs hypothèses et les deux les plus courantes sont les suivantes : (1) l'une suppose que l'antigène soit endocyté puis passe dans le cytosol avec l'aide de la protéine Sec61 et subit ensuite la voie classique de présentation des antigènes intracellulaires et (2) l'autre suppose que toutes les étapes de dégradations de l'antigène et la fixation au CMH de classe I aient lieu dans un même compartiment cellulaire [24].

Cette voie permet aux DC d'induire l'activation des LT CD8<sup>+</sup> sans pour autant être infectées par un pathogène intracellulaire.

### **3.2. Les signaux d'activation des LT naïfs**

En présence d'antigène, l'initiation de la réponse primaire nécessite trois signaux qui sont nécessaires à l'activation des LT CD8<sup>+</sup>, à leur différenciation et à leur survie (Figure 4) :

- \_ l'interaction entre le TCR et le CMH de classe I qui permet d'activer les cellules spécifiques à l'antigène (signal 1),
- \_ l'interaction entre les différentes molécules de costimulation exprimées à la surface des DC matures et les LT CD8<sup>+</sup> (signal 2),
- \_ la stimulation induite par les cytokines proinflammatoires (signal 3) [25-28].



**Figure 4** Schéma de phase d'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> par les cellules dendritiques (d'après [29])

### 3.2.1. Signal 1 : interactions TCR/CMHpeptide

Le premier signal correspond à l'interaction du complexe CMHp avec le TCR. Une étude réalisée concernant l'interaction entre le TCR et le CMHp a montré que la qualité de cette interaction peut être modifiée par différents paramètres comme la densité d'antigène ou l'affinité du TCR pour l'antigène [30].

De plus, les études dans des conditions physiologiques ont montré que l'activation des LT par la stimulation *via* son TCR seule n'induit pas son activation à moins que les autres signaux y soient associés [31,32]. Les autres signaux (2 et 3) sont donc indispensables pour une activation optimale des LT naïfs.

Lors de l'engagement entre le TCR et le complexe CMH $\alpha$  spécifique et si les facteurs d'activation sont réunis, il y a formation d'une synapse immunologique entre le lymphocyte T et le CPAg ainsi que l'activation des voies de signalisation intracellulaires qui vont induire l'activation du lymphocyte T, sa différenciation et sa maturation vers le stade effecteur en passant par le recrutement de molécules telles que PKC (Protein Kinase C), LAT (Linker for activation of T cell), et LCK (Leukocyte-specific protein tyrosine kinase).

### 3.2.2. Signal 2 : les molécules de costimulation

Le second signal implique l'interaction entre un couple récepteur/ligand présent à la surface des LT CD8 $^+$  et des DC. Il en existe deux types : les molécules de costimulation positive et négative [33]. La majorité des molécules de costimulation appartient à la famille des immunoglobulines (IgSF) et à la famille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TNFRSF, *Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily*). Parmi ces molécules, seules les molécules CD28, CD27 et HVEM (Herpesvirus entry mediator) sont exprimées de façon constitutive par les LT naïfs alors que la majeure partie d'entre elles n'est inducible que suite à la reconnaissance d'un antigène par le TCR. À la suite de l'interaction entre le complexe CMH $\alpha$  avec le TCR du LT CD8 $^+$ , les molécules de costimulation se regroupent la plupart du temps avec les molécules du TCR au niveau de la synapse immunologique où elles vont agir en synergie pour induire ou inhiber l'activation et modifier la fonctionnalité des LT CD8 $^+$  [34]. L'ensemble des molécules exprimées constitutivement à la surface des cellules a un effet positif sur le signal transduit *via* le TCR alors que celles qui sont inducibles, peuvent soit avoir un effet positif (ICOS, CD30, OX40, 4-1BB, SLAM) soit négatif (CTLA-4, PD-1, BTLA) sur le signal TCR. Cependant, en présence de leurs ligands, les molécules de costimulation ne peuvent pas activer d'elles-mêmes de façon productive les LT CD8 $^+$ , mais peuvent uniquement moduler le signal délivré *via* le TCR.

Les études ont permis de montrer l'importance des molécules de costimulation comme CD28 et 4-1BB au cours de l'expansion et de la différenciation de LT CD8 $^+$ . Ainsi, la molécule CD28 serait indispensable pour la génération d'une réponse cytotoxique contre de nombreux agents pathogènes [35,36], également lorsque le signal d'activation est faible et de courte durée pour les LT CD8 $^+$  naïfs [37]. En ce qui concerne la molécule de costimulation 4-1BB, elle est induite rapidement sur les LT CD8 $^+$  suite à la stimulation antigénique [38] et joue un rôle important dans la réponse CD8 $^+$  notamment sur la synthèse d'IFN- $\gamma$  et la survie des LT

activés [38,42]. Ces études permettent d'affirmer que les LT naïfs sont capables lors de leur activation d'intégrer un ensemble de signaux délivrés directement par les DC [43].

En outre, les molécules de costimulation vont réguler l'activation et moduler la fonctionnalité des LT CD8<sup>+</sup> avec une régulation spatiotemporelle de l'expression de ces molécules. En effet, lors de l'activation, les molécules de costimulation positive sont présentes en majorité, puis pendant la phase de contraction, les molécules de costimulation négative prennent le relais et sont exprimées à la surface des LT CD8<sup>+</sup> pour supprimer leur activité [44]. Sur certaines molécules de costimulation, plusieurs ligands peuvent interagir, possiblement à travers plusieurs sites de fixation et ces molécules de costimulation en fonction du ligand peuvent moduler la réponse dans un sens ou dans l'autre comme c'est le cas pour la molécule HVEM [45].

Au niveau des DC, leur activation par contact avec les LT CD4<sup>+</sup> induit à leur surface la surexpression de molécules de costimulation de la famille B7 telles que CD80 et CD86. Les interactions entre ces molécules de costimulation lors de la stimulation antigénique ont pour conséquence la prolifération, la survie des LT activés et la production d'IL-2 [46,47].

### 3.2.3. Signal 3 : les cytokines proinflammatoires

Le troisième signal provient des cytokines proinflammatoires comme l'interleukine-12 (IL-12) produite par les DC activées, des interférons de type I (IFN- $\alpha$  et  $\beta$ ) et de type II (IFN- $\gamma$ ) produits respectivement par les DC plasmacytoïdes et par les cellules NK et les LT activés. Des études ont montré que ce signal joue un rôle déterminant dans la réponse immune. En effet, l'ajout de ces cytokines dans un milieu de culture de LT activés permet d'augmenter la prolifération et la survie de ces cellules à la fois *in vitro* [25,27,48] mais également dans des études *in vivo* d'immunisation [49].

Plusieurs études ont montré que les cytokines proinflammatoires sécrétées diffèrent en fonction du type de pathogène [50,52]. En effet, l'expansion des LT CD8<sup>+</sup> suite à l'infection par le virus LCMV (Lymphocytic ChoriMeningitis Virus) nécessite la stimulation par l'IFN de type I alors que l'expansion des LT CD8<sup>+</sup> lors d'une infection par *L. monocytogenes* semble être plus dépendante de l'IL-12 et de l'IFN- $\gamma$  [50]. Ainsi, la reconnaissance des pathogènes via les récepteurs Toll-like (TLR) notamment et les interactions spécifiques qui vont s'établir entre un agent pathogène et l'organisme seront déterminantes pour le type de cytokines pro-inflammatoires produites.

Ces cytokines sont donc nécessaires à l'établissement d'une réponse efficace en contribuant par exemple à l'augmentation du nombre de LT effecteurs lors du pic de la réponse et à leur survie [53].

### 3.2.4. Molécules d'activation

L'activation des LT CD8<sup>+</sup> conduit à la différenciation en cellules effectrices et à une modification profonde du métabolisme de la cellule. Lors de la stimulation spécifique des LT CD8<sup>+</sup> par le complexe CMHp, le complexe TCR-CD3 va induire une cascade de signalisation impliquant de nombreuses protéines intracellulaires comme Lck, ZAP-70 ou Fyn. Ces modifications intracellulaires se traduisent également par une modification phénotypique avec une expression différentielle de nombreuses molécules de surface qui vont nous permettre d'identifier les cellules activées : CD25, CD40, CD69, CD71, Ki67, CD38 ou HLA-DR.

**CD25** correspond à la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2 qui est inductible suite à l'activation par le TCR du LT. Les chaînes  $\beta$  et  $\gamma$  du récepteur à l'IL-2 forment un récepteur de faible affinité à l'IL-2 mais l'association avec la chaîne  $\alpha$ , CD25, forme un récepteur doté d'une plus forte affinité et permet donc de répondre plus efficacement à l'IL-2 [54].

**CD40** fait partie de la super famille des récepteurs du TNF (Tumor Necrosis Factor) qui agit comme une molécule de costimulation. Cette molécule est exprimée de façon constitutive sur les CPAg et est inductible sur les LT CD8<sup>+</sup>. Son ligand est le CD40L (CD154) et son expression peut être induite sur les cellules dendritiques qui vont par la suite activer de façon optimale les LT CD8<sup>+</sup> [55]. La fixation CD40L-CD40 provoque l'activation de nombreuses voies intracellulaires comme la voie MAPK ou NF- $\kappa$ B [54].

**CD69 (AIM, Leu23, MLR3)** est constitué d'un homodimère avec deux sous unités de 28 et 32kDa. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire de signalisation qui est impliquée dans l'induction de la prolifération des LT. CD69 est exprimé à de très faibles niveaux sur les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> des PBMC au repos (<5-10%). Il s'agit d'une des premières molécules d'activation qui est exprimée à la surface de la cellule comme montré dans les études avec une stimulation avec l'anticorps anti-CD3 ou la phytohémataglutinine [56659]. Le pic d'expression de cette molécule est autour de 16-24 heures post activation puis cette expression diminue et devient à peine détectable après 72 heures. Lorsque la protéine CD69

est exprimée à la surface des cellules T, elle agit comme une molécule de costimulation pour l'activation et la prolifération des cellules T [60]. L'incapacité d'augmenter l'expression de CD69 après activation par le TCR se traduit par une mauvaise fonctionnalité des LT comme décrit par Critchley-Thorne et. al dans le cas de patients atteints de mélanome métastatique [61].

**CD71 (TFRC, Transferrin Receptor, Tfr)** est un récepteur membranaire de transport du fer dont l'expression augmente après 24 à 48 heures après activation des LT. Cette expression continue d'augmenter et est maintenue à la surface pendant plusieurs jours [62]. CD71 est associé à la chaîne  $\beta$  du TCR et à la molécule ZAP-70 et peut participer au signal TCR. Cette molécule est un facteur essentiel à la prolifération des LT.

**Ki67** est une protéine nucléaire qui est associée à la prolifération de la cellule. L'activation de la cellule précède la phase de prolifération et ce marqueur peut donc être utilisé à la fois comme marqueur de prolifération mais également comme marqueur tardif d'activation des cellules. Cette protéine est présente lors des phases G<sub>1</sub>, S et G<sub>2</sub> et aussi lors de la mitose mais est absente des cellules au repos [63].

Le **CD38** humain est une glycoprotéine transmembranaire de 45kDa qui est exprimé à la surface des LT CD8<sup>+</sup> après activation. Trois grandes fonctions ont été découvertes pour cette protéine : (1) la fonction de transducteur, (2) la fonction d'adhésion et (3) la fonction enzymatique [64,65].

(1) Plusieurs travaux ont montré l'implication du CD38 dans la transduction de signal du TCR. En effet, la présence d'un anticorps agoniste du CD38 provoque la prolifération et l'activation des LT et ce signal passerait par l'intermédiaire de la machinerie transductionnelle du TCR/CD3 [66].

(2) L'implication du CD38 dans l'adhésion cellulaire a été suggérée avec les observations que les mécanismes de migration cellulaire dépendent du niveau d'expression de CD38 membranaire. En effet, les lymphocytes qui expriment un niveau faible de CD38 vont migrer vers les ganglions lymphatiques alors que les LT activés qui expriment un niveau fort de CD38 vont migrer vers les tissus en périphérie. Un des ligands possibles du CD38 est la molécule d'adhésion endothéliale, CD31 [67].

(3) Le CD38 peut fournir de l'énergie aux LT activés. Le CD38 peut agir comme une ectoenzyme multifonctionnelle qui catalyse la synthèse et l'hydrolyse de l'ADP-ribose

cyclique à partir de l'ADP-ribose et du nicotinamide<sup>+</sup> (NAD<sup>+</sup>) et est impliqué dans la régulation du niveau calcique. Il participe notamment au recyclage des nucléotides extracellulaires comme cela a été montré sur les LT [68]. De plus, l'activation des LT nécessite une grande quantité d'énergie que la synthèse intracellulaire *de novo* ne suffit pas à combler. L'expression du CD38 et des autres ectoenzymes qui ont également des activités nucléotidases est couplée à l'activation et permet ainsi de fournir l'énergie nécessaire aux lymphocytes.

Dans le cas de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), on peut noter une surexpression de CD38 à la surface des LT [69,70]. Le rôle du CD38 est double : la surexpression de CD38 permet de (1) compenser la diminution de biosynthèse *de novo* de nucléotides et (2) de produire la NAD<sup>+</sup> qui peut traverser la membrane plasmique et qui peut exercer une activité antivirale. La NAD<sup>+</sup> inhibe la réplication virale au niveau postintégration et augmente la survie des cellules infectées par le VIH-1 en empêchant leur apoptose [71,73].

**HLA-DR** correspond à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II qui est exprimé à la surface des cellules après activation. Le complexe majeur d'histocompatibilité est situé dans le chromosome 6 chez l'homme. On a découvert 1 gène qui code la chaîne et 2 gènes qui codent la chaîne du CMH de classe II HLA-DR [54]. Les premières études ont permis de montrer que lorsqu'on stimulait les cellules T avec de la Phorbol Myristate Acetate (PMA) (ou Phytohémataglutinine, PHA), les cellules expriment tardivement ce marqueur à la surface [62]. De plus, un traitement par l'interféron- (IFN- ) sur des LB, des cellules dendritiques ou des monocytes induit l'expression de HLA-DR [74]. Cette expression nécessite la production d'un activateur de transcription appelé transactivateur du CMH de classe II (CIITA). En effet, CIITA est le facteur limitant qui permet d'augmenter rapidement l'expression du CMH de classe II induite par l'IFN- [75]. La présentation antigénique par les molécules de CMH de classe II a souvent été associée aux CPAg et notamment aux cellules dendritiques et la présence et le rôle de cette molécule après activation à la surface des LT CD8<sup>+</sup> sont encore à définir. Cependant, plusieurs études ont montré que la présence de HLA-DR est associée à une prolifération de ces cellules. En effet, les cellules Ki67<sup>+</sup> sont toutes HLA-DR<sup>+</sup>, l'activité de la télomérase est présente au sein des cellules exprimant les marqueurs HLA-DR et CD28 alors qu'elle est quasiment absente au sein des cellules négatives pour HLA-DR ou CD28 et le pool de cellules HLA-DR<sup>+</sup> est enrichi en cellules impliquées dans la progression du cycle cellulaire [76,77]. Speiser et al. montrent

de plus que le marqueur HLA-DR permet de caractériser une population de LT CD8<sup>+</sup> activés et qui est différentes des LT CD8<sup>+</sup> effecteurs cytotoxiques.

Outre le TCR des LT CD4<sup>+</sup>, il existe un autre ligand de HLA-DR qui est le FcR-Like 6 (FCRL6) [78]. Cette protéine fait partie de la famille des récepteurs Fc-like (FCRL) qui ont une structure similaire à celle des récepteurs Fc [79] mais pour le moment aucune étude n'a démontré que ces récepteurs s'associent aux Ig comme les récepteurs Fc. Par ailleurs, des études ont montré que le FCRL6 est exprimé à la surface des LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques et que cette expression est augmentée sur les cellules au stade de différenciation terminale chez les patients infectés par le VIH [80]. Le rôle de cette interaction entre HLA-DR et FCRL6 n'a pas encore démontré.

## **4. Expansion clonale et différenciation des LT naïfs en cellules effectrices**

### **4.1. Expansion clonale des LT activés**

L'une des conséquences majeures de l'activation des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène est l'induction d'une forte expansion. Des études chez la souris ont montré que le nombre de LT CD8<sup>+</sup> naïfs spécifiques d'un antigène est de l'ordre de 10 à 1000 cellules par hôte [81-86]. La phase de multiplication clonale permet de passer de ce faible nombre de cellules naïves à plus de 10<sup>5</sup> cellules avec des capacités effectrices supérieures pour combattre efficacement l'infection [87]. L'ampleur de l'expansion joue également un rôle majeur puisqu'il va déterminer le nombre de cellules mémoires sur le long terme [88,89].

### **4.2. Différenciation des LT activés en cellules effectrices**

L'activation induit l'acquisition de nouvelles fonctions qui vont permettre aux LT CD8<sup>+</sup> effecteurs de déclencher la destruction des cellules exprimant un complexe CMHp pour lequel ils sont spécifiques. Cette activité implique plusieurs voies qui pourraient agir en synergie : la voie perforine / granzyme (dépendante de calcium), la voie Fas / FasL (indépendante de calcium) et aussi la sécrétion de cytokines proapoptotiques comme le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha).

## 4.2.1. Cytotoxicité

### 4.2.1.1. Induction de la mort cellulaire

Les LT CD8<sup>+</sup> effecteurs sont capables d'éliminer les cellules cibles exprimant le CMH-peptide qu'ils reconnaissent. La présentation de l'antigène doit se faire via le CMH de classe I pour pouvoir être reconnu par les LT CD8<sup>+</sup>. Les antigènes présentés sont soit d'origine intracellulaire et proviennent des pathogènes intracellulaires soit d'origine extracellulaire et cette présentation se fait via la présentation antigénique croisée. La capacité des LT CD8<sup>+</sup> à éliminer des cellules cibles se fait selon deux voies : la voie cytotoxique avec la sécrétion de perforine/granzymes et la voie Fas-FasL.

- **La voie de perforine/granzyme**

Suite à la reconnaissance et à l'activation des LT CD8<sup>+</sup> par la cellule cible *via* le complexe CMH<sub>p</sub> spécifique, la fonction cytotoxique se met en place avec l'organisation de la synapse immunologique et la synthèse des granules lytiques. La mise en place de la synapse immunologique se fait à travers la réorganisation du cytosquelette avec la polarisation du MTOC (microtubule organizing center) et la genèse d'un pôle sécrétoire avec la sécrétion des granules d'exocytose [90,91].

Les granules lytiques contiennent de nombreuses protéines capables d'induire la mort par apoptose impliquant les voies caspases de façon très rapide, de l'ordre de 20 min (Figure 5). Les composants principaux des granules sont la perforine et les molécules de granzymes. Il existe 5 types de granzymes : granzyme A, B, H, K et M. Les granzymes les plus étudiés sont les granzymes A et B et il a été montré récemment que l'expression de perforine et du granzyme B corrèle avec l'activité cytotoxique alors que l'expression du granzyme A ne corrèle pas [92]. Nous allons donc par la suite nous intéresser à la perforine et au granzyme B. La perforine est une protéine essentielle dans la capacité cytotoxique découverte en 1985. Son mécanisme d'action est encore sujet à débat. Initialement, la perforine était supposée induire l'apoptose en perméabilisant la membrane cellulaire par la formation de pores. Cependant, l'expression de la perforine seule ne suffit pas à induire la mort cellulaire et les dommages causés à l'ADN [93] et le modèle selon lequel, la perforine formerait des pores dans la membrane plasmique comme les composants du complément, a souvent été controversé. Ainsi, deux voies d'entrée des protéines de granzymes dans le cytosol ont été proposées :

\_ la perforine forme des pores microscopiques dans la membrane plasmique qui génèrent un influx calcique provoquant l'endocytose rapide des granzymes. Cette endocytose est démontrée par l'importance de la dynamine, une protéine cytoplasmique impliquée dans la formation des vésicules d'endocytose, dans la cytotoxicité induite par le granzyme B [94,95],

\_ la perforine forme des pores de façon transitoire à la surface des cellules cibles qui permet une entrée directe des protéines de granzymes dans le cytosol [96].

L'entrée des granzymes dans le cytosol entraîne l'induction de la mort cellulaire par apoptose. Les granzymes sont des protéases qui seraient activées avant leur entrée dans la cellule cible par la sérine [97]. Le mécanisme d'action du granzyme B est résumé dans la Figure 5. Deux voies principales d'induction de l'apoptose ont été identifiées, la première impliquant l'activation des caspases qui dépendent de la présence de calcium et la deuxième impliquant la perméabilisation mitochondriale [93,98].

Le granzyme A a également été beaucoup étudié et son mécanisme d'induction de mort est caractérisé par deux principales propriétés :

\_ en synergie avec la perforine, le granzyme A induit le découpage des ADN simple brin plutôt que la fragmentation de l'ADN,

\_ la mort cellulaire est indépendante des caspases et cible le noyau [99-101],

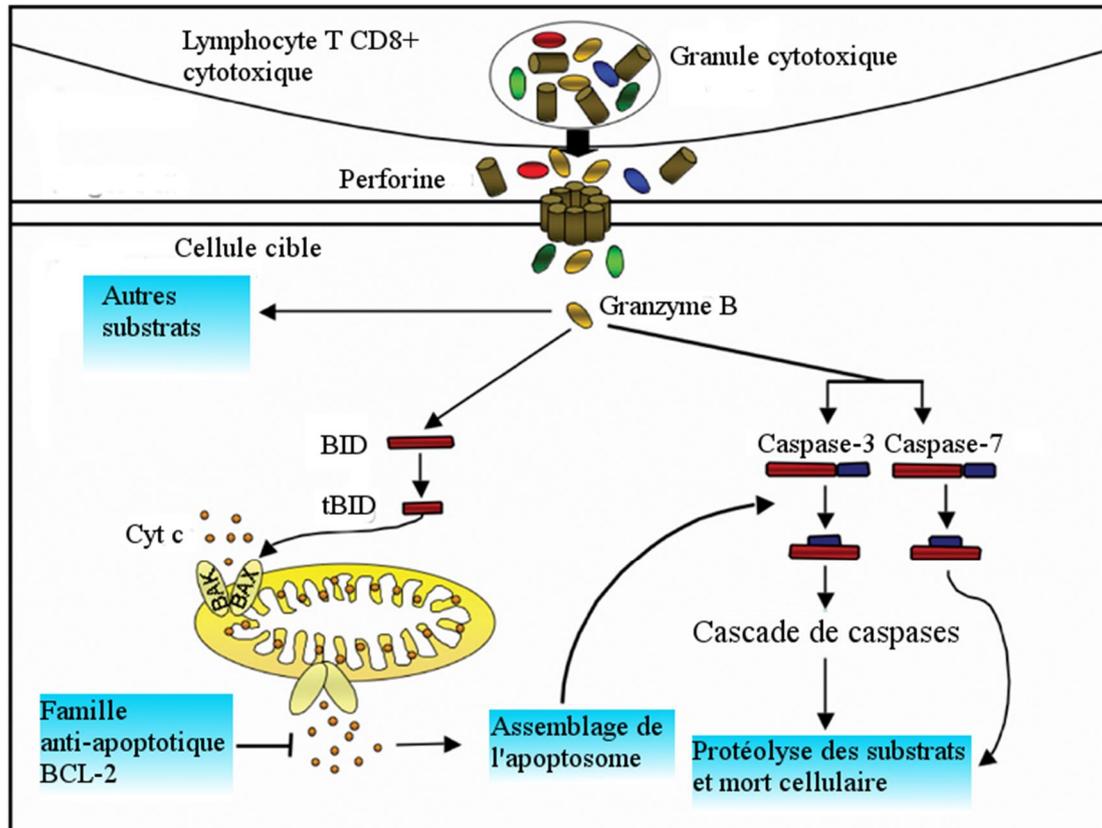


Figure 5 Schéma de l'induction de la mort cellulaire par la voie perforine/granzyme B par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (d'après [93])

- **La voie Fas/FasL**

Les LT CD8<sup>+</sup> effecteurs sont aussi capables d'induire l'apoptose des cellules cibles via un autre mécanisme indépendant du calcium : la voie Fas/FasL. L'IL-2 joue un rôle important dans l'induction de l'expression de Fas Ligand (CD95L) et de Fas (CD95) à la surface des LT CD8<sup>+</sup> activés et dans leur plus grande sensibilité à la mort cellulaire. En effet, des cellules de souris déficientes en IL-2 ou en IL-2RB ont montré être résistantes à l'apoptose induite par la voie Fas/FasL ce qui conduit à une prolifération lymphocytaire non contrôlée et de sévères réactions auto-immunes [102].

Le mécanisme d'action de cette voie d'apoptose est le suivant : les LT CD8<sup>+</sup> effecteurs qui expriment à leur surface la protéine FasL (CD95L) se lient aux cellules cibles qui expriment le récepteur Fas (CD95). Cette liaison va entraîner le recrutement de diverses protéines et la formation d'un complexe appelé DISC (*death inducing signaling complex*) qui permet le recrutement des protéines adaptatrices FADD et TRADD. Leur interaction va résulter en un recrutement et une activation de la voie des caspases 8 et 10 et induire l'apoptose des cellules cibles directement ou par l'intermédiaire du relargage de cytochrome-c par la mitochondrie [103-105].

L'expression de FasL à la surface des LT CD8<sup>+</sup> est également dépendante du signal délivré via le TCR. Contrairement aux protéines cytolytiques, la molécule de FasL n'est pas stockée, sa synthèse n'est optimale que quelques heures après le signal TCR. Ainsi, sa mise en place est tardive par rapport à la voie de perforine/granzyme.

#### 4.2.2. Sécrétion de cytokines et de chimiokines par les cellules effectrices

Les LT CD8<sup>+</sup> produisent aussi différentes cytokines après activation. Les LT CD8<sup>+</sup> effecteurs se caractérisent principalement par la sécrétion de l'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$  et de l'IL-2. Ces cytokines ont des rôles très divers :

- augmentation de l'expression de molécules impliquées dans la présentation de l'Ag sur les APC ou les cellules cibles comme pour l'IFN- $\gamma$  [106,107];
- activation de l'activité microbicide pour l'IFN- $\gamma$  [107];
- l'induction de la mort cellulaire via le récepteur TNFR1 par le TNF- $\alpha$  [107].

Les LT CD8<sup>+</sup> vont également produire différentes chimiokines dans les heures suivant l'activation (CCL3, CCL4) ou au contraire de façon tardive (CCL5) [108-110]. Leurs rôles peuvent être multiples, outre leur effet chimioattractant, ces chimiokines peuvent en effet

moduler la prolifération des LT [111,112]. Enfin, il faut noter que si, en absence d'antigène, la cellule effectrice garde la capacité d'exprimer ses fonctions, l'induction de ces fonctions reste sous le contrôle de l'interaction du TCR avec le CMHp spécifique [113,114]. Cette particularité permet de restreindre l'expression des fonctions dans le temps et dans l'espace et ainsi d'éviter les effets non spécifiques. À ce jour, il existe une exception à cette règle ; ainsi, la production d'IFN- $\gamma$  par les LT CD8<sup>+</sup> effecteurs ou mémoires peut être induite par une combinaison de IL12/18 [115].

#### 4.2.3. Régulation de la différenciation des LT CD8<sup>+</sup>

De nombreux facteurs de transcription vont entrer en jeu lors de l'activation et de la différenciation des LT CD8<sup>+</sup> en cellules effectrices et en cellules mémoires. Nous allons nous intéresser ici à l'action de deux facteurs de transcription à « boîte T », T-bet et Eomes. T-bet et Eomes partagent 74% de similitudes de séquences dans leur domaine de « boîte T ».

Ces deux facteurs de transcription jouent un rôle important dans la régulation des fonctions effectrices et la différenciation des LT CD8<sup>+</sup> en cellules mémoires. Leur rôle a été mis en évidence à la fois *in vitro* mais aussi *in vivo* chez la souris. La délétion du gène *tbx21* qui code pour la protéine T-bet induit une diminution des fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup> comme la sécrétion de cytokines et la capacité cytotoxique [116,117]. En effet, il a été montré que T-bet se fixe sur la région promotrice de la *perforine* et du *granzyme B* et influence le niveau d'expression de ces molécules [118,120]. De plus, T-bet régule de façon négative les gènes de IL-2 et PD-1 [121,123]. McLane et al. ont montré que les cellules naïves T CD8<sup>+</sup> n'expriment pas ou très peu T-bet et qu'à la suite de la stimulation TCR, le niveau augmente avec une forte fréquence de cellules effectrices exprimant un fort niveau de T-bet [124].

De même, Eomes partagent des fonctions redondantes avec T-bet [119]. Les études portant sur les expériences de souris délétées en *eomes* ont montré qu'elles étaient déficientes dans la formation des cellules mémoires et du renouvellement homéostatique [118,125,126] soulignant son rôle dans la différenciation en cellules mémoires. De plus, la délétion d'*eomes* dans les LT CD8<sup>+</sup> activés a pour conséquence une forte diminution de l'expression de l'IFN- $\gamma$ , la perforine et le granzyme B. Il a néanmoins été montré que la surexpression d'Eomes induit une augmentation des fonctions effectrices contrairement à T-bet [119] et que le niveau d'expression d'Eomes des LT CD8<sup>+</sup> naïves est faible et que la stimulation TCR n'induit pas une augmentation du niveau d'expression [124].

T-bet et Eomes augmentent l'expression de IL-2R qui est requis pour la survie des LT CD8<sup>+</sup> mémoires et la prolifération homéostatique en réponse au signal à IL-15 [127]. Cependant, alors que la forte expression d'Eomes corrèle avec la fréquence des cellules mémoires centrales, la forte expression de T-bet inhibe l'expression de IL-7R et mène à la formation des cellules effectrices et les cellules mémoires effectrices [125,128]. T-bet est fortement exprimé très tôt dans les LT CD8<sup>+</sup> effecteurs mais diminue progressivement avec la formation des cellules mémoires alors que l'expression d'Eomes augmente initialement dans les cellules effectrices et continue à augmenter durant la transition effecteur mémoire.

Une récente étude a montré que les cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques du CMV (CytoMegaVirus) présentent trois profils d'expression de T-bet et d'Eomes : T-bet<sup>low</sup>/Eomes<sup>high</sup>, T-bet<sup>int</sup>/Eomes<sup>high</sup> et T-bet<sup>high</sup>/Eomes<sup>high/low</sup>. Les lymphocytes avec une forte expression de T-bet sont plus efficaces dans la reconnaissance des antigènes viraux et présentent une avidité plus faible. Smith et al. montrent de plus que cette forte expression corrèle avec une forte expansion clonale et une différenciation au stade effecteur terminal [129]. T-bet maintient la réponse T CD8<sup>+</sup> spécifique du virus lors de l'infection chronique et supprime l'expression de PD-1. Cependant, lors de l'infection par le VIH, l'expression de T-bet diminue au cours du temps et le niveau d'expression de PD-1 augmente et apparaît un dysfonctionnement des LT CD8<sup>+</sup> [122]. Chez la souris, Paley et al. montrent que dans le cas de l'infection par le LCMV, les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du virus avec une forte expression d'Eomes sont associés à un épuisement plus important et à une production réduite de cytokines comparé aux cellules avec une forte expression de T-bet [130].

## 5. Phase de contraction de la réponse T CD8<sup>+</sup>

La notion d'homéostasie est définie par le maintien à un niveau d'équilibre de paramètres de l'organisme comme la glycémie ou le nombre total de LT. La forte expansion des LT CD8<sup>+</sup> lors de la réponse immunitaire va déséquilibrer cette balance et un retour à l'équilibre s'opère après élimination du pathogène. Les LT vont subir une forte contraction de leur nombre qui résulte en une diminution de l'ordre de 90 à 95% des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques par apoptose [89,126,131]. Les 5 à 10% des cellules qui persistent vont se différencier en cellules mémoires et constituer un pool de cellules en charge de la surveillance immunitaire.

La phase de contraction est donc caractérisée par la mort de la majorité des LT CD8<sup>+</sup> effecteurs et le retour à un état homéostatique. Il existe plusieurs mécanismes permettant

d'expliquer la mort lymphocytaire en périphérie, notamment la mort induite après activation et qui peut être distinguée en deux voies de signalisation : AICD (activation induced cell death) ou l'ACAD (cells autonomous or activated T cells autonomous cell death). D'autres mécanismes sont également mis en jeu lors de cette phase de contraction telle que la déprivation de cytokines et l'induction de molécules pro-apoptotiques.

## 5.1. La voie AICD

Le mécanisme le plus étudié est la mort induite par activation ou AICD. L'induction de la mort cellulaire des lymphocytes T déjà activés se fait par une restimulation de leur TCR et par la liaison de l'IL-2 à son récepteur. Alors que les LT possèdent un phénotype résistant à l'AICD lors de la phase de prolifération, ils le perdent lors de la phase de contraction de la réponse immunitaire. Plusieurs voies de mort cellulaire ont été décrites et nous allons présenter ici le mécanisme impliquant la liaison entre les récepteurs de mort et leurs ligands.

L'un des principaux mécanismes de mort cellulaire par l'AICD se fait par la voie TRAIL. Les molécules de mort de la superfamille du TNF comme « TNF-related apoptosis-inducing ligand » (TRAIL) et TNFR1 sont induites par l'activation et induisent la mort des cellules cibles [132]. La molécule TRAIL se fixe à deux récepteurs de mort pro apoptotiques, TRAIL-R1 (DR4) et TRAIL-R2 (DR5). Après fixation de TRAIL sur son récepteur, il y a formation d'un complexe de fixation induisant la mort via l'activation de la voie des caspases et l'initiation de l'apoptose [133].

Lors de l'infection par le VIH, les LT CD4<sup>+</sup> présentent une augmentation de l'expression de TRAIL et de DR5 comparés à ceux des patients non infectés [134]. Les auteurs montrent également que la présence de la glycoprotéine du VIH et de l'IFN- $\gamma$  induit l'augmentation de l'expression de TRAIL. Cette augmentation se fait essentiellement sur les pDC et les monocytes et favorisent le fort turn over des LT.

## 5.2. La voie ACAD

L'ACAD correspond à la mort des cellules activées par privation de cytokine et n'est, elle, pas dépendante de l'activation du TCR [135]. Ce mécanisme se met en place, lorsque la stimulation antigénique diminue de par la clairance du pathogène et suggère que l'ACAD est probablement plus impliquée que l'AICD dans la phase de contraction qui suit la phase de

prolifération. Elle permet une régulation de la phase de contraction de façon homéostatique et implique l'expression de molécules pro et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 qui sont régulées principalement par deux cytokines : l'IL-7 et l'IL-15. Ces deux cytokines jouent un rôle important dans la survie des cellules en permettant d'inhiber l'apoptose. En effet, Schluns et al. ont montré que l'absence de signalisation avec l'IL-15 ou avec l'IL-7 se traduit par une contraction accrue avec une plus faible génération et survie de cellules mémoires [136,137]

La phase de contraction après élimination du pathogène se fait principalement par mort par privation en cytokine et seules certaines cellules vont recevoir le signal nécessaire à leur survie et vont se différencier en cellules mémoires.

## 6. Phase mémoire

A l'issue de la contraction émerge une population de LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène correspondant aux LT CD8<sup>+</sup> mémoires à long terme.

Au cours de la différenciation en cellules mémoires, les LT subissent un certain nombre de modifications génétiques, phénotypiques et fonctionnelles par le biais de signaux multiples et la force et la durée de la stimulation du TCR, l'expression des molécules de costimulation à la surface des cellules, les cytokines et responsables de régulations transcriptionnelles et métaboliques ainsi qu'une ségrégation inégale des facteurs déterminant le lignage [138]. Ces cellules mémoires ont ainsi une longue durée de vie et sont capables de réagir rapidement à une réinfection par le même pathogène [139].

### 6.1. Genèse des cellules mémoires

Les réponses mémoires sont importantes puisqu'elles constituent la base des réponses induites par les vaccins et permettent une protection accrue contre un pathogène. Les modèles murins ont permis de mieux comprendre la mise en place des cellules mémoires. Cependant, le mécanisme d'induction de ces cellules n'a pour le moment pas été clairement établi. Il existe plusieurs modèles qui permettent d'expliquer la différenciation des cellules naïves en cellules mémoires (Figure 6) :

1. la différenciation asymétrique où les cellules naïves se différencient soit en cellules effectrices qui vont mourir soit en cellules non-effectrices qui vont former le pool de cellules mémoires,

2. la différenciation linéaire, où il existe un continuum entre les cellules naïves, effectrices et mémoires [140]
3. la différenciation décroissante où l'intensité et la durée de la stimulation antigénique vont déterminer la formation du pool de cellules mémoires.

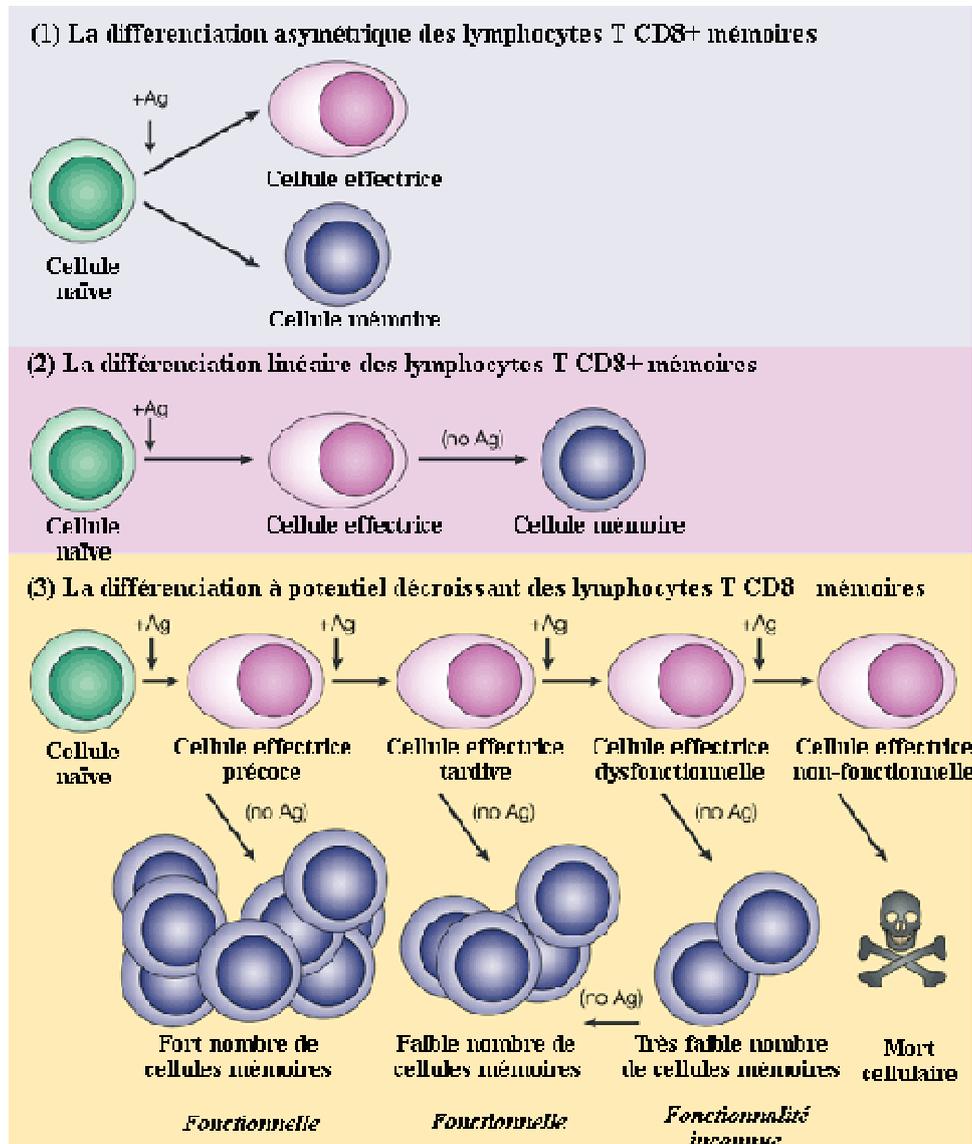


Figure 6 Schéma de la différenciation des cellules naïves en cellules mémoires (d'après [14])

### 6.1.1. Le modèle de la différenciation asymétrique

Le premier modèle propose l'hypothèse suivante sur la différenciation en cellules mémoires : l'activation des LT CD8<sup>+</sup> naïves entraîne une division cellulaire asymétrique et forme deux lignées différentes, celle des cellules effectrices et celle des cellules mémoires. Ce modèle est basé sur les différences phénotypiques et de capacité d'auto-renouvellement entre les populations effectrices et mémoires [141]. Ce modèle est confirmé par l'observation par

Chang et al. en 2007 que la première division après activation engendre une division asymétrique avec une différence de taille et de contenu entre les deux cellules filles [142]. Selon ce modèle, la voie de différenciation des LT CD8<sup>+</sup> est fixée très tôt dans la réponse.

### *6.1.2. Le modèle de la différenciation linéaire*

Selon ce modèle, les LT CD8<sup>+</sup> naïfs sont activés et vont se différencier en cellules effectrices et la population d'effecteurs contient les précurseurs de la future population mémoire [143-147]. En effet, en 1999, Jacob et al. ont montré que les LT CD8<sup>+</sup> mémoires sont dérivés de cellules effectrices qui ont exprimé le granzyme B. De plus, des études ont montré que ces cellules effectrices qui vont donner les LT CD8<sup>+</sup> mémoires montrent une expression de CD127 plus importante lors des 48 premières heures. En effet, après transfert de ces cellules chez une autre souris, ces cellules se différencient préférentiellement en cellules mémoires [146]. Alors que la plupart des cellules effectrices vont mourir par apoptose, ces précurseurs de cellules mémoires vont persister et former le pool de cellules mémoires.

### *6.1.3. Le modèle de la différenciation à potentiel décroissant*

Selon ce modèle, ce qui distingue les cellules effectrices qui vont mourir et celles qui vont survivre et se différencier en cellules mémoires est la durée et le niveau de la stimulation antigénique auxquels sont soumis les cellules [148]. Cette hypothèse est confirmée par le devenir des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> spécifiques d'un antigène dans le cas d'une infection chronique. En effet, dans le cas d'une infection par le VIH ou par l'hépatite C, les cellules T spécifiques vont persister mais devenir dysfonctionnelles [149-151]. La charge virale semble corrélée avec le dysfonctionnement des CTL [152-155].

## **6.2. Hétérogénéité des cellules mémoires**

Il existe cependant une certaine hétérogénéité des cellules mémoires avec notamment la distinction entre deux sous-populations de LT CD8<sup>+</sup> mémoires qui vont exprimer des marqueurs phénotypiques différents [156,157] :

- les LT CD8<sup>+</sup> mémoires effecteurs (ME) qui sont CCR7<sup>-</sup> CD62L<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> et qui sont présents en périphérie,

- les LT CD8<sup>+</sup> mémoires centraux (MC) qui sont CCR7<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> et qui sont présents dans les ganglions lymphatiques.

Les LT CD8<sup>+</sup> ME semblent être dans un état de différenciation plus avancée avec une acquisition plus rapide des fonctions effectrices après stimulation que les LT CD8<sup>+</sup> MC. Au niveau de la capacité proliférative, les cellules ME présentent une plus faible expansion après stimulation antigénique ou cytokinique et une longueur de télomères plus réduite que les LT CD8<sup>+</sup> MC [140,157,159].

### 6.3. Maintien des cellules mémoires

Les LT CD8<sup>+</sup> mémoires ont la capacité de survivre pour une très longue période de temps et le nombre de cellules mémoires reste constant. Plusieurs études ont montré que le maintien du nombre de LT CD8<sup>+</sup> mémoires dans l'organisme est lié à la capacité d'autorenouvellement par prolifération cellulaire. L'homéostasie des LT CD8<sup>+</sup> mémoires est sous le contrôle de signaux pro et anti-apoptotiques [138] et de la prolifération homéostatique qui est régulée par les cytokines homéostatiques telles que l'IL-7 et l'IL-15 [160,161]. Elle est de plus indépendante de la stimulation antigénique.

#### 6.3.1. L'interleukine-15

L'IL-15 est indispensable aux LT CD8<sup>+</sup> mémoires comme le montrent les études chez les souris déficientes en IL-15 qui ne présentent pas de cellules CD8<sup>+</sup> mémoires [162]. Des travaux ont montré que l'injection d'adjuvants comme le poly I:C ou le LPS entraîne la production d'interféron, notamment l'interféron de type I qui à son tour induit la synthèse d'IL-15 par de nombreuses cellules comme les monocytes, les macrophages, les cellules stromales et les cellules épithéliales [163,165]. Cette cytokine agit directement sur les LT CD8<sup>+</sup> mémoires et permet le maintien du pool de LT CD8<sup>+</sup> mémoires par une prolifération homéostatique en l'absence d'antigène [166,168].

Le récepteur de l'IL-15 est composé du CD122 (IL-2R/IL-15R $\beta$ ) et du CD132 (récepteur  $\gamma$ ). Le CD122 est sous la régulation de deux facteurs de transcription de la famille « boîte T », Tbet et Eomes [118]. En l'absence de cette cytokine, des LT CD8<sup>+</sup> mémoires sont générés après la réponse primaire mais ils ne se divisent pas et leur nombre diminue [140]. L'IL-15

joue également un important rôle dans le développement des cellules NK, dans leur homéostasie et dans la régulation de leur activité [169,170].

### 6.3.2. *L'interleukine-7*

L'interleukine-7 est une cytokine essentielle au développement et à la survie des LT dans le thymus et en périphérie. En effet, les souris déficientes en IL-7 ou pour l'expression de son récepteur présente une lymphopénie sévère avec une diminution importante du nombre de LT [171,173]. L'IL-7 est un facteur de survie indispensable pour les LT au cours de leur maturation dans le thymus et pour les LT matures périphériques. En périphérie, l'IL-7 est produite par les cellules non lymphoïdes dans les organes lymphoïdes comme les cellules stromales, par les cellules dendritiques folliculaires et les cellules dendritiques du sang périphérique. L'IL-7 est nécessaire à la survie et à la prolifération homéostatique des LT naïfs en périphérie en régulant la taille du pool de LT en périphérie [174]. Lors de lymphopénie, le taux d'IL-7 augmente ce qui induit la prolifération des LT circulants et lorsque le nombre de LT est rétabli, la concentration d'IL-7 n'est plus suffisante pour maintenir la survie de tous les LT si la prolifération se maintient.

Le récepteur de l'IL-7 est composé du CD132 et du CD127 (IL-7R $\beta$ ). Le CD132 est fortement exprimé à la surface des LT CD8 $^+$  mémoires [165] et le CD127 est exprimée par les LT naïfs et les LT mémoires. Cependant, l'expression du CD127 est rapidement perdue lors de l'activation. Des travaux suggèrent que la présence précoce ou la réexpression de CD127 permet d'identifier les LT effectrices qui vont générer les LT mémoires [146].

De plus, le développement de la réponse mémoire T CD8 $^+$  nécessite également l'aide apportée par les LT CD4 $^+$  [16].

### 6.3.3. *L'aide des lymphocytes T CD4 $^+$*

Les LT CD4 $^+$  via les interactions avec les DC et la production d'IL-2 vont permettre de délivrer des signaux indispensables à l'expansion de LT CD8 $^+$  activés, à leur différenciation de cellules effectrices en cellules mémoires et à leur maintien [15]. Les LT CD4 $^+$  vont ainsi favoriser la rencontre des LT CD8 $^+$  et DC via l'association CD40L/CD40 à la surface des LT CD4 $^+$  et des DC et rendrait ainsi la DC mature et prête à induire la réponse T CD8 $^+$

[Schoenberger 1998 Nature]. Par ailleurs, les LT CD4<sup>+</sup> sont indispensables à la génération d'une bonne réponse mémoire T CD8<sup>+</sup>. En effet, en l'absence de LT CD4<sup>+</sup>, les LT CD8<sup>+</sup> mémoires vont moins bien répondre lors d'un second contact avec un pathogène et vont présenter une expression importante de la protéine TRAIL à leur surface [175,176].

Les LT CD4<sup>+</sup> sont donc indispensables à la génération d'une bonne réponse T CD8<sup>+</sup> en favorisant à la fois une bonne génération de LT CD8<sup>+</sup> effecteurs mais également une bonne réponse T CD8<sup>+</sup> mémoires.

## **6.4. Fonctions effectrices accrues des cellules mémoires**

Les cellules naïves ont besoin de subir toute la phase d'activation et de différenciation en cellules effectrices comme décrits dans les chapitres 3 et 4. Par contre, le seuil d'activation des cellules mémoires est plus facilement atteint avec une exigence moindre en concentration d'antigène et en signaux de costimulation pour être activées. Les cellules mémoires sont ainsi capables de répondre et d'acquies des fonctions effectrices rapidement après restimulation. Parmi ces fonctions, on retrouve une forte capacité proliférative, la production de cytokines et la cytotoxicité.

### *6.4.1. La capacité proliférative*

Lors d'une stimulation antigénique, la capacité proliférative des cellules mémoires est beaucoup plus importante que celle des cellules naïves. Verga-Fernandes et al. ont en effet montré dans des études *in vivo* chez la souris que les LT CD8<sup>+</sup> mémoires ont une plus forte expansion que les LT CD8<sup>+</sup> naïves [139] ainsi qu'un temps de latence qui précède la phase d'expansion plus faible, qui passe de 27h à 12h. Cette expansion plus rapide semble être liée à la présence d'une kinase dépendante de cycline préactivée, Cdk6, dans le cytoplasme des cellules mémoires [177].

### *6.4.2. La capacité cytotoxique*

Les cellules mémoires sont capables d'exhiber une forte capacité cytotoxique après quelques heures de stimulation à la fois *in vitro* [178] et *in vivo* [179] alors que la cytotoxicité est une fonction effectrice acquise après plusieurs jours pour les cellules naïves. Bien que chez la

souris, les cellules effectrices soient les premières cellules à présenter une activité cytotoxique, après 4 heures de stimulation, les cellules mémoires affichent une capacité cytotoxique *in vivo* équivalente à celle des cellules effectrices.

Il faut toutefois noter qu'il existe une hétérogénéité de l'activité cytotoxique au sein de la population mémoire. Deux études chez l'homme semblent suggérer que les LT CD8<sup>+</sup> ME ont une capacité cytotoxique plus importante que les LT CD8<sup>+</sup> MC : (1) les cellules mémoires qui ont la capacité cytotoxique la plus élevée se trouvent en périphérie plutôt que dans les organes lymphoïdes secondaires [156] et (2) l'expression constitutive de perforine semble restreinte à la sous population ME plutôt que MC [157].

### 6.4.3. La sécrétion de cytokines

Après stimulation, les LT CD8<sup>+</sup> sont capables de produire les mêmes cytokines que les LT CD8<sup>+</sup> naïves. Cependant, en fonction de la cytokine produite, la cinétique de sécrétion diffère entre cellules naïves et cellules mémoires. Concernant la sécrétion de IL-2, les études ont montré qu'elle est hétérogène au sein des cellules mémoires avec les cellules ME sécrétant moins de IL-2 que les cellules MC voire que les cellules naïves [157,180]. Alors que la production de TNF- $\alpha$  est la même entre les cellules mémoires et les cellules naïves, les cellules mémoires sont capables de produire de l'IFN- $\gamma$  plus rapidement que les cellules naïves [181].

Après résolution de l'infection et élimination du pathogène, les LT CD8<sup>+</sup> effecteurs sont éliminés et seuls les LT CD8<sup>+</sup> mémoires persistent dans l'organisme. Lors d'une réinfection par le même pathogène, les LT CD8<sup>+</sup> mémoires vont réagir efficacement en se différenciant rapidement en cellules effectrices et éliminer le pathogène.

Nous présenterons dans le chapitre suivant le cas de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) qui est caractérisée par une forte déplétion des LT CD4<sup>+</sup>, une hyperactivation du système immunitaire. Nous détaillerons en outre le cas particulier d'un rare groupe de patients qui contrôlent spontanément l'infection en l'absence de traitement, les « HIV controllers » (HIC) et le rôle que peuvent jouer les LT CD8<sup>+</sup> dans le contrôle de l'infection.

# Pathogénèse du virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1) responsable du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) et réponse immunitaire

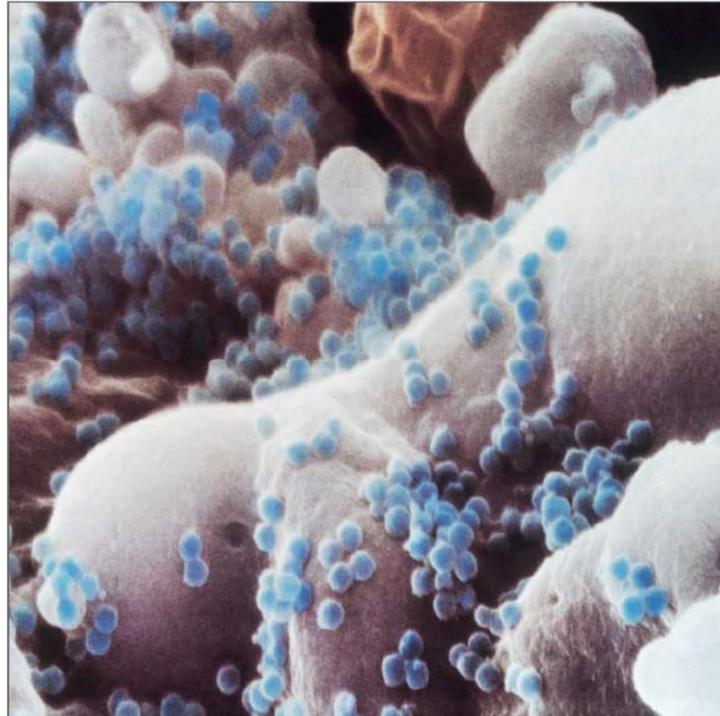


Figure 7 Surface d'un lymphocyte T infecté par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (d'après [182])

En 2008, l'Assemblée Nobel de l'Institut Karolinska a attribué le prix Nobel de Médecine à deux chercheurs français, Françoise BARRE-SINOUSI et Luc MONTAGNIER, pour leur découverte du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) (Figure 7), soulignant ainsi son importance. En effet, ce virus est à l'origine d'une pandémie mondiale et constitue depuis maintenant trente ans un objet de recherche intense dans de nombreux pays.

## 1. Découverte de l'agent pathologique

La découverte des premiers cas de SIDA remonte à Juin 1981 avec la description de cinq cas de pneumocystose due à *Pneumocystis carinii*, une pathologie rare qui ne se produit que chez des patients immunodéprimés. Les cliniciens américains décrivent en plus des candidoses buccales, de multiples infections virales, et un sarcome de Kaposi chez des individus a priori sains cliniquement. Tous ces symptômes ont permis de mettre en évidence un nouveau type

d'immunodéficience acquise caractérisé par une lymphopénie avec une baisse significative du nombre de LT CD4<sup>+</sup> [183-185].

Les premiers signes indiquant que le SIDA pouvait être causé par un rétrovirus datent de 1983 lorsque l'équipe du Pr Montagnier à l'Institut Pasteur met en évidence une activité de transcriptase inverse au sein d'une culture de LT provenant d'une biopsie de ganglions lymphatiques d'un patient atteint du SIDA [186]. Pourtant, de nombreux chercheurs considèrent au début que ce rétrovirus faisait partie de la même famille que les HTLV (human T-lymphotropic virus) puisqu'il possède des caractéristiques très proches des HTLV. Cependant les principales caractéristiques de ce rétrovirus sont une réplication très importante dans les LT CD4<sup>+</sup> avec une lyse de ces cellules cibles, alors que des rapports ont montré que le HTLV ne lyse pas les lymphocytes mais les immortalise plutôt [187]. Ceci a permis d'identifier pour la première fois l'agent étiologique responsable du SIDA.

Mais il fallut attendre 1984, pour que la communauté scientifique soit définitivement convaincue que ce rétrovirus est l'agent étiologique du SIDA [188]. De plus, d'autres équipes de recherche ont également décrit la présence de ce virus à la fois chez des patients au stade SIDA ou atteints de troubles neurologiques mais aussi chez des patients sains cliniquement. Ce virus fut par la suite appelé VIH-1.

En 1986, un second virus a été identifié et était très proche du premier et fut nommé VIH-2 [188]. Les grandes différences entre les deux virus sont :

- \_ la répartition géographique avec le VIH-2 localisé essentiellement en Afrique de l'ouest alors que le VIH-1 est une pandémie mondiale [189],

- \_ la virulence avec une proportion de patients atteints par le VIH-2 qui ne développent pas la maladie plus importante dans le cas du VIH-1 (35% contre 1%) [190].

Ici nous nous intéresserons uniquement à l'étude des réponses contre le VIH-1.

## 2. Epidémiologie

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'environ 35 millions de personnes vivaient avec le VIH en 2012. Les pays en développement sont les plus touchés, et en particulier ceux d'Afrique Subsaharienne qui concentrent près de 70% des personnes infectées par le virus (à titre de comparaison, l'Amérique du Nord n'en regroupe que 4,5%) (Figure 8). De plus, le nombre de personnes infectées ne cesse de croître depuis le début de l'épidémie d'une part car ces personnes vivent aujourd'hui plus longtemps grâce aux progrès

remarquables accomplis au niveau de la prise en charge médicale des patients infectés ; et d'autre part car le nombre de nouvelles infections reste élevé, avec près de 2,3 millions de nouvelles infections par an en 2012. Cependant, l'OMS a annoncé en 2013 que ce nombre représentait la plus faible augmentation depuis la deuxième moitié des années 1990 où on enregistrait 3,5 millions de personnes. De plus, le rapport indique que le nombre de personnes décédant de causes liées au SIDA a diminué pour atteindre 1,6 million en 2012 notamment dû à une plus forte prise en charge des personnes sous traitement antirétroviral. (Rapport ONUSIDA 2013).

En France, on estime qu'environ 160 000 personnes vivaient avec le VIH en 2011 et 1300 personnes sont mortes du SIDA cette même année ; 6000 personnes ont été contaminées en 2011.

De nos jours, l'infection par le VIH représente une épidémie mondiale et constitue une des causes de décès les plus importantes dans le monde (6ème cause de décès à l'échelle du globe et 2ème cause de décès dans les pays à faibles revenus en 2011 [191]), avec environ 30 millions de personnes mortes du SIDA depuis 1981.

Le VIH prospère donc au sein d'un nombre croissant d'êtres humains, et la lutte contre l'infection par ce virus constitue aujourd'hui un enjeu de santé publique considérable à l'échelle mondiale. Cependant, cette évolution préoccupante ne reflète en rien les efforts de la recherche, des organisations et des autorités publiques visant à combattre cet agent pathogène. Ainsi, dès la découverte du virus, de nombreux scientifiques se sont investis dans la recherche d'un vaccin préventif et de traitements pour lutter contre le VIH et prévenir l'infection. Ces travaux n'ont malheureusement pas encore abouti ni à la mise au point d'un vaccin préventif efficace contre le virus, ni à celle de thérapies curatives. Néanmoins, ils ont permis d'innombrables avancées dans la compréhension des caractéristiques biologiques du virus et des interactions entre l'organisme hôte et le pathogène, ce qui a fortement contribué à la mise au point de traitements pour l'instant basés sur une combinaison de médicaments antirétroviraux, c'est à dire destinés à inhiber la réplication virale mais qui ne parviennent pas, malgré leur efficacité, à éliminer totalement le virus de l'organisme. En 2009, la pharmacopée anti-VIH comprenait 25 composés antirétroviraux approuvés par les autorités américaines (représentées par la Food and Drug Administration (FDA)) et les autorités européennes (représentées par la European Medicine Agency (EMA)), divisés en six classes fonctionnelles en fonction de leur mode d'action et de leur cible dans le cycle réplcatif du virus [192,193]. De nos jours, il existe une trentaine de traitements disponibles. Ces traitements se révèlent très efficaces dans de nombreux cas et ont permis, dans les régions où

leur accès en cas d'infection est relativement répandu, une forte réduction de la mortalité et de la morbidité associées au SIDA, un allongement de la durée de vie ainsi qu'une amélioration des conditions de vie des personnes séropositives. Le problème majeur qui se pose à l'heure actuelle est la diffusion à l'échelle mondiale des traitements anti-rétroviraux qui permettrait une meilleure prise en charge des patients et de réduire le nombre de nouvelles infections. Ils sont toutefois contraignants et présentent de nombreuses limitations. En particulier, l'émergence de virus résistant aux antiviraux, les effets secondaires parfois graves liés à leur prise, et la persistance du virus au sein de l'organisme constituent des obstacles majeurs au succès durable et universel de ces thérapies. De plus, de nouveaux problèmes se posent liés à la toxicité à court et à moyen terme des traitements sur l'organisme. C'est pourquoi la recherche de nouvelles molécules antirétrovirales reste active afin de les améliorer, d'en diminuer les effets secondaires et d'offrir aux patients en échec de traitement de nouvelles alternatives thérapeutiques.

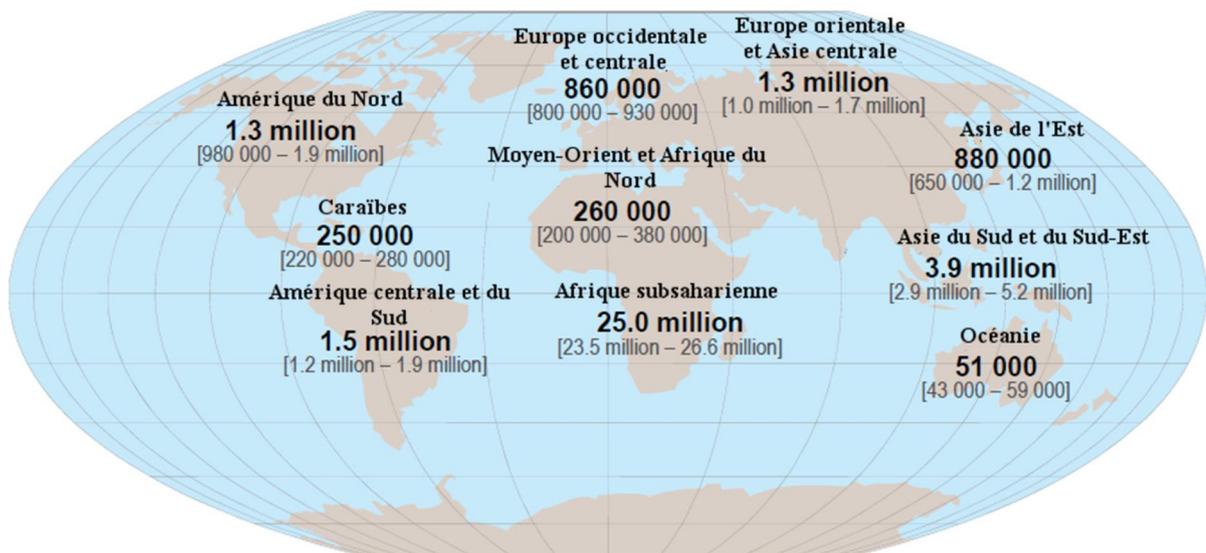


Figure 8 Schéma de la répartition de l'épidémie du VIH dans le monde en 2013 (d'après le rapport ONUSIDA 2013)

### 3. Présentation du VIH-1

Le VIH est un virus de la famille des rétrovirus qui fait partie du groupe des lentivirus. Le VIH-1 a un diamètre d'environ 120nm et un génome composé de deux copies d'ARN (Acide RiboNucléique) simple brin de 9kb codant neuf gènes regroupés en trois classes de protéines : les polyprotéines comme Gag ou Env, les protéines accessoires comme Nef ou Vif et les

protéines de régulation comme Tat ou Rev. Le VIH est caractérisé par un cycle de réplication nécessitant la conversion de son génome, constitué d'ARN simple brin, en ADN (Acide DésoxyriboNucléique) double brin et l'intégration de cet ADN viral formé dans le génome de la cellule infectée [194]. Cet agent pathogène est à l'origine du SIDA qui correspond à un stade avancé de l'infection, caractérisé par une perte considérable des défenses immunitaires, en particulier du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, acteurs majeurs de la réponse immunitaire.

L'organisme infecté présente alors une sensibilité accrue à de nombreuses infections opportunistes et aux cancers. Le stade SIDA de l'infection est défini par un nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> inférieur à 200 cellules par mm<sup>3</sup> de sang (un individu sain possède entre 800 et 1200 lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par mm<sup>3</sup> de sang), ou par la présence d'une infection opportuniste grave, par exemple la toxoplasmose ou une infection par le cytomégalo virus [195].

### 3.1. Evolution de l'infection par le VIH-1

Dans l'histoire naturelle de l'infection par le VIH, l'évolution de la maladie en l'absence de traitement peut se décomposer en trois phases : la contamination suivie de la primo-infection, la phase asymptomatique et le stade SIDA (Figure 9).

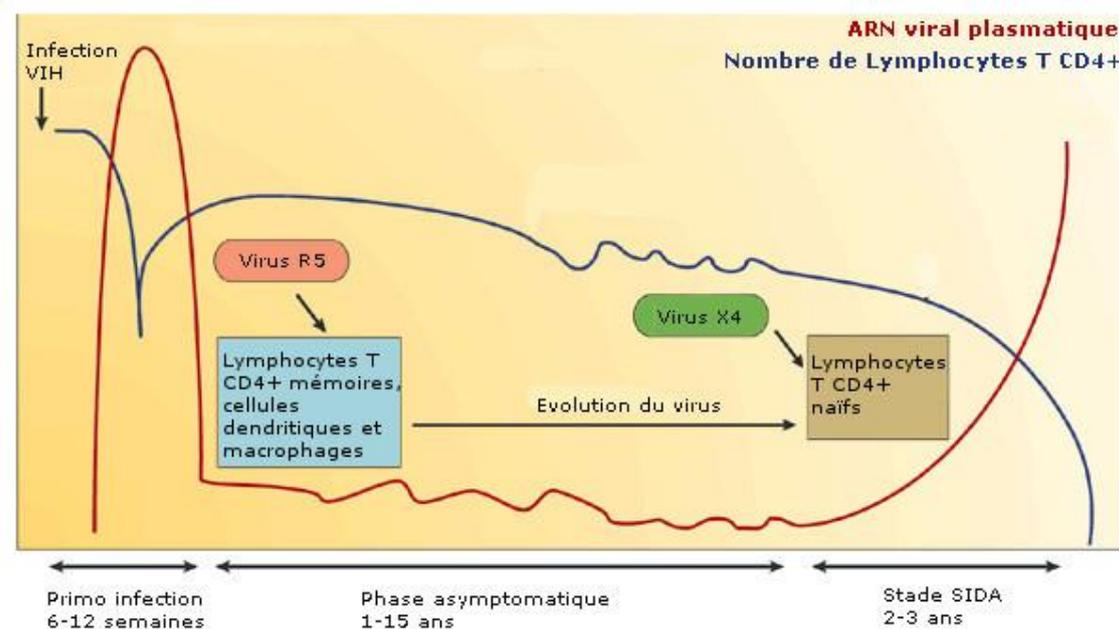


Figure 9 Représentation schématique de l'évolution de l'infection par le VIH-1

Il existe différentes voies de contamination mais la plus commune à l'heure actuelle est la transmission par voie sexuelle. L'efficacité de la contamination par cette voie varie de 0.3 à 30% en fonction de l'état des muqueuses, de la présence d'autres infections sexuellement transmissibles comme la syphilis et de la charge virale.

Plusieurs mécanismes ont été proposés dans cette revue [196] afin d'expliquer l'entrée du virus au niveau des muqueuses (Figure 10) :

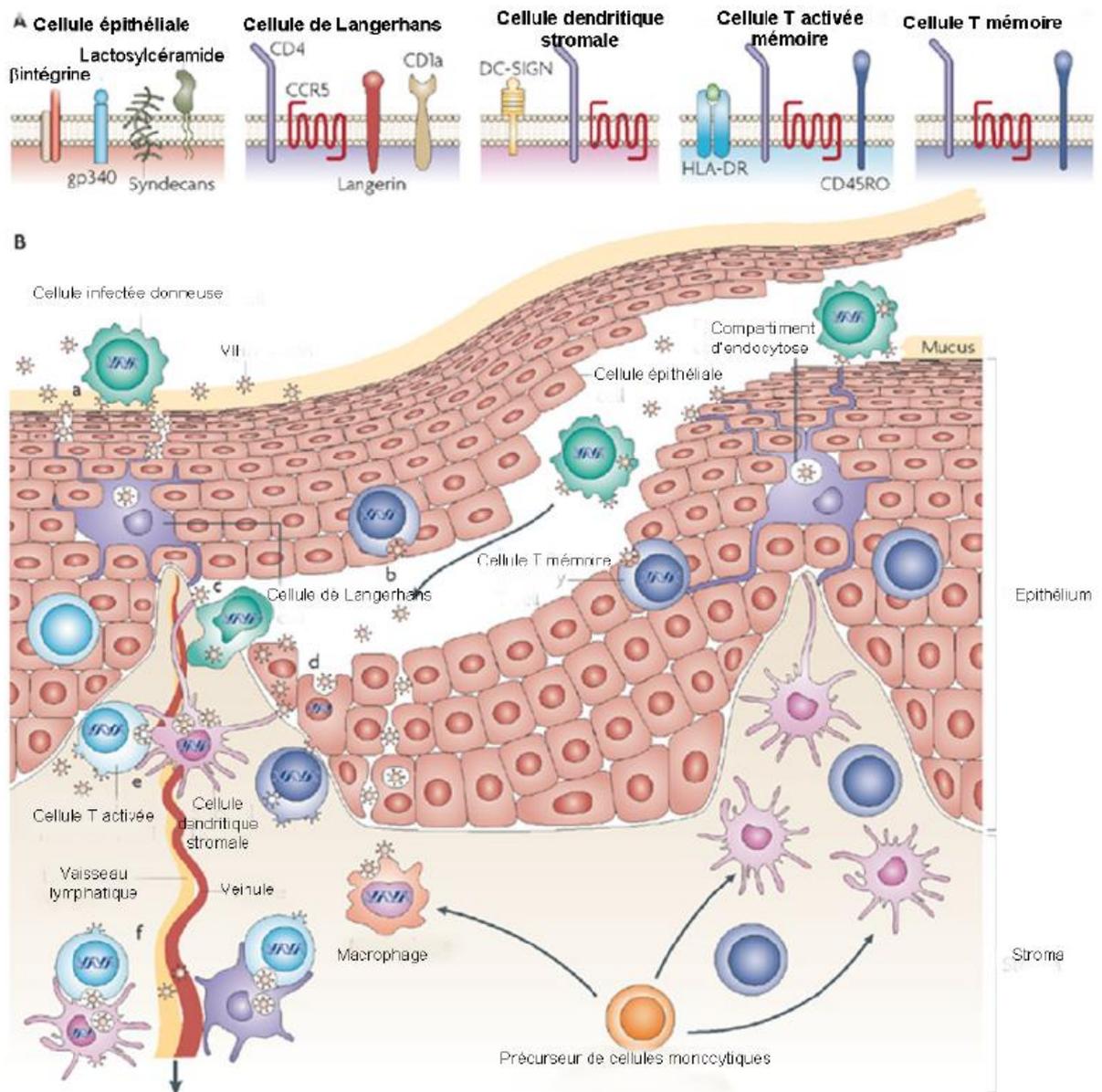
- \_ la présence de microlésions des muqueuses (présentes dans plus de 60% des cas) favorise l'entrée du virus,

- \_ la pénétration du virus dans l'organisme par transcytose de certaines cellules épithéliales des muqueuses,

- \_ l'entrée du virus directement capté par les prolongements à l'extérieur des cellules dendritiques,

- \_ le virus passerait entre les cellules épithéliales et infecterait les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de la muqueuse.

Dès que le VIH pénètre dans l'organisme hôte, le virus commence à infecter de nombreuses cellules et va se disséminer dans tout l'organisme.



**Figure 10 Schéma de la pénétration du VIH dans les muqueuses et de sa dissémination dans l'organisme (d'après [196])**

### 3.2. La primo-infection

Lors de la primo-infection, le virus est à tropisme CCR5 et infecte les cellules cibles qui vont exprimer le récepteur CD4 et le corécepteur CCR5 et qui notamment dans les muqueuses sont essentiellement les lymphocytes T  $CD4^+$ , monocytes, macrophages et les cellules dendritiques. Après infection de ces cellules, il commence à se répliquer. Une des hypothèses permettant d'expliquer la rapide dissémination du VIH dans l'organisme est la très grande diffusion du virus par les cellules dendritiques. Les DC captent des antigènes viraux et vont migrer vers l'organe lymphoïde le plus proche pour le présenter aux différentes cellules

de l'immunité [197]. Des études *in vitro* ont permis de montrer que le VIH profite de cette migration pour s'accrocher aux cellules dendritiques via la fixation de la protéine gp120 du VIH sur des lectines de type C comme le DC-SIGN [198,200]. Le virus va par la suite être internalisé dans des vacuoles en attendant la maturation et la migration des cellules dendritiques vers l'organe lymphoïde secondaire. Le VIH va ensuite pouvoir infecter de nouvelles cellules cibles dans les tissus lymphoïdes [196,198,199,201,202]. De plus, on peut constater que les LT CD4<sup>+</sup> mémoires ainsi que les cellules activées sont les principales cibles du virus. En effet, une perte rapide et dramatique de ces cellules dès les premiers jours de l'infection par le VIH est visible (courbe bleue sur la Figure 9). L'infection de LT CD4<sup>+</sup> mémoires et naïfs est l'une des causes de la persistance du virus dans l'organisme pendant des années. En effet, dans ces cellules, il se retrouve à un état latent sans production d'antigène viral et représente un réservoir latent de virus [203]. On note en outre que cette perte rapide de ces cellules a essentiellement lieu au niveau du tractus gastrointestinal ou GALT (gut associated lymphoid tissue) qui est un lieu riche en LT CD4<sup>+</sup> activés ou mémoires exprimant CCR5 [204]. Cette diminution de cellules immunitaires va fragiliser la barrière intestinale et est responsable d'une entrée massive de bactéries dans l'organisme qui favorise l'activation du système immunitaire [205,207].

Le virus va ainsi se multiplier de façon exponentielle et va se disséminer dans l'organisme entier. La charge virale augmente de façon importante quelques jours après la contamination. Le pic de réplication virale apparaît 2 à 4 semaines après la transmission du virus (courbe rouge sur la Figure 9) et le taux de virus dans le sang peut excéder 10<sup>7</sup> copies d'ARN viral/ml de plasma.

Les réponses immunitaires humorale et cellulaire spécifiques anti-VIH sont activées et permettent de réduire la charge virale. Les anticorps et les LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques anti-VIH sont générés au bout de quelques semaines et corréleront avec l'élimination d'une grande partie des cellules infectées et à la diminution de la charge virale. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> jouent un rôle prépondérant puisqu'ils permettent à la fois la lyse des cellules infectées, la production de cytokines envers l'immunité innée et la production des CAF (facteurs antiviraux des cellules T CD8<sup>+</sup>) qui ont des effets anti-VIH. Toutes ces réponses permettent de diminuer la charge virale. Cependant, le système immunitaire ne parvient pas à éliminer complètement l'infection due à de nombreux mécanismes d'échappement mis en place par le virus et un niveau stable de charge virale s'établit que l'on nomme « viral set point ».

### **3.3. La phase asymptomatique**

Durant cette période, un équilibre apparent s'établit entre le virus et le système immunitaire et s'étend généralement de huit à dix ans. L'élimination virale par le système immunitaire est compensée par la forte réplication virale. Deux types de virus sont retrouvés principalement chez l'hôte : des virus infectant les cellules exprimant le récepteur CD4<sup>+</sup> et le corécepteur CCR5 et des virus capable d'infecter des cellules exprimant le récepteur CD4<sup>+</sup> et le corécepteur CXCR4 [208].

Les réponses dirigées contre les différentes protéines du virus sont observées mais ne suffisent pas à la fois quantitativement mais aussi qualitativement. Le taux de LT CD4<sup>+</sup> va alors lentement diminuer jusqu'à être inférieur à 200 cellules par millilitre, seuil généralement associé au développement des premiers symptômes liés à une immunodépression.

### **3.4. Le stade SIDA**

Le stade SIDA est caractérisé par une diminution du nombre de cellules T CD4<sup>+</sup> (inférieure à 200 cellules/ $\mu$ l) qui est associée à une augmentation importante de la charge virale. Il y a alors une forte immunodéficience et des maladies opportunistes et des cancers apparaissent. Certaines des pathologies peuvent être traitées par l'utilisation des antibiotiques et des antifongiques mais la forte fréquence de ces maladies finit par être fatale et la survie moyenne au stade SIDA est de 2 à 3 ans.

## **4. Déficience des réponses T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>**

L'infection par le VIH-1 est caractérisée par une altération quantitative et qualitative des réponses immunitaires cellulaires T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> spécifiques du virus. Ce dysfonctionnement des cellules T spécifiques du VIH-1 peut expliquer la persistance du virus dans l'organisme mais il est également possible que cette persistance virale entraîne une activation continue et une altération des réponses immunitaires. Différentes causes ont été mises en avant afin d'expliquer cette altération des réponses T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> et notamment la présence du virus et l'hyperactivation du système immunitaire.

## 4.1. Causes de ces altérations

### 4.1.1. Virus

Le rôle des LT CD4<sup>+</sup> dans la réponse immunitaire adaptative est primordial. Ces cellules contrôlent à la fois la réponse immunitaire innée comme la maturation des cellules dendritiques mais également la réponse immunitaire adaptative comme la différenciation et la maturation des LB. Des études ont également permis de montrer leur importance dans l'étape de différenciation en cellules mémoires des LT CD8<sup>+</sup> [16]. L'élimination des LT CD4<sup>+</sup> par le virus entraîne donc une dérégulation de ces réponses et permet d'expliquer en partie l'altération des réponses anti-VIH. Cependant, au cours de l'infection, tous les LT CD4<sup>+</sup> de l'hôte ne sont pas infectés par le VIH et d'autres mécanismes entrent en jeu pour expliquer la déplétion générale des LT CD4<sup>+</sup>. Herbeuval et al. ont émis l'hypothèse que d'une part la fixation de la glycoprotéine du VIH à la surface des LT CD4<sup>+</sup> peut induire une mort cellulaire de ces cellules par ADCC (Antibody-dependent cellular cytotoxicity) et d'autre part que l'association de la glycoprotéine et de l'IFN- $\gamma$  induit l'augmentation de l'expression de TRAIL et DR5 et entraîne la mort des LT CD4<sup>+</sup> par apoptose. Tous ces mécanismes de déplétion des LT CD4<sup>+</sup> peuvent rendre compte du dysfonctionnement observé des LT CD8<sup>+</sup>.

### 4.1.2. Hyperactivation du système immunitaire

Lors de l'infection par le VIH, une des caractéristiques principales est la forte et persistante activation des cellules. Cette forte activation joue un rôle prépondérant dans la progression de la maladie vers le stade SIDA. De tous les paramètres étudiés, le degré d'hyperactivation à J0 constitue même un meilleur indice de progression de la maladie que le niveau de la charge virale [209].

Chez l'homme, le niveau d'activation des LT CD8<sup>+</sup> est fortement corrélé avec la survie des patients et à une progression de la maladie, bien plus que la charge virale [210-214]. Ceci est corroboré par des études menées chez les primates non humains. En effet, chez les hôtes naturels du SIV comme le mangabey et le singe vert d'Afrique, l'infection par le SIV ne se traduit pas par une progression vers le stade SIDA contrairement au cas du macaque. En comparant les différents paramètres de l'infection dans les deux types d'espèces, seule l'activation du système immunitaire diffère. Effectivement, malgré la persistance d'une

charge virale élevée et la destruction massive des cellules T CD4<sup>+</sup> au niveau de la muqueuse intestinale, l'infection par le SIV chez les hôtes naturels est caractérisée par une activation immunitaire faible. Par contre, chez les macaques Rhésus infectés par le SIV, l'infection est marquée par à la fois une absence de contrôle de la charge virale et aussi une hyperactivation des cellules du système immunitaire et à la progression de la maladie [215,220].

Ces caractéristiques de forte charge virale plasmatique sans progression de la maladie est également retrouvé chez un petit groupe d'individus qui a été appelé VNP (virologic non progressors) [221,222].

De plus, bien que l'infection par le VIH-2 ne soit pas un modèle idéal car caractérisée par une faible charge virale et une progression lente vers la maladie, on peut tout de même noter que cette progression lente est associée à une activation immunitaire plus faible que dans le cas de l'infection par le VIH-1. Les études comparatives avec l'infection par le VIH-1 permettent de montrer que l'activation du système immunitaire joue un rôle prépondérant dans la déplétion des LT CD4<sup>+</sup> [214].

Chez les patients infectés par le VIH dont la charge virale est contrôlée soit spontanément comme chez les HIV-contrôleurs (HIC, HIV controllers) soit par les traitements antirétroviraux, le niveau d'activation du système immunitaire ainsi que la morbi-mortalité sont toutefois supérieurs aux niveaux observés chez les sujets non infectés par le VIH [70,223,224].

## **4.2. Hyperactivation**

### *4.2.1. Causes de cette hyperactivation*

La forte et persistante activation du système immunitaire peut être attribuée à plusieurs facteurs. Différents mécanismes ont été mis en évidence (Figure 11):

1. L'action du virus et des protéines virales comme la gp120
2. Les infections opportunistes et la réactivation de virus persistants comme le CMV ou EBV (Epstein-Barr Virus)
3. La perte fonctionnelle du système immunitaire au niveau du tractus gastro-intestinal
4. La lymphopénie T CD4<sup>+</sup>

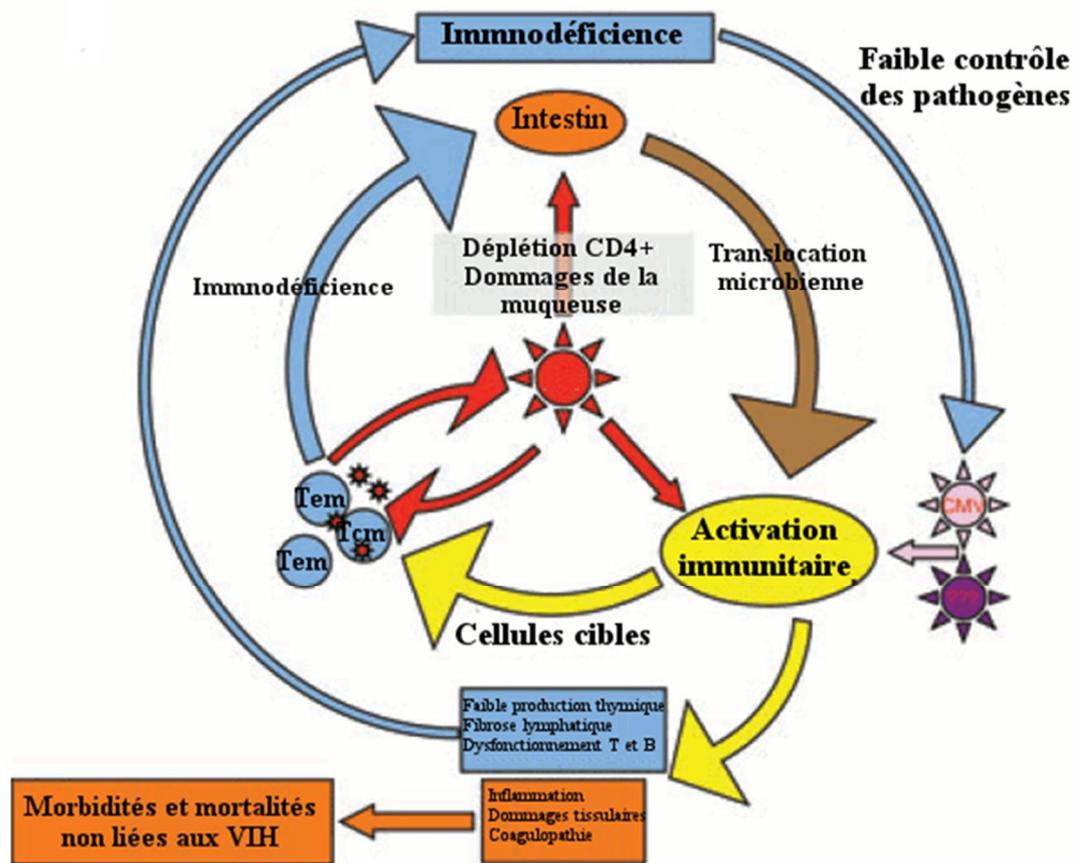


Figure 11 Schéma représentant les conséquences de l'hyperactivation sur l'organisme et dans la progression de la maladie (d'après [225]).

#### 4.2.1.1. L'action du virus et des protéines virales

La persistance virale et l'émergence constante de nouveaux variants du VIH-1 produisent un état de stimulation antigénique permanent. En phase chronique de l'infection par le VIH-1, cette stimulation entraîne une forte expansion des réponses T CD8<sup>+</sup> avec jusqu'à 20% des cellules T CD8<sup>+</sup> du sang qui sont spécifiques du virus [226,227] et également des fortes réponses B. Dans le cas des cellules T CD4<sup>+</sup>, c'est un peu moins de 3% des cellules du sang qui sont spécifiques du VIH-1 [227], et ceci s'explique par le fait que les cellules spécifiques du VIH-1 sont préférentiellement infectées et donc lysées par le virus [228]. Les protéines virales peuvent également agir sur le système immunitaire inné à travers la reconnaissance des motifs spécifiques du VIH par les PRR notamment les TLR ou la fixation de la glycoprotéine sur les CD4. Cette reconnaissance induit la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et conduit à un état d'inflammation chronique amenant tout le système immunitaire à un état d'activation chronique [229-231].

Les fortes réponses du système immunitaire inné et adaptatif contre le virus et les antigènes du VIH contribuent à maintenir cet état d'hyperactivation. Cependant, comme vu précédemment, un haut niveau de réplication virale n'est pas suffisant pour expliquer cette activation chronique et d'autres facteurs jouent un rôle important.

#### 4.2.1.2. Les infections opportunistes et la réactivation de virus persistants

L'hyperactivation immunitaire peut-être due à des effets indirects de l'infection par le VIH-1. En effet, certains virus latents comme les virus CMV et EBV sont réactivés à cause du statut immunodéprimé des patients et de la réaction inflammatoire environnante. Les infections opportunistes sont également plus fréquentes chez ces patients et stimulent de nouvelles et nombreuses cellules. Plusieurs études ont montré que des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de CMV et EBV avaient un profil de cellules activées dans l'infection par le VIH-1 [232-236] et l'utilisation de traitement contre le CMV chez les patients infectés par le VIH, le Valganciclovir a permis de réduire significativement l'activation des LT CD8<sup>+</sup> mesurée par la fréquence des cellules CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> chez les patients sous HAART qui avaient une reconstitution LT CD4<sup>+</sup> incomplète [237].

#### 4.2.1.3. La translocation microbienne au niveau du tractus gastro-intestinal

Un autre mécanisme a également été impliqué dans l'activation chronique du système immunitaire [205-207,238]. Les auteurs suggèrent que la déplétion massive des LT CD4<sup>+</sup> et plus particulièrement les cellules CCR5<sup>+</sup> dans le tractus gastro-intestinal a pour conséquence la perte des cellules épithéliales intestinales, une disruption des jonctions serrées et la perte d'intégrité de la barrière muqueuse. Ceci favorise la translocation bactérienne et fongique et le relargage de matériels étrangers dans la circulation sanguine [239]. Cette forte translocation se traduit par des niveaux plasmatiques de LPS (Lipopolysaccharide) fortement augmentés chez les patients en phase chronique de l'infection par le VIH-1 et chez les macaques infectés par le SIV. Le matériel microbien dans la circulation sanguine favorise l'hyperactivation du système immunitaire notamment à travers la stimulation par les TLR. Cette stimulation de TLR va favoriser la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  ou IL-6 (Interleukine 6) [240-242]. Et finalement les monocytes des patients infectés par le VIH-1 ne

répondent plus à une stimulation *ex-vivo* par le LPS, suggérant que ces monocytes ont été stimulés *in vivo* de façon chronique par le LPS [238]. L'infection par le VIH est associée à de forts taux de LPS plasmatique mais la translocation microbienne n'est pas suffisante pour expliquer cette activation car certains patients présentent une forte activation malgré de faibles taux de LPS [243].

De plus, la perte d'intégrité de la barrière mucosale est en partie due à la déplétion des cellules T CD4<sup>+</sup> Th17. Alors que chez les singes verts d'Afrique et Mangabeys [244,245] ainsi que chez les HIC, les LT CD4<sup>+</sup> Th17 sont préservées [246-248] ; chez les patients progressifs, une forte déplétion de ces cellules est observée surtout au niveau du tractus gastro-intestinal. Les cellules Th17, qui sécrètent de l'IL-17 et de l'IL-22, induisent le recrutement des neutrophiles sur les sites inflammatoires, la production de protéines des jonctions serrées et assurent la régénération épithéliale [244,249-251]. La perte de ces cellules contribue à la perte d'intégrité physique et immune au niveau de la muqueuse. En l'absence d'une réponse Th17 fonctionnelle et forte, il y a translocation de bactéries du GALT vers la périphérie [251].

Tous ces mécanismes agissent en synergie et contribuent à la forte et persistante activation du système immunitaire. Le virus modifie l'ensemble des réponses du système immunitaire et entraîne une hyperactivation qui va s'autoentretenir.

#### 4.2.1.4. Lymphopénie T CD4<sup>+</sup> cause d'activation

Dans un contexte de lymphopénie, une forte réponse homéostatique se met en place. En effet, il a été montré précédemment chez la souris déficiente en LT qu'une injection de LT naïfs induit une forte prolifération de ces cellules alors que chez une souris wild-type, ces cellules ne se divisent pas [252]. Cependant, cette prolifération s'accompagne d'une différenciation de ces cellules en « memory-like » et ne restaure pas le pool de LT naïfs. Ce mécanisme a donc été appelé prolifération induite par la lymphopénie [253].

Dans le contexte de l'infection par le VIH-1, la forte déplétion T CD4<sup>+</sup> s'accompagne d'une forte activation des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> [70]. Deux études de Catalfano et al. ont montré que la déplétion T CD4<sup>+</sup> et la charge virale entraînent la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> et donc son activation [254,255]. Ils montrent tout d'abord chez des témoins séronégatifs que les LT CD4<sup>+</sup> des individus avec un nombre faible de LT CD4<sup>+</sup> prolifèrent plus que les LT CD4<sup>+</sup> des

individus avec un nombre plus important de cellules. Ce résultat est retrouvé chez les patients infectés par le VIH : entre deux groupes de patients qui ont des charges virales similaires mais différent dans le niveau de LT CD4<sup>+</sup>, la prolifération est plus forte chez les patients avec un plus faible nombre de LT CD4<sup>+</sup> [254]. En se focalisant sur les cellules selon leur phénotype de différenciation, ils montrent de plus que le nombre de LT CD4<sup>+</sup> naïfs est le paramètre qui corrèle avec la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> naïfs et non la charge virale alors que sur les autres sous populations, mémoires et effectrices, le nombre de LT CD4<sup>+</sup> et la charge virale corrèlent avec la prolifération des cellules [255].

Tous ces éléments mettent en avant les différents mécanismes qui vont se mettre en place suite à l'infection par le VIH-1 et contribuer à maintenir une hyperactivation du système immunitaire.

#### *4.2.2. Conséquences de cette hyperactivation*

Cet état d'hyperactivation persistante a des conséquences importantes sur le fonctionnement de la réponse immune contre le VIH mais également contre les autres infections. Elle bouleverse l'homéostasie du système immunitaire et entraîne des altérations à la fois quantitatives mais aussi qualitatives des réponses. La stimulation chronique du système immunitaire lors de l'infection par le VIH-1 crée un état d'hyperactivation des cellules qui se manifeste par (Figure 11) :

- une production de cellules cibles supplémentaires. La réponse homéostatique face à la déplétion des LT CD4<sup>+</sup> a pour conséquence une forte activation et prolifération des LT CD4<sup>+</sup> et entraîne la production de nouvelles cellules cibles pour le VIH. Cela crée donc un cercle vicieux où l'infection favorise l'activation du système immunitaire et cette activation favorise l'infection [228],

- la présence d'un grand nombre de cellules T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> exprimant des marqueurs d'activation typiques comme CD38, HLA-DR et l'antigène nucléaire Ki67 [35,209,214,256,257]. Cette forte activation induit une susceptibilité accrue des cellules à l'AICD [258]. Plusieurs études démontrent que la voie Fas/FasL est augmentée pendant la phase chronique de l'infection et que le taux de Fas soluble plasmatique est un marqueur de progression de la maladie [259,261]. L'infection par le VIH entraîne une expansion des LT CD8<sup>+</sup> mais la fonctionnalité de ces cellules est fortement réduite chez les patients avec une

forte activation. Concernant les LT CD4<sup>+</sup>, la déplétion de ces cellules a pour conséquence une fonctionnalité réduite et une répartition différente des sous populations LT CD4<sup>+</sup>. De plus, le rapport entre le nombre de LT CD8<sup>+</sup> et le nombre de LT CD4<sup>+</sup> s'inverse chez les patients infectés par le VIH,

- des niveaux plasmatiques accrus de cytokines et chimiokines proinflammatoires. C'est par exemple le cas du TNF- $\alpha$ , de l'IL-6 et de l'IL-1 (Interleukine 1 bêta) dont les concentrations sont élevées dans le plasma et dans les ganglions lymphatiques d'individus séropositifs [242,262,263]. La sécrétion de chimiokines telles que MIP-1 $\alpha$  (Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha), MIP-1 $\beta$  (Macrophage Inflammatory Protein-1 bêta) et RANTES (Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted) est également augmentée chez les patients infectés par le VIH-1 [264]. Toutes ces cytokines et chimiokines proinflammatoires maintiennent le fort niveau d'hyperactivation,

- l'hyperactivation entraîne l'inhibition directe des fonctions des cellules du système immunitaire comme les LB, des cellules NK, les monocytes. La plus faible fonctionnalité de ces cellules entraîne un plus faible contrôle viral, une plus forte réplication virale et donc une plus forte activation [265,266].

- la destruction et la dérégulation de l'architecture des tissus qui sont cruciaux pour l'homéostasie et les fonctions T comme la moelle osseuse, le thymus ou les ganglions lymphatiques [267,268]. En outre, la production thymique de lymphocytes T est diminuée chez les individus infectés par le VIH [269].

- la forte prolifération et un fort renouvellement des cellules vont entraîner un épuisement des cellules et un vieillissement prématuré du système immunitaire [233].

## **5. Cas particulier de patients exposés non infectés et LTNP**

La plupart des patients infectés par le VIH va progresser dans la maladie et atteindre le stade SIDA (Figure 9). Il existe cependant un petit nombre de patients qui semblent protégés soit de l'infection malgré une forte exposition au VIH soit en contrôlant l'infection. On peut ainsi définir deux groupes de patients : (1) les patients exposés non infectés et (2) les « long term non progressors ».

## 5.1. Présentation des patients exposés non infectés

Des études basées sur une cohorte de travailleurs du sexe (CSW) à Nairobi au Kenya de 1981 à 1985, ont permis d'identifier un groupe de personnes qui n'ont jamais été infecté par le VIH malgré des années d'exposition [270] et ces personnes ont été appelées des individus fortement exposés mais non infectés par le VIH (HESN, HIV Exposed but SeroNegative) [271]. Plusieurs hypothèses ont été mises en avant pour expliquer cette différence de susceptibilité à l'infection par le VIH parmi lesquelles on retrouve des facteurs viraux, génétiques, immunologiques mais également des facteurs sociologiques [272]. Cependant, le mécanisme de protection de ces individus n'a pas encore été élucidé dû à la fois à une définition imprécise des personnes résistantes à l'infection par le VIH mais également au faible nombre de patients dans les études [273,274].

## 5.2. Le cas particulier des « long term non progressors » et des « HIV controllers »

### 5.2.1. Présentation des LTNP et HIC

Il existe une très faible proportion de patients infectés par le VIH qui ne développent pas de symptômes pendant plus de 10 ans d'infection. Ces patients que l'on a d'abord appelé les « long term non-progressors » (LTNP) ont été identifiés avant la création des tests permettant de quantifier la charge virale plasmatique et la virémie ne faisait donc pas partie des premiers critères de définition de cette population [275,276]. Avec l'introduction des premiers tests et un suivi plus long de ces patients, il est apparu que la plupart de ces patients LTNP progresse plus lentement vers la maladie et voit leur nombre de LT CD4<sup>+</sup> chuter au cours du temps [277]. Cependant, ce n'est pas le cas de tous les LTNP et certains patients parviennent à contrôler spontanément la réplication virale et à maintenir une charge virale faible. Plusieurs groupes de patients ont ainsi été identifiés en fonction de différents critères immunologiques et/ou virologiques.

En se basant sur les critères immunologiques notamment le nombre de LT CD4<sup>+</sup>, il est possible d'identifier un groupe de patients qui parvient à maintenir spontanément un fort niveau de LT CD4<sup>+</sup> malgré l'infection par le VIH. Une cohorte en France a été créée sous la direction du professeur Autran et a été appelée cohorte des patients ALT (asymptomatique à

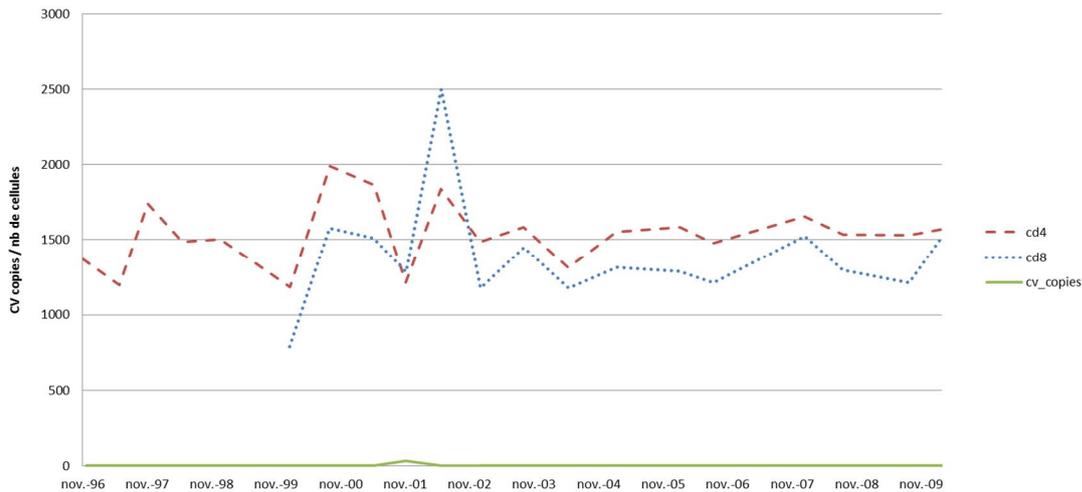
long terme). Cette cohorte est constituée de patients dont le niveau de LT CD4<sup>+</sup> est supérieur à 500 cellules/ml de sang et dont le taux de LT CD4<sup>+</sup> ne diminue pas au cours du temps. Dans une cohorte américaine, ces patients représentent environ 2.04% des patients infectés [278]. Cependant, le niveau de charge virale n'entre pas dans les critères d'inclusion et un suivi sur le long terme montre que chez certains patients une charge virale est détectable [279] ainsi qu'un déclin des LT CD4<sup>+</sup>.

Lorsque les premiers tests de mesure de la charge virale ont été disponibles, il a été possible d'identifier des patients qui parvenaient à maintenir une charge virale faible voir indétectable en l'absence de traitement et ont été appelés HIV-contrôleurs (HIC, HIV controllers). Cependant, les critères d'inclusion sont variables en fonction des cohortes de HIC. Deux groupes de patients HIC ont ainsi été identifiés :

- \_ Les « Elites Controllers » qui parviennent à maintenir une charge virale très basse (<50 copies d'ARN viral/ml de plasma) en absence de traitement antiviral et pendant une très longue période [278,280-283]. Ces patients représentent environ 0.55% des patients infectés par le VIH,

- \_ Les supprimeurs virémiques qui constituent un groupe de patients dont la charge virale est faible (<2000 copies/ml) en absence de traitement et représentent environ 3.34% des patients infectés par le VIH [278].

En France, la découverte de ces patients s'est poursuivie par la création d'un observatoire puis d'une cohorte qui ont permis le suivi des patients HIC [282]. Ces individus sont tous infectés par le VIH mais présentent des taux élevés de LT CD4<sup>+</sup> et une très faible baisse de leur niveau au cours du temps [284,285] et progresse rarement vers le stade SIDA [286,287] (Figure 12). C'est principalement pour ces raisons que de nombreuses recherches se sont focalisées sur l'étude de ces patients et sur la compréhension des mécanismes mis en jeu expliquant leur capacité à inhiber la réplication virale.

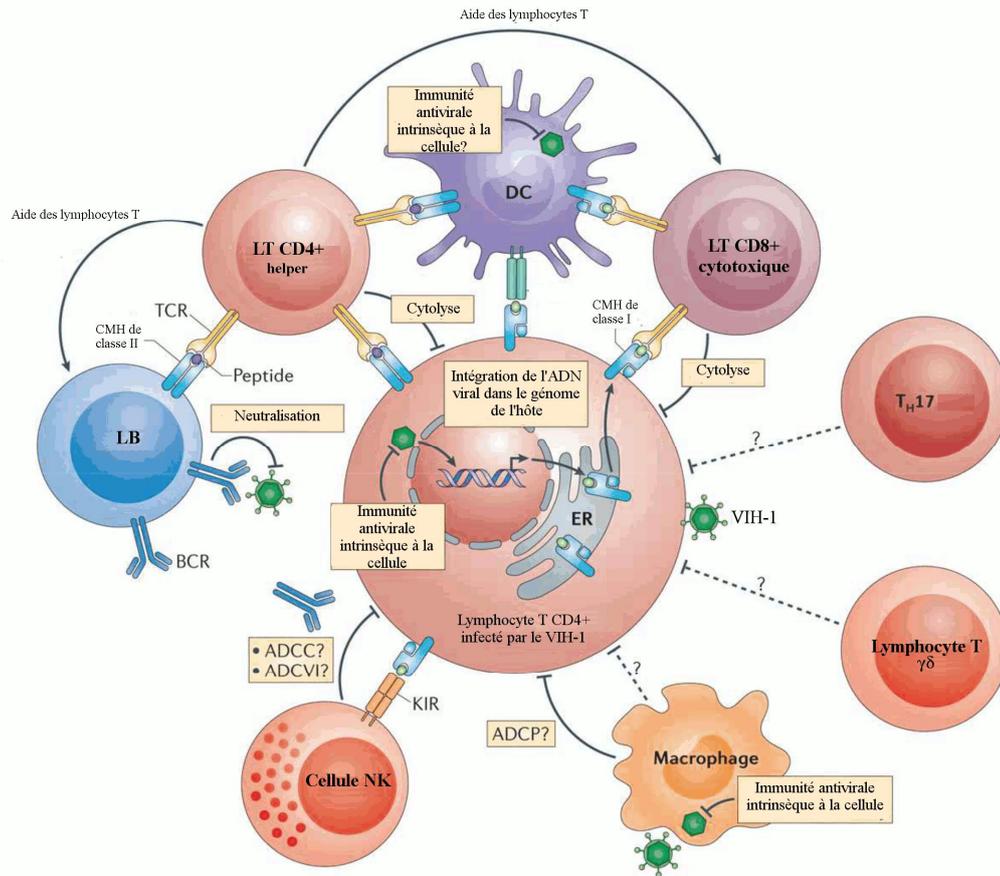


**Figure 12 Représentation schématique de l'évolution du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et de la charge virale au cours du temps.**

### 5.2.2. Hypothèses du contrôle de l'infection par le VIH chez les HIC

La principale caractéristique qui distingue les HIC des patients progressseurs est le contrôle de la réplication virale *in vivo*. La recherche et la découverte des mécanismes précis mis en jeu pourraient apporter des informations importantes dans le but de développer des thérapies à la fois curatives et préventives contre le VIH. Plusieurs facteurs ont été découverts jouant un rôle dans le contrôle de la réplication virale chez ces patients (Figure 13) :

- \_ le virus lui-même,
- \_ l'importance des facteurs génétiques et des facteurs de restriction,
- \_ le rôle de l'immunité innée,
- \_ et le rôle de l'immunité adaptative.



**Figure 13** Schéma représentant les différentes causes possibles du contrôle de l'infection par le VIH-1 chez les VIH contrôleurs (d'après [288]).

### 5.2.2.1. Les variabilités génétiques du virus

Les premières études ont émis l'hypothèse d'un contrôle de l'infection chez les HIC par une infection avec des souches de virus non fonctionnels. En effet, des souches virales avec d'importantes délétions génétiques particulièrement dans le gène *nef* ont été retrouvées chez certains patients contrôlant l'infection [289-291]. Cependant, de récentes études ont permis de montrer que la plupart de ces patients HIC ont été infectés par des souches virales compétentes à la fois au niveau de l'infectiosité et au niveau de la réplication virale [292-296]. De plus, les virus atténués retrouvés chez certains HIC sont probablement la conséquence d'une pression de sélection exercée par les LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques plutôt qu'une cause de la faible charge virale chez ces patients [297].

### 5.2.2.2. Les facteurs génétiques et de restriction de l'hôte

De nombreuses études ont analysé les facteurs génétiques et des facteurs de restriction de l'hôte qui permettent d'expliquer le statut de HIC. Les polymorphismes sur le gène du récepteur CCR5 en particulier la mutation delta 32 rendent les patients résistants à l'infection par le VIH et sont également associés à une progression plus lente [298,6300]. Cependant, seule une faible proportion de HIC présente ces polymorphismes [301] ; ils ne permettent donc pas d'expliquer le contrôle de la réplication virale chez tous les HIC. En outre, des études dans des cohortes de HIC aux Etats-Unis et en France ont montré que les LT CD4<sup>+</sup> sont moins susceptibles à l'infection par le VIH [302,303]. La protéine p21 est une protéine inhibitrice de kinase dépendante de cycline et l'élongation transcriptionnelle du VIH nécessite l'activité des kinases. Deux études contradictoires ont analysé l'implication de cette protéine sur l'inhibition de la réplication virale [302,303]. L'une montre que l'inhibition de la réplication virale est associée à une uprégulation de la protéine p21 et l'autre a montré que cette protéine n'est pas la cause de cette inhibition et que d'autres facteurs de restriction doivent être impliqués comme APOBEC.

### 5.2.2.3. La réponse immunitaire innée

Les cellules de l'immunité innée ont été peu étudiées auparavant dans le contrôle de la réplication virale chez les HIC. Deux types de cellules ont récemment été mis en évidence dans ce rôle : les cellules dendritiques et les cellules tueuses naturelles (NK). Les cellules dendritiques myéloïdes des HIC présentent des propriétés présentatrices antigéniques supérieures à celles d'autres patients [304]. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont capables d'exercer une activité antivirale induite par la production d'IFN- et la quantité de ces cellules est supérieure chez les HIC par rapport aux patients progressseurs [305]. De plus, les DC plasmacytoïdes ont une fréquence et des propriétés fonctionnelles similaires aux cellules des donneurs sains et ceci confirme que chez les HIC, les DC plasmacytoïdes conservent leurs propriétés malgré l'infection par le VIH.

Concernant les cellules NK, elles jouent un rôle primordial dans la lutte antivirale à travers une activité cytotoxique. Ces cellules peuvent différencier les cellules saines des cellules étrangères ou anormales grâce à la reconnaissance de l'expression constitutive des CMH de classe I sur les cellules saines [306,307]. L'expression du CMH de classe I envoie un signal

inhibiteur sur les cellules NK en se fixant sur son récepteur à ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif) ou ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) et l'absence d'expression de CMH de classe I à la surface des cellules va induire la lyse de ces cellules par les cellules NK. Cependant, la régulation des cellules NK se fait à travers un ensemble de signaux activateurs et inhibiteurs [306] et ces cellules sont capables de lyser une cellule exprimant le CMH de classe I si les signaux activateurs sont plus nombreux et prédominent sur les signaux inhibiteurs [306]. Chez l'homme, il existe deux grandes familles de récepteurs qui reconnaissent les CMH de classe I : les récepteurs d'immunoglobuline killer (KIR) et les récepteurs hétérodimères CD94/NKG2A. Les récepteurs d'immunoglobuline killer (KIR) jouent un rôle primordial dans la régulation de l'activation des cellules NK et chaque cellule exprime entre deux et six KIR. Il a été démontré que la fréquence de certains allèles du gène KIR et du gène du CMH de classe I était augmentée chez les patients qui progressaient plus lentement vers le stade SIDA (Voir partie 5.2.3.1).

#### 5.2.2.4. La réponse immunitaire adaptative

Les réponses immunitaires adaptatives ont été depuis longtemps étudiées afin de déterminer le corrélat permettant de définir les réponses nécessaires au contrôle de l'infection par le VIH. De fortes réponses efficaces T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> sont généralement retrouvées chez les HIC. Bien que les réponses quantitatives des LT CD8<sup>+</sup> mesurées en ELISpot ne diffèrent pas entre les patients HIC et les patients non contrôleurs, d'un point de vue qualitatif, les réponses présentent de grandes différences qui seront exposées dans les paragraphes suivants.

#### 5.2.3. Forte réponse T CD8<sup>+</sup>

Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> font partie de la réponse immunitaire adaptative et sont capables d'éliminer les cellules infectées par un pathogène intracellulaire. Depuis le début de l'épidémie SIDA, de nombreuses évidences ont été présentées quant au rôle des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dans la lutte contre l'infection VIH. De plus, les patients HIC qui constituent une population remarquable de patients infectés par le VIH chez qui la réplication virale est spontanément indétectable en l'absence de thérapie antivirale possèdent une forte réponse immunitaire T antivirale. En effet, cette réponse T joue probablement un rôle majeur dans ce

contrôle comme en témoignent (1) le lien avec certains allèles, dits protecteurs, du système CMH [308,309] mais également (2) les associations faites dans des modèles simiens d'infection pathogène des macaques par SIVmac où la présence de certains allèles corrèle parfaitement avec le contrôle de la maladie [310].

De plus, plusieurs équipes ont montré le rôle antiviral direct des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques du virus, soit dans des tests de cytotoxicité après culture [311,312], soit dans des tests d'inhibition de la réplication virale tel que notre groupe l'a démontré [313,314]. D'autres fonctions ont été montrées comme étant préservées chez ces patients, en liaison avec les fonctions tueuses (production de perforine, de granzymes) [311,315], ou pas (prolifération, synthèse d'IL-2) [312,316].

### 5.2.3.1. Fréquence importante de certains HLA de classe I (B27-B57)

Un individu possède jusqu'à six allèles différents du gène codant pour le HLA de classe I : deux pour chaque locus de HLA de classe I, HLA-A, HLA-B et HLA-C. L'équipe du Pr Carrington a montré en 2003 que les personnes homozygotes pour un des loci du HLA de classe I progressaient plus rapidement vers le stade SIDA [308]. Ceci a permis de mettre en évidence l'importance de la diversité de la réponse T CD8<sup>+</sup> dans la lutte contre le VIH. Cependant, dans certaines situations, une réponse restreinte sur une séquence du VIH peut être associée à un contrôle efficace sur une longue période de temps. En effet, de nombreuses études ont montré que les patients possédant certains allèles comme le HLA-B\*5701 ont une virémie plus faible et une progression vers la maladie plus lente [317-319]. De plus, chez les patients HIC, la fréquence de certains allèles, dits protecteurs, comme les HLA-A\*2501, HLA-B\*1402, HLA-B\*2701, HLA-B\*5202, HLA-B\*5701 [308,309,320] est augmentée et dont les réponses restreintes sont impliquées dans le contrôle de l'infection [321]. De même, certains allèles ont été associés à une progression plus rapide de la maladie comme le HLA-B\*3501 [322].

De même, il a été montré que certains HLA de classe I associés à certains récepteurs KIR des NK corrélaient avec un meilleur pronostic de la maladie [323-327]. En effet, le gène KIR3DL1 code pour 4 allotypes, un récepteur activateur KIR3DS1 et 3 récepteurs inhibiteurs KIR3DL1\**h* qui est fortement exprimé, KIR3DL1\**l* qui est faiblement exprimé et

KIR3DL1\*004 qui est retenu dans le cytoplasme et n'est donc pas exprimé à la surface de la cellule. Le récepteur inhibiteur KIR3DL1\*004 associé aux HLA-B\*27 et HLA-B\*57 est corrélé à une progression plus lente. Le récepteur activateur KIR3DS1 associé au HLA-B\*57 est corrélé avec une progression plus lente [326]. Quant aux deux autres récepteurs, ils sont corrélés à une meilleure protection lorsqu'ils sont associés aux HLA dits protecteurs HLA-B\*27 et HLA-B\*57 [326]. La corrélation entre l'expression de ces deux récepteurs inhibiteurs et les HLA dits protecteurs peut sembler contradictoire. Cependant, comme discuté ici [323], il est possible que les cellules NK lors de leur maturation, expriment de forts niveaux d'expression de récepteurs inhibiteurs comme KIR3DL1\*004 qui ont une forte affinité pour le HLA-B\*57 [328,329]. Lors de l'infection par le VIH, les cellules infectées vont voir l'expression du HLA de classe I diminuée à la surface et ainsi les cellules NK ne vont plus recevoir le signal inhibiteur et s'activer.

De ce fait, la grande fréquence de certains HLA de classe I dits protecteurs suggèrent que les réponses T CD8<sup>+</sup> restreintes par ces allèles et les réponses NK peuvent jouer un rôle dans le contrôle de la réplication virale chez les HIC.

### 5.2.3.2. Modèle SIV

Le modèle animal d'infection du macaque par le virus de l'immunodéficience simien (SIV) est le modèle qui se rapproche le plus de l'infection par le VIH. Il a été utilisé afin de mieux comprendre l'infection et le rôle du système immunitaire. Il a également permis de mettre en évidence le rôle des LT CD8<sup>+</sup> dans le contrôle de l'infection lors de la phase chronique.

Il est possible de simuler différents types d'infection et de progression de la maladie avec le modèle simien en fonction de la souche virale et de l'espèce simienne utilisées. Une infection par la souche SIVmac239 permet chez certains macaques Rhésus un contrôle de l'infection. Dans ce modèle, la charge virale est contrôlée à un niveau très bas [330]. Il est apparu nécessaire de comprendre comment le contrôle de la réplication virale a lieu chez ces macaques contrôleurs. Des expériences de déplétion de LT CD8<sup>+</sup> à l'aide d'anticorps monoclonal anti-CD8 qui ont permis d'éliminer ces cellules CD8<sup>+</sup> *in vivo* chez les animaux, ont mis en évidence que la chute brutale du niveau de CD8<sup>+</sup> mesuré dans le sang conduit à une augmentation brutale du niveau de la charge virale. De plus, après un certain temps, les macaques contrôlent à nouveau la réplication virale et ce contrôle corrèle avec l'augmentation

du taux de LT CD8<sup>+</sup>. De plus, chez les macaques, on peut observer une corrélation entre la présence des allèles du complexe majeur d'histocompatibilité simien, Mamu-B\*08 et Mamu-B\*17 et le contrôle de la répllication virale [310,331] ce qui corrobore un rôle déterminant des cellules CD8<sup>+</sup> dans le contrôle durable de la répllication virale *in vivo* [332].

### 5.2.3.3. Rôle des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dans l'inhibition de la répllication virale

Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> jouent donc un rôle prépondérant dans l'infection par le VIH. De nombreuses études ont cherché à caractériser les réponses T CD8<sup>+</sup> chez les HIC et à comprendre les caractéristiques importantes liées au contrôle de la répllication virale chez ces patients (Figure 14).

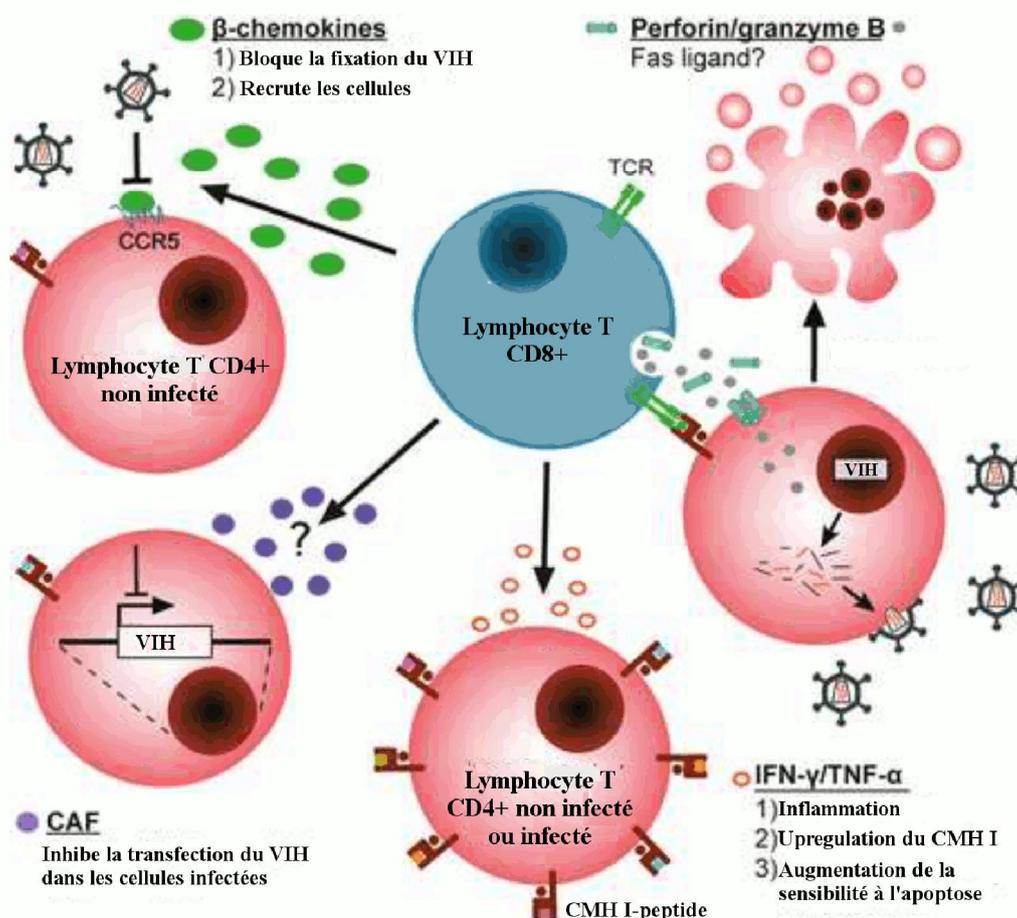


Figure 14 Schéma du contrôle de l'infection par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (d'après [333])

L'une des principales caractéristiques des LT CD8<sup>+</sup> découvertes chez les HIC a été leur capacité à inhiber la réplication virale chez les LT CD4<sup>+</sup> autologues *ex vivo*. Cette inhibition de la réplication virale peut se faire par deux voies (Figure 14):

- la voie cytotoxique comme décrite plus haut et où l'activité inhibitrice semble être principalement induite par les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de la protéine virale Gag [313,314],
- ou par la voie CNAR et qui se fait sans élimination des cellules infectées [334,335].

Ce mécanisme alternatif d'inhibition de la réplication non cytotoxique anti-VIH qui est induit par les LT CD8<sup>+</sup> s'appelle CNAR (CD8<sup>+</sup> cell noncytotoxic anti-HIV response) et diffère de l'activité classique cytotoxique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Des études portant sur l'infection du SIV chez les singes montrent en effet que les LT CD8<sup>+</sup> sont capables d'exercer une forte activité CNAR. Chez les macaques Rhésus contrôleurs, le niveau de charge virale est très faible et la déplétion *in vivo* des LT CD8<sup>+</sup> entraîne une augmentation rapide de la charge virale. La reprise de la réplication virale chez ces macaques met en évidence que les LT CD8<sup>+</sup> n'ont pas lysés toutes les cellules infectées par le SIV et que l'inhibition observée avant déplétion des LT CD8<sup>+</sup> se fait sans élimination de toutes les cellules infectées [336]. Chez l'homme, ce mécanisme apparaît dès les premières étapes de la primo-infection du VIH, varie en intensité selon les patients et corrèle directement avec le statut clinique. En effet, les patients LTNP présentent une plus forte fréquence de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ayant une forte activité CNAR en comparaison des patients progressseurs [335]. Cette activité CNAR est également retrouvée chez les patients exposés mais non infectés alors que les LT CD8<sup>+</sup> des personnes saines non exposés au VIH, des patients au stade SIDA, et des patients infectés recevant un traitement antirétroviral ne présentent pas d'activité CNAR ou seulement une très faible activité [334,337].

L'activité CNAR est induite par une molécule soluble produite par les LT CD8<sup>+</sup>, la protéine CAF (CD8<sup>+</sup> cell anti-HIV factor) [338]. La protéine CAF n'est pas présente dans les granules cytotoxiques et l'activité CNAR n'induit pas l'apoptose des cellules infectées. Son mode d'action a été démontrée : elle supprime la réplication virale en bloquant la transcription du virus [339]. Il a été démontré de plus que cette activité induite par les LT CD8<sup>+</sup> est indépendante de la reconnaissance du CMH des LT CD4<sup>+</sup> infectés. Il faut toutefois noter que cette protéine CAF n'a toujours pas été identifiée clairement et que plusieurs études sont actuellement en cours afin de déterminer cette protéine.

#### 5.2.3.4. Caractérisation des réponses T CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH chez les HIC

Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH chez les HIC jouent donc un rôle important dans l'activité inhibitrice. La caractérisation de ces cellules a donc été entreprise afin de voir les paramètres liés à cette capacité d'inhibition de la réplication virale.

- **Réponse Quantitative**

L'une des premières hypothèses était que les réponses quantitatives des LT CD8<sup>+</sup> des HIC étaient supérieures à celles des patients virémiques. Cependant, en mesurant l'intensité de la réponse des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH par des tests de mesure de la production d'interféron en ELISpot, aucune différence n'a été constatée [314]. Il apparaît donc évident que les réponses T CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH en terme quantitatif ne suffisent pas à expliquer les différences de contrôle viral entre ces deux groupes. Il est intéressant de noter que chez les patients virémiques et HAART, la charge virale pourrait expliquer l'intensité des réponses T CD8<sup>+</sup>, chez les patients HIC, la faible charge virale ne suffit pas à expliquer cette forte réponse T CD8<sup>+</sup> [313]. L'origine de cette forte réponse T CD8<sup>+</sup> chez les HIC est encore sujet à débat mais il semble que chez les patients qui possèdent les HLA de classe I dits protecteurs, la plus forte charge virale permet de maintenir une stimulation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH et une plus forte fréquence de cellules spécifiques [340].

Les études ont démontré que les réponses des LT CD8<sup>+</sup> diffèrent par contre en terme qualitatif. En effet, ces études mettent en évidence l'importance de la qualité des réponses des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques et que ces réponses permettent de distinguer les HIC des patients progressifs.

- **Réponse qualitative**

L'épuisement et la plus grande sénescence des LT CD8<sup>+</sup> caractéristiques des patients progressifs du VIH ne sont pas retrouvées chez les HIC [341]. De plus, les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH présentent des caractéristiques fonctionnelles supérieures aux cellules des patients virémiques et sous traitement HAART. En effet, les HIC ont une fréquence plus importante de LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH qui peuvent dégranuler et induire une réponse cytotoxique ou induire l'apoptose des cellules cibles, produire de nombreuses cytokines et

chemokines en plus des caractéristiques prolifératives supérieures après stimulation avec des peptides du VIH [311,315,342,343].

- L'activité cytotoxique

De nombreuses études ont montré que les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques des HIC ont une capacité cytotoxique supérieure avec une production supérieure de perforine et de granzyme B suite à une stimulation peptidique [312,343] mais également une capacité supérieure d'inhiber la réplication virale des LT CD4<sup>+</sup> autologues. Cette capacité d'inhiber la réplication virale a été montrée être fortement corrélée avec la forte capacité cytotoxique des cellules [312,314].

De plus, chez les patients virémiques, on note une perte des fonctions effectrices pendant la phase chronique et cette perte est associée au déclin de l'expression de T-bet. Les patients HIC expriment un plus fort niveau de T-bet qui est associé à cette plus forte expression de molécules cytotoxiques comme la perforine et le granzyme B [344]. Dans des modèles murins, Paley et al. démontrent de même que la plus forte expression de Eomes est associée à une plus forte expression de granzyme B [130].

- Capacité proliférative

La capacité proliférative des LT CD8<sup>+</sup> est plus importante chez les HIC comparée aux cellules des autres groupes de patients infectés par le VIH. De plus, cette forte prolifération des cellules est associée avec un haut niveau de granules cytotoxiques et donc une forte capacité cytotoxique qui est seulement observée chez les HIC [311]. En outre, l'IL-2 est une cytokine importante dans la prolifération des cellules et on retrouve une fréquence plus importante de cellules sécrétant de l'IL-2 suite à une stimulation peptidique chez les HIC comparé aux autres patients [301,321,345].

- La polyfonctionnalité

La capacité d'avoir plusieurs fonctions simultanément que l'on appelle polyfonctionnalité semblent être un facteur clé des HIC. La polyfonctionnalité a été mesurée en tenant compte de la capacité des LT CD8<sup>+</sup> à produire plusieurs cytokines (IFN- $\gamma$ , MIP1, IL-2, TNF- $\alpha$ ) et la capacité d'hexocytose (CD107a) en même temps après stimulation par un peptide du VIH [346]. Cette polyfonctionnalité semble être liée à un phénotype des LT CD8<sup>+</sup> plus immature, comme celui des cellules mémoires centrales [347]. En comparant la polyfonctionnalité des cellules entre les différents groupes de patients infectés par le VIH, on remarque qu'il s'agit d'une caractéristique qui différencie les HIC et les patients progressifs.

- L'avidité accrue

L'affinité du TCR pour son peptide se situe au niveau moléculaire et correspond à la force de la liaison du TCR avec le complexe CMH-peptide. L'avidité se situe au niveau cellulaire et correspond à la force des interactions entre les différents TCR et les complexes CMH-peptide. L'avidité fonctionnelle [348] peut être mesurée par la production de IFN- $\gamma$  après stimulation des cellules par différentes concentrations de peptide. Elle est définie comme la concentration nécessaire pour induire 50% de la réponse maximale. Une faible avidité se caractérise par une concentration d'antigène élevée nécessaire pour induire 50% de la réponse maximale. En comparant les avidités fonctionnelles entre les différents patients infectés par le VIH, il a été démontré que les HIC possèdent une plus forte avidité fonctionnelle que les patients virémiques [349,351]. Cette plus forte avidité fonctionnelle est fortement associée à cette plus forte représentation des HLA-B\*27 et HLA-B\*57. En effet, l'avidité des réponses restreintes par ces HLA est plus forte que l'avidité des réponses restreintes par les autres HLA. Il en est de même au niveau clonal ; au sein d'un patient porteur du HLA-B\*27, l'avidité des réponses restreintes par ce HLA est supérieure aux autres réponses restreintes par les autres HLA du même patient [350]. De plus, la plus forte avidité fonctionnelle a été corrélée à une plus faible charge virale en ADN et suggère que cette caractéristique joue un rôle important dans le contrôle du virus [352]. Cependant, tous les patients HIC ne possèdent pas un HLA de classe I avec une forte avidité et la fréquence de cellules positives pour la perforine ne diffère pas significativement entre les patients avec un HLA protecteur et les autres patients.

#### 5.2.4. Hétérogénéité de la réponse T CD8<sup>+</sup> chez les HIC

De par la définition des HIC qui représente une catégorie de patients avec un contrôle *in vivo* de la réplication virale pendant au moins 5 ans, on remarque une hétérogénéité des patients et on peut distinguer deux groupes selon les réponses immunologiques T CD8<sup>+</sup>. Les réponses T spécifiques intenses ne sont pas retrouvées chez tous les patients et on peut séparer les patients en fonction des réponses T CD8<sup>+</sup>. Notre équipe a décidé de distinguer les HIC selon la capacité des LT CD8<sup>+</sup> à inhiber *ex vivo* la réplication virale des LT CD4<sup>+</sup> autologues. L'inhibition de la réplication virale *ex vivo* a été mesurée en comparant le niveau de la protéine p24 dans le surnageant de la culture de LT CD4<sup>+</sup> surinfectés et le surnageant de la coculture entre les LT CD4<sup>+</sup> surinfectées et les LT CD8<sup>+</sup> autologues. D'après les études

menées par l'équipe de Saez-Cirion et al., les LT CD8<sup>+</sup> des patients virémiques et sous HAART ont une capacité de réduire la charge virale de 2 log au maximum. Les patients HIC ont ainsi été classés en deux groupes avec l'un dont les LT CD8<sup>+</sup> montrent une faible capacité de réduire la charge virale (<2log) qu'on appelle les *Weak Responders* et l'autre dont les LT CD8<sup>+</sup> montrent une forte capacité à réduire la charge virale (>2log) qu'on appelle les *Strong Responders* [314].

De plus, cette capacité d'inhiber la réplication virale corrèle fortement avec les réponses quantitatives des LT CD8<sup>+</sup> mesurées en ELISpot IFN- $\gamma$ . Nos études ont montré que les « Weak Responders » présentent des cellules spécifiques du VIH quantitativement et qualitativement différents de celles des « Strong Responders ». Les « Weak Responders » ont de plus faibles fréquences de cellules spécifiques et l'expression de molécules d'activation, CD38 et HLA-DR est moins forte chez ces patients.

## Objectifs du travail de thèse

Lors de l'infection par le VIH, les réponses T CD8<sup>+</sup> présentent de nombreux défauts fonctionnels que ce soit d'ordre qualitatif et quantitatif. Les HIV-contrôleurs constituent un groupe de patients qui parvient à contrôler *in vivo* la réplication virale à des niveaux très bas et au sein duquel de fortes réponses T CD8<sup>+</sup> ont été caractérisées [313]. De nombreuses études se sont donc intéressées à définir les réponses T CD8<sup>+</sup> et leurs mécanismes d'induction chez les HIC. Le but de ce travail était de caractériser les réponses T CD8<sup>+</sup> optimales pour le contrôle de la réplication virale chez les patients HIC.

Comme vu précédemment, plusieurs éléments plaident pour un rôle clé de l'activation immunitaire comme cause de déplétion T CD4<sup>+</sup> et de progression [70]. D'après les études menées par l'équipe de P. Hunt et al. qui mesure l'activation du système immunitaire par la fréquence de LT CD8<sup>+</sup> exprimant le phénotype CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>, l'activation immunitaire observée chez les HIC est inférieure à celle des patients virémiques et est similaire à celle des patients sous traitement anti rétroviraux [70]. De ce fait, la plus faible activation immunitaire chez les HIC pourrait expliquer l'absence fréquente de progression chez ces patients. Cependant, elle reste plus élevée que chez les sujets sains non-infectés, cette activation à bas bruit pouvant alors rendre compte de la progression et de la chute des LT CD4<sup>+</sup> observées chez un petit nombre d'individus et de la survenue de complications à long terme identiques à ce qu'on observe chez des patients non-contrôleurs sous traitement efficace prolongé et qui a été mis sur le compte de l'activation résiduelle. En revanche, cette faible activation permettrait de stimuler la réponse T CD8<sup>+</sup> spécifique et de maintenir ainsi le contrôle immunitaire de la charge virale. Notre laboratoire en collaboration avec l'Institut Pasteur a montré qu'une forte proportion chez les HIC des LT CD8<sup>+</sup> globaux et spécifiques du VIH présente une expression particulière avec une faible expression de CD38 et une forte expression de HLA-DR. De ce fait, les HIC présentent une fréquence significativement plus importante de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> exprimant le phénotype CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> que les LT CD8<sup>+</sup> des autres patients.

Nous avons donc émis l'hypothèse que le contrôle *in vivo* de la réplication virale chez les HIC serait dû à une bonne réponse immunitaire induite par les LT CD8<sup>+</sup> présentant cette expression d'activation particulière et nous avons analysé les fonctions effectrices et mémoires des cellules CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> et étudié le mécanisme responsable de l'induction de ce phénotype particulier.

Par ailleurs il a été montré que les facteurs de transcription de la « boîte T », T-bet et Eomes jouent un rôle très important dans la fonctionnalité des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. La forte expression de T-bet corrèle avec un phénotype de cellules effectrices et avec un fort potentiel cytotoxique. Cependant, peu d'études ont été faites concernant l'expression d'Eomes dans l'infection par le VIH et son implication dans la fonctionnalité des LT CD8<sup>+</sup> notamment chez les HIC.

Nous avons donc effectué une étude comparative de l'expression d'Eomes entre différents groupes de patients infectés par le VIH et nous avons émis l'hypothèse que les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH des HIC présentent une expression particulière d'Eomes compatible avec des bonnes fonctionnalités comme la capacité proliférative et le potentiel cytotoxique contrairement aux cellules des autres patients VIH<sup>+</sup>.

Nous avons dans un troisième temps étudié l'hétérogénéité de la réponse T chez les HIC. Comme détaillé précédemment, nous pouvons distinguer les HIC en 2 groupes selon leur capacité à induire une faible ou une forte inhibition de la réplication virale *ex vivo*. Nous avons précédemment montré que les Weak Responders présentent de plus faibles réponses T CD8<sup>+</sup> avec une plus faible fréquence de cellules spécifiques. Nous avons étudié la capacité cytotoxique des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH et l'impact des réponses T CD4<sup>+</sup> sur les réponses T CD8<sup>+</sup> au sein des 2 groupes de patients HIC.

# Matériel et Méthodes

Cette section présente l'ensemble des groupes de patients étudiés et les techniques utilisées dans la réalisation de mon projet de thèse.

## Présentation des patients

Notre équipe de recherche s'intéresse plus particulièrement aux réponses T CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH de différents groupes de patients infectés par le VIH-1. Le laboratoire fait partie de la coordination des cohortes de patients VIH financées par l'ANRS, les cohortes CO06 PRIMO et CoDeX dont sont issus la majorité des patients étudiés ici.

La cohorte CO-06 est une cohorte multicentrique créée en 1996 et regroupe les patients infectés et suivis depuis la primo-infection. Les patients suivis sont à la fois des patients virémiques avec une charge virale supérieure à 3 log de copies d'ARN viral/ml et des patients sous traitement antirétroviral et qui ont une charge virale en dessous des seuils de détection dans les tests standards.

La cohorte CoDeX regroupe les patients HIC. Nous avons identifié cette population sur le site de Bicêtre en 2005 [282] et un observatoire national puis une cohorte sous le nom CoDeX ont été organisés sous l'égide de l'ANRS et nous avons en ce moment environ 240 patients suivis dans ce cadre [282]. Cette cohorte regroupe les patients qui contrôlent le VIH-1 infectés dont les critères d'inclusion sont les suivants :

- \_ une infection VIH-1 depuis au moins 5 ans,
- \_ les 5 dernières charge virales testées en dessous de 400 copies/ml,
- \_ et ne jamais avoir pris de traitement.

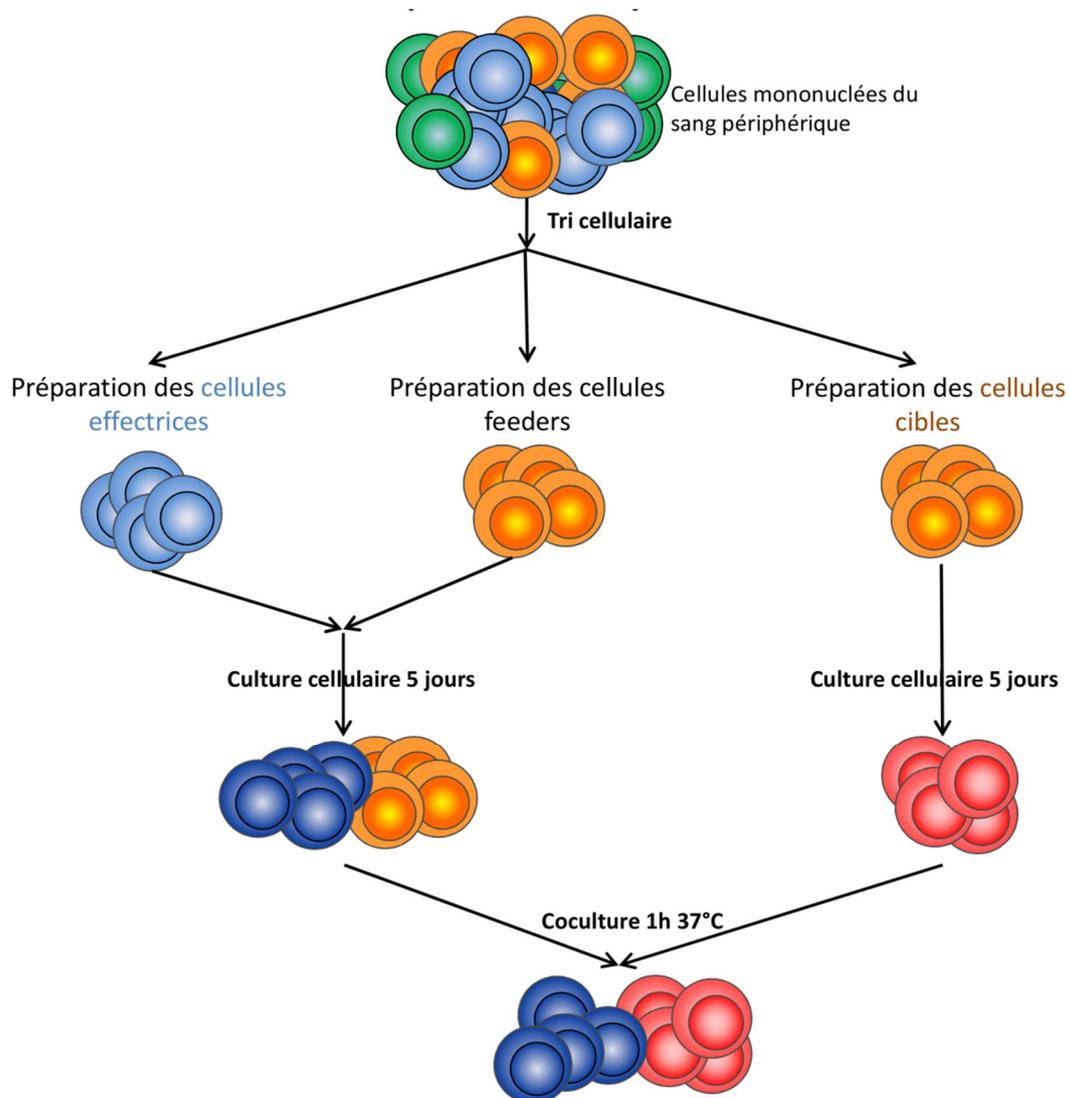
Notre équipe s'est plus particulièrement focalisée sur l'étude de l'activation chez ces différents patients en analysant l'expression de deux molécules CD38 et HLA-DR.

## Présentation du test de cytotoxicité

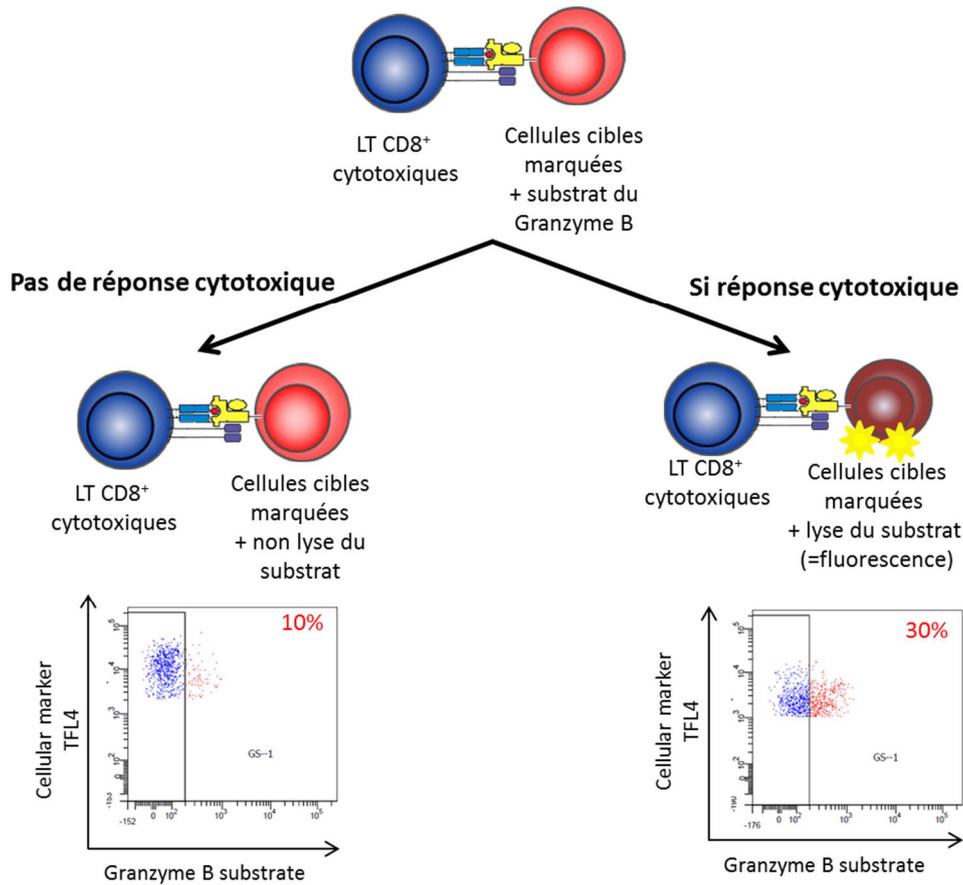
La capacité cytotoxique a été mesurée à la fois en évaluant le niveau d'expression de deux molécules cytotoxiques, la perforine et le granzyme B, mais aussi en évaluant la capacité des LT CD8<sup>+</sup> à induire l'apoptose des cellules cibles.

Le test de cytotoxicité est basé sur la lyse d'un substrat fluorescent du granzyme B dans les cellules cibles vivantes. Les cellules cibles utilisées dans le test sont des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) déplétées de LT CD8<sup>+</sup> et des cellules NK. Les cellules effectrices sont les LT CD8<sup>+</sup>. L'avantage de ce test est qu'il mesure rapidement (1h) cette capacité et le principe du test permet ainsi de mettre en évidence les premières étapes de la cytotoxicité : lorsqu'il y a reconnaissance du CMH de classe I par le TCR, il y a exocytose des granules cytotoxiques et principalement des molécules de perforine et de granzyme B, puis intégration du granzyme B dans les cellules cibles. Le test mesure ainsi la présence et l'activité du granzyme B dans les cellules cibles encore vivantes.

### Préparation des cellules pour le test de cytotoxicité



## Principe du test de cytotoxicité



**Figure 15** Schéma représentant (en haut) les différentes étapes et les différentes cellules utilisées pour la préparation du test de cytotoxicité et (en bas) le principe et exemple de résultat de ce test.

En pratique, nous sommes partis de 10-15 millions de PBMC de patients HIC qui ont été séparés en 3 groupes : (1) les cellules qui vont servir de cellules effectrices, (2) les cellules qui vont servir de feeders et (3) les cellules qui vont servir de cellules cibles (Figure 15).

- (1) Les cellules effectrices ont été récupérées après marquage et tri cellulaire sur un FACS ARIA III,
- (2) et (3) Les cellules feeders et les cellules cibles ont été récupérées après déplétion cellulaire des LT CD8<sup>+</sup> et des NK sur des colonnes Miltenyi Biotec.

Les cellules effectrices et les cellules feeders ont été mises en coculture pendant 5 jours en présence d'un peptide afin d'activer les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques.

Les cellules cibles ont été mis en culture avec de la phytohemagglutinin (PHA) et de l'IL-2 pendant 5 jours afin de blaster ces cellules et d'augmenter leur sensibilité au test de cytotoxicité.

A la fin de la culture, les cellules cibles ont été marquées afin de les différencier des cellules effectrices. Puis les cellules cibles ont été mises en coculture avec les LT CD8<sup>+</sup> avec un ratio de 50:1 pour le ratio Effecteur:Cibles en présence du substrat de granzyme B. S'il y a reconnaissance entre le CMH-p et le TCR, les LT CD8<sup>+</sup> vont libérer les molécules cytotoxiques comme la perforine et le granzyme B. Ces molécules vont entrer dans la cellule cible et induire l'apoptose. Notre test permet de mesurer l'activité du granzyme B dans les cellules cibles en mesurant la lyse d'un substrat du granzyme B qui est présent dans la cellule cible. La mesure de cette activité se fait 1h après la mise en coculture et passage sur un FACS CANTO.

### **Etude phénotypique *ex vivo* des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH**

L'utilisation de complexes tétramères et dextramères de CMH de classe I avec son épitope peptidique a permis d'identifier les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques d'un épitope et de les caractériser. Ce marquage a donc permis de mieux comprendre leur rôle dans le contrôle des infections virales.

Les études *ex vivo* et *in vitro* des cellules spécifiques ont été effectuées sur les PBMC à l'aide d'un marquage avec des anticorps couplés à un fluorochrome et ont été analysées sur un cytomètre de flux pour évaluer l'état d'activation, de différenciation, de fonctions mémoires et effectrices.

La stratégie de gating afin d'étudier les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH a été la suivante : nous avons tout d'abord exclu les cellules mortes via un marqueur de viabilité, puis sélectionné les lymphocytes, les cellules CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> et les cellules spécifiques. Par la suite, à l'aide d'isotypes, nous avons sélectionné les différentes sous populations CD38/HLA-DR.

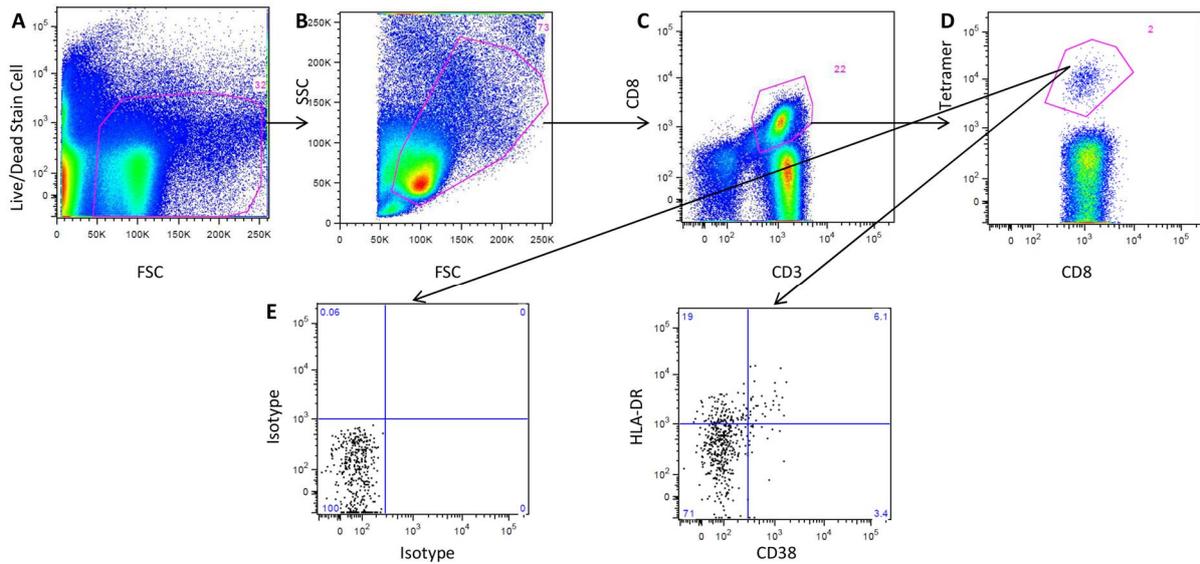


Figure 16 Schéma représentant la stratégie de gating pour étudier les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH

### Principe du test d'inhibition de la réplication virale

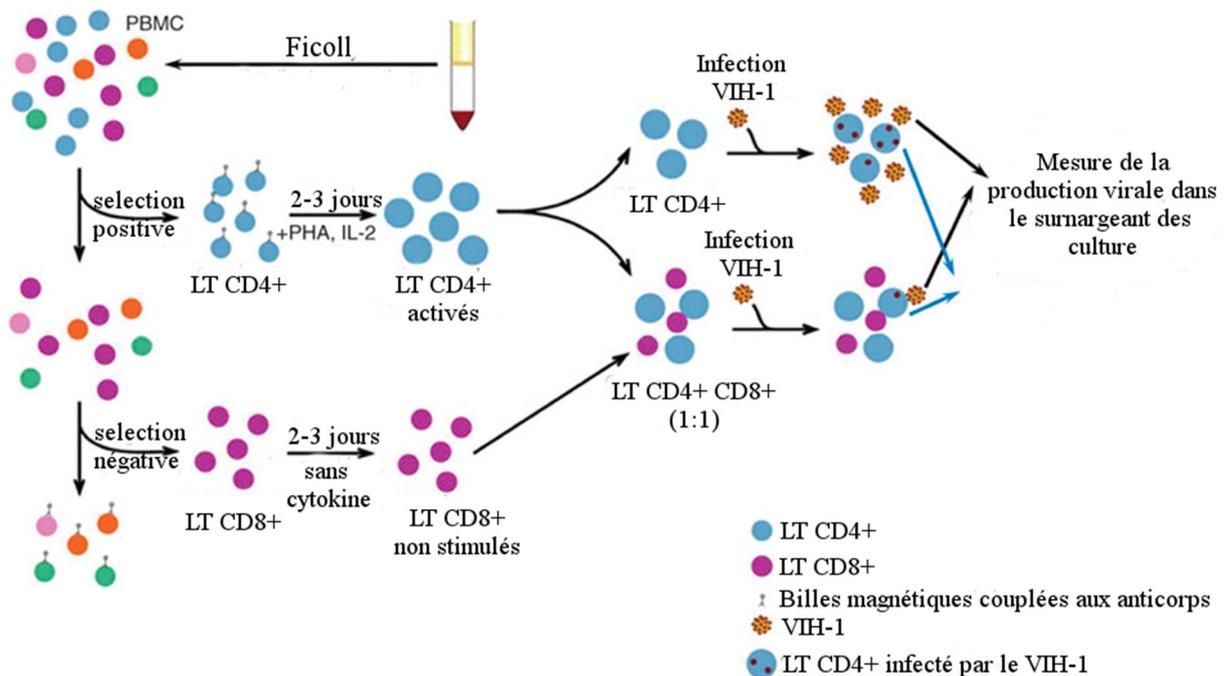


Figure 17 Protocole du test d'inhibition de la réplication virale (d'après [353])

La capacité d'inhibition de la réplication virale des LT CD8<sup>+</sup> a été mesurée selon le protocole décrit ici [353]. Le test est basé sur la capacité des LT CD8<sup>+</sup> à inhiber la production virale par les LT CD4<sup>+</sup> infectés. En pratique, les LT CD4<sup>+</sup> et les LT CD8<sup>+</sup> d'un patient sont isolés et les LT CD4<sup>+</sup> sont activés par de la PHA et de l'IL-2 pendant 3 jours puis infectés par la souche de VIH-1 BaL. A l'issue de cette étape, les LT CD4<sup>+</sup> infectés sont mis en culture avec ou sans

les LT CD8<sup>+</sup> non stimulés autologues pendant 7 jours. La protéine p24 est ensuite mesurée dans le surnageant par une méthode d'ELISA pour évaluer la réplication virale. La capacité des LT CD8<sup>+</sup> à inhiber la réplication virale est exprimée comme le log de la différence de production de la protéine p24 entre la culture seule des LT CD4<sup>+</sup> infectés et la coculture entre LT CD4<sup>+</sup> infectés et LT CD8<sup>+</sup> autologues :

$$\log_{p24} \text{ decrease} = \log ([\text{protéine p24}]_{\text{LT CD4}^+ \text{ infectés seuls}} - [\text{protéine p24}]_{\text{coculture LT CD4}^+ \text{ et LT CD8}^+}).$$

### **Principe du test d'ELISpot IFN-**

Le test d'ELISpot IFN- permet de mesurer la réponse spécifique à un peptide du VIH en quantifiant le nombre de LT CD8<sup>+</sup> produisant de l'IFN- après stimulation. Les peptides ont été utilisés à une concentration de 2 µg/mL et les cellules produisant de l'IFN- sont détectées par une révélation de l'IFN- formant des spots. Les résultats d'une réponse spécifique vis-à-vis d'un antigène sont exprimés en nombre de spots par 10<sup>6</sup> PBMC et sont considérés positifs s'ils sont supérieurs à 50 spots/10<sup>6</sup> PBMC après soustraction du bruit de fond.

### **Principe du test d'avidité**

Le test d'avidité est basé sur le test d'ELISpot IFN- en utilisant différentes concentrations de peptides allant de 10<sup>-5</sup> à 10<sup>-11</sup> M. L'avidité est définie comme la concentration de peptide nécessaire afin d'obtenir 50% de la réponse maximale (EC50%) et est exprimée ici en log EC50%.

# Résultats

## Article 1 : Potential role for HIV-specific CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in viral suppression and cytotoxicity in HIV controllers

Stéphane Hua, Camille Lécuroux, Asier Sáez-Cirión, Gianfranco Pancino, Isabelle Girault, Pierre Versmisse, Faroudy Boufassa, Olivier Taulera, Martine Sinet, Olivier Lambotte, and Alain Venet

Accepté à PLoS One

### Hypothèse et objectif de recherche

Les patients HIC sont caractérisés par une plus faible activation et inflammation que les patients virémiques. Cette faible activation se traduit par l'absence d'expression du marqueur CD38. Cependant, ces patients présentent une expression paradoxale avec la présence du marqueur HLA-DR. Les travaux du Dr Giorgi ont permis de montrer qu'il existe une corrélation positive entre la fréquence de LT CD8<sup>+</sup> présentant le phénotype CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> et l'absence de progression mesurée par le nombre de LT CD4<sup>+</sup> [354]. La fréquence de cette sous population de façon plus importante chez les HIC comparée aux autres patients VIH<sup>+</sup> nous a amené à faire l'hypothèse que cette sous population participe activement au contrôle de la réplication virale *in vivo*.

Le but de ce travail a donc été de caractériser les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH chez les HIC présentant ce phénotype particulier CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> et de définir leur rôle dans le contrôle de la réplication virale. Cette sous population a été assez peu décrite mais récemment Buckheit et al. ont montré qu'elle présente de bonnes capacités cytotoxiques [355].

Les objectifs de cet article ont été :

- Mettre en évidence que la sous population LT CD8<sup>+</sup> spécifiques CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> présentent des caractéristiques d'activation particulière avec une expression de HLA-DR et une absence d'expression d'autres marqueurs d'activation
- LT CD8<sup>+</sup> spécifiques CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> comparé aux cellules CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> présentent de meilleures fonctions mémoires avec une meilleure survie, une forte

fréquence de cellules polyfonctionnelles et une meilleure prolifération mais également de meilleures fonctions effectrices avec une meilleure capacité cytotoxique,

- Préciser le mécanisme d'induction du phénotype CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>



# Potential Role for HIV-Specific CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T Cells in Viral Suppression and Cytotoxicity in HIV Controllers

Stéphane Hua<sup>1,2</sup>, Camille Lécuroux<sup>1,2</sup>, Asier Sáez-Cirión<sup>3</sup>, Gianfranco Pancino<sup>3</sup>, Isabelle Girault<sup>1,2</sup>, Pierre Versmisse<sup>3</sup>, Faroudy Boufassa<sup>2,4,5</sup>, Olivier Taulera<sup>6</sup>, Martine Sinet<sup>1,2</sup>, Olivier Lambotte<sup>1,2,7</sup>, Alain Venet<sup>1,2\*</sup>

1 INSERM U1012, Le Kremlin-Bicêtre, France, 2 Université Paris-Sud 11, Le Kremlin-Bicêtre, France, 3 Institut Pasteur, Unité de Régulation des Infections Rétrovirales, Paris, France, 4 INSERM U1018, Le Kremlin-Bicêtre, France, 5 Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Bicêtre, Département d'épidémiologie, Le Kremlin-Bicêtre, France, 6 AP-HP, Hôpital Saint-Louis, Paris, France, 7 AP-HP, Hôpital Bicêtre, Service de Médecine Interne, Le Kremlin-Bicêtre, France

## Abstract

**Background:** HIV controllers (HIC) are rare HIV-1-infected patients who exhibit spontaneous viral control. HIC have high frequency of CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells. Here we examined the role of this subset in HIC status.

**Materials and Methods:** We compared CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells with the classical CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> activated phenotype in terms of 1) their activation status, reflected by CD69, CD25, CD71, CD40 and Ki67 expression, 2) functional parameters: Bcl-2 expression, proliferative capacity, and IFN- $\gamma$  and IL-2 production, and 3) cytotoxic activity. We also investigated how this particular profile is generated.

**Results:** Compared to CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> cells, CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> cells exhibited lower expression of several activation markers, better survival capacity (Bcl-2 MFI, 367 [134–462] vs 638 [307–747],  $P=0.001$ ), higher frequency of polyfunctional cells (15% [7%–33%] vs 21% [16%–43%],  $P=0.0003$ ), greater proliferative capacity (0-fold [0–2] vs 3-fold [2–11],  $P=0.007$ ), and higher cytotoxicity *in vitro* (7% [3%–11%] vs 13% [6%–22%],  $P=0.02$ ). The CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> profile was preferentially generated in response to low viral antigen concentrations.

**Conclusions:** These data highlight the role of CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cell cytotoxicity in HIC status and provide insights into the mechanism by which they are generated. Induction of this protective CD8<sup>+</sup> subset may be important for vaccine strategies.

**Citation:** Hua S, Lécuroux C, Sáez-Cirión A, Pancino G, Girault I, et al. (2014) Potential Role for HIV-Specific CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T Cells in Viral Suppression and Cytotoxicity in HIV Controllers. PLoS ONE 9(7): e101920. doi:10.1371/journal.pone.0101920

**Editor:** Derya Unutmaz, New York University, United States of America

**Received:** April 17, 2014; **Accepted:** June 12, 2014; **Published:** July 7, 2014

**Copyright:** © 2014 Hua et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability:** The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported in part by institutional grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Agence Nationale de Recherche sur le SIDA and Sidaction. SH received institutional grants from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and Sidaction. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* Email: alain.venet@u-psud.fr

## Introduction

A very small number of HIV-1-infected individuals spontaneously control viral replication. These so-called HIV controllers (HIC) usually have relatively high CD4<sup>+</sup> T cell counts and remain AIDS-free for several decades [1,2]. Several factors have been implicated in HIC status, including viral defects, cellular factors, and the innate immune system [3], but T cells, especially HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells, are considered to play a major role. Overrepresentation of certain HLA class I alleles (especially HLA-B\*57 and HLA-B\*27) is associated with strong HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses [4–6]. Studies of simian disease models also show that expression of the MHC class I alleles Mamu-B\*08 and Mamu-B\*17 correlates with viral control [7,8]. Several studies

have linked viral control to HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cell poly-functionality [9], proliferation to HIV antigens, and lytic granule content [10,11].

We and others have shown that HIC usually possess HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells capable of suppressing HIV replication *ex vivo* [12,13]. Although HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells usually express similar levels of two activation markers – CD38 and HLA-DR – which correlate with viral load in non-controllers [14], they exhibit a peculiar activation phenotype in HIC, with low CD38 expression and high HLA-DR expression [13,15]. Immune activation can have opposite effects on CD8<sup>+</sup> T cell functional capacities. Indeed, a degree of immune activation is necessary for efficient effector responses (resting CD8<sup>+</sup> T cells usually lack effector functions but can become cytotoxic when activated [16]),

whereas overactivation may lead to exhaustion [17] and functional inefficiency [18]. The CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> phenotype might reflect a low level of activation and could thereby contribute to HIC status [13,15,19].

Here we studied CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells in a large population of HIC, focusing on functional activation status, memory/effector functions, and the mechanism underlying HLA-DR expression in the absence of CD38 expression.

## Materials and Methods

### Ethics statement

All the subjects provided their written informed consent to participation. The study was approved by the local investigational review board (*Comité de Protection des Personnes Ile de France VII*, Paris, France) and performed in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki.

### Study participants

We collected samples from 120 HIV-infected individuals, comprising 80 patients enrolled in the French ANRS CO21 CODEX cohort of HIC (inclusion criteria: HIV infection at least 5 years previously; 5 latest plasma HIV RNA values <400 copies/mL; no HAART), 21 untreated, chronically viremic patients, and 19 HAART-treated aviremic individuals (HIV RNA <50 copies/mL) enrolled in the French ANRS CO6 PRIMO cohort. Clinical and biological characteristics of the study participants are shown in Table 1. Peripheral blood samples from seven HIV-uninfected healthy blood donors (HD) were obtained from *Etablissement Français du Sang* (Paris, France).

### Cell preparation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from EDTA-anticoagulated blood by Ficoll density gradient centrifugation and stored in liquid nitrogen. Human leukocyte antigen typing used the complement-dependent microlymphocytotoxic technique (Ingen).

### Flow cytometry of HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells

Specific CD8<sup>+</sup> T cells were characterized by staining, first for 15 minutes at room temperature with APC-labeled peptide-HLA class I multimers (Proimmune and Immudex for HLA-B\*57 peptides) derived from the HIV proteins Gag, Nef, Pol, and Env and from the Epstein-Barr virus (EBV) proteins BMLF-1 and BZLF-1, and then with labeled antibodies for 15 minutes at 4°C. Anti-CD38-PerCP-Cy5.5 and anti-HLA-DR-PE-Cy7 were used

to identify and sort the different activation subsets. The following antibodies were used to characterize HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells: FITC-coupled anti-CD71, -CD40, -Bcl-2 and -Granzyme B; PE-coupled anti-Ki67, -CD69 and -CD25; V450-coupled anti-CD8 (BD Biosciences); VioGreen-coupled anti-CD3 (Miltenyi Biotec); and PE-coupled anti-perforin (clone D48, Diaclone). Dead cells were excluded by using the Live Dead Fixable Near-IR Dead Cell Stain kit (Molecular Probes, Invitrogen). For intracellular staining, cells were incubated with the appropriate antibodies for 30 minutes at 4°C after incubation with FACS permeabilizing solution (BD Biosciences). Samples were acquired on an LSR Fortessa cell analyzer (BD Biosciences) and analyzed with FACS DIVA software (BD Biosciences). An example of the gating strategy is shown in the Figure S1 and an example of the expression of the activation markers and cytokine production by the different subsets is shown in Figure S2. We assessed an average of two tetramers per patient and acquired at least 80 events per subset studied.

CD8<sup>+</sup> T cells were sorted with an ARIA cell sorter (BD Biosciences) into the following activation subsets: CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>, and CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>, using anti-CD56-PE to exclude NK cells, anti-CD8-V450 and anti-CD4-APC-H7 antibodies (BD Biosciences) according to the manufacturer's guidelines. After sorting, cells were resuspended at a density of 1×10<sup>6</sup>/mL and cultured for five days before used in the cytotoxicity assay described below. Purity was routinely >95% for each subset (data not shown). Too few cells expressed the CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>-</sup> phenotype to obtain interpretable data.

### Intracellular cytokine production

PBMC were stimulated for 15 hours in medium containing the relevant optimal HIV peptide (2 μM). After 1 hour of stimulation, cytokine secretion was blocked by adding brefeldin A (10 μg/mL, Sigma-Aldrich Chemie). After further incubation, samples were stained as described above. Anti-IFN-γ-APC and anti-IL-2-PE antibodies (BD Biosciences) were used to detect intracellular cytokine production. A negative control (medium) and a positive control (staphylococcal enterotoxin B, SEB) were included in each experiment. The polyfunctionality was assessed by measuring the dual production of IFN-γ and IL-2. The results were expressed as frequency of IFN-γ<sup>+</sup>/IL-2<sup>+</sup> producing cells among IFN-γ<sup>+</sup> or IL-2<sup>+</sup> producing cells.

### In vitro HIV suppression assay

The capacity of CD8<sup>+</sup> T cells to suppress HIV-1 infection of autologous CD4<sup>+</sup> T cells *ex vivo* was assessed as described in details

**Table 1. Study population.**

	Viremic	HAART	HIC	P
n	21	19	80	
Age (years)	38 [31–46]	41 [34–44]	48 [42–53]	<0.0001
Gender (% men)	95%	84%	54%	0,0004
Time since HIV diagnosis (years)	1,5 [1–2]	4 [1–6]	13 [9–17]	<0.0001
CD4/μl	499 [374–697]	645 [500–818]	801 [645–1020]	<0.0001
CD8/μl	1150 [862–1609]	648 [492–747]	792 [610–951]	0,0001
Plasma HIV-RNA (log <sub>10</sub> copies/ml) <sup>a</sup>	4,62 [4,44–4,81]	<1,7	1 [0,3–1,7]	<0.0001

Median values [1<sup>st</sup>–3<sup>rd</sup> interquartile range] are shown for age, time since diagnosis, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell counts, and HIV RNA viral loads.

<sup>a</sup>Viremic and HAART-treated patients' RNA viral loads were measured using an assay with a quantification limit of <50 copies/ml, while values in HIC were obtained with ultrasensitive assays.

doi:10.1371/journal.pone.0101920.t001

elsewhere [20]. Briefly, CD4<sup>+</sup> T cells were activated with phytohemagglutinin (PHA) and IL-2 for three days, then infected with HIV-1 BaL and cultured alone or with unstimulated autologous CD8<sup>+</sup> T cells (1:1 ratio). P24 antigen was measured in culture supernatants with an ELISA method (Zeptometrix) as a measure of viral replication. The capacity of CD8<sup>+</sup> T cells to suppress HIV infection was expressed as the log decrease in p24 production when superinfected CD4<sup>+</sup> T cells were cultured in the presence of CD8<sup>+</sup> T cells.

### Cytotoxicity assay

The Grantoxilux Plus! cytotoxicity assay was used according to the manufacturer's instructions (OncoImmunit, Inc). It is based on Granzyme-B-mediated intracellular cleavage of a fluorogenic substrate in live target cells. Briefly, PBMC were used as target cells, CD8<sup>+</sup> T cells as effectors, and CD8-depleted PBMC as feeders. Target cells were stimulated with PHA and IL-2 for five days. Effector cells were cocultured with feeders at a ratio of 1:1 and with HIV peptide (2 μM) for five days. On day 5, target cells were primed for 1 h with the cognate or an irrelevant peptide, labeled with TFL4 (OncoImmunit, Inc.), and then cocultured with CD8<sup>+</sup> T cells at an Effector:Target ratio of 50:1. The cells were then incubated with Granzyme B substrate (OncoImmunit Inc.) for 1 h and analyzed immediately by flow cytometry. The results are expressed as the difference between the frequency of lysed target cells incubated with the cognate peptide and the frequency of lysed target cells incubated with the irrelevant peptide. An example of the cytotoxic assay is shown in Figure S3.

### Healthy donor cell culture

CD8<sup>+</sup> T cells were isolated by using a human anti-CD56 antibody (Miltenyi Biotec) to deplete NK cells and a human anti-CD8 antibody (Miltenyi Biotec). Purity was greater than 95%. Isolated CD8<sup>+</sup> T cells were cultured *in vitro* (2 × 10<sup>6</sup> cells/mL) with medium alone, with the optimal concentrations of peptides, or with anti-CD3/CD28 antibodies as control (Miltenyi Biotec). IFN-α (PBL InterferonSource) was used at 500 IU/mL.

### Functional avidity

Functional avidity was measured in an IFN-γ ELISpot assay using single-epitope peptides corresponding to optimal HIV-CTL epitopes (National Institutes of Health HIV Molecular Immunology Database: [http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/tables/optimal\\_ctl\\_summary.html](http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/tables/optimal_ctl_summary.html)) according to the subjects' HLA types. Functional avidity of CD8<sup>+</sup> T cell responses was assessed by performing limiting peptide dilutions ranging from 10<sup>-5</sup> to 10<sup>-11</sup> M in *in vitro* assays as described elsewhere [21]. It was defined as the peptide concentration required to achieve 50% of the maximal response (EC<sub>50%</sub>) and was expressed as log EC<sub>50%</sub>.

### Statistical methods

Data were analyzed with Prism software (GraphPad Software Inc.). Groups were compared using a nonparametric Mann-Whitney or Wilcoxon paired test for continuous data or a chi-squared test for categorical data. Correlations were evaluated using Spearman's rank correlation coefficient. The Spearman r correlation and (in the Figures) the Pearson correlation curve are indicated for significant correlations. The threshold for statistical significance was set to  $P < 0.05$ .

## Results

### Study population

Baseline data for the 80 HIC, 21 viremic patients and 19 HAART-treated patients are shown in Table 1. HIC differed significantly from the other two groups of patients in terms of the sex ratio, age, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell counts, viral RNA loads, and time since diagnosis.

### Higher frequencies of CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells in HIV controllers

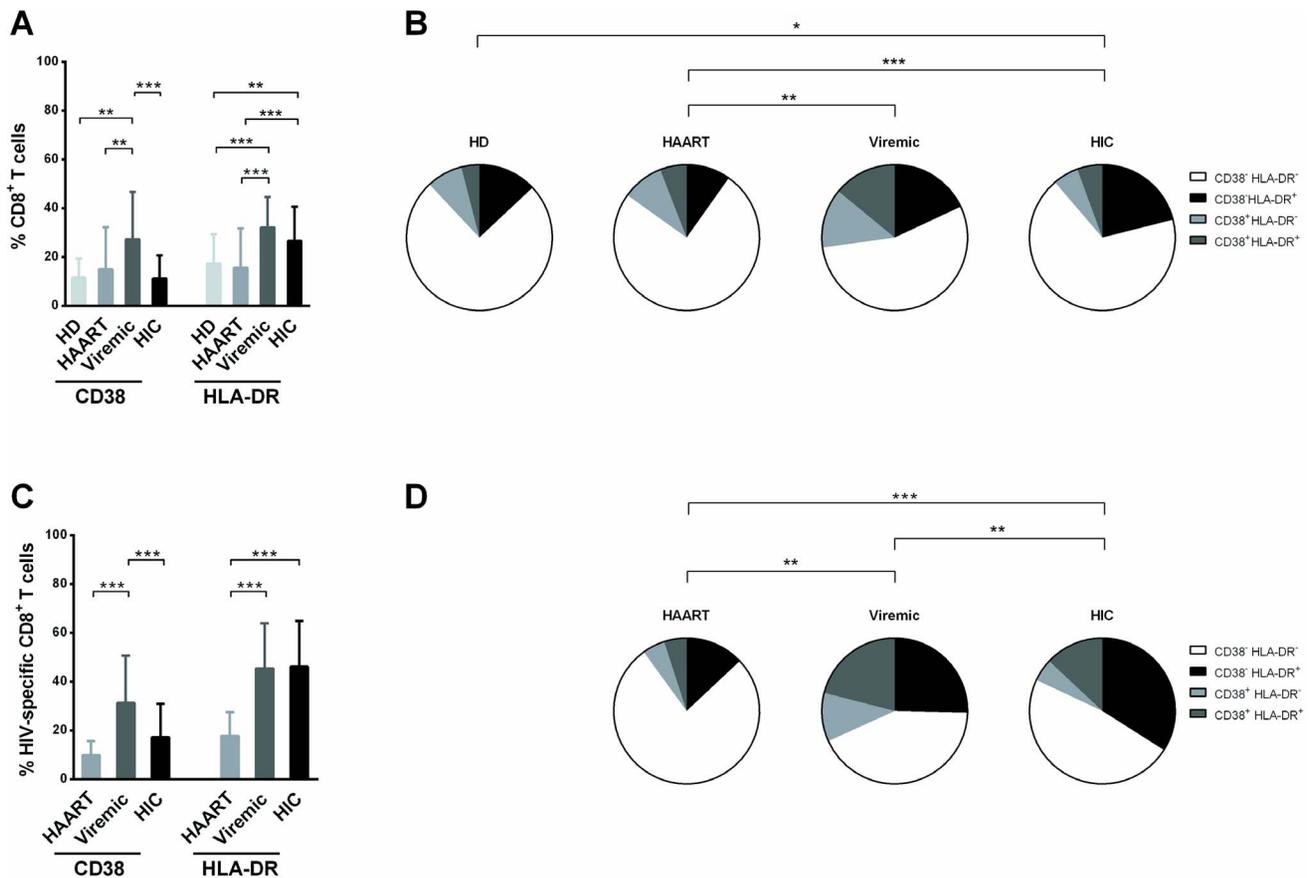
We first compared CD38 and HLA-DR expression *ex vivo* on bulk CD8<sup>+</sup> T cells in the healthy donors (HD), viremic patients, HAART-treated patients, and HIV controllers (HIC) (Figure 1A–B) and on HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells in the three groups of HIV-infected patients (Figure 1C–D). As previously reported by our group [15], median [1<sup>st</sup>–3<sup>rd</sup> interquartile range] CD38 expression was lower in HD, HAART-treated patients and HIC (11% [6%–14%], 12% [5%–14%], 9% [5%–14%] respectively) than in viremic patients (20% [14%–39%]) ( $P = 0.0001$  for each comparison, Fig. 1A). HLA-DR expression was higher in viremic patients and HIC (29% [23%–38%] and 27% [19%–32%], respectively) than in HD and HAART-treated patients (14% [11%–21%] and 11% [7%–19%]) ( $P = 0.0002$  and  $P < 0.0001$  for viremic patients versus HD and HAART, respectively;  $P = 0.006$  and  $P = 0.0008$  for HIC versus HD and HAART, respectively; Fig. 1A). Consequently, the CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> phenotype was more frequent in viremic patients (14% [8%–19%]) than in HD, HAART-treated patients and HIC (2% [1%–3%], 3% [1%–4%] and 4% [3%–8%], respectively) ( $P < 0.0001$  for all three comparisons, Fig. 1B). CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> expression was more frequent in HIC than in HAART-treated patients (21% [15%–28%] vs 9% [5%–12%],  $P = 0.0003$ , Fig. 1B).

HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cell frequency was higher in HIC (2705 SFC/10<sup>6</sup> PBMC [1135–5675]) and in viremic patients (2255 SFC/10<sup>6</sup> PBMC [1334–6933]) than in HAART-treated patients (1138 SFC/10<sup>6</sup> PBMC [179–2733]) ( $P = 0.009$  and  $P = 0.03$  between HIC and HAART-treated patients and between viremic patients and HAART-treated patients respectively). HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells with high CD38 expression were also less frequent in HAART-treated patients and HIC (10% [6%–16%] and 13% [11%–39%], respectively) than in viremic patients (28% [15%–48%]) ( $P < 0.0001$  for both comparisons, Fig. 1C).

HLA-DR expression in HAART-treated patients (19% [10%–24%]) was far lower than in HIC (47% [32%–61%],  $P < 0.0001$ ), and in viremic patients (50% [32%–58%], Fig. 1C). The frequency of CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> was thus higher in HIC (33% [20%–46%]) than in both HAART-treated and viremic patients (13% [6%–19%] and 20% [15%–47%], respectively;  $P < 0.0001$  for both comparisons, Figure 1D). Moreover, there is a correlation between the frequency of CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> and the frequency of HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells ( $P = 0.002$ ,  $r = 0.22$ ) which suggested that CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> may contribute mainly to the high frequency of HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells

### CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells are more weakly activated than their CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> counterparts

Although expression *ex vivo* of the activation markers CD69 (activation marker), CD40 (costimulatory receptor), CD71 (transferrin receptor protein 1), CD25 (IL-2Rα) and Ki67 (proliferative marker) was rather low on HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells in HIC (3% [2%–6%], 4% [2%–8%], 4% [3%–7%], 1% [1%–2%] and 1% [0%–9%], respectively, Fig. 2A), classical CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> activated cells exhibited higher expression of CD69 (9% [4%–



**Figure 1. CD38 and HLA-DR expression on bulk and HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells.** (A) Proportions of bulk CD8<sup>+</sup> T cells from HD (n = 16, light gray bars), HAART-treated patients (n = 19, mid gray bars), viremic patients (n = 21, dark gray bars) and HIC (n = 79, black bars) expressing CD38 and HLA-DR. (C) Proportions of HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells from HAART-treated patients (n = 13, mid gray bars), viremic patients (n = 39, dark gray bars) and HIC (n = 80, black bars) expressing CD38 and HLA-DR. Pie charts representing CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>-</sup> (white), CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> (black), CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>-</sup> (light gray) and CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> (dark gray) cells among bulk (B) and HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells (D). Statistical differences shown in the pie charts are based on the difference in the frequency of the CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> subset between the different groups. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . doi:10.1371/journal.pone.0101920.g001

15%), CD40 (14% [7%–20%]), CD71 (13% [7%–16%]), CD25 (3% [1%–8%]) and Ki67 (25% [12%–49%]), than the other subsets. Strikingly, expression of these markers on the CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> subset was very low and similar to that observed on resting CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>-</sup> cells (median 0–2% for both subsets and all activation markers). Thus, the CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> subset is more weakly activated than the CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> subset.

### The CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> subset contains a higher frequency of polyfunctional cells and has higher proliferative and cytotoxic capacities than the CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> subset

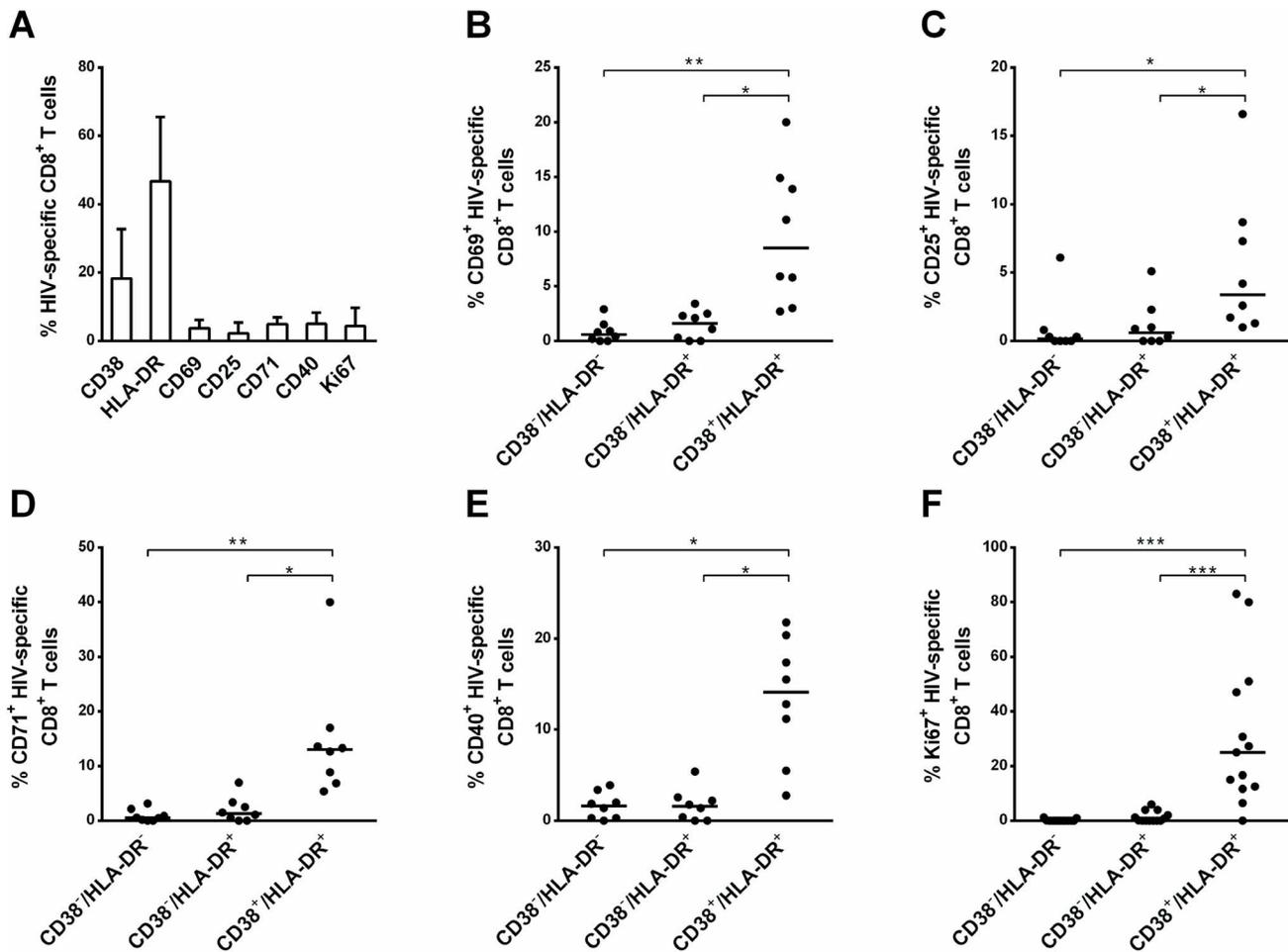
The survival capacity was assessed by measuring the difference of the median fluorescence intensity of Bcl-2 expression of one subset and the isotype. Bcl-2 expression *ex vivo*, was higher for CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> cells than for CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> cells (638 [307–747] vs 367 [134–462],  $P = 0.001$ , respectively, Fig. 3A).

We then analyzed dual production *in vitro* of IFN- $\gamma$  and IL-2 as a marker of polyfunctionality. As shown in Figure 3B the CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> subset contained more IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>-producing cells than the CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> subset (21% [16%–43%] vs 15% [7%–33%],  $P = 0.0003$ , Fig. 3B). We analyzed the proliferation capacity *in vitro* by assessing the number of HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells at the beginning and the end of the culture and calculated the fold increase of HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells. After sorting and

culture with cognate peptides, proliferation of CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> cells increased 3.2-fold [1.2–7.8], whereas CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> cells did not proliferate significantly (0.4-fold [0.0–1.7]) ( $P = 0.007$ , Fig. 3C).

Although *ex vivo* perforin expression did not differ between the two subsets (52% [21%–67%] and 52% [26%–67%], respectively,  $P = 0.26$ , Fig. 3D), CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> cells exhibited lower granzyme B *ex vivo* expression than CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> cells (29% [8%–54%] and 36% [12%–64%], respectively,  $P = 0.01$ , Fig. 3E). However, *ex vivo* after sorting cells, cytotoxicity was very low and similar with the two subsets (0% [0%–8%] vs 4% [4%–16%], respectively,  $P = 0.2$ ; data not shown). After sorting and coculture with CD8-depleted PBMC for 5 days, CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> cells showed increased cytotoxicity (13% [7%–23%]), contrary to the CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> subset (7% [3%–11%]) ( $P = 0.001$ , Fig. 3F). CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells thus responded significantly more strongly to cognate antigen than did their CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> counterparts.

*Ex vivo* HIV-suppressive activity was routinely evaluated with freshly isolated whole-blood T cells which often include several HIV specificities while cytotoxicity was evaluated only on immunodominant peptides. Of note, HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cell cytotoxicity correlated with HIV-suppressive activity, expressed as the log decline in p24 antigen ( $P = 0.004$ ;  $r = 0.37$ , data not



**Figure 2. Activation phenotype of CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> and CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> subsets from HIC.** (A) Proportions of HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells expressing CD38, HLA-DR, CD69, CD25, CD71, CD40 and Ki67. (B–F) Proportions of CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> and CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells expressing CD69 (B), CD25 (C), CD71 (D), CD40 (E) and Ki67 (F) (n=8). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . doi:10.1371/journal.pone.0101920.g002

shown). Interestingly, only the frequency of the CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells correlated strongly with the log p24 decrease ( $P < 0.0001$ ;  $r = 0.32$ , data not shown). No such correlation was found with CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> cells ( $P = 0.5$ ).

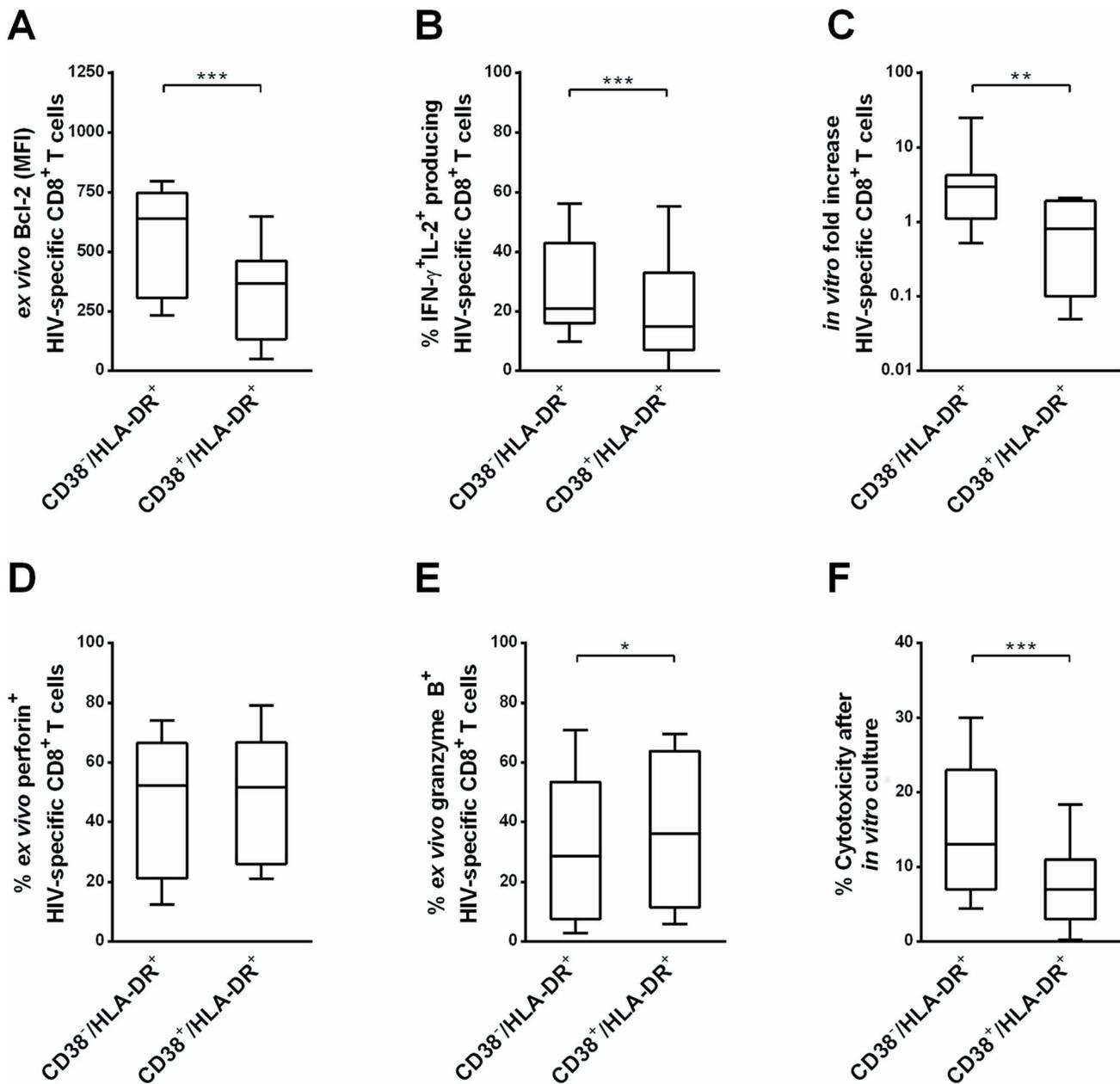
#### The conditions of stimulation determine CD38 and HLA-DR expression by specific CD8<sup>+</sup> T cells

Finally, we examined the mechanisms by which resting CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>-</sup> cells become CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> cells in the context of viral infection. For this purpose, we used an *in vitro* resting and fully unactivated model in which EBV-specific CD8<sup>+</sup> T cells which are mostly CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>-</sup> as shown in Figure 4 are stimulated by EBV peptides in various conditions.

We postulated that the CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> profile might result from a dual activation pathway, in which antigenic peptide stimulation leads to HLA-DR expression while indirect activation by IFN- $\alpha$  leads to CD38 expression [22,23]. As expected, IFN- $\alpha$  stimulation led to CD38 expression on bulk CD8<sup>+</sup> T cells (14% [7%–17%]) and, to a lesser degree, on EBV-specific CD8<sup>+</sup> T cells (9% [4%–28%]), whereas neither bulk nor EBV-specific CD8<sup>+</sup> T cells expressed HLA-DR (0% [0%–1%] and 0% [0%–1%] respectively; Figure 4, middle panel), confirming the non-specific

nature of IFN- $\alpha$ -induced activation. However, stimulation with EBV peptides led to strong expression of both CD38 and HLA-DR by EBV-specific cells (69% [53%–84%] vs 72% [61%–83%], respectively; Figure 4 lower panel), while no change was observed in the total CD8<sup>+</sup> T cell population. We suspected that the increase in CD38 expression might be related to IFN- $\alpha$  production by non T cells in this model, but neither blockade with an anti-IFN- $\alpha$ R antibody nor the use of highly purified CD8<sup>+</sup> T cells significantly modified our results.

Interestingly, the antigen concentration correlated positively with the degree of activation and also affected the profile of activated cells. At low antigen levels, most activated cells expressed HLA-DR but not CD38. Indeed, the frequency of CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> cells among activated cells was higher at low antigen levels (89% [44%–98%] and 2% [1%–11%] at 0.2 nM and 2000 nM, respectively;  $P = 0.0006$ , Fig. 5A), whereas CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> cells exhibited the opposite behavior (4% [0%–14%] vs 91% [78%–97%] at 0.2 nM and 2000 nM, respectively;  $P = 0.001$ , Fig. 5B).



**Figure 3. Qualitative features of CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> and CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cell subsets in HIC.** (A) Bcl-2 expression on CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> and CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells (n = 11). (B) Proportion of CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> and CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells producing both IFN- $\gamma$  and IL-2 among HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells producing IFN- $\gamma$  or IL-2 (n = 35). (C) Fold increase in CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> and CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cell numbers after 5 days of culture with HIV peptides (2  $\mu$ M) (n = 7). (D-E) Proportion of CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> and CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells producing perforin (D) and granzyme B (E) (n = 35). (F) Graphs representing percentage cytotoxicity (measured as granzyme-B-mediated intracellular cleavage of a fluorogenic substrate) of CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> and CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells (n = 11). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

doi:10.1371/journal.pone.0101920.g003

The CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> phenotype by specific CD8<sup>+</sup> T cells in HIC is conditioned by low viral loads and high antigen sensitivity

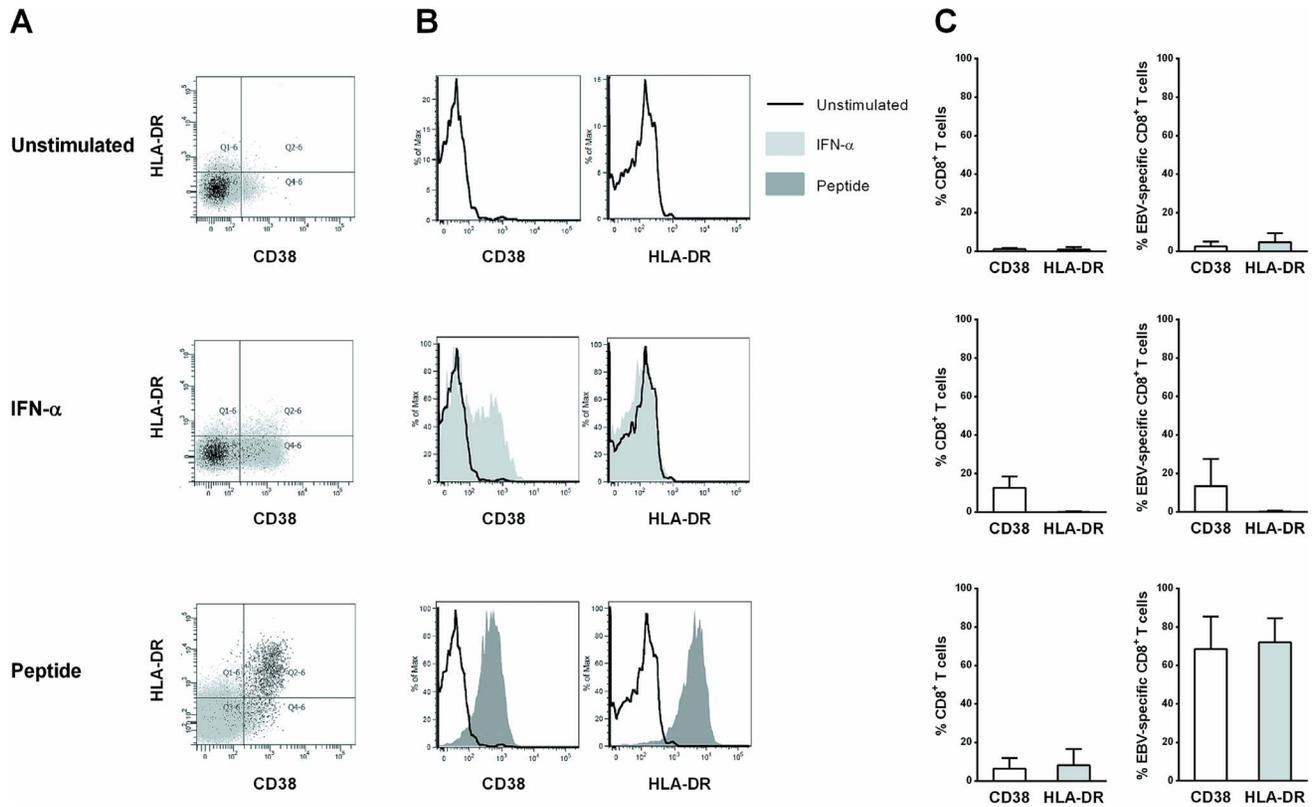
HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cell sensitivity to cognate antigen, measured with an ELISpot assay, showed an overall positive correlation between the frequency of *ex vivo* CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> in these cells and the antigen sensitivity of HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells ( $r = 0.34$ ,  $P = 0.01$ , Figure 6A), whereas no such correlation was

seen with CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>-</sup> cells ( $P = 0.39$ ) or CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> cells ( $P = 0.05$ , Figure 6B).

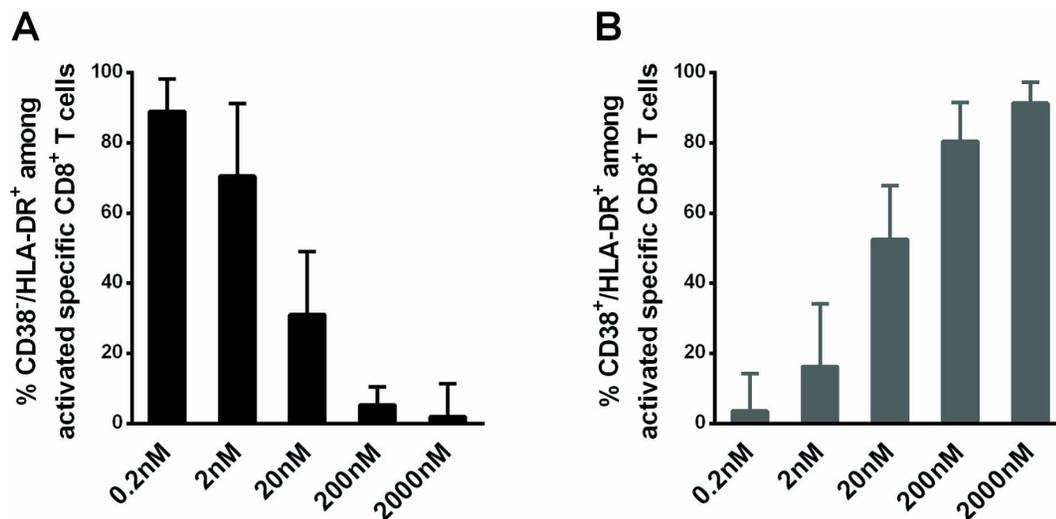
These results suggest strongly that the CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> subset is induced in the context of low viral loads and expressed on highly avid cells.

## Discussion

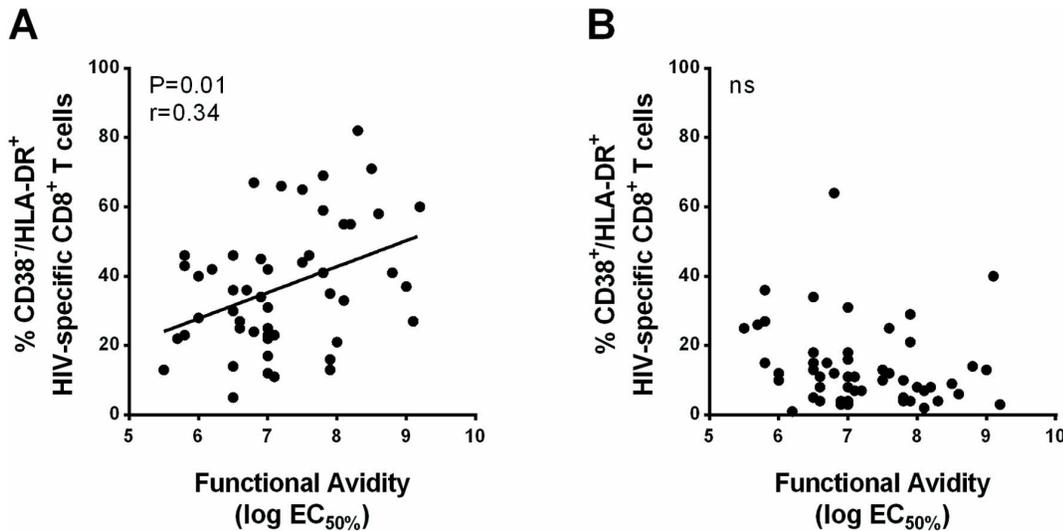
HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells in HIV controllers were initially shown to exhibit (i) efficient proliferation and cytotoxicity [10,11],



**Figure 4. Influence of stimulatory conditions on the activation phenotype of specific CD8<sup>+</sup> T cells.** (A) Representative dot plots of HLA-DR and CD38 expression in unstimulated conditions (upper graph), after IFN- $\alpha$  stimulation (middle graph) or peptide stimulation (2  $\mu$ M, lower graph) among specific (dark dots) and non-specific (gray dots) CD8<sup>+</sup> T cells from healthy donors after a four-day culture period. CD38 and HLA-DR expression in bulk (C left panel) and specific CD8<sup>+</sup> T cells (B and C right panel). (B) Flow cytometry histograms showing representative results for cells from one individual in unstimulated conditions (dark lines), after IFN- $\alpha$  stimulation (light gray histograms) or peptide stimulation (dark gray histograms). (C) Surface expression of CD38 (white bars) and HLA-DR (gray bars) on bulk and specific CD8<sup>+</sup> T cells (n = 4). doi:10.1371/journal.pone.0101920.g004



**Figure 5. Stimulation with a low antigen concentration induces the CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> phenotype on specific CD8<sup>+</sup> T cells.** (A) Graphs representing the frequency of (A) CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> cells (dark histograms) and (B) CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> cells (dark gray histograms) among activated EBV-specific healthy donor CD8<sup>+</sup> T cells (i.e. those expressing CD38 and/or HLA-DR) after a four-day culture period (n = 8). doi:10.1371/journal.pone.0101920.g005



**Figure 6. High antigen sensitivity is associated with a high frequency of CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> cells in HIC.** The antigen sensitivity of HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells was measured in ELISpot assays with serial limiting dilutions of antigenic peptides (from 10<sup>-5</sup> to 10<sup>-11</sup> M) and was expressed as the log molar concentration of peptide yielding 50% of the maximum response (EC<sub>50%</sub>). Correlations between the proportion of CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> (A) or CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> (B) and the antigen sensitivity of HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells from HIC. Correlations were evaluated using the Spearman rank correlation coefficient. The Spearman  $r$  correlation and the Pearson correlation curve are indicated for significant correlations ( $n = 47$ ). doi:10.1371/journal.pone.0101920.g006

(ii) strong virus suppression *ex vivo* [13], and (iii) a particular activation phenotype: CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> [13,15]. Little is known about this CD8<sup>+</sup> T cell subset and its possible role in HIC. The activation status of this CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> subset in HIC is puzzling, as HLA-DR expression suggests an activated state, while the lack of CD38 expression suggests the opposite. None of the other activation markers studied here were expressed by these cells, including those expressed early after activation, such as CD69 and CD25, and those expressed later, such as CD71 and CD40 [24,25]. This exclusive HLA-DR expression suggests a low state of activation, and is in keeping with absent expression of Ki-67, a marker of cell cycling. A previous study showed coexpression of HLA-DR and Ki-67 by these cells after immunotherapy, but the authors did not evaluate CD38 expression [26].

This low level of activation is compatible with efficient survival evaluated here in terms of Bcl-2 expression level, and also with good proliferative potential. Previous studies showed an association between HLA-DR expression and proliferation [26,27]. And indeed, these CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> cells expanded 3-fold in culture, whereas their CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> counterparts did not expand significantly. Of note, this expansion of CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> cells was associated with differentiation into effector cells, as their HIV-specific cytotoxicity was higher than that of CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> cells, even after adjusting for the HIV-specific-effector-to-target ratio. These data confirm those reported by Blankson et al., who showed that sorted CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells from HIC, when placed in short-term culture with autologous unstimulated CD4<sup>+</sup> T cells, were the first cells to suppress viral replication [28]. Additionally, although CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> and CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> showed similar *ex vivo* cytotoxic capacity, the very low frequency of CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> cells, and their poor proliferative capacity shown here and elsewhere [29], make it unlikely that this population has a major role in suppressing viral replication. These data suggest that *in vivo* CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> cells which are less susceptible than CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> cells to exhaustion, have a greater capacity to control viral replication than CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> cells. Although we and others have observed that HIV-

specific CD8<sup>+</sup> T cells from some HIC patients lack HIV-suppressive activity *ex vivo*, they are capable of differentiating when exposed to cognate antigens, acquiring the ability to lyse infected cells and to suppress HIV replication [30].

We also explored the conditions in which the CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> phenotype is generated by using an *in vitro* model with EBV peptides and cells from healthy donors. We needed a non-activated condition to evaluate the mechanism of CD38 and HLA-DR expression. EBV infection is a model of infection with effective memory resting cells while HIV infection leads to persistent activation and inflammation even in HIC. Therefore, we believed that the EBV-model is a more appropriate model to address the question of CD38 and HLA-DR induction after activation. We confirmed that IFN- $\alpha$  induces CD38 expression but not HLA-DR expression [22,23] and that this activation is not virus-specific. Conversely, EBV peptide stimulation led to activation of EBV-specific CD8<sup>+</sup> T cells expressing both CD38 and HLA-DR. It has been shown that strong TCR stimulation by anti-CD3/CD28 leads to *cd38* transcription in purified CD8<sup>+</sup> T cells [23], possibly explaining how CD38 is expressed following peptide stimulation even in IFN- $\alpha$ -antagonizing conditions. However, we found that low EBV peptide concentrations elicited the CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> phenotype on the vast majority of activated cells, in keeping with the low viral load and lack of IFN- $\alpha$  production in experimental models of viral control [31]. Although plasmacytoid dendritic cells from HIC are able to produce IFN- $\alpha$  efficiently after HIV antigen stimulation *in vitro* [32,33], HIC do not produce detectable IFN- $\alpha$  *in vivo*, as shown by tissue studies [34], which can explain the absence of IFN- $\alpha$  pathway mediated CD38 expression. The discrepancy between the low frequency of CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> cells among virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells in our *in vitro* model and the high frequency observed *in vivo* in HIC may be due to the contrast between brief activation *in vitro* and chronic activation by low HIV viral loads in HIC. The preferential activation of the CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> subset by low antigen concentrations is particularly interesting, as memory cells activated by low antigen concentrations show little senescence, have high proliferation

rates, are able to persist for long periods [35], and maintain their TCR on the membrane surface, enabling a persistent cytotoxic response [36]. Furthermore, the peptide concentrations that yielded the CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> phenotype in our *in vitro* EBV model are similar to the estimated concentrations of HIV antigens present *in vivo* [37,38]. In addition, the high antigen sensitivity observed in HIC may reinforce preferential induction of the CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> profile on the most sensitive cells, which are endowed with the best functional profile [21,38–40]. Indeed, antigen sensitivity has been shown to correlate negatively with HIV cellular viral load [40]. However, high antigen sensitivity is not the only feature that can explain HIC status. Indeed, we observed no increase in the frequency of CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> cells in patients positive for HLA-B\*27 or HLA-B\*57 ([21] and data not shown) whereas antigen sensitivity is particularly high in this context [21,39]. We moreover observed no difference in the frequency of this subset when comparing different HIV peptide specificities (data not shown). In addition, we have previously reported a lack of difference in perforin expression and inhibition of viral replication between HIC with and without protective HLA alleles [21,41].

T cell activation is necessary for effector functions such as cytotoxicity and suppression of viral replication, but the persistent immune activation associated with systemic inflammation is known to play a key role in HIV disease progression [42,43]. This is also the case in HIC, who display low but higher frequencies of classical activated CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells than do healthy donors (HD) and HAART-treated patients [43]. This excessive immune activation may result from the persistence of extremely low levels of HIV replication [44] and/or enhanced microbial translocation from the gut [45]. HIC exhibit a degree of disease progression and sometimes experience a decline in CD4<sup>+</sup> T cells or even lose their ability to control HIV [46], possibly as a result of persistent immune activation [46,47]. Alternatively, CD4<sup>+</sup> T cell activation might permit persistent low-level infection of these cells, in turn maintaining efficient stimulation of the HIV-specific immune response [21,43] and thereby helping to control viral replication through inducing CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> profile.

## Conclusions

The paradoxical activation profile of some HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells, with HLA-DR but not CD38 expression and weak expression of all other activation markers, might confer the capacity to differentiate into effective cytotoxic cells after moderate activation [28] while avoiding the deleterious effects of excessive immune activation. It would be a favorable condition as compared to HAART-treated patients who display a very low viral load which leads to an absence of immune activation and effective response and as compared to viremic patients who display high viral load which leads to excessive activation and exhaustion. A high frequency of CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> cells among total CD8<sup>+</sup> T

cells has been linked to slow HIV disease progression and high CD4<sup>+</sup> T cell counts [48]. We suspect that the expansion of this particular activated subset will lead to effective HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells capable of rapid viral suppression. Induction of this protective cell subset by activation with low concentrations of HIV antigens, together with limited lymphocyte activation, might have implications for HIV vaccine strategies.

## Supporting Information

**Figure S1 Example of gating strategy of subsets of HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells in HIV controllers.** Cells were gated (A) on live cells using live/dead stain cells kit, (B) on lymphocytes, (C) on CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> expressing cells, (D) on HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells using tetramer staining, (E) on different subset of CD38 and HLA-DR expressing cells using isotypes as control.

(TIF)

**Figure S2 Dot plots of activation marker expression and cytokine production on different subsets of HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells in HIV controllers.** Representative dot plots of CD25 and CD40 (A), CD69 and CD71 (B), Ki67 (C) expression and IL-2 and/or IFN- $\gamma$  secretion (D) on CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>-</sup> (left panel), CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> (middle panel) and CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> (right panel) subsets

(TIF)

**Figure S3 Dot plots of the cytotoxic assay of CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> and CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells.** Cytotoxic capacity was assessed by measuring the frequency of positive target cells for granzyme B substrate. The results were expressed as the difference between the frequency using effector cells co-cultured with target cells incubated with the relevant peptide (B and D) and the frequency in the negative control using effector cells co-cultured with target cells incubated with irrelevant peptide (A and C).

(TIF)

## Acknowledgments

The authors thank all the clinicians and the patients from all of the participating centers of the French HIV Controllers cohort (Agence Nationale de Recherche sur le SIDA, CO21-CODEX Cohort) and of the French PRIMO cohort (ANRS CO6-PRIMO Cohort). We also thank Christine Rouzioux for the data on viral RNA, Sandie Gérard for technical support, David Young who edited the English text and Christine Bourgeois and Nicolas Noel for helpful discussions.

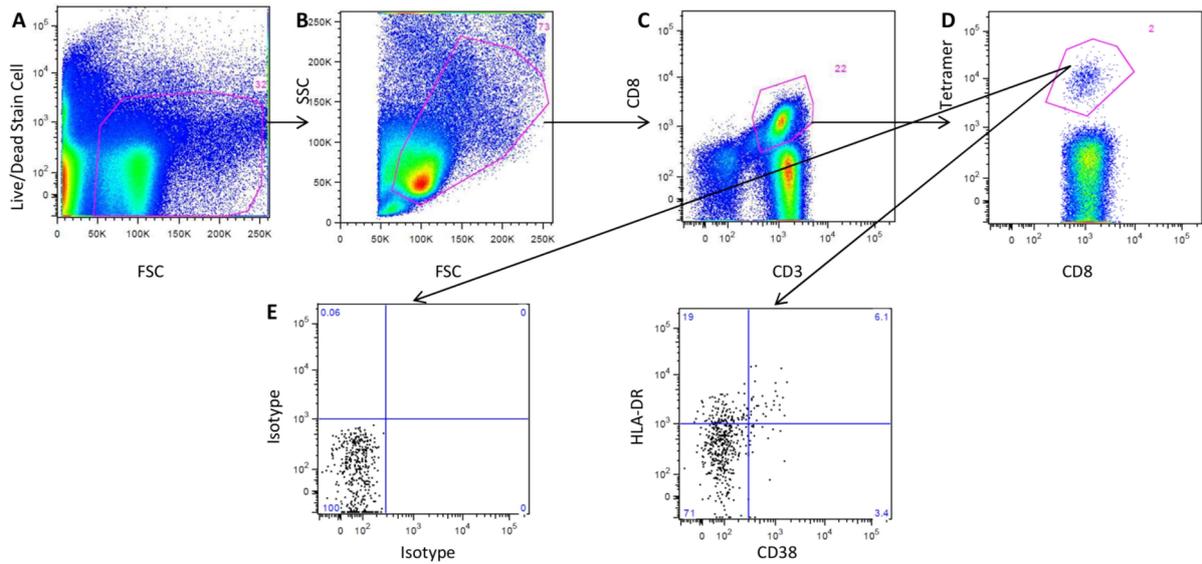
## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AS-C GP OL MS AV. Performed the experiments: SH CL IG AS-C PV. Analyzed the data: SH CL MS AV. Contributed to the writing of the manuscript: SH CL AV. Helped to coordinate the French CODEX cohort: FB OT OL.

## References

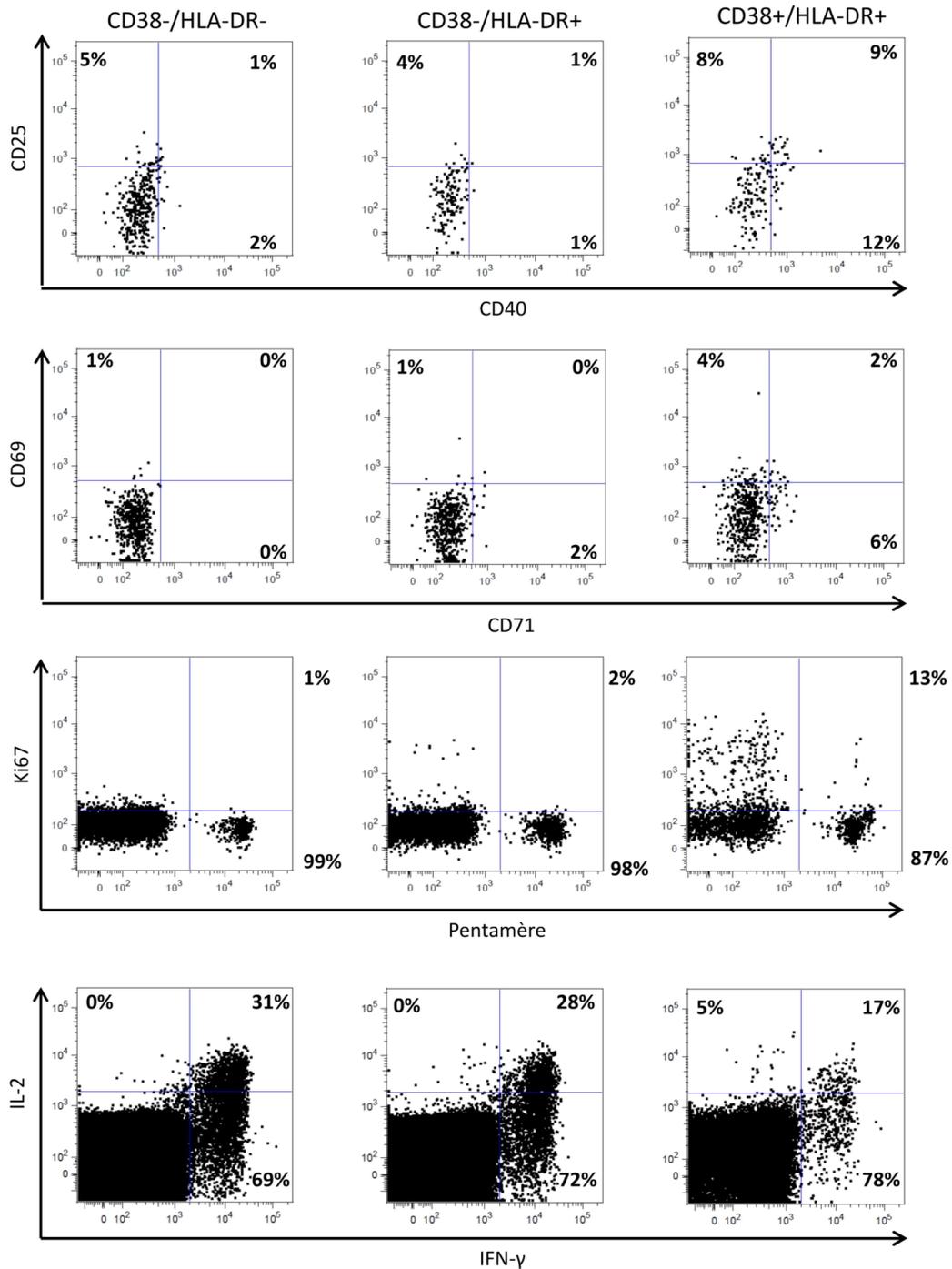
- Deeks SG, Walker BD (2007) Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity* 27: 406–416. doi:10.1016/j.immuni.2007.08.010.
- Lambotte O, Boufassa F, Madec Y, Nguyen A, Goujard C, et al. (2005) HIV Controllers: A Homogeneous Group of HIV-1–Infected Patients with Spontaneous Control of Viral Replication. *Clin Infect Dis* 41: 1053–1056. doi:10.1086/433188.
- Sáez-Cirión A, Pancino G (2013) HIV controllers: a genetically determined or inducible phenotype? *Immunol Rev* 254: 281–294. doi:10.1111/imr.12076.
- Carrington M, O'Brien SJ (2003) The influence of HLA genotype on AIDS. *Annu Rev Med* 54: 535–551. doi:10.1146/annurev.med.54.101601.152346.
- Carrington M, Walker BD (2012) Immunogenetics of spontaneous control of HIV. *Annu Rev Med* 63: 131–145. doi:10.1146/annurev-med-062909-130018.
- Goulder PJR, Walker BD (2012) HIV and HLA class I: an evolving relationship. *Immunity* 37: 426–440. doi:10.1016/j.immuni.2012.09.005.
- Loffredo JT, Maxwell J, Qi Y, Glidden CE, Borchardt GJ, et al. (2007) Mamu-B\*08-positive macaques control simian immunodeficiency virus replication. *J Virol* 81: 8827–8832. doi:10.1128/JVI.00895-07.
- Yant LJ, Friedrich TC, Johnson RC, May GE, Maness NJ, et al. (2006) The High-Frequency Major Histocompatibility Complex Class I Allele Mamu-B\*17 Is Associated with Control of Simian Immunodeficiency Virus SIVmac239 Replication. *J Virol* 80: 5074–5077. doi:10.1128/JVI.80.10.5074-5077.2006.
- Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, et al. (2006) HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *Blood* 107: 4781–4789. doi:10.1182/blood-2005-12-4818.

10. Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, Sabbaghian MS, Rabin R, et al. (2002) HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat Immunol* 3: 1061–1068. doi:10.1038/nr845.
11. Migueles SA, Osborne CM, Royce C, Compton AA, Joshi RP, et al. (2008) Lytic granule loading of CD8<sup>+</sup> T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity* 29: 1009–1021. doi:10.1016/j.immuni.2008.10.010.
12. Chen H, Piechocka-Trocha A, Miura T, Brockman MA, Julg BD, et al. (2009) Differential Neutralization of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Replication in Autologous CD4<sup>+</sup> T Cells by HIV-Specific Cytotoxic T Lymphocytes. *J Virol* 83: 3138–3149. doi:10.1128/JVI.02073-08.
13. Sáez-Cirión A, Lacabartz C, Lambotte O, Versmisse P, Urrutia A, et al. (2007) HIV controllers exhibit potent CD8<sup>+</sup> T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 6776–6781. doi:10.1073/pnas.0611244104.
14. Doisne J-M, Urrutia A, Lacabartz-Porret C, Goujard C, Meyer L, et al. (2004) CD8<sup>+</sup> T cells specific for EBV, cytomegalovirus, and influenza virus are activated during primary HIV infection. *J Immunol Baltim Md* 1950 173: 2410–2418.
15. Sáez-Cirión A, Sinet M, Shin SY, Urrutia A, Versmisse P, et al. (2009) Heterogeneity in HIV suppression by CD8<sup>+</sup> T cells from HIV controllers: association with Gag-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses. *J Immunol Baltim Md* 1950 182: 7828–7837. doi:10.4049/jimmunol.0803928.
16. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R (2002) Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2: 251–262. doi:10.1038/nri778.
17. Sachdeva M, Fischl MA, Pahwa R, Sachdeva N, Pahwa S (2010) Immune Exhaustion Occurs Concomitantly With Immune Activation and Decrease in Regulatory T Cells in Viremic Chronically HIV-1-Infected Patients: *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr* 54: 447–454. doi:10.1097/QAI.0b013e3181e0c7d0.
18. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, et al. (2006) Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* 12: 1198–1202. doi:10.1038/nm1482.
19. Deeks SG, Kitchen CMR, Liu L, Guo H, Gascon R, et al. (2004) Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4<sup>+</sup> T-cell changes independent of viral load. *Blood* 104: 942–947. doi:10.1182/blood-2003-09-3333.
20. Sáez-Cirión A, Shin SY, Versmisse P, Barré-Sinoussi F, Pancino G (2010) Ex vivo T cell-based HIV suppression assay to evaluate HIV-specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses. *Nat Protoc* 5: 1033–1041. doi:10.1038/nprot.2010.73.
21. Lécroux C, Sáez-Cirión A, Girault I, Versmisse P, Boufassa F, et al. (2014) Both HLA-B\*57 and plasma HIV RNA levels contribute to the HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cell response in HIV controllers. *J Virol* 88: 176–187. doi:10.1128/JVI.02098-13.
22. Manion M, Rodriguez B, Medvik K, Hardy G, Harding CV, et al. (2012) Interferon-alpha administration enhances CD8<sup>+</sup> T cell activation in HIV infection. *PLoS One* 7: e30306. doi:10.1371/journal.pone.0030306.
23. Hervas-Stubbs S, Riezu-Boj J-I, Gonzalez I, Mancheño U, Dubrot J, et al. (2010) Effects of IFN- $\alpha$  as a signal-3 cytokine on human naïve and antigen-experienced CD8<sup>+</sup> T cells. *Eur J Immunol* 40: 3389–3402. doi:10.1002/eji.201040664.
24. Bourgeois C, Rocha B, Tanchot C (2002) A Role for CD40 Expression on CD8<sup>+</sup> T Cells in the Generation of CD8<sup>+</sup> T Cell Memory. *Science* 297: 2060–2063. doi:10.1126/science.1072615.
25. Caruso A, Licenziati S, Corulli M, Canaris A, De Francesco M, et al. (1997) Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry* 27: 71–76. doi:10.1002/(SICI)1097-0320(19970101)27:1<71::AID-CYTO9>3.0.CO;2-O.
26. Speiser DE, Migliaccio M, Pittet MJ, Valmori D, Liénard D, et al. (2001) Human CD8<sup>+</sup> T cells expressing HLA-DR and CD28 show telomerase activity and are distinct from cytolytic effector T cells. *Eur J Immunol* 31: 459–466. doi:10.1002/1521-4141(200102)31:2<459::AID-IMMU459>3.0.CO;2-Y.
27. Imamichi H, Lempicki RA, Adelsberger JW, Hasley RB, Rosenberg A, et al. (2012) The CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> T cells expanded in HIV-1 infection are qualitatively identical to those from healthy controls. *Eur J Immunol* 42: 2608–2620. doi:10.1002/eji.201142046.
28. Buckheit RW III, Salgado M, Silciano RF, Blankson JN (2012) Inhibitory potential of subpopulations of CD8<sup>+</sup> T cells in HIV-1-infected elite suppressors. *J Virol* 86: 13679–13688. doi:10.1128/JVI.02439-12.
29. Sandoval-Montes C, Santos-Argumedo L (2005) CD38 is expressed selectively during the activation of a subset of mature T cells with reduced proliferation but improved potential to produce cytokines. *J Leukoc Biol* 77: 513–521. doi:10.1189/jlb.0404262.
30. Ndhlovu ZM, Proudfoot J, Cesa K, Alvino DM, McMullen A, et al. (2012) Elite controllers with low to absent effector CD8<sup>+</sup> T cell responses maintain highly functional, broadly directed central memory responses. *J Virol* 86: 6959–6969. doi:10.1128/JVI.00531-12.
31. Campillo-Gimenez L, Laforce M, Fay M, Brussel A, Cumont M-C, et al. (2010) Nonpathogenesis of simian immunodeficiency virus infection is associated with reduced inflammation and recruitment of plasmacytoid dendritic cells to lymph nodes, not to lack of an interferon type I response, during the acute phase. *J Virol* 84: 1838–1846. doi:10.1128/JVI.01496-09.
32. Barblu L, Machmach K, Gras C, Delfraissy J-F, Boufassa F, et al. (2012) Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) from HIV controllers produce interferon- $\alpha$  and differentiate into functional killer pDCs under HIV activation. *J Infect Dis* 206: 790–801. doi:10.1093/infdis/jis384.
33. Herbeval J-P, Shearer GM (2007) HIV-1 immunopathogenesis: How good interferon turns bad. *Clin Immunol* 123: 121–128. doi:10.1016/j.clim.2006.09.016.
34. Herbeval J-P, Nilsson J, Boasso A, Hardy AW, Kruhlak MJ, et al. (2006) Differential expression of IFN-alpha and TRAIL/DR5 in lymphoid tissue of progressor versus nonprogressor HIV-1-infected patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 7000–7005. doi:10.1073/pnas.0600363103.
35. West EE, Youngblood B, Tan WG, Jin H-T, Araki K, et al. (2011) Tight regulation of memory CD8<sup>+</sup> T cells limits their effectiveness during sustained high viral load. *Immunity* 35: 285–298. doi:10.1016/j.immuni.2011.05.017.
36. Betts MR, Price DA, Brenchley JM, Loré K, Guenaga FJ, et al. (2004) The functional profile of primary human antiviral CD8<sup>+</sup> T cell effector activity is dictated by cognate peptide concentration. *J Immunol Baltim Md* 1950 172: 6407–6417.
37. Varela-Rohena A, Molloy PE, Dunn SM, Li Y, Suhoski MM, et al. (2008) Control of HIV-1 immune escape by CD8<sup>+</sup> T cells expressing enhanced T-cell receptor. *Nat Med* 14: 1390–1395. doi:10.1038/nm.1779.
38. Almeida JR, Sauce D, Price DA, Papagno L, Shin SY, et al. (2009) Antigen sensitivity is a major determinant of CD8<sup>+</sup> T-cell polyfunctionality and HIV-suppressive activity. *Blood* 113: 6351–6360. doi:10.1182/blood-2009-02-206557.
39. Berger CT, Frahm N, Price DA, Mothe B, Ghebremichael M, et al. (2011) High-functional-avidity cytotoxic T lymphocyte responses to HLA-B-restricted Gag-derived epitopes associated with relative HIV control. *J Virol* 85: 9334–9345. doi:10.1128/JVI.00460-11.
40. Almeida JR, Price DA, Papagno L, Arkoub ZA, Sauce D, et al. (2007) Superior control of HIV-1 replication by CD8<sup>+</sup> T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J Exp Med* 204: 2473–2485. doi:10.1084/jem.20070784.
41. Hersperger AR, Pereyra F, Nason M, Demers K, Sheth P, et al. (2010) Perforin expression directly ex vivo by HIV-specific CD8<sup>+</sup> T-cells is a correlate of HIV elite control. *PLoS Pathog* 6: e1000917. doi:10.1371/journal.ppat.1000917.
42. Giorgi JV, Lyles RH, Matud JL, Yamashita TE, Mellors JW, et al. (2002) Predictive value of immunologic and virologic markers after long or short duration of HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999 29: 346–355.
43. Hunt PW, Brenchley J, Sinclair E, McCune JM, Roland M, et al. (2008) Relationship between T cell activation and CD4<sup>+</sup> T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J Infect Dis* 197: 126–133. doi:10.1086/524143.
44. Pereyra F, Palmer S, Miura T, Block BL, Wiegand A, et al. (2009) Persistent Low-Level Viremia in HIV-1 Elite Controllers and Relationship to Immunologic Parameters. *J Infect Dis* 200: 984–990. doi:10.1086/605446.
45. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, et al. (2006) Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 12: 1365–1371. doi:10.1038/nm1511.
46. Boufassa F, Sáez-Cirion A, Lechenadec J, Zucman D, Avettand-Fenoel V, et al. (2011) CD4 dynamics over a 15 year-period among HIV controllers enrolled in the ANRS French observatory. *PLoS One* 6: e18726. doi:10.1371/journal.pone.0018726.
47. Okulicz JF, Marconi VC, Landrum ML, Wegner S, Weintrob A, et al. (2009) Clinical Outcomes of Elite Controllers, Viremic Controllers, and Long-Term Nonprogressors in the US Department of Defense HIV Natural History Study. *J Infect Dis* 200: 1714–1723. doi:10.1086/646609.
48. Giorgi JV, Ho HN, Hirji K, Chou CC, Hultin LE, et al. (1994) CD8<sup>+</sup> lymphocyte activation at human immunodeficiency virus type 1 seroconversion: development of HLA-DR<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> cells is associated with subsequent stable CD4<sup>+</sup> cell levels. The Multicenter AIDS Cohort Study Group. *J Infect Dis* 170: 775–781.



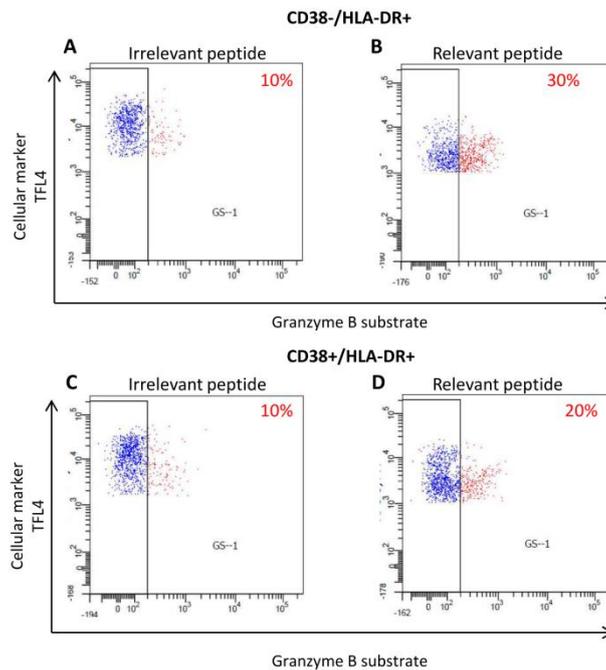
**Figure S1. Example of gating strategy of subsets of HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells in HIV controllers**

Cells were gated (A) on live cells using live/dead stain cells kit, (B) on lymphocytes, (C) on CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> expressing cells, (D) on HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells using tetramer staining, (E) on different subset of CD38 and HLA-DR expressing cells using isotypes as control.



**Figure S2. Dot plots of activation marker expression and cytokine production on different subsets of HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells in HIV controllers**

Representative dot plots of CD25 and CD40 (A), CD69 and CD71 (B), Ki67 (C) expression and IL-2 and/or IFN- $\gamma$  secretion (D) on CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>-</sup> (left panel), CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> (middle panel) and CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> (right panel) subsets



**Figure S3. Dot plots of the cytotoxic assay of CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> and CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells**

Cytotoxic capacity was assessed by measuring the frequency of positive target cells for granzyme B substrate. The results were expressed as the difference between the frequency using effector cells co-cultured with target cells incubated with the relevant peptide (B and D) and the frequency in the negative control using effector cells co-cultured with target cells incubated with irrelevant peptide (A and C).

## **Article 2 : High Eomesodermin expression among CD57<sup>+</sup> CD8 T cells identifies a CD8 T cell subset associated with viral control during human immunodeficiency virus infection**

Federico Simonetta\*, Stéphane Hua\*, Camille Lecuroux, Sandie Gérard, Faroudy Boufassa, Asier Sáez-Ciri3n, Gianfranco Pancino, Cécile Goujard, Olivier Lambotte, Alain Venet and Christine Bourgeois (\* co-auteurs)

Accepté à Journal of Virology

### **Hypothèse et objectif de recherche**

Les HIC sont caractérisés par des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH fonctionnels qui présentent de fortes capacités effectrices comme une meilleure cytotoxicité contrairement aux cellules des autres patients infectés par le VIH.

Les fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup> sont sous le contrôle des facteurs de transcription de la « boîte T », T-bet et Eomes. Les études sur T-bet ont permis de montrer que ce facteur de transcription est plus exprimé sur les cellules des HIC comparativement à celles des autres patients et associé à un meilleur potentiel cytotoxique [344]. Cependant, peu d'études se sont intéressées à l'expression d'Eomes chez les patients infectés par le VIH et son rôle reste pour le moment ambigu. Une étude récente démontre que l'expression d'Eomes est plus importante chez les patients virémiques [356] alors qu'une autre étude montre que l'expression *Eomes* en ARN<sub>m</sub> des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH diminue significativement de la primo-infection à la phase chronique [357] ce qui suggère que l'expression d'Eomes est associée à la perte de la fonctionnalité des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH. Aucune étude n'a pour le moment été effectuée concernant l'expression d'Eomes chez les HIC.

De plus, il a été montré récemment que l'expression de CD57, qui est habituellement utilisé comme un marqueur de sénescence, permet d'identifier les cellules qui expriment fortement les molécules cytotoxiques et qui ont donc un fort potentiel cytolytique [358] mais cette association entre CD57 et cytotoxicité n'a pas pour le moment été étudiée chez les HIC. .

Nous avons dans cette étude voulu évaluer les différents paramètres qui permettent de définir les LT CD8<sup>+</sup> avec une bonne capacité cytotoxique comme observée chez les cellules des HIC

en étudiant l'expression des facteurs de transcription, T-bet et Eomes, et de CD57 sur les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH. L'hypothèse formulée est qu'il existe différents niveaux d'expression de CD57, de T-bet et d'Eomes avec des capacités cytotoxiques différentes. Nous émettons l'hypothèse que les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH des HIC présentent préférentiellement un profil d'expression de ces 3 marqueurs et que les cellules des autres groupes de patients VIH<sup>+</sup> vont avoir un profil d'expression de ces 3 marqueurs différent. Pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, nous avons effectué une étude comparative de l'expression de CD57, d'Eomes et de T-bet au sein des différents groupes de patients infectés par le VIH.

Les objectifs de cet article ont donc été les suivants :

- Etudier le niveau d'expression de CD57 dans les différents groupes de patients : témoins sains, patients en primo infection, patients virémiques, patients sous traitement et HIC.
- Mise en évidence de l'hétérogénéité de l'expression d'Eomes : Eomes<sup>-</sup>, Eomes<sup>int</sup> et Eomes<sup>hi</sup> en l'associant au marquage CD57.
- Caractériser les sous populations Eomes<sup>hi</sup>CD57<sup>+</sup> et Eomes<sup>int</sup>CD57<sup>+</sup> sur l'état de différenciation, les fonctions effectrices et la survie
- Mise en évidence d'une sous population exprimée préférentiellement chez les HIC : Eomes<sup>hi</sup>CD57<sup>+</sup>

## High Eomesodermin Expression among CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T Cells Identifies a CD8<sup>+</sup> T Cell Subset Associated with Viral Control during Chronic Human Immunodeficiency Virus Infection

Federico Simonetta, Stéphane Hua, Camille Lécuroux, Sandie Gérard, Faroudy Boufassa, Asier Sáez-Ciri3n, Gianfranco Pancino, Cécile Goujard, Olivier Lambotte, Alain Venet and Christine Bourgeois  
*J. Virol.* 2014, 88(20):11861. DOI: 10.1128/JVI.02013-14.  
Published Ahead of Print 6 August 2014.

---

Updated information and services can be found at:  
<http://jvi.asm.org/content/88/20/11861>

---

*These include:*

### REFERENCES

This article cites 32 articles, 21 of which can be accessed free at: <http://jvi.asm.org/content/88/20/11861#ref-list-1>

### CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), [more»](#)

---

---

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>  
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

---

# High Eomesodermin Expression among CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T Cells Identifies a CD8<sup>+</sup> T Cell Subset Associated with Viral Control during Chronic Human Immunodeficiency Virus Infection

Federico Simonetta,<sup>a,b,c</sup> Stéphane Hua,<sup>a,b</sup> Camille Lécuroux,<sup>a,b</sup> Sandie Gérard,<sup>a,b</sup> Faroudy Boufassa,<sup>d</sup> Asier Sáez-Cirión,<sup>e</sup> Gianfranco Pancino,<sup>e</sup> Cécile Goujard,<sup>b,f</sup> Olivier Lambotte,<sup>a,b,f</sup> Alain Venet,<sup>a,b</sup> Christine Bourgeois<sup>a,b</sup>

INSERM, U1012, Le Kremlin-Bicêtre, France<sup>a</sup>; Université Paris-Sud, UMR-S1012, Le Kremlin-Bicêtre, France<sup>b</sup>; Division of Hematology, Department of Medical Specialties, Geneva University Hospitals, Geneva, Switzerland<sup>d</sup>; INSERM UMR-S 1018, Centre d'études en santé publique, Le Kremlin-Bicêtre, France<sup>e</sup>; Institut Pasteur, Unité de Régulation des Infections Rétrovirales, Paris, France<sup>e</sup>; AP-HP, Hôpital Bicêtre, Service de Médecine Interne et Immunologie clinique, Le Kremlin-Bicêtre, France<sup>f</sup>

## ABSTRACT

During HIV infection, increased CD57 expression among CD8<sup>+</sup> T cells has been associated with immune senescence and defective immune responses. Interestingly, CD57-expressing CD8<sup>+</sup> T cells exhibit a dual profile, being simultaneously highly cytotoxic (terminally differentiated effectors) and poorly proliferative (replicative senescent). Recent publications point toward a positive role of CD57-expressing CD8<sup>+</sup> T cell subsets, presumably due to their high cytolytic activity. We further investigated the phenotype of CD57-expressing CD8<sup>+</sup> T cells in healthy donors and during HIV infection combining CD57 expression to Eomesodermin (EOMES), a T box transcription factor which determines, coordinately with T-bet, effector and memory CD8<sup>+</sup> T cell differentiation. We defined in healthy donors two functionally distinct CD57-expressing CD8<sup>+</sup> T cell subsets exhibiting different levels of EOMES expression: EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> and EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells. EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> cells exhibited low cytotoxic activity but preserved proliferative capacity and interleukin 7 (IL-7) receptor expression, whereas EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> cells exhibited obvious cytotoxic functions and a more terminally differentiated phenotype. We next performed a similar analysis in different contexts of HIV infection: primary infected patients, long-term viremic patients, aviremic patients treated with antiretroviral therapy, and HIV controllers; we demonstrated a higher percentage of CD57-expressing cells in all HIV-infected patients regardless of virological status. When heterogeneity in EOMES expression among CD57 cells was taken into account, we detected significantly higher proportions of EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> cells among HIV-specific and nonspecific CD8<sup>+</sup> T cells from HIV controllers than in aviremic antiretroviral-treated patients and viremic patients. Importantly, such a peculiar non-terminally differentiated EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> phenotypic profile was associated with viral control.

## IMPORTANCE

This study demonstrates that functional heterogeneity exists among CD57-expressing CD8 T cells, which include both terminally differentiated, highly cytotoxic EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells and less differentiated EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells, which do not exhibit immediate cytotoxic functions but present high proliferative capacity. Interestingly, HIV controllers present a high proportion of EOMES<sup>hi</sup> CD57 cells among CD57-expressing HIV-specific CD8 T cells compared to both long-term viremic and aviremic antiretroviral therapy (ART)-treated patients, suggesting a beneficial role for this cell subset in viral control.

During chronic HIV infection, virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells functionally decline, progressively losing their proliferative capacity and cytotoxic potential and progressing to exhaustion and/or senescence (1, 2) except in rare individuals: the HIV controllers (HIC). These patients exhibit persistently undetectable HIV RNA in the absence of antiretroviral therapy (ART) (3) and maintain polyfunctional HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells which retain proliferative potential (4–6) as well as the ability to produce effector cytokines and cytotoxic molecules (5–8). Such a peculiar, nonexhausted profile has been related to the presence of longer telomeres and higher levels of constitutive telomerase activity in HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells from HIC (2). CD57 expression identifies senescent human T cells displaying a terminally differentiated phenotype (1, 10–12) and increases during HIV infection, probably as a result of chronic immune activation (11, 13). Interestingly, CD57-expressing CD8<sup>+</sup> T cells exhibit a dual profile, being simultaneously highly efficient cytotoxic cells (terminally differentiated effectors) (14) and poor proliferative (replicative senescence) subsets (1).

However, recent publications provided new insights on the

role of CD57-expressing cells during HIV infection. Lee et al. demonstrated that HIV and cytomegalovirus (CMV) differently regulate CD57 expression on CD8<sup>+</sup> T cells, inducing terminal differentiation in CMV infection but accumulation of less differentiated cells in HIV infection, as assessed by a decreased proportion of CD57-expressing cells among CD28<sup>−</sup> CD8<sup>+</sup> T cells (15). The same group also demonstrated that proportions of CD57-expressing CD28<sup>−</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were increased following ART treatment (16). Additionally, low proportions of CD28<sup>−</sup> CD8<sup>+</sup> T

Received 11 July 2014 Accepted 28 July 2014

Published ahead of print 6 August 2014

Editor: G. Silvestri

Address correspondence to Christine Bourgeois, christine.bourgeois@u-psud.fr.

F.S. and S.H. contributed equally to this article.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JVI.02013-14

cells expressing CD57 were a predictive marker of mortality among ART-treated HIV-infected patients with advanced disease (16). These recent data point toward a positive role for CD57-expressing CD8<sup>+</sup> T cell subsets, presumably due to their high cytolytic activity, in contrast to the deleterious impact of immune senescence, usually associated with the CD57-expressing subsets. We further investigated the phenotype of CD57-expressing CD8<sup>+</sup> T cells combining CD57 expression to Eomesodermin (EOMES), a T box transcription factor which determines, coordinately with T-bet, effector CD8<sup>+</sup> T cell differentiation, regulating interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), perforin, and granzyme B expression (17–19), as well as memory CD8<sup>+</sup> T cell transition and maintenance (20–22). EOMES expression has been reported to be upregulated in early effectors and to further increase during memory differentiation (20). During murine chronic viral infections, maintained high T-bet expression has been associated with terminal effector differentiation (23, 24), whereas high EOMES expression correlates with the long-term memory fraction (25) and characterizes cells exhibiting increased proliferative potential, granzyme B production, and cytotoxicity (26). At present, the precise role performed by EOMES during HIV infection remains unclear: a recent report showed that EOMES expression was increased in viremic HIV patients (27), whereas *Eomes* mRNA has been shown to significantly decrease in HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells from primary HIV infection to chronic phase (28), suggesting that loss of EOMES expression could be associated with CD8<sup>+</sup> T cell functional decline.

In this report, we demonstrate functional heterogeneity among CD57-expressing CD8<sup>+</sup> T cells. By combining CD57 with EOMES expression, we were able to identify in healthy donors (HD) two functionally distinct subsets: EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells displaying a memory phenotype and EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells exhibiting high cytotoxic functions and a terminally differentiated phenotype. We performed a cross-sectional analysis of EOMES and CD57 expression in CD8<sup>+</sup> T cells isolated from different groups of HIV-infected patients: primary infected patients, ART-treated aviremic patients, chronically viremic patients, and HIV controllers. We showed that CD57 expression is increased in all HIV-infected patient groups studied, including HIV controllers. Taking into account heterogeneity in EOMES expression among CD57-expressing CD8<sup>+</sup> T cells, we showed that HIV controllers maintained significantly lower proportions of EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> cells and higher fractions of EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> cells among both HIV-specific and nonspecific CD8<sup>+</sup> T cells than both untreated viremic and ART-treated aviremic patients and that such a peculiar phenotype was associated with viral control.

These data suggest that CD57 expression *per se* is not a reliable marker of terminal differentiation, whereas the combination of EOMES and CD57 provided a more accurate insight on the tight balance between proliferating memory and cytotoxic terminally differentiated cells during HIV infection.

## MATERIALS AND METHODS

**Study participants.** We collected samples from 147 HIV-infected individuals with their informed consent. Thirty-two primary infected untreated patients were enrolled in the French ANRS multicenter PRIMO cohort (Agence Nationale de Recherche sur le SIDA, CO06). Primary infection was defined by HIV RNA positivity and by a negative or emerging antibody response. We also studied 30 untreated chronically infected patients who are referred to as viremic patients. Thirty-one ART-treated aviremic

TABLE 1 Characteristics of HIV-infected patients and healthy controls<sup>a</sup>

Group (no. of individuals)	Age (yrs)	Viral load (log <sub>10</sub> copies/ml)	CD4 count (cells/ $\mu$ l)
Healthy donors (21)	49 (31–58)		
Primary infected patients (32)	35 (30–40)	5.2 (4.7–5.8)	469 (363–614)
ART untreated patients (30)	37 (29–42)	4.4 (3.9–4.8)	488 (361–732)
ART treated patients (31)	40 (33–48)	<1.7	771 (544–893)
HIV controllers (54)	47 (40–53)	<2.6	771 (596–931)

<sup>a</sup> A total of 168 subjects were included in this study, in the 5 groups listed: healthy donors, HIV-infected patients studied during primary HIV infection, non-ART-treated viremic patients, aviremic (viral load < 50 copies/ml) ART-treated patients, and HIV controllers, defined as showing spontaneous viral control for more than 5 years (viral load < 400 copies/ml). Median values and 25th and 75th percentiles are presented (in parentheses) for age, viral load, and CD4 count for each group.

individuals presenting plasma HIV RNA levels of <50 copies/ml and treated for at least 12 months were included in the study. Fifty-four patients were enrolled in the French HIV controller cohort (ANRS, CO21 CODEX) (inclusion criteria: no ART, HIV infection for >5 years, five last consecutive plasma HIV RNA values of <400 copies/ml). HIV RNA detection assay with a detection limit reaching <40 copies/ml was performed for all samples from HIV controllers. Clinical and biologic characteristics of participants are shown in Table 1. All HIV-infected patient groups were age matched with the exception of HIV controllers, which by definition are long-term HIV-infected patients and are older than others. Peripheral blood samples from 21 non-HIV-infected blood donors were obtained from the Etablissement Français du Sang (Saint Louis Hospital, Paris, France). These donors were selected to be age matched with HIV controllers.

**Laboratory studies. (i) Cell preparation.** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from anticoagulated blood by Ficoll density gradient centrifugation. Human leukocyte antigen (HLA) typing was done with the complement-dependent microlymphocytotoxic technique (One Lambda, Montpellier, France). Cells were cryopreserved in liquid nitrogen for subsequent analysis.

**(ii) Flow cytometry.** PBMCs were analyzed by 10-color flow cytometry. Cryopreserved cells were thawed, and after incubation with purified Fc receptor binding inhibitor (e-Bioscience), samples were stained with labeled antibodies against surface markers for 15 min at 4°C. Conjugated antibodies against the following were used: CD4 (fluorescein isothiocyanate [FITC]), CD57 (phycoerythrin [PE]-CF594), CD27 (Alexa Fluor 700), CD45RA (allophycocyanin [APC]-H7), CD8 (V450), and CD3 (V500) from BD Biosciences (San Jose, CA) and CD57 (FITC or PE) from Miltenyi. Intracellular staining for cytotoxic molecules was performed using anti-granzyme B (FITC or Alexa Fluor 700; clone GB11 [BD Biosciences]) and antiperforin (FITC; clone B-D48 [Diaclone]). Intracellular detection of EOMES (anti-EOMES Alexa Fluor 647; clone WD1928 [e-Bioscience]) and T-bet (anti-T-bet peridinin chlorophyll protein [PerCP]-Cy5.5; clone 4B10 [e-Bioscience]) was performed on fixed and permeabilized cells by following the manufacturer's instructions (e-Bioscience). Detection of perforin and granzyme B was performed *ex vivo* without any stimulation or brefeldin/monensin incubation. Samples were acquired on an LSRFortessa cell analyzer (BD Biosciences), and data files were analyzed using FlowJo software (Tree Star Inc.).

**Peptide-HLA class I pentamers.** HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells were identified by employing soluble PE-labeled peptide-HLA class I pentamers (Proimmune, Oxford, United Kingdom) derived from the HIV Gag, Nef, Pol, and Env proteins. The following epitopes were used: the HLA-A\*0201-restricted peptide ligands SLYNTVATL (Gag residues 77 to 85) and ILKEPVGHV (Pol residues 476 to 484), the A\*0301-restricted peptide ligands RLRPGGKKK (Gag residues 20 to 28) and QVPLRPMTYK (Nef residues 73 to 82), the A\*1101-restricted ligand AVDLSHFLK (Nef residues 84 to 92), the A\*2402-restricted peptide ligand RYPLTFGWY

(Nef residues 134 to 143), the B\*0702-restricted peptide ligand IPRRI RQGL (Env residues 848 to 856), the B\*0801-restricted peptide ligands GEIYKRWII (Gag residues 259 to 267) and FLKEKGGL (Nef residues 90 to 97), and the B\*2705-restricted peptide ligand KRWILGLNK (Gag residues 263 to 272).

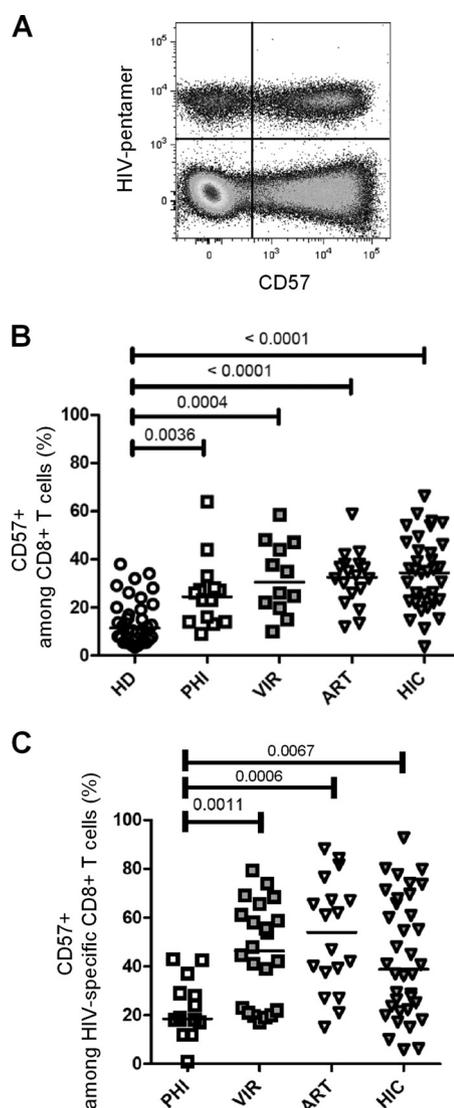
**Statistical methods.** Statistical analysis was performed using GraphPad prism software. Nonparametric Mann-Whitney test was employed to compare cell subsets or patient groups. Spearman's rank test was used to determine correlations. *P* values above 0.05 were considered not statistically significant.

## RESULTS

**CD57 expression is increased on both total and HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells in chronically HIV-infected patients independently of viral load.** We first compared degrees of CD57 surface expression in CD8<sup>+</sup> T cells isolated from HIV-negative subjects and from different HIV-infected patient groups, namely, subjects with primary HIV infection (PHI), long-term viremic (VIR) patients, ART-treated aviremic patients, and HIV controllers (HIC). For HIV-infected patients, analysis was performed on both total and HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells identified using HIV epitope-HLA-I pentamers (Fig. 1A). In healthy donors, 11.5% (median; interquartile range [IQR], 3.5% to 38.0%) of CD8<sup>+</sup> T cells expressed CD57 (Fig. 1B). Analysis of CD57 expression in HIV-infected individuals revealed a significant increase in CD57-expressing CD8<sup>+</sup> T cell proportions in primary HIV-infected patients (24.5%; IQR, 9.0% to 64.0%; *P* = 0.0036), untreated viremic chronically infected patients (30.5%; IQR, 10.0% to 58.6%; *P* = 0.0004), and aviremic ART-treated patients (32.7%; IQR, 12.0% to 58.9%; *P* < 0.0001) compared with healthy donors (Fig. 1B). Interestingly, CD8<sup>+</sup> T cells isolated from HIV controllers also expressed increased levels of CD57 (34.6%; IQR, 3.7% to 66.4%; *P* < 0.0001) compared to those expressed by healthy donors (Fig. 1B). These results indicate that CD57 expression in CD8<sup>+</sup> T cells is increased during early and more advanced phases of HIV infection, independently of active viral replication.

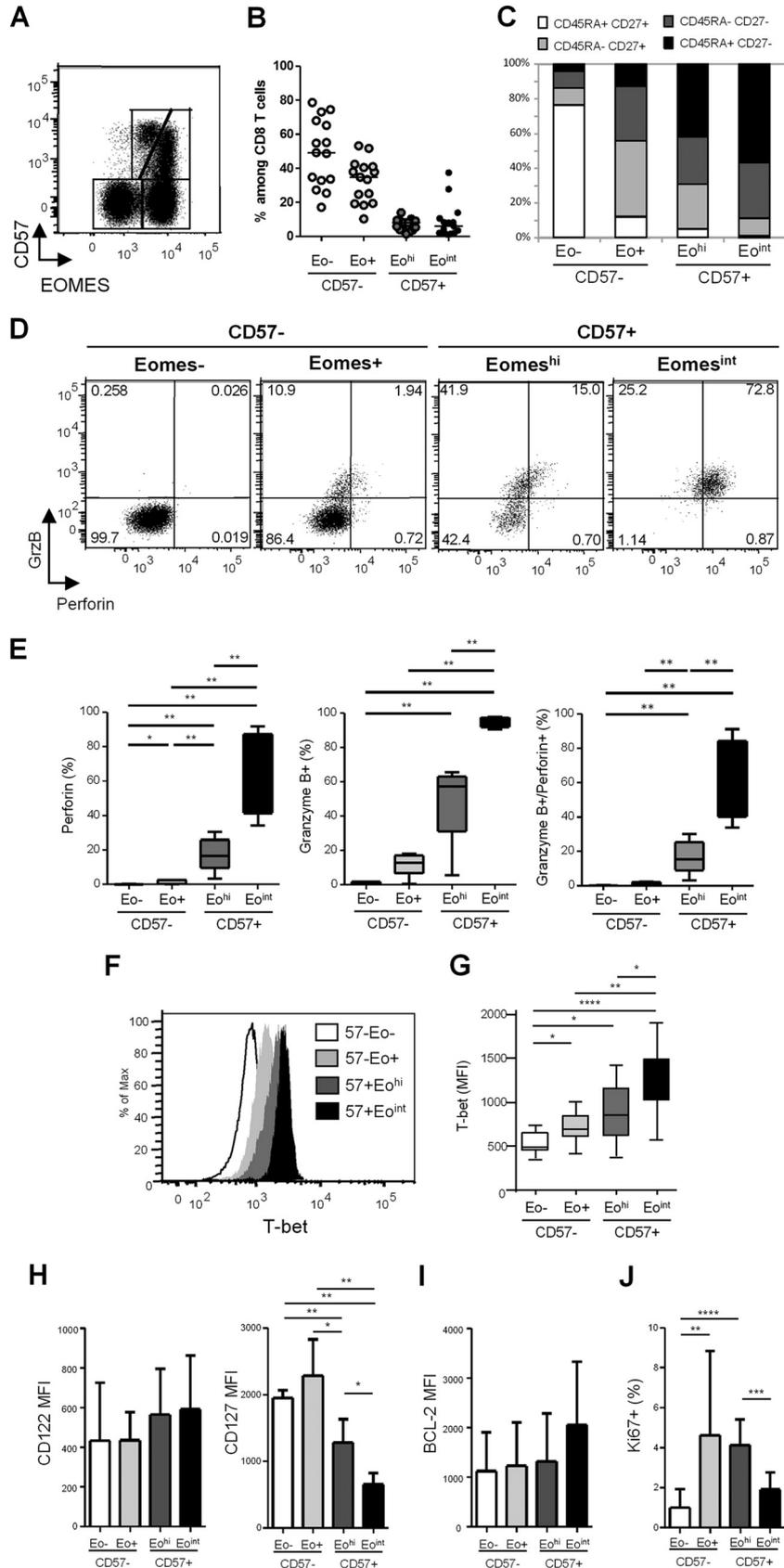
We next assessed CD57 expression at the surface of HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells. HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells from PHI patients displayed only low proportions of CD57-expressing cells (18.50%; IQR, 1.0% to 43.0%) (Fig. 1C). Conversely, untreated viremic chronically infected patients displayed significantly higher proportions of CD57-positive HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells (46.3%; IQR, 17.0% to 79.4%) than PHI patients (*P* = 0.0011) (Fig. 1C). Among aviremic patients, HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells from ART-treated patients and from HIC contained high proportions of CD57-positive cells (ART-treated patients, 54.0% [IQR, 15.0% to 88.3%]; HIC, 38.8% [IQR, 5.9% to 92.7%]) (Fig. 1C). All chronically infected groups exhibited significantly higher proportions of CD57-expressing HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells than did PHI patients (*P* = 0.0011, *P* = 0.0006, and *P* = 0.0067 for VIR and ART-treated patients and HIC, respectively). These results indicate that chronically HIV-infected patients, including HIV controllers, display high proportions of CD57-expressing HIV-specific and nonspecific CD8<sup>+</sup> T cells.

**Identification of two distinct CD57-expressing CD8<sup>+</sup> T cell subsets based on EOMES expression.** Expression of the T box transcription factor EOMES has been recently associated with terminal differentiation, CD57 being coexpressed with EOMES (29). In an analysis of EOMES and CD57 coexpression in CD8<sup>+</sup> T cells, four cell subsets were identified (Fig. 2A and B): (i) a double negative subset, EOMES<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup>, represented approximately half of



**FIG 1** CD57 expression in CD8<sup>+</sup> T cells during HIV infection. (A) Representative dot plot of CD57 expression on CD8<sup>+</sup> T cells costained with pentamers folded with HIV-derived peptides recovered from one HIV-infected patient. (B) CD57-expressing cells among CD8<sup>+</sup> T cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors (HD; open circles), primary HIV-infected patients (PHI; open squares), untreated viremic patients (VIR; filled gray squares), aviremic patients treated with ART (ART; open triangles), and HIV controllers (HIC; filled gray triangles). (C) CD57-expressing cells among HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells, identified by pentamer staining as shown in panel A. Median percentages are represented for each group, and *P* values are indicated when significant.

CD8<sup>+</sup> T cells in healthy donors (median, 49.8% [IQR, 34.8% to 66.1%]); (ii) an EOMES<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup> population represented the second most represented subset (median, 34.7% [22.7% to 42.3%]). Finally, EOMES<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> cells showed a heterogeneous level of EOMES expression, allowing us to identify two smaller subsets: (iii) an EOMES<sup>high</sup> CD57<sup>+</sup> (EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup>) and (iv) an EOMES<sup>intermediate</sup> CD57<sup>+</sup> subset (EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup>), representing in healthy donors 7.6% (3.7% to 11.4%) and 4.0% (1.4% to 8.7%) of total CD8<sup>+</sup> T cells, respectively. When surface expression of CD45RA and CD27 was analyzed to characterize cellular differentiation of the four CD8<sup>+</sup> T cell subsets identified on the basis of



**FIG 2** Phenotypic and functional characterization of EOMES<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells. (A) Representative dot plot of EOMES and CD57 expression in CD8<sup>+</sup> T cells from one healthy donor (HD). (B) Proportions of CD8<sup>+</sup> T cell subsets defined by EOMES and CD57 expression in HD: EOMES<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> (Eo<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup>), EOMES<sup>+</sup>

EOMES and CD57 expression, we found that among CD57<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells, EOMES<sup>-</sup> cells were mainly composed of CD45RA<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> naive T cells (Fig. 2C). Conversely, EOMES<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup> cells contained the highest proportions of CD45RA<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> memory CD8<sup>+</sup> T cells and an important proportion of CD45RA<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup> effector/memory CD8<sup>+</sup> T cells (Fig. 2C). CD57<sup>+</sup> cells, either EOMES<sup>hi</sup> or EOMES<sup>int</sup>, were mainly represented by CD45RA<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup> effector/memory and CD45RA<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> terminally differentiated CD8<sup>+</sup> T cells (TEMRA) (Fig. 2C). The EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell subset contained the highest proportions of CD45RA<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> TEMRA CD8<sup>+</sup> T cells, suggesting higher differentiation of this cell subset. However, we could not associate clear phenotypic discrimination between EOMES<sup>hi</sup> and EOMES<sup>int</sup> CD57-expressing CD8<sup>+</sup> T cell fractions.

**The EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> phenotype is associated with higher cytotoxic potential and T-bet coexpression in CD8<sup>+</sup> T cells.** We next studied the cytotoxic potential of the four CD8<sup>+</sup> T cell subsets defined by EOMES and CD57 expression based on granzyme B and perforin expression. CD57<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells, either EOMES negative or positive, were almost completely deprived in cytotoxic molecule-producing cells (Fig. 2D and E). EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> cells contained significantly higher proportions of cells expressing perforin (16.6% [9.5% to 25.9%]), granzyme B (57.4% [31.1% to 63.0%]), or both (15.3% [9.0% to 25.4%]) than did EOMES<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> or EOMES<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup> cell subsets (Fig. 2D and E). Finally, EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> cells presented the highest proportions of perforin-expressing (73.1% [41.4% to 87.2%]) and granzyme B-expressing (93.8% [91.9% to 97.5%]) cells, the great majority of EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells (72.3% [40.1% to 84.5%]) coexpressing both granzyme B and perforin (Fig. 2D and E). We thus demonstrated that CD57-expressing CD8<sup>+</sup> T cells include two fractions exhibiting highly different cytotoxic potentials that can be segregated using EOMES expression.

As the T box transcription factor T-bet also modulates CD8<sup>+</sup> T-cell differentiation and granzyme B and perforin production in mice, we assessed T-bet expression in CD8<sup>+</sup> T cell subsets identified based on EOMES and CD57 expression. The lowest levels of T-bet were expressed by EOMES-negative cells (median fluorescence intensity [MFI], 489 [440 to 651]), in accordance with their less differentiated resting state (Fig. 2F and G). A progressive increase in T-bet expression was identified from EOMES<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup> cells (MFI, 696 [597 to 846]) to EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> cells (MFI, 859 [613 to 1,160]) and EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> cells (MFI, 1,328 [1,013 to 1,490]) (Fig. 2F and G). Interestingly, the EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> subset, which presented the most terminally differentiated effector phenotype and the highest granzyme B and perforin production, expressed the highest levels of T-bet. Collectively, these data indicate that EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells represent a terminally

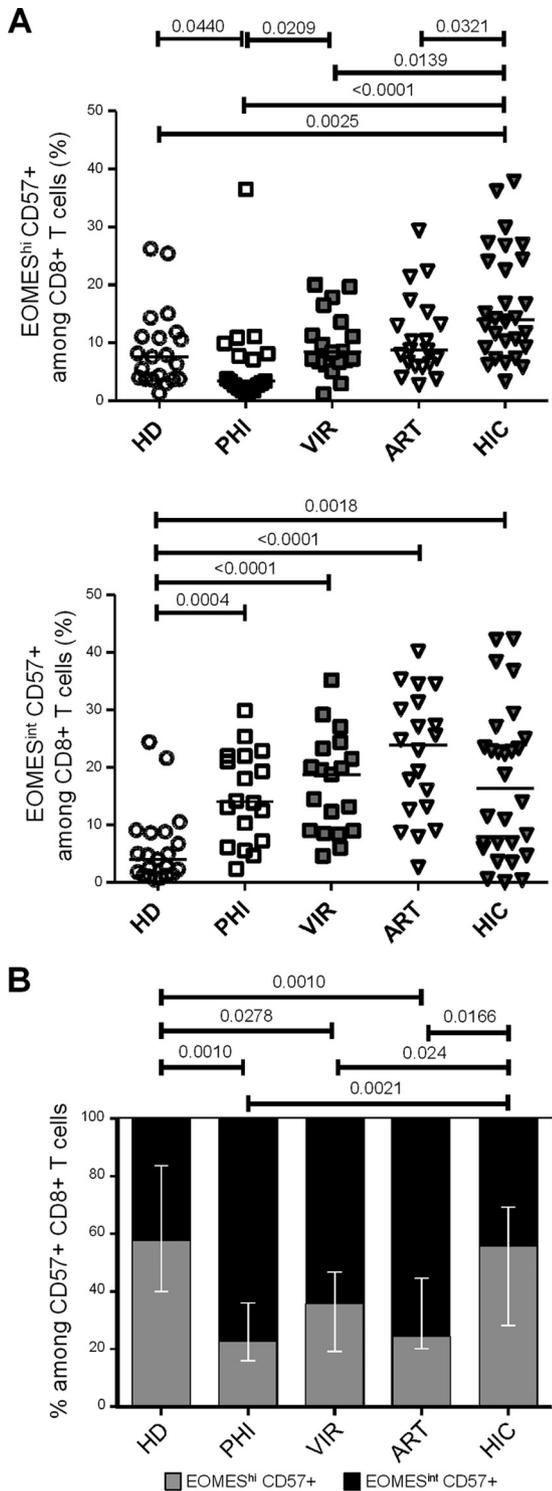
differentiated effector cell subset characterized by the highest cytotoxic potential and highest levels of T-bet expression.

**The EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> phenotype is associated with higher CD127 expression and higher proliferation ability in CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells.** We next characterized CD8<sup>+</sup> T cell subsets for surface expression of CD122 and CD127, which are necessary for transduction of interleukin 15 (IL-15) and IL-7 signaling, respectively, and therefore essential for CD8<sup>+</sup> T cell homeostasis. As shown in Fig. 2H, we failed to detect any significant difference in CD122 expression at the surface of the four CD8<sup>+</sup> T cell subsets identified based on CD57 and EOMES expression. Conversely, we found that EOMES<sup>hi</sup> and EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> cells displayed significantly lower levels of CD127 than CD57-negative subsets (Fig. 2H). However, EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> cells retained higher levels of CD127 expression (mean MFI, 1,282 ± 351) than did the highly cytotoxic EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> cells (MFI, 657 ± 166) (Fig. 2H).

To determine whether such a difference in CD127 was associated with any homeostatic advantage, we studied the expression of the antiapoptotic molecule BCL-2 as a marker of survival and the expression of Ki-67 as a proliferation marker. As shown in Fig. 2I, we failed to detect any significant difference in BCL-2 expression among the four subsets. Conversely, we found lower proportions of Ki-67-expressing cells in EOMES<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> cells (1.0% ± 0.9%) compared to both EOMES<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup> (4.6% ± 4.2%) and EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (4.1% ± 1.3%) T cells (Fig. 2J). Interestingly, EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> cell subsets presented significantly higher proportions of Ki-67<sup>+</sup> cells than did EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells (1.9% ± 0.8%) (Fig. 2J). Collectively, these data suggest a higher homeostatic potential for EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells, which exhibited higher expression of IL-7 receptor and proliferative capacity compared with the high immediate cytotoxicity provided by the EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> subset.

**Higher levels of EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in HIV controllers.** We then investigated CD57 expression during HIV infection introducing EOMES expression. Primary HIV-infected patients displayed significantly reduced proportions of EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> cells (3.4% [1.1% to 36.5%]) compared to those displayed by healthy donors (7.6% [1.3% to 26.2];  $P = 0.0440$ ) and viremic individuals (8.4% [1.1% to 20.0%];  $P = 0.0209$ ) (Fig. 3A, upper graph). Conversely, proportions of EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in chronically HIV-infected patients, either viremic or aviremic ART treated (8.8% [2.8% to 29.4%]), were not different from those observed in healthy individuals (Fig. 3A, upper graph). Interestingly, CD8<sup>+</sup> T cells from HIV controllers displayed significantly higher proportions of EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> cells (13.9% [3.3% to 37.9%]) than did healthy donors ( $P = 0.0025$ ) and primary HIV-infected ( $P < 0.0001$ ), chronically viremic ( $P = 0.0139$ ), and aviremic ART-treated ( $P = 0.0321$ ) patients (Fig. 3A, upper

CD57<sup>-</sup> (Eo+ CD57-), EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> (Eo<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup>), and EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> (Eo<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup>). (C) Phenotypic characterization of EOMES<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup>, EOMES<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup>, EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup>, and EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> cells based on CD45RA and CD27 expression. Graphs represent proportions of CD45RA<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> (white bars), CD45RA<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> (light gray bars), CD45RA<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup> (dark gray bars), and CD45RA<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> (black bars) CD8<sup>+</sup> T cells. (D) Representative dot plots of granzyme B and perforin expression in CD57<sup>-</sup> and CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell subsets defined based on EOMES expression from one healthy donor. (E) Percentages of perforin-positive (left graph), granzyme B-positive (middle graph), and granzyme B- and perforin-coexpressing (right graph) cells among EOMES<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> (white bars), EOMES<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup> (light gray bars), EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> (dark gray bars), and EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> (black bars) CD8<sup>+</sup> T cells from HD ( $n = 10$ ). (F) T-bet expression in CD8<sup>+</sup> T cell subsets. Flow cytometry histograms show representative results from one individual. (G) Histograms represent the median T-bet median fluorescence intensity (MFI) ± SD in EOMES<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> (white bars), EOMES<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup> (light gray bars), EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> (dark gray bars), and EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> (black bars) CD8<sup>+</sup> T cells from 10 HD. (H to J) Mean MFI of CD122 and CD127 (H) and BCL-2 (I) and mean percentages of Ki-67<sup>+</sup> cells (J) in EOMES-CD57<sup>-</sup> (white bars), EOMES<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup> (light gray bars), EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> (dark gray bars), and EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> (black bars) CD8 T cells from 10 HD. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ .

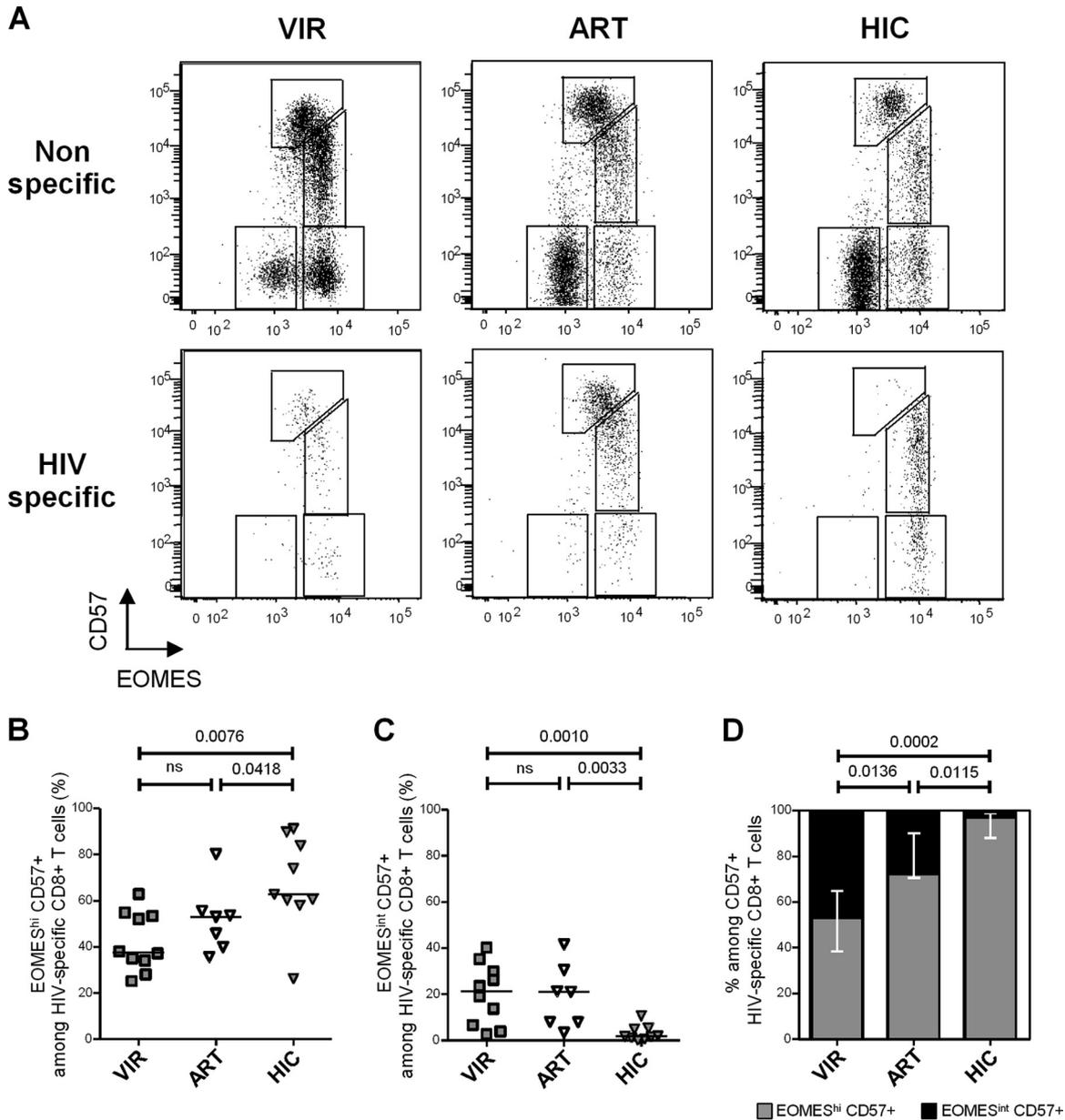


**FIG 3** Effects of different phases of HIV infection on CD57- and EOMES-expressing CD8<sup>+</sup> T cell subsets. (A and B) Graphs present EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> (A) and EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> (B) percentages among CD8<sup>+</sup> T cells in PBMCs from HD, primary HIV-infected patients (PHI; open squares), untreated viremic patients (VIR; filled gray squares), ART-treated aviremic patients (ART; open triangles), and HIV controllers (HIC; filled gray triangles). (C) Proportions of EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> (gray bars) and EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> (black bars) among CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells from HD and PHI, VIR, ART, and HIC patients. *P* values are indicated.

graph). When we focused on the EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell subset, i.e., the fraction exhibiting high cytolytic content *ex vivo*, we observed higher proportions in HIV-infected patient groups, including primary infected individuals (14.1% [2.4% to 29.9%]; *P* = 0.0004), chronically infected patients (18.8% [4.6% to 35.2%]; *P* < 0.0001), aviremic ART-treated patients (23.9% [2.7% to 40.2%]; *P* < 0.0001), and HIV controllers (16.4% [0.2% to 24.4%]; *P* = 0.0018) than in healthy donors (4.0% [0.5% to 24.4%]), while we failed to detect any significant difference among HIV-infected patient groups (Fig. 3A, lower graph). Because such increases may be directly driven by the higher percentage of CD57-expressing cells among CD8<sup>+</sup> T cells observed in HIV-infected patients (as shown in Fig. 1B), we analyzed the proportions of EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> and EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> fractions among CD57-expressing CD8<sup>+</sup> T cells. We observed that primary HIV-infected, chronically viremic, and aviremic ART-treated patients presented a significant reduction in the proportions of EOMES<sup>hi</sup> cells among CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells associated with an increase on the EOMES<sup>int</sup> fraction (Fig. 3B). Interestingly, HIV controllers represented the only patient group retaining a balance of these two subsets similar to that observed in healthy donors (Fig. 3C). Collectively, these results show that while displaying proportions of CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells similar to those of other groups (Fig. 1B), HIV controllers retained higher proportions of EOMES<sup>hi</sup> cells among CD57<sup>+</sup> cells.

**HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells from HIV controllers present an EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> phenotype.** We next assessed EOMES and CD57 expression in HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells from chronically viremic patients (*n* = 10), aviremic ART-treated individuals (*n* = 7), and HIV controllers (*n* = 9) identified using HIV epitope-HLA-I pentamers (Fig. 4A). We detected significantly higher proportions of EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> cells (i.e., the fraction exhibiting higher survival and proliferation profiles) among HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells from HIV controllers (62.8% [26.3% to 91.2%]) than in cells from both chronic viremic (37.7% [25.2% to 62.9%]; *P* = 0.0076) and ART-treated (53.1% [35.7% to 80.2%]; *P* = 0.0418) patients (Fig. 4B). Conversely, lower proportions of EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> cells (i.e., the fraction exhibiting higher cytolytic molecule contents *ex vivo*) among HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells were observed in HIV controllers (1.9% [0.2% to 10.7%]) than in both chronic viremic (21.4% [2.7% to 40.1%]; *P* = 0.0010) and ART-treated (21.1% [3.5% to 41.7%]; *P* = 0.0418) patients (Fig. 4C). Restricting the analysis to CD57<sup>+</sup> HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells, we observed the lowest proportions of EOMES<sup>hi</sup> cells among CD57-expressing cells in chronic viremic HIV-infected individuals (53.1% [30.9% to 90.3%]) (Fig. 4D). In contrast, CD57<sup>+</sup> HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells from HIV controllers were almost completely constituted by EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> cells (96.7% [85.5% to 99.7%]), EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> cells being barely detectable (Fig. 4D). These data confirm in HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells results obtained in analyses performed on global CD8<sup>+</sup> T cells and indicate that CD57-expressing HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells from HIV controllers presented a skewed phenotype toward an EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> phenotype compared with both those from viremic and aviremic ART-treated patients.

**Higher EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> proportions among both global and HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells are associated with lower viral loads.** Finally, we studied whether CD57-expressing CD8<sup>+</sup> T cells subsets correlated with viral load in chronically HIV-infected untreated patients. HIV load did not correlate with CD57<sup>+</sup> proportions



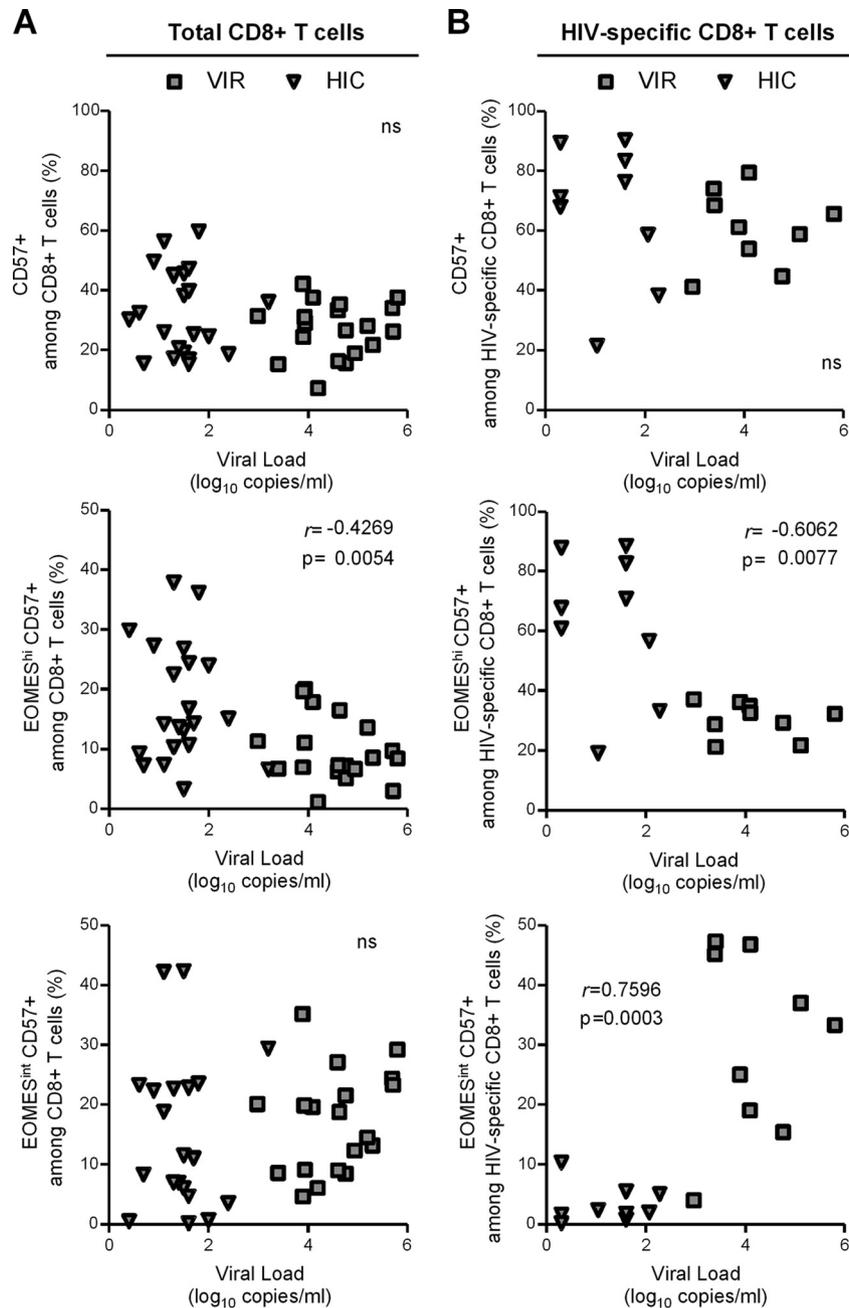
**FIG 4** HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells from HIV controllers present a peculiar EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> phenotype. (A) Representative dot plots of EOMES and CD57 expression in total (upper graphs) and HIV-specific (lower graphs) CD8<sup>+</sup> T cells from VIR, ART, and HIC patients. (B and C) Proportions of EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> (B) and EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> (C) cells among HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells from VIR (gray filled squares), ART (open triangles), and HIC (gray filled triangles) patients. (D) Proportions of EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> (gray bars) and EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> (black bars) among HIV-specific CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells from VIR, ART, and HIC patients. *P* values are indicated.

of either total (Fig. 5A, upper graph) or HIV-specific (Fig. 5B, upper graph) CD8<sup>+</sup> T cells. However, when we took into account CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell heterogeneity in terms of EOMES expression, we detected a significant inverse correlation between viral load and EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> proportions among both total ( $r = -0.4269$ ;  $P = 0.0054$ ) and HIV-specific ( $r = -0.6062$ ;  $P = 0.0077$ ) CD8<sup>+</sup> T cells (Fig. 5, middle graphs). In contrast, while no association with viral load was observed when considering the immediately cytotoxic EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> subset among total CD8 T cells (Fig. 5A, lower graph), we found a significant, positive correlation between viral levels and the proportion of EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> cells among HIV-specific

CD8<sup>+</sup> T cells ( $r = -0.7596$ ,  $P = 0.0003$ ) (Fig. 5B, lower graph). Collectively, these results revealed differential impact of CD57-expressing subsets on viral load and supported the notion that the EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> subset, which exhibits a higher proliferation capacity and homeostatic potential but lower immediate cytotoxic potential, could play a role in viral control.

**DISCUSSION**

The CD57 antigen, a member of the N-CAM family initially described as a natural killer cell marker, has been reported to identify human CD8<sup>+</sup> T cells displaying high cytotoxic activity and poor



**FIG 5** Relationship between CD57-expressing CD8<sup>+</sup> T cell subsets and viral load. Correlation between viral load and CD57<sup>+</sup> (upper graphs), EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> (middle graphs), or EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> (lower graphs) cells among total (A) and HIV-specific (B) CD8<sup>+</sup> T cells from untreated chronically HIV-infected patients. Different symbols identify patients groups: viremic patients (gray filled squares) and HIV controllers (filled gray triangles). Correlations were evaluated using a Spearman rank correlation coefficient test. Spearman *r* index and *P* value are indicated.

proliferative activity leading to the coexistence of terminally differentiated phenotype and senescence. *In vitro* studies revealed functional impairment of HIV-specific CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells as indicated by their high susceptibility to apoptosis and activation-induced cell death associated with a reduced capacity to proliferate in response to appropriate stimulation (1, 10, 11). Interestingly, Lee et al. (16) recently demonstrated that the proportions of CD57-expressing cells among CD28<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were increased following ART treatment and represented a favorable prognostic factor during HIV infection, pointing toward a posi-

tive role for the CD57-expressing fraction. We hypothesized that such a discrepancy relied on functional heterogeneity among CD57-expressing CD8<sup>+</sup> T cells. We thus aimed to further characterize CD57-expressing CD8<sup>+</sup> T cells during HIV infection by analyzing the expression of Eomesodermin (EOMES) and T-bet, two transcription factors determining coordinately memory (20, 21) and effector (30) CD8<sup>+</sup> T cell fate.

In healthy subjects, we distinguished two functionally different subsets among CD57-expressing cells; the EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> fraction but not the EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> fraction exhibited high gran-

zyme B and/or perforin contents. Our results show that highly cytotoxic, terminally differentiated EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells presented the highest levels of T-bet expression, in accordance with data from Hersperger et al. (31). Conversely, EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> cell subsets presented lower levels of T-bet expression associated with a less differentiated memory phenotype and retain high homeostatic and proliferative potential, as revealed by high levels of CD127 expression and a high proportion of proliferating cells *ex vivo*, respectively. Such an EOMES/T-bet coexpression pattern supports in human CD8<sup>+</sup> T cells a model in which the relative expression levels of T-bet and EOMES in CD8<sup>+</sup> T cells reciprocally promote a terminal effector differentiation versus a memory fate, as previously suggested for mice (20–22). Such heterogeneity may provide a rationale for discrepancies concerning functional characteristics of CD57- or EOMES-expressing cells (1, 14, 26, 29).

CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell proportions increase physiologically during aging (32), presumably mostly driven by chronic infections such as with CMV. An increase in CD57 expression during chronic HIV infection has also been documented, occurring probably as a result of chronic immune activation (11, 13). Taking advantage of the study of several French cohorts of patients at different phases of HIV infection, we confirmed in this work that CD57 expression in both total and HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells is increased during the chronic phase of infection. Interestingly, equally high percentages of CD57-expressing CD8<sup>+</sup> T cells were observed at the surface of CD8<sup>+</sup> T cells isolated from viremic and aviremic ART-treated patients and HIV controllers. Primary HIV-infected patients exhibited a significantly reduced proportion of CD57-expressing HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells compared to those exhibited by all chronically infected groups. Such a low proportion of CD57-expressing cells, which include potent cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells, is in accordance with an important role for chronic immune activation on CD57 expression and may participate in the insufficient viral control during primary infection. We thus further focused on the chronic stages of HIV infection. By integrating EOMES expression in the analysis, we demonstrated that HIV controllers exhibited a significantly higher proportion of EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells than did both viremic and aviremic ART-treated patients. Extending our analysis to HIV-specific responses, we observed that HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells from HIV controllers retain an EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> phenotype, in contrast to cells from viremic and ART-treated aviremic patients, which mostly exhibited terminally differentiated EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> cells. Our study suggests that maintenance of high EOMES expression in CD57<sup>+</sup> cells could contribute to the higher efficiency of CD8<sup>+</sup> T cell responses in HIC (5–8). Indeed, among untreated chronically infected patients, proportions of EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> cells among total and HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells inversely correlate with viral loads, suggesting a beneficial role for this cell population in viral control. Conversely, the proportion of EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> cells among HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells was positively associated with viral load, suggesting that viral persistence contributed to terminal differentiation. However, viral load is probably not the only factor responsible for the expansion of the EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> fraction, as HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells from HIV controllers still exhibited significantly lower proportions of the EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> fraction and higher proportions of the EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> fraction than did ART-treated aviremic patients (i.e., a patient group with an equivalent viral load).

Previous reports have suggested that HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells from HIV controllers have a greater capacity to produce cytotoxic molecules (5, 8). Our results, demonstrating higher frequencies of non-terminally differentiated, actively proliferating EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in HIV controllers, are only in apparent contrast with previous reports. Migueles and coworkers reported that high perforin production by CD8<sup>+</sup> T cells from HIV long-term nonprogressors (LNTPs) was a consequence of their ability to more readily proliferate and undergo greater numbers of divisions upon antigen stimulation (5). Our results using EOMES/CD57 identification led to a similar observation: the EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> fraction, which exhibited a higher proliferative capacity, was associated with better viral control. It is tempting to speculate that the large and rapid expansion of HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells from LNTPs partly reflects the higher fraction of EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> fraction among CD57-expressing HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells. The use of the EOMES/CD57 combination requires intracellular staining and thus does not allow us to directly demonstrate the cytotoxic potential of the EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> fraction upon *in vitro* stimulation. CD57 expression was higher in the EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> fraction than in the EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> fraction, which leads us to question whether a higher level of CD57 expression may reflect higher terminal differentiation. We may therefore speculate that EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells could represent a progenitor subset ready to rapidly proliferate and further differentiate into fully functional, perforin-producing EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> cells upon antigenic encounter. Accordingly, Buckheit et al. have previously demonstrated that HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cell subsets exhibit different *in vitro* suppressive activities depending on the time point considered: terminally differentiated cells were more suppressive at an early stage, whereas a less differentiated fraction exhibited an equally suppressive function at later time points (33). Polyfunctionality, a marker of efficient T cell responses, may thus also rely on the diversity of CD8<sup>+</sup> T cell differentiation ensuring a large timescale of cytotoxic responses balancing from immediate to late induced cytotoxic activity.

In conclusion, our results demonstrate functional heterogeneity among CD57-expressing CD8<sup>+</sup> T cells. CD57-expressing CD8<sup>+</sup> T cells include both terminally differentiated, highly cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells and less differentiated cells that may act as progenitors capable of rapidly proliferating and further differentiating into fully functional, perforin-producing EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> cells upon antigenic encounter. We identified a skewed balance between EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> and EOMES<sup>int</sup> CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in HIV controllers, who exhibited a more preserved EOMES<sup>hi</sup> CD57<sup>+</sup> fraction. Importantly, such a less differentiated profile was associated with viral control. Our study suggests that maintenance of high EOMES expression could contribute to the higher efficiency of cytotoxic responses by developing an adequate balance between less differentiated and terminally differentiated fractions.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Marc Tardieu and Jean-François Delfraissy for their support.

We declare no competitive financial interests.

This work was supported by the Agence Nationale de la recherche contre le SIDA et les hépatites virales (ANRS) and Fondation de France. Federico Simonetta was also supported by the Fondation pour la recherche médicale (FRM).

## REFERENCES

- Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, Casazza JP, Kuruppu J, Migueles SA, Connors M, Roederer M, Douek DC, Koup RA. 2003. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood* 101:2711–2720. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2002-07-2103>.
- Lichterfeld M, Mou D, Cung TDH, Williams KL, Waring MT, Huang J, Pereyra F, Trocha A, Freeman GJ, Rosenberg ES, Walker BD, Yu XG. 2008. Telomerase activity of HIV-1-specific CD8+ T cells: constitutive up-regulation in controllers and selective increase by blockade of PD ligand 1 in progressors. *Blood* 112:3679–3687. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-01-135442>.
- Lambotte O, Boufassa F, Madec Y, Nguyen A, Goujard C, Meyer L, Rouzioux C, Venet A, Delfraissy JF. 2005. HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clin. Infect. Dis.* 41:1053–1056. <http://dx.doi.org/10.1086/433188>.
- Card CM, Keynan Y, Lajoie J, Bell CP, Dawood M, Becker M, Kasper K, Fowke KR. 2012. HIV controllers are distinguished by chemokine expression profile and HIV-specific T-cell proliferative potential. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 59:427–437. <http://dx.doi.org/10.1097/QAI.0b013e3182454fcd>.
- Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, Sabbaghian MS, Rabin R, Hahlan CW, Van Baarle D, Kostense S, Miedema F, McLaughlin M, Ehler L, Metcalf J, Liu S, Connors M. 2002. HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat. Immunol.* 3:1061–1068. <http://dx.doi.org/10.1038/ni845>.
- Zimmerli SC, Harari A, Cellerai C, Vallelian F, Bart PA, Pantaleo G. 2005. HIV-1-specific IFN-gamma/IL-2-secreting CD8 T cells support CD4-independent proliferation of HIV-1-specific CD8 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:7239–7244. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0502393102>.
- Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, Lederman MM, Benito JM, Goepfert PA, Connors M, Roederer M, Koup RA. 2006. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* 107:4781–4789. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2005-12-4818>.
- Hersperger AR, Pereyra F, Nason M, Demers K, Sheth P, Shin LY, Kovacs CM, Rodriguez B, Sieg SF, Teixeira-Johnson L, Gudonis D, Goepfert PA, Lederman MM, Frank I, Makedonas G, Kaul R, Walker BD, Betts MR. 2010. Perforin expression directly ex vivo by HIV-specific CD8 T-cells is a correlate of HIV elite control. *PLoS Pathog.* 6:e1000917. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000917>.
- Reference deleted.
- Le Priol Y, Puthier D, Lecureuil C, Combadiere C, Debre P, Nguyen C, Combadiere B, Lécureuil C, Combadiere C, Debré P, Combadiere B. 2006. High cytotoxic and specific migratory potencies of senescent CD8+ CD57+ cells in HIV-infected and uninfected individuals. *J. Immunol.* 177:5145–5154. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.177.8.5145>.
- Papagno L, Spina CA, Marchant A, Salio M, Rufer N, Little S, Dong T, Chesney G, Waters A, Easterbrook P, Dunbar PR, Shepherd D, Cerundolo V, Emery V, Griffiths P, Conlon C, McMichael AJ, Richman DD, Rowland-Jones SL, Appay V. 2004. Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection. *PLoS Biol.* 2:E20. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0020020>.
- Petrovas C, Chaon B, Ambrozak DR, Price DA, Melenhorst JJ, Hill BJ, Geldmacher C, Casazza JP, Chattopadhyay PK, Roederer M, Douek DC, Mueller YM, Jacobson JM, Kulkarni V, Felber BK, Pavlakis GN, Katsikis PD, Koup RA. 2009. Differential association of programmed death-1 and CD57 with ex vivo survival of CD8+ T cells in HIV infection. *J. Immunol.* 183:1120–1132. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0900182>.
- Lewis DE, Puck JM, Babcock GF, Rich RR. 1985. Disproportionate expansion of a minor T cell subset in patients with lymphadenopathy syndrome and acquired immunodeficiency syndrome. *J. Infect. Dis.* 151:555–559. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/151.3.555>.
- Chattopadhyay PK, Betts MR, Price DA, Gostick E, Horton H, Roederer M, De Rosa SC. 2009. The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression. *J. Leukoc. Biol.* 85:88–97. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0208107>.
- Lee SA, Sinclair E, Hatano H, Hsue PY, Epling L, Hecht FM, Bangsberg DR, Martin JN, McCune JM, Deeks SG, Hunt PW. 2014. Impact of HIV on CD8+ T cell CD57 expression is distinct from that of CMV and aging. *PLoS One* 9:e89444. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0089444>.
- Lee SA, Sinclair E, Jain V, Huang Y, Epling L, Van Natta M, Meinert CL, Martin JN, McCune JM, Deeks SG, Lederman MM, Hecht FM, Hunt PW. 2014. Low proportions of CD28– CD8+ T cells expressing CD57 can be reversed by early ART initiation and predict mortality in treated HIV infection. *J. Infect. Dis.* 210:372–382. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiu109>.
- Cruz-Guilloty F, Pipkin ME, Djuretic IM, Levanon D, Lotem J, Lichtenheld MG, Groner Y, Rao A. 2009. Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *J. Exp. Med.* 206:51–59. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20081242>.
- Intlekofer AM, Banerjee A, Takemoto N, Gordon SM, Dejong CS, Shin H, Hunter CA, Wherry EJ, Lindsten T, Reiner SL. 2008. Anomalous type 17 response to viral infection by CD8+ T cells lacking T-bet and eomesodermin. *Science* 321:408–411. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1159806>.
- Pearce EL, Mullen AC, Martins GA, Krawczyk CM, Hutchins AS, Zediak VP, Banica M, DiCioccio CB, Gross DA, Mao CA, Shen H, Cereb N, Yang SY, Lindsten T, Rossant J, Hunter CA, Reiner SL. 2003. Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science* 302:1041–1043. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1090148>.
- Banerjee A, Gordon SM, Intlekofer AM, Paley MA, Mooney EC, Lindsten T, Wherry EJ, Reiner SL. 2010. Cutting edge: the transcription factor eomesodermin enables CD8+ T cells to compete for the memory cell niche. *J. Immunol.* 185:4988–4992. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1002042>.
- Intlekofer AM, Takemoto N, Wherry EJ, Longworth SA, Northrup JT, Palanivel VR, Mullen AC, Gasink CR, Kaech SM, Miller JD, Gapin L, Ryan K, Russ AP, Lindsten T, Orange JS, Goldrath AW, Ahmed R, Reiner SL. 2005. Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat. Immunol.* 6:1236–1244. <http://dx.doi.org/10.1038/ni1268>.
- Rao RR, Li Q, Odunsi K, Shrikant PA. 2010. The mTOR kinase determines effector versus memory CD8+ T cell fate by regulating the expression of transcription factors T-bet and Eomesodermin. *Immunity* 32:67–78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2009.01.010>.
- Intlekofer AM, Takemoto N, Kao C, Banerjee A, Schambach F, Northrup JK, Shen H, Wherry EJ, Reiner SL. 2007. Requirement for T-bet in the aberrant differentiation of unhelped memory CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 204:2015–2021. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20070841>.
- Joshi NS, Cui W, Chande A, Lee HK, Urso DR, Hagman J, Gapin L, Kaech SM. 2007. Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity* 27:281–295. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2007.07.010>.
- McLane LM, Banerjee PP, Cosma GL, Makedonas G, Wherry EJ, Orange JS, Betts MR. 2013. Differential localization of T-bet and Eomes in CD8 T cell memory populations. *J. Immunol.* 190:3207–3215. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1201556>.
- Paley MA, Kroy DC, Odorizzi PM, Johnnidis JB, Dolfi DV, Barnett BE, Bikoff EK, Robertson EJ, Lauer GM, Reiner SL, Wherry EJ. 2012. Progenitor and terminal subsets of CD8+ T cells cooperate to contain chronic viral infection. *Science* 338:1220–1225. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1229620>.
- Hasley RB, Hong C, Li W, Friesen T, Nakamura Y, Kim GY, Park J-H, Hixon JA, Durum S, Hu Z, Sneller MC, Oguariri R, Imamichi T, Lane HC, Catalfamo M. 2013. HIV immune activation drives increased Eomes expression in memory CD8 T cells in association with transcriptional downregulation of CD127. *AIDS* 27:1867–1877. <http://dx.doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283618487>.
- Ribeiro-dos-Santos P, Turnbull EL, Monteiro M, Legrand A, Conrod K, Baalwa J, Pellegrino P, Shaw GM, Williams I, Borrow P, Rocha B. 2012. Chronic HIV infection affects the expression of the 2 transcription factors required for CD8 T-cell differentiation into cytolytic effectors. *Blood* 119:4928–4938. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-12-395186>.
- Dolfi DV, Mansfield KD, Polley AM, Doyle SA, Freeman GJ, Pircher H, Schmader KE, Wherry EJ. 2013. Increased T-bet is associated with senescence of influenza virus-specific CD8 T cells in aged humans. *J. Leukoc. Biol.* 93:825–836. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0912438>.

30. Sullivan BM, Juedes A, Szabo SJ, von Herrath M, Glimcher LH. 2003. Antigen-driven effector CD8 T cell function regulated by T-bet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:15818–15823. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2636938100>.
31. Hersperger AR, Martin JN, Shin LY, Sheth PM, Kovacs CM, Cosma GL, Makedonas G, Pereyra F, Walker BD, Kaul R, Deeks SG, Betts MR. 2011. Increased HIV-specific CD8<sup>+</sup> T-cell cytotoxic potential in HIV elite controllers is associated with T-bet expression. *Blood* 117:3799–3808. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-12-322727>.
32. Tarazona R, DelaRosa O, Alonso C, Ostos B, Espejo J, Peña J, Solana R. 2000. Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells. *Mech. Ageing Dev.* 121:77–88. [http://dx.doi.org/10.1016/S0047-6374\(00\)00199-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0047-6374(00)00199-8).
33. Buckheit RW, Salgado M, Silciano RF, Blankson JN. 2012. Inhibitory potential of subpopulations of CD8<sup>+</sup> T cells in HIV-1-infected elite suppressors. *J. Virol.* 86:13679–13688. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02439-12>.

### Article 3 :

## La forte réponse T CD4<sup>+</sup> spécifique du VIH corrèle avec la forte réponse T CD8<sup>+</sup> spécifique du VIH chez les HIC

Camille Lécuroux, Stéphane Hua, Asier Saez-Cirion, Isabelle Girault, Pierre Versmisse, Christine Bourgeois, Olivier Lambotte, Alain Venet

En préparation

### Hypothèse et objectif de recherche

Les HIC sont caractérisés par des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH capables d'inhiber fortement *ex vivo* la réplication virale contrairement aux cellules des autres patients infectés par le VIH. Cependant, cette capacité inhibitrice n'est pas retrouvée chez l'ensemble des patients HIC et il existe donc une hétérogénéité de la réponse inhibitrice. Nous avons alors défini deux groupes de patients : l'un capable d'inhiber fortement la réplication virale et que l'on appelle les « Strong Responders » (SR) et l'autre groupe qui inhibe faiblement la réplication virale et que l'on nomme les « Weak Responders » (WR).

Nous avons dans cette étude voulu évaluer différents paramètres que ce soit les réponses T CD8<sup>+</sup> mais aussi T CD4<sup>+</sup> qui peuvent permettre d'expliquer la différence d'inhibition de la réplication virale des LT CD8<sup>+</sup> des WR et des SR. L'hypothèse formulée est que les réponses T CD4<sup>+</sup> sont associées aux réponses T CD8<sup>+</sup>. Ainsi, nous pensons que les SR présentent de fortes réponses T CD4<sup>+</sup> qui sont associées à la meilleure réponse T CD8<sup>+</sup> alors que les WR présentent de faibles réponses T CD4<sup>+</sup> associées à de faibles réponses T CD8<sup>+</sup>. Pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, nous avons effectué une étude comparative des réponses T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> au sein des WR et des SR.

Les objectifs de cet article ont donc été les suivants :

- Etudier les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH et mettre en évidence que cette forte capacité d'inhibition de la réplication virale des SR est liée à une meilleure réponse T CD8<sup>+</sup>
- Etudier les LT CD4<sup>+</sup> spécifiques du VIH au sein des WR et des SR
- Associer les réponses T CD8<sup>+</sup> aux réponses T CD4<sup>+</sup> et voir s'il existe une corrélation entre ces deux réponses T

## Introduction

Les patients HIV-contrôleurs représentent un rare groupe de patients infectés par le VIH-1 et qui contrôlent l'infection en l'absence de traitement. Plusieurs arguments plaident en faveur du rôle des LT CD8<sup>+</sup> dans ce contrôle. Tout d'abord, les études de déplétion CD8<sup>+</sup> chez les macaques ont mis en évidence leur importance lors de l'infection par le SIV [332]. Les observations de pression de sélection et l'émergence de mutations d'échappement traduisent l'existence de réponses T CD8<sup>+</sup> efficaces contre le virus [359,360]. Enfin, la surreprésentation des HLA de classe I HLA-B\*27 et HLA-B\*57 chez les HIC plaident en faveur du rôle des LT CD8<sup>+</sup> dans le contrôle de l'infection [308,319,361].

Plusieurs études ont montré que les HIC possèdent des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH capables d'inhiber fortement la réplication virale *ex vivo* contrairement aux cellules des autres patients [286,313]. Cependant, il existe au sein des HIC une grande hétérogénéité de la réponse T CD8<sup>+</sup> au niveau de leur capacité d'inhibition de la charge virale *ex vivo* [314] et on a défini deux groupes : « Weak Responders » (WR) constitués de patients avec de faibles réponses T CD8<sup>+</sup> et « Strong Responders » (SR) constitués de patients avec de fortes réponses T CD8<sup>+</sup>.

Les réponses T CD4<sup>+</sup> jouent un rôle essentiel dans le développement des bonnes réponses T CD8<sup>+</sup> effectrices chez la souris. Les LT CD8<sup>+</sup> activés en absence de LT CD4<sup>+</sup> sont incapables de répondre de façon optimale lors d'une réactivation durant la phase mémoire de l'infection. En effet, les LT CD8<sup>+</sup> présentent à la fois des défauts de réponses en terme de capacité proliférative mais également dans la capacité de sécrétion des cytokines IFN- et IL-2 [36,55,362]. Les LT CD4<sup>+</sup> ont pour principale caractéristique de sécréter de l'IL-2 pour aider les LT CD8<sup>+</sup> à proliférer en réponse lors d'une restimulation.

Le but de de cette étude est de caractériser les réponses T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> chez les patients présentant des profils différents : les WR versus les SR. Nous avons montré tout d'abord que les SR présentent une plus forte fréquence de LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH et une plus forte capacité de sécrétion de cytokines. Puis nous avons évalué différentes capacités effectrices des LT CD8<sup>+</sup> avec une plus forte fréquence de cellules présentant le profil CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> mais également une plus forte capacité cytotoxique des SR par rapport aux WR. De la même manière, la fréquence des LT CD4<sup>+</sup> et la capacité de sécrétion de cytokines sont plus importantes chez les SR que chez les WR. Nous avons montré que les SR possèdent de fortes réponses T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> comparés aux WR et que les réponses T CD8<sup>+</sup> corrélaient avec les réponses T CD4<sup>+</sup>. Nous émettons l'hypothèse que chez les WR, les faibles réponses T CD8<sup>+</sup> sont la conséquence des faibles réponses T CD4<sup>+</sup>.

## **Méthodes**

### **Population d'étude**

Nous avons étudié 79 patients issus de la cohorte Codex (Cohorte ANRS Codex) [critères d'inclusion : infection VIH depuis au moins 5 ans, ne jamais avoir pris de traitement anti-rétroviral et les 5 dernières charges virales inférieures à 400 copies/ml]. Les caractéristiques biologiques et cliniques sont présentées dans la Table 1.

### **Préparation des cellules**

Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) ont été isolées à partir du sang de patients et par centrifugation sur Ficoll. La détermination du HLA (Human leukocyte antigen) a été obtenue par une technique de microlymphocytotoxicité dépendant du complément (One Lambda, Montpellier, France). Les cellules ont été cryopréservées dans de l'azote liquide pour des analyses ultérieures.

### **Cytométrie de flux**

Les PBMC ont été analysés sur un cytomètre de flux 6 couleurs (FACS CANTO). Les cellules spécifiques du VIH ont été identifiées après marquage par des pentamères et dextramères du HLA de classe I couplés aux différents épitopes dérivés des protéines Gag, Nef, Env et Pol. Les cellules ont ensuite été co-marquées avec les anticorps membranaires : CD3 couplé en APC-H7, CD8 couplé en PerCP-Cy5.5, CD27 couplé en FITC, CD38 couplé en FITC, CD45RO couplé en PE, HLA-DR couplé en PE-Cy7 et intracellulaires : IFN- couplé en APC et IL-2 couplé en PE. La caractérisation phénotypique des cellules spécifiques du VIH est réalisée en cytométrie de flux.

### **Marquage intracellulaire de cytokines**

La sécrétion d'IFN- et d'IL-2 par les LT CD8<sup>+</sup> et les LT CD4<sup>+</sup> a été analysée par cytométrie de flux après stimulation de 15h par un peptide spécifique et après blocage de la sécrétion par la bréfeldine A.

### **Capacité proliférative par CFSE**

Les PBMC ont été marqués avec 0,35 µM de carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE, Molecular Probes) pendant 10 minutes à 37°C. Après plusieurs lavages, ils ont été stimulés

pendant 6 jours avec des peptides du HIV (2 µg/mL). Après incubation, les cellules ont été lavées, marquées par des anticorps comme décrit précédemment (Cytométrie de flux). Un contrôle négatif (milieu seul) et un contrôle positif (stimulation par SEB) ont été inclus dans chaque expérience. Les résultats ont été mesurés par cytométrie de flux.

### **Activité cytotoxique des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH**

Nous avons caractérisé la capacité cytotoxique des LT CD8<sup>+</sup> par un test de cytotoxicité décrit précédemment. Brièvement, les PBMC ont été séparés en deux : 10 millions de PBMC vont servir de cellules effectrices et 2 millions de PBMC vont servir de cellules cibles. Les cellules effectrices sont stimulées pendant 5 jours avec 2µM d'un peptide spécifique du VIH (peptide A). Les cellules cibles sont blastées pendant 5 jours avec de la PHA (1µg/ml) et de l'IL-2 (10UI/ml). A jour 5, les LT CD8<sup>+</sup> des cellules effectrices sont sélectionnées à l'aide de billes anti-CD8 (Miltenyi Biotec) et les cellules cibles sont déplétées de LT CD8<sup>+</sup> et de NK avec des billes anti-CD8 et anti-CD56 (Miltenyi Biotec). Les cellules cibles sont ensuite mises en culture pendant 1h à 37°C soit avec le peptide A soit avec un autre peptide qui servira de contrôle négatif. Puis ces cellules sont marquées par du TFL4 (Grantoxilux) pendant 15 min à 37°C. Les LT CD8<sup>+</sup> sont par la suite ajoutés à la culture des cellules cibles à un ratio Effecteur : cibles (50 : 1) et incubés pendant 1h à 37°C. Les cellules sont ensuite analysées par cytométrie de flux (FACS CANTO).

### **Inhibition de la réplication virale *ex vivo***

La mesure de la capacité d'inhibition de la réplication virale a été effectuée comme décrit précédemment [353]. Brièvement, les LT CD4<sup>+</sup> ont été activés par de la PHA et de l'IL-2 pendant 3 jours, puis infectés avec le VIH-1 BaL et mis en culture avec du milieu (contrôle négatif) ou des LT CD8<sup>+</sup> autologues non stimulés (ratio 1 : 1). L'antigène p24 est mesuré à la fin de la culture dans le surnageant par ELISA (Zeptomatrix) comme une mesure de la réplication virale. La capacité des LT CD8<sup>+</sup> à supprimer l'infection par le VIH est exprimée en log decrease de la production de p24 quand les LT CD4<sup>+</sup> superinfectés ont été mis en culture avec les LT CD8<sup>+</sup>.

### **Méthodes statistiques**

Les données ont été analysées avec le programme GraphPad. Les groupes ont été comparés par un test non paramétrique Mann-Whitney pour des données quantitatives ou un test de chi<sup>2</sup> pour des données qualitatives. Les corrélations ont été évaluées par un test de Spearman. Le

coefficient de corrélation  $r$  de Spearman et (dans les figures) la droite de régression de Pearson sont indiqués lorsque les corrélations sont significatives. Le seuil pour les tests significatifs a été mis à  $P < 0.05$ .

## Résultats

### Caractéristiques cliniques des deux groupes de HIC « Weak Responders » et « Strong Responders »

	Weak Responders (log p24 decrease < 2)	Strong Responders (log p24 decrease > 2)	p
Number	37	42	
Gender (% men)	50%	41%	0,45
Age (years)	47 [42-54]	48 [42-52]	0,95
Time since diagnosis (years)	14 [11-16]	13 [9-17]	0,88
HLA-B*57 carriers (%)	41%	48%	0,53
Protective HLA-B carriers (%)	59%	64%	0,56
CD4/ $\mu$ l	835 [712-1029]	783 [569-971]	0,30
CD8/ $\mu$ l	737 [523-938]	795 [664-954]	0,26
Plasmatic HIV-RNA (copies/mL)	6 [1-36]	20 [2-74]	0,08
Cellular HIV-DNA (copies/106 PBMC)	11 [10-30]	14 [10-54]	0,58

**Table 1: Study population**

Il n'y a aucune différence significative dans les paramètres cliniques et biologiques entre les « Weak Responders » (WR) et les « Strong Responders » (SR). En effet, ni la proportion de patients avec un HLA dit protecteur (ie HLA-B\*57 et/ou HLA-B\*27) ni les taux de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> ne diffèrent entre les WR et les SR. Il existe une tendance quant à la mesure de la charge virale en ARN avec une plus faible charge virale chez les WR comparés aux SR mais cette différence n'est pas significative.

**Les « Strong Responders » présentent une fréquence plus importante de cellules spécifiques T CD8<sup>+</sup> du VIH que les « Weak Responders » notamment dû à une fréquence plus importante de cellules effectrices**

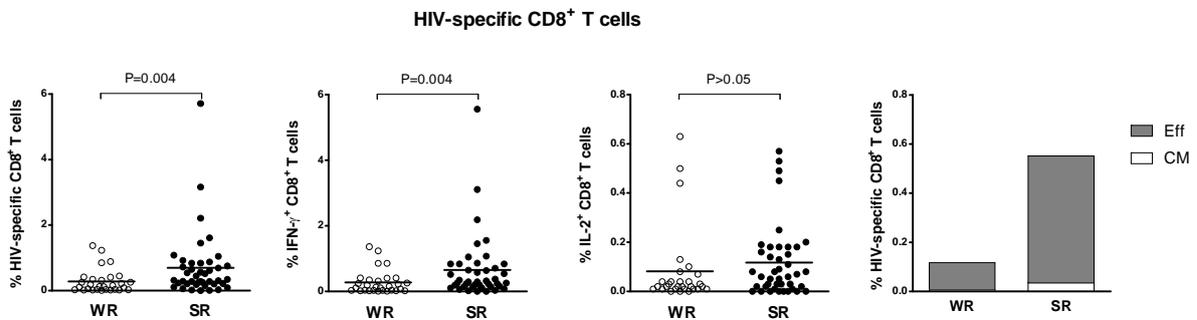


Figure 1 : Fréquence de LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH fonctionnels chez les SR et les WR.

Nous avons tout d'abord mesuré la fréquence de cellules spécifiques T CD8<sup>+</sup> par la production de cytokines (IFN- $\gamma$  et/ou IL-2) après stimulation par un peptide du VIH et comparé cette fréquence entre les « Weak Responders » (WR) et les « Strong Responders » (SR). Nous montrons que les WR ont une fréquence plus faible de cellules spécifiques T CD8<sup>+</sup> du VIH comparé aux SR (0.13% [0.04%-0.38%] vs 0.33% [0.21%-0.84%],  $P=0.004$ ) notamment dû aux cellules sécrétant de l'IFN- $\gamma$  (0.13% [0.03%-0.38%] vs 0.29% [0.14%-0.84%],  $P=0.01$ , respectivement). Par contre, il n'y a pas de différence significative dans la fréquence de cellules sécrétant de l'IL-2 entre les WR et les SR (0.02% [0.01%-0.06%] vs 0.07% [0.02%-0.18%],  $P=0.08$ , respectivement). En s'intéressant à l'état de différenciation des cellules spécifiques du VIH qui sécrètent des cytokines, nous pouvons noter que les cellules effectrices (Eff, CCR7<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>) sont les principales cellules sécrétant les cytokines comparées aux cellules mémoires (MC, CCR7<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) chez les WR et chez les SR (0.007  $\pm$  0.014% de MC et 0.110  $\pm$  0.186% de LT CD8<sup>+</sup> effectrices spécifiques du VIH chez les WR et 0.035  $\pm$  0.069% de MC et 0.517  $\pm$  0.502% de LT CD8<sup>+</sup> effectrices spécifiques du VIH chez les SR). Cependant, bien que la contribution des MC dans la réponse T CD8<sup>+</sup> ne diffère pas significativement entre les WR et les SR, celle des cellules effectrices est différente avec une plus forte contribution chez les SR que chez les WR ( $P<0.0001$ ).

**Les « Strong Responders » présentent de plus fortes réponses T CD8<sup>+</sup> avec de plus fortes capacités cytotoxiques que les « Weak Responders »**

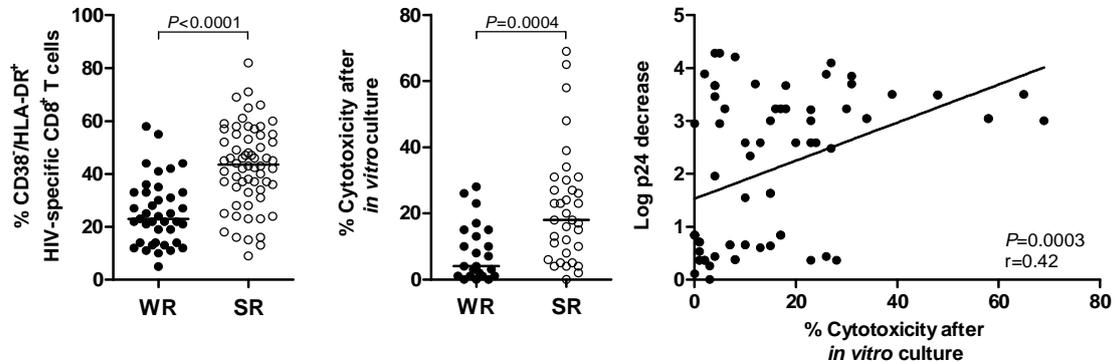


Figure 2 : Profil d'activation et capacité cytotoxique des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH chez les WR et les SR.

Le phénotype CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> est préférentiellement exprimé sur les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH des HIC et ces cellules démontrent de fortes caractéristiques mémoires et effectrices. Dans cette étude, nous montrons tout d'abord que les SR présentent de plus fortes fréquences de LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH avec le profil CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> comparés aux WR (44% [34%-55%] vs 23% [14%-33%],  $P < 0.0001$ ). Nous retrouvons également que les SR ont de plus fortes capacités cytotoxiques *in vitro* que les WR (18% [8%-30%] vs 4% [1%-15%],  $P = 0.0004$ ). De plus, la forte capacité d'inhibition de la réplication virale corrèle avec la capacité cytotoxique ( $P = 0.0003$ ,  $r = 0.42$ ).

**Les « Strong Responders » présentent une fréquence plus importante de cellules spécifiques T CD4<sup>+</sup> du VIH notamment dû à une fréquence plus importante de cellules effectrices que les « Weak Responders »**

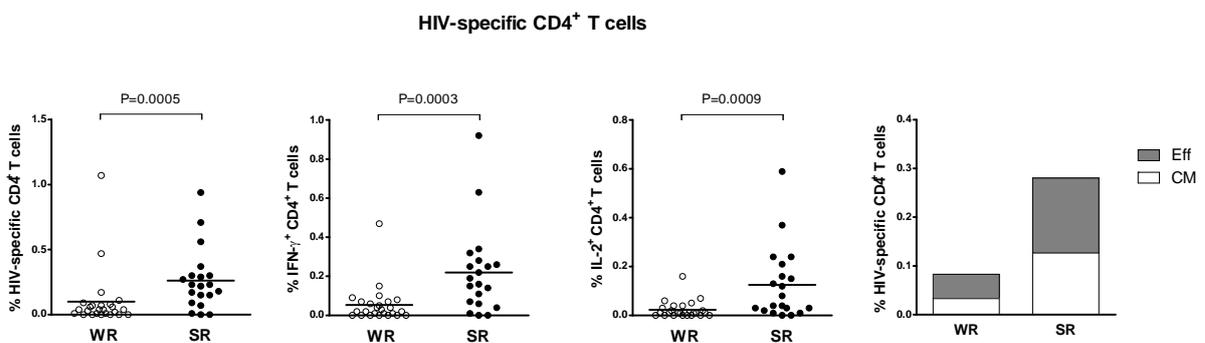


Figure 3 : Fréquence de LT CD4<sup>+</sup> spécifiques du VIH fonctionnels chez les SR et les WR.

Nous retrouvons les mêmes résultats que pour les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH entre WR et SR. Les WR présentent une fréquence de LT CD4<sup>+</sup> spécifiques du VIH plus faible que les SR (0.04% [0.01%-0.08%] vs 0.23% [0.11%-0.3%],  $P=0.0005$ , respectivement) ainsi qu'une plus faible fréquence de cellules sécrétant de l'IFN- $\gamma$  (0.02% [0%-0.07%] vs 0.06% [0.02%-0.2%],  $P=0.0003$ , respectivement) ou de l'IL-2 (0.01% [0%-0.04%] vs 0.18% [0.06%-0.28%],  $P=0.0009$ , respectivement). De même, concernant l'état de différenciation des cellules qui sécrètent les cytokines, la contribution des cellules effectrices dans la sécrétion des cytokines est beaucoup plus importante que celle des cellules mémoires que ce soit chez les WR ou chez les SR (0.033  $\pm$  0.052% de MC et 0.050  $\pm$  0.076% de LT CD4<sup>+</sup> effectrices spécifiques du VIH chez les WR et 0.127  $\pm$  0.335% de MC et 0.154  $\pm$  0.128% de LT CD4<sup>+</sup> effectrices spécifiques du VIH chez les SR). Nous pouvons noter tout de même que la contribution des cellules mémoires au sein des LT CD4<sup>+</sup> est supérieure à celle au sein des LT CD8<sup>+</sup> que ce soit chez les WR et chez les SR. Nous retrouvons comme chez les LT CD8<sup>+</sup> que la contribution des cellules effectrices est différente entre WR et SR avec une plus forte contribution des cellules effectrices chez les SR que chez les WR ( $P=0.03$ ).

### L'activité des LT CD8<sup>+</sup> effecteurs corrèle avec la fréquence des LT CD4<sup>+</sup> spécifiques du VIH

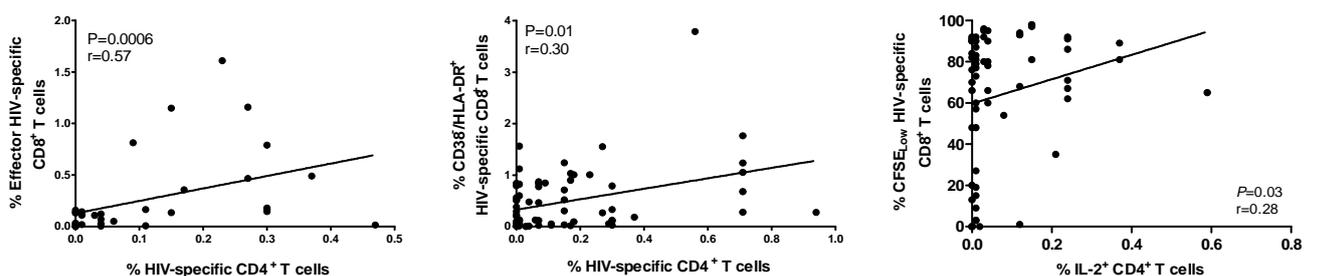


Figure 4 : Corrélations entre réponse T CD8<sup>+</sup> spécifique du VIH et réponse T CD4<sup>+</sup> spécifique du VIH.

Nous avons par la suite étudié l'association entre les réponses T CD8<sup>+</sup> et les réponses T CD4<sup>+</sup>. La fréquence de LT CD8<sup>+</sup> effecteurs spécifiques du VIH corrèle avec la fréquence de LT CD4<sup>+</sup> spécifiques du VIH ( $P=0.0006$ ,  $r=0.57$ ). De plus, la fréquence de la sous population effectrice CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> est associée avec la fréquence de LT CD4<sup>+</sup> spécifiques du VIH

( $P=0.01$ ,  $r=0.30$ ). Concernant la capacité proliférative des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH, nous montrons que cette capacité mesurée en CFSE corrèle avec la capacité des LT CD4<sup>+</sup> à produire de l'IL-2 ( $P=0.03$ ,  $r=0.28$ ) et ces résultats suggèrent que les LT CD4<sup>+</sup> contribuent à induire une meilleure réponse T CD8<sup>+</sup>.

## La capacité d'inhibition de la réplication virale corrèle avec les réponses T CD8<sup>+</sup> et T CD4<sup>+</sup> spécifiques du VIH

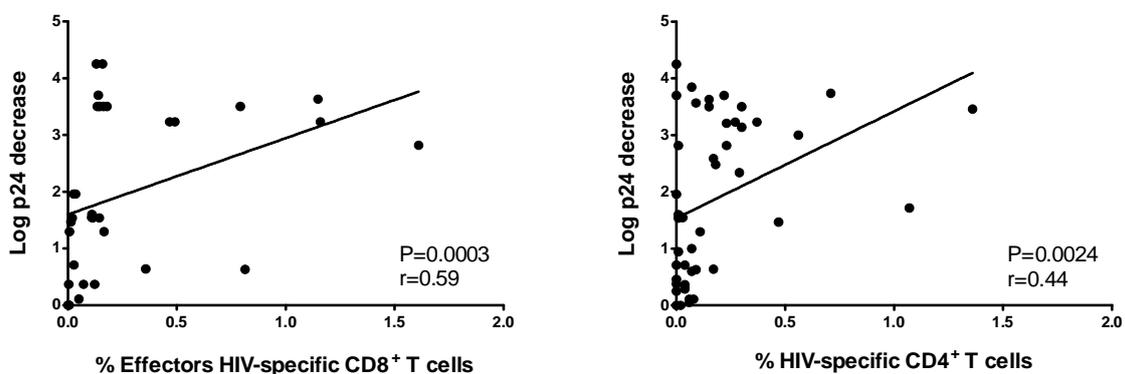


Figure 5 : Corrélations entre inhibition de la réplication virale induite par les LT CD8<sup>+</sup> et fréquence de LT CD8<sup>+</sup> et LT CD4<sup>+</sup> spécifiques du VIH.

La corrélation entre la capacité d'inhibition de la réplication virale mesurée par le log p24 decrease et la fréquence de LT CD8<sup>+</sup> effecteurs ( $P=0.0003$ ,  $r=0.59$ ) suggère que les LT CD8<sup>+</sup> effecteurs spécifiques du VIH sont responsables de l'inhibition de la réplication virale. Cette capacité d'inhibition corrèle également avec la fréquence de LT CD4<sup>+</sup> spécifiques du VIH ( $P=0.002$ ,  $r=0.44$ ). Ceci suggère que la présence de LT CD4<sup>+</sup> conduit à une meilleure réponse des LT CD8<sup>+</sup> et donc à un meilleur contrôle de l'infection par le VIH par les réponses T. Les patients avec une faible réponse T CD4<sup>+</sup> spécifique du VIH semblent posséder une faible réponse T CD8<sup>+</sup> effectrice spécifique du VIH et un faible contrôle de la réplication virale par les LT CD8<sup>+</sup>.

## Conclusion

Nous avons étudié deux groupes de HIC avec une capacité d'inhibition de la réplication virale des LT CD8<sup>+</sup> *ex vivo* différente: les « Weak Responders » (WR) qui ont une faible capacité

des LT CD8<sup>+</sup> à inhiber la réplication virale (<2 log p24 decrease) et les « Strong Responders » (SR) qui ont une forte capacité des LT CD8<sup>+</sup> à inhiber la réplication virale (>2 log p24 decrease). Le but de cette étude était d'analyser les réponses T CD8<sup>+</sup> et T CD4<sup>+</sup> des deux groupes de patients et de déterminer les paramètres les différenciant.

Les WR et les SR ne présentent pas de différence dans les paramètres cliniques avec des charges virales en ARN et en ADN ainsi que des taux de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> similaires. La surreprésentation de certains HLA de classe I chez les HIC notamment HLA-B\*27 et HLA-B\*57 et la meilleure fonctionnalité des réponses T CD8<sup>+</sup> restreintes par ces HLA comparées aux réponses restreintes par d'autres HLA [308,340] peuvent suggérer que ce paramètre joue un rôle déterminant dans la différence entre les « Weak Responders » et les « Strong Responders ». Cependant, le lien entre les meilleures réponses T CD4<sup>+</sup> observées chez les SR et la présence d'un HLA de classe I protecteur ne paraît pas évident. Par ailleurs, la fréquence de patients avec un HLA protecteur est similaire entre les deux groupes de HIC et ne permet donc pas d'expliquer les meilleures réponses T des SR par rapport aux WR.

Cette plus forte réponse T CD8<sup>+</sup> chez les SR par rapport aux WR peut être liée à une plus forte réponse T CD4<sup>+</sup>. En effet, l'aide des LT CD4<sup>+</sup> est importante dans la réponse immune et notamment dans l'aide apportée aux LT CD8<sup>+</sup> ceci pourrait expliquer cette différence de réponse entre WR et SR. Des études montrent que la forte fonctionnalité des LT CD4<sup>+</sup> avec une forte avidité fonctionnelle [363] et une forte capacité de sécrétion d'IL-2 et d'IL-21 permettent d'induire une forte activité antivirale des LT CD8<sup>+</sup> [364,365] et nous laissent supposer que les HIC possèdent de fortes réponses T CD4<sup>+</sup>. Dans notre étude, nous avons montré que la fréquence des LT CD4<sup>+</sup> ainsi que leur capacité à produire des cytokines, l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-2 sont supérieures chez les SR par rapport aux WR et que cette plus forte fréquence de cellules ou la plus forte capacité de sécrétion de cytokines corrèle avec une plus forte fréquence de LT CD8<sup>+</sup> effecteurs et une plus forte fonctionnalité de ces cellules. Ces résultats suggèrent que chez les SR, les LT CD4<sup>+</sup> spécifiques sont plus nombreux et permettent de soutenir une meilleure réponse T CD8<sup>+</sup> alors que chez les WR, les faibles réponses T CD4<sup>+</sup> ne permettent pas de maintenir une forte réponse T CD8<sup>+</sup>. La faible fréquence de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> fonctionnels chez les WR suggère que le contrôle de la réplication virale n'est pas induit par les LT CD8<sup>+</sup>.

Il ne faut toutefois pas totalement exclure un rôle des LT CD8<sup>+</sup> dans l'inhibition de la réplication chez les WR *in vivo*. En effet, une étude de Pereyra et al. a montré que les WR

sont capables de présenter de fortes réponses T CD8<sup>+</sup> après une activation longue [347]. Sur des patients HIC qui présentent *ex vivo* des faibles réponses en inhibition de la réplication virale et en ELISpot IFN- $\gamma$ , les auteurs montrent qu'après une culture de 14 jours, les LT CD8<sup>+</sup> sont polyfonctionnels et sont capables d'inhiber fortement la réplication virale. Il est donc possible que les WR possèdent des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> dans un état de différenciation moins avancé et qu'ils nécessitent d'être réactivés et de se amplifier pour acquérir des fonctions effectrices. Cependant, ces résultats ont été obtenus après une culture longue *in vitro* et ne sont pas forcément représentatifs des réponses exprimés *in vivo*. De même, il est possible qu'après activation longue *in vitro*, les LT CD8<sup>+</sup> des patients sous traitement inhibent la réplication virale de façon similaire.

De plus, la tendance d'une plus faible charge virale chez les WR par rapport aux SR peut permettre d'expliquer les faibles réponses T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Il est possible que le niveau des réponses T résulte du niveau de la charge virale et que les fortes fréquences de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH ne sont que le reflet d'une plus forte activation de ces cellules. En effet, nous avons précédemment montré que les WR présentent une activation plus faible que les SR avec une plus faible expression de HLA-DR sur les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH [340] ce qui renforce cette idée d'une plus faible réponse T et une plus faible activation chez les WR résultant d'une plus faible charge virale. Cependant, dans cette étude, seuls les WR porteurs d'un HLA protecteur ont une charge virale plus faible. En effet, les WR non porteurs d'un HLA protecteur et les SR porteurs ou non d'un HLA protecteur possèdent une charge virale similaire et qui est plus importante que les WR porteurs d'un HLA protecteur. Donc, ces résultats montrent que chez les patients porteurs d'un HLA protecteur, il existe une différence de charge virale et une différence de réponse T entre WR et SR ce qui suggère que le niveau de charge virale impacte le niveau des réponses T. Par contre, chez les autres patients, non porteurs d'un HLA protecteur, le niveau de charge virale étant le même entre WR et SR, il semble que ce paramètre n'influence pas le niveau des réponses T.

Il est donc possible qu'un autre mécanisme d'inhibition de la réplication virale ait lieu permettant à ces patients de contrôler *in vivo* l'infection par le VIH. Les études génétiques ont mis en évidence une corrélation entre certains allèles KIR3DL codant pour des molécules d'activation ou d'inhibition des cellules NK et certains HLA dits protecteurs [308,320]. Ces résultats mettent en évidence que les cellules NK peuvent jouer un rôle important dans l'inhibition de la réplication virale. De plus, il a récemment été montré que les réponses NK corrélaient inversement aux réponses T CD8<sup>+</sup> chez les HIC suggérant fortement que chez les

WR, les cellules NK permettent de contrôler l'infection [366]. Mais tous les patients HIC ne sont pas porteurs d'un HLA de classe I protecteurs et les réponses NK ne permettent donc pas d'expliquer le contrôle de l'infection chez tous les WR.

Récemment, il a été mis en évidence que les cellules CD4<sup>+</sup>, LT et macrophages, des HIC sont plus résistants à l'infection par le VIH que les cellules des autres patients. Deux équipes ont mis en évidence le rôle du facteur de restriction p21 dans la meilleure résistance à l'infection chez les HIC [302,367]. Cette plus forte restriction du VIH pourrait permettre d'expliquer le meilleur contrôle de l'infection par rapport aux autres patients VIH. Nous pouvons également émettre l'hypothèse d'une plus forte restriction du VIH chez les WR ce qui expliquerait une plus faible induction de la réponse T. Chez les SR, la plus faible restriction se traduirait par une plus forte infection des LT CD4<sup>+</sup> comme suggéré par la tendance d'une plus forte charge virale et ceci induirait une plus forte activation des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> et une plus forte réponse T anti-VIH comme mesurée *ex vivo* chez ces patients. Les futures études devraient porter leur attention sur l'importance de cette restriction au sein des WR et des SR. S'il s'avère qu'il existe une différence significative sur le niveau de restriction entre WR et SR, ceci pourrait expliquer les différences de réponses T observées dans cette étude.

## Discussions & Perspectives

L'identification des patients qui contrôlent spontanément le VIH-1 a permis d'avoir un modèle de contrôle durable de l'infection par le VIH-1. Au cours de ces travaux, nous avons étudié le rôle et la fonctionnalité des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH chez ces patients. Nous avons analysé plus particulièrement deux sous populations de LT CD8<sup>+</sup> spécifiques qui sont exprimées de façon préférentielle chez les HIC : les cellules présentant le phénotype particulier CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> et les cellules caractérisées par un phénotype Eomes<sup>hi</sup>CD57<sup>+</sup>. Ces cellules semblent donc être des marqueurs du contrôle durable de l'infection et nous avons émis l'hypothèse que ces cellules sont responsables du contrôle de la réplication virale *in vivo*. De plus parmi les patients HIC, il existe une hétérogénéité de la réponse T CD8<sup>+</sup> concernant la capacité d'inhiber la réplication virale *ex vivo* et nous avons défini deux groupes : les « Weak Responders » (WR) et les « Strong Responders » (SR). Nous avons par la suite étudié les réponses T CD8<sup>+</sup> et T CD4<sup>+</sup> de ces deux groupes de patients.

Dans une étude, nous avons montré que les cellules avec le phénotype particulier CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> affichent à la fois des caractéristiques de cellules mémoires au repos avec une faible activation, une bonne survie, une forte fréquence de cellules polyfonctionnelles et une forte capacité de prolifération mais aussi des caractéristiques de cellules effectrices avec une forte capacité cytotoxique. Nous avons par ailleurs montré que les HIC présentent des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH avec une forte expression d'Eomes suggérant que cette expression est responsable de la meilleure fonctionnalité des LT CD8<sup>+</sup> des HIC comparés aux autres patients. Enfin, nous avons montré que les Strong Responders ont de meilleures réponses T CD8<sup>+</sup>, présentent une fréquence plus importante de la sous population CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> ainsi que des réponses T CD4<sup>+</sup> supérieures à celles observées chez les Weak Responders. Tout ceci suggère que les fortes réponses T CD8<sup>+</sup> observées chez les HIC sont induites par les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH avec le phénotype CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> et/ou Eomes<sup>hi</sup>CD57<sup>+</sup> et par de fortes réponses T CD4<sup>+</sup>.

La discussion s'articulera autour des différentes hypothèses de contrôle de l'infection du VIH chez les HIC. Nous nous focaliserons sur les LT CD8<sup>+</sup>, leur niveau d'expression des facteurs de transcription de la boîte T, Eomes et T-bet, et sur le rôle de la sous population CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> dans le contrôle *in vivo* de l'infection.

## **L'activation est nécessaire à une réponse efficace du système immunitaire mais est également délétère même chez les patients HIC**

Comme présenté dans l'introduction, l'activation des LT CD8<sup>+</sup> est nécessaire pour induire les fonctions effectrices des cellules. Néanmoins, dans le cas du VIH, l'activation peut aussi être délétère et ce paramètre est celui qui corrèle le plus avec la progression de la maladie et la diminution du niveau de LT CD4<sup>+</sup>. L'activation est mesurée par l'expression de CD38 et HLA-DR sur les LT CD8<sup>+</sup>. Une forte activation telle qu'observée chez les patients virémiques avec la forte fréquence de LT CD8<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> corrèle avec une déplétion rapide des LT CD4<sup>+</sup>. L'introduction des traitements antirétroviraux a permis de diminuer grandement la charge virale et l'activation systémique chez ces patients. De plus, en comparant la fréquence de LT CD8<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>, on remarque que le niveau d'activation est plus faible chez les patients sous traitement et les HIC que chez les patients virémiques mais supérieur à celui des témoins séronégatifs [70]. On peut toutefois noter que le niveau d'activation des HIC est supérieur à celui des patients HAART. Le traitement antirétroviral a donc permis de diminuer la charge virale ainsi que l'activation systémique et de diminuer la progression de la maladie mais l'infection n'est pas complètement éliminée et une production virale résiduelle est toujours présente. Ceci s'accompagne de dommages de la barrière intestinale, avec la présence de LPS ou du sCD14 dans le plasma supérieure à celle des patients non infectés [368]. Ces paramètres sont le reflet de l'altération de la barrière intestinale et de la translocation bactérienne et ces deux paramètres participent à l'activation et à l'inflammation généralisées vu chez ces patients HAART [238].

Concernant les HIC, bien qu'il y ait un contrôle de la réplication virale sans traitement à des niveaux en dessous des seuils de détection classique (<50 copies/ml), il est également possible de détecter la présence de virus et donc de montrer qu'il y a une réplication virale résiduelle à bas bruit [369]. De plus certains patients contrôleurs manifestent des signes de progression avec une baisse du taux de LT CD4<sup>+</sup> après un certain nombre d'années. L'équipe de F. Boufassa a présenté des travaux sur des HIC étudiés pendant de nombreuses années et a montré que certains patients affichent une déplétion des LT CD4<sup>+</sup> [284]. L'infection par le VIH-1 chez les HIC n'est donc pas totalement contrôlée et il est probable que cette réplication résiduelle conduit à une activation et une inflammation systémique qui entraînent une baisse du taux de LT CD4<sup>+</sup> chez certains HIC. On peut également supposer que l'activation

systémique entraîne une déficience des réponses immunitaires et favorise le maintien d'une réplication virale résiduelle et tout ceci conduit à un maintien de ce cycle entre réplication virale et activation. Le maintien de cette activation et inflammation peut provenir de la réplication virale résiduelle [369] mais également des altérations de la barrière intestinale avec une translocation bactérienne. Les forts niveaux de LPS, de sCD14 et de DP10 supérieurs à ceux des patients non infectés semblent confirmer l'altération de la barrière intestinale [368].

Cette activation généralisée peut donc entraîner sur le long terme une baisse du niveau de LT CD4<sup>+</sup> chez les HIC mais peut également avoir d'autres effets sur l'organisme du patient. Des études ont permis de montrer en effet, que certains HIC contrôlant l'infection par le VIH présentent des symptômes de maladies non reliées au VIH comme une athérosclérose ou des déficiences cognitives [222,223,370].

L'activation des réponses immunitaires semble donc jouer un rôle important puisqu'elle est nécessaire afin d'induire de bonnes réponses comme c'est le cas de l'infection par le virus de la grippe où une forte activation a lieu [54]. Cependant, une forte activation persistante est néfaste pour le système immunitaire comme on peut le voir dans le cas des patients virémiques du VIH-1 qui présentent des réponses T CD8<sup>+</sup> déficientes avec un épuisement et un dysfonctionnement plus importants [371,372]. La faible activation même persistante présente chez les HIC semble par contre permettre de maintenir une bonne réponse immunitaire avec des LT CD8<sup>+</sup> fonctionnels. Cependant, cette activation permanente a des effets délétères sur le long terme puisque certains patients manifestent certains signes cliniques caractéristiques des patients infectés. Nous pouvons nous demander quel mécanisme est responsable du contrôle de l'infection chez les HIC.

## **Le rôle des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> chez les HIC**

Les LT CD4<sup>+</sup> jouent un rôle primordial dans la réponse immunitaire adaptative. En effet, les LT CD4<sup>+</sup> sont importants dans la différenciation des LT CD8<sup>+</sup> en cellules mémoires puisque des études chez la souris ont montré que l'absence des LT CD4<sup>+</sup> provoque une très faible réponse T CD8<sup>+</sup> secondaire [16,31,175]. Les LT CD4<sup>+</sup> jouent également un rôle important dans la différenciation et la maturation des lymphocytes B et la production d'anticorps [54]. Le VIH a pour principales cellules cibles les LT CD4<sup>+</sup> activés et ceci peut expliquer le dysfonctionnement des réponses immunes chez les patients virémiques. De même, chez les

patients qui ont initié un traitement antirétroviral lors de la phase chronique, les réponses T CD8<sup>+</sup> présentent des caractéristiques moins bonnes que celles des patients HIC [311,312,343]. Il est donc possible que l'altération des réponses T CD4<sup>+</sup> lors de la formation des réponses T CD8<sup>+</sup> soit responsable de la mauvaise fonctionnalité des réponses cellulaires.

De plus, il a été montré qu'un traitement précoce, ie en primo-infection, est bénéfique pour le patient. En effet, des études dans le laboratoire ont montré que l'initiation du traitement dès la primo-infection permet aux LT CD8<sup>+</sup> d'avoir une meilleure fonctionnalité que les patients sans traitement ou qui ont initié un traitement plus tard [373,374]. On peut émettre l'hypothèse que le traitement a permis de réduire la charge virale mais également la forte déplétion de LT CD4<sup>+</sup> et que la présence de ces cellules a permis aux LT CD8<sup>+</sup> de se différencier en cellules mémoires avec une bonne fonctionnalité. De plus, les HIC qui ont des forts taux de LT CD4<sup>+</sup> présentent également des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH avec de meilleures fonctions mémoires comme une meilleure capacité proliférative, une meilleure survie avec une plus forte expression du CD127, mais également de meilleures fonctions effectrices avec une plus forte production de perforine que les cellules des patients virémiques [288].

Nos travaux confirment qu'il existe un lien étroit entre réponse spécifique T CD8<sup>+</sup> et réponse spécifique T CD4<sup>+</sup>. En effet, chez les patients HIC, on observe une hétérogénéité de la réponse T CD8<sup>+</sup> avec des « Weak Responders » et des « Strong Responders » comme décrit précédemment. Il en est de même pour les réponses T CD4<sup>+</sup> et ces réponses sont parallèles aux réponses T CD8<sup>+</sup>. En effet, les WR montrent une plus faible réponse T CD4<sup>+</sup> et les SR montrent une plus forte réponse T CD4<sup>+</sup>. Tous ces résultats semblent confirmer que les plus fortes réponses T CD8<sup>+</sup> des HIC sont étroitement liées aux réponses T CD4<sup>+</sup>.

Il est donc possible que chez les HIC, le contrôle de l'infection se fasse très tôt lors de la primo-infection et que les LT CD4<sup>+</sup> spécifiques soient préservés et permettent d'induire de bonnes réponses T CD8<sup>+</sup>. En effet, des études ont émis l'hypothèse que les LT CD4<sup>+</sup> sont moins sensibles à l'infection et que le contrôle de la réplication virale passe par l'expression des facteurs de restriction et plus particulièrement par la protéine p21 chez les HIC [302,303]. Cette protéine est un inhibiteur des kinases cycline-dépendantes qui contrôle la progression du cycle cellulaire à travers l'activation des complexes cyclin-CDK1/2. Deux études démontrent que les HIC possèdent des LT CD4<sup>+</sup> qui sont moins susceptibles à l'infection par le VIH-1 que les cellules d'autres patients [302,303]. Bien que ces deux études montrent une plus faible

susceptibilité à l'infection après activation des LT CD4<sup>+</sup> par l'anticorps CD3, le mécanisme proposé diffère. Chen et al. montrent qu'en bloquant l'expression de la protéine p21, ils induisent une forte augmentation des rétro-transcrits viraux et une augmentation de la production d'ARN<sub>m</sub> viraux. Ils émettent donc l'hypothèse que la p21 est responsable de la restriction de la réplication virale dans ces cellules [302]. Saez-Cirion et al. quant à eux, démontrent que le niveau d'expression de la p21 n'est pas corrélé au niveau de restriction du virus. Bien que l'expression de la protéine p21 est plus élevée *ex vivo* chez les HIC que chez les autres groupes de patients (patients HAART, patients virémiques et témoins sains), après activation par le CD3, les LT CD4<sup>+</sup> des différents groupes de patients, ont des niveaux similaires d'expression de p21. Ce résultat indique que le plus fort niveau de restriction du VIH n'est pas lié au niveau de la protéine p21 et que cette restriction passe par un autre mécanisme [303]. Cependant, les auteurs ont montré récemment que dans les macrophages, cette protéine est impliquée dans le contrôle de la réplication virale via l'inhibition de la synthèse de désoxynucléotides [367]. Ces résultats suggèrent que la plus forte résistance à l'infection des cellules cibles chez les HIC permet à ces patients d'avoir un système immunitaire plus fonctionnel.

## **L'importance des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> chez les HIC**

Chez les « Strong Responders », les fortes réponses T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> et la capacité des LT CD8<sup>+</sup> à inhiber la réplication virale *ex vivo* suggèrent que les LT CD4<sup>+</sup> et LT CD8<sup>+</sup> jouent un rôle important dans le contrôle durable de l'infection. Par contre, chez les « Weak Responders », les faibles réponses T CD8<sup>+</sup> et T CD4<sup>+</sup> spécifiques du VIH posent la question du rôle de ces cellules dans le contrôle de la maladie. Cette faible réponse T chez les WR suggère que le contrôle de la réplication virale n'est pas restreint à l'activité des LT CD8<sup>+</sup> sur les cellules infectées. Les réponses NK peuvent expliquer l'inhibition de la réplication virale chez ces patients. En effet, une étude récente de Tomescu et al. démontre que chez les HIC, les réponses T CD8<sup>+</sup> corrélaient inversement avec les réponses NK [366] ce qui pourrait expliquer le contrôle de la réplication virale chez les patients avec de faibles réponses T CD8<sup>+</sup>.

Cependant, les réponses T CD8<sup>+</sup> peuvent également intervenir chez les WR. En effet, une étude récente de Pereyra et al. démontre que malgré la faible réponse T CD8<sup>+</sup> *ex vivo*, il est possible d'induire de fortes réponses T CD8<sup>+</sup> anti- $\delta$ VIH chez les WR après activation *in vitro*.

En effet, certains HIC présentent de faibles réponses T CD8<sup>+</sup> mesurées par l'ELISpot IFN- $\gamma$  et par un test d'inhibition de la réplication virale mais après activation pendant 14 jours, ces cellules possèdent une forte réponse avec une forte capacité d'inhibition de la réplication virale, une forte fréquence de cellules polyfonctionnelles et une forte expansion des cellules spécifiques du VIH. Ces résultats suggèrent donc que ces patients ont la capacité de répondre et de contrôler le virus après activation. Ils émettent l'hypothèse que cette capacité vient de la présence de cellules mémoires centrales capables de s'expandre et d'acquérir des fonctions effectrices [347]. Il faut toutefois noter que ces résultats sont obtenus après une culture longue *in vitro* et qu'ils ne sont pas forcément représentatifs des réponses exprimées *in vivo*. De même, il est possible qu'après activation longue *in vitro*, les LT CD8<sup>+</sup> des patients sous traitement inhibent la réplication virale de façon similaire.

Dans le laboratoire, nous avons confirmé ces résultats en étudiant les réponses T CD8<sup>+</sup> des WR après activation longue avec des peptides agonistes. Nos études montrent que chez certains patients qui ne présentent aucune réponse en ELISpot IFN- $\gamma$  *ex vivo*, il est possible d'induire des réponses après une culture longue en réponse ELISpot IFN- $\gamma$  mais que cette induction de réponse n'est pas retrouvée chez tous les patients WR. De plus, il est à noter que les WR dont il est possible d'induire une forte réponse T CD8<sup>+</sup> ne sont pas tous porteurs d'un HLA protecteur (data not shown). Les LT CD8<sup>+</sup> semblent donc jouer un rôle important dans le contrôle de la réplication virale.

## **L'importance des HLA de classe I dans le contrôle de la réplication virale chez les patients HIC**

Il faut tout d'abord noter que le VIH échappe au système immunitaire en induisant une diminution d'expression des HLA de classe I à travers la protéine Nef. A cause des différences de séquences dans le domaine cytoplasmique, les HLA-A et  $\beta$ B sont plus affectés par Nef que les HLA-C et  $\beta$ E [375]. Néanmoins, une étude a montré que le domaine cytoplasmique du HLA-B est plus résistant à la régulation médiée par Nef comparé au HLA-A. Ces différences de régulation ont un effet sur la reconnaissance des cellules infectées par les LT CD8<sup>+</sup> *in vitro*. Rajapaksa et al. émettent l'hypothèse que la relative résistance de régulation du HLA-B comparé au HLA-A contribue au meilleur contrôle du VIH par les réponses des LT CD8<sup>+</sup> restreintes par le HLA-B [376] et permettrait d'expliquer la forte corrélation de certains HLA-B avec un meilleur pronostic comme le HLA-B\*5701.

Chez les HIC, la plus forte représentation de certains HLA de classe I, comme le HLA-B\*5701 ou le HLA-B\*27, a permis d'émettre l'hypothèse que les réponses restreintes par ces HLA comme les réponses T CD8<sup>+</sup> et les réponses NK jouent un rôle très important dans le contrôle de la maladie. De même, il existe une corrélation de certains HLA de classe I avec une plus rapide progression (HLA-B\*35) et d'autres avec une progression plus lente. En effet, le virus présente une très forte variabilité de séquence avec un fort pouvoir de mutation. Il a été démontré que certaines séquences du génome du virus varient énormément, ce qui lui permet d'échapper aux réponses immunitaires sans perte de virulence. A l'opposé, certaines séquences essentiellement dans le gène de la protéine Gag, sont conservées et une mutation dans cette séquence a un impact important sur sa virulence [377]. Les HLA-B\*27 et HLA-B\*57 sont des HLA protecteurs et dont les réponses restreintes contre la protéine Gag sont en général très fortes chez les patients HIC [340]. Cependant, tous les patients porteurs d'un HLA de classe I dit protecteur ne deviennent pas des patients HIC et la majorité va progresser vers le stade SIDA en l'absence de traitement même si ces patients vont présenter des caractéristiques cliniques plus favorables [317,378,379]. Cela suggère que la présence de HLA de classe I dits protecteurs joue un rôle dans le contrôle de la réplication virale mais n'est pas suffisant pour expliquer le statut de HIC et le contrôle sur le long terme.

Chez les HIC, les réponses restreintes par ces HLA protecteurs sont majoritairement dirigées contre la protéine Gag. Les épitopes ciblés par ces HLA semblent très conservés et des mutations sur ces séquences entraînent une perte de virulence [380,381]. De plus, Lécurox et al. démontrent que les réponses restreintes par ces HLA présentent de meilleures réponses mémoires et effectrices que les réponses restreintes par d'autres HLA : la fréquence de cellules mémoires centrales (CCR7<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>), la survie mesurée par l'expression de CD127, l'avidité fonctionnelle, la capacité proliférative, la production d'IL-2 et les réponses en ELISpot IFN- $\gamma$  contre la protéine Gag sont plus importantes [340]. Cependant, il n'existe pas de différence significative entre les deux groupes de HIC selon qu'ils possèdent un HLA protecteurs ou non dans la capacité d'inhibition de la réplication virale *ex vivo* ni dans la capacité cytotoxique. La fréquence de cellules produisant de la perforine et présentant le profil CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> ne diffèrent pas non plus entre les deux groupes de HIC [315,340]. Il existe en outre une hétérogénéité de la capacité d'inhibition de la réplication virale chez les HIC porteurs d'un HLA protecteurs ou non et cela nous a permis de distinguer quatre groupes : les WR porteurs ou non d'un HLA protecteur et les SR porteurs ou non d'un HLA protecteur. Nous avons montré dans le laboratoire que seuls les WR porteurs d'un HLA

protecteurs présentent une plus faible charge virale et une plus faible fréquence de patients qui font des épisodes de blips viraux, ie des mesures de charges virales détectables au-delà de 50 copies/mL, comparés aux trois autres groupes [340]. Ces résultats suggèrent que chez les patients avec un HLA de classe I protecteur, la capacité d'inhibition de la réplication virale est associée à la fréquence de LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH et ces deux paramètres sont dépendants de la charge virale : la faible réponse T CD8<sup>+</sup> retrouvée chez les WR avec un HLA protecteur peut être expliquée par une très faible charge virale. En revanche, chez les HIC non porteurs d'un HLA protecteur, l'hétérogénéité de la capacité d'inhibition de la réplication virale des LT CD8<sup>+</sup> ne semble pas pouvoir être expliquée par une différence de fréquence de LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH, ni par une différence de charge virale. Ceci suggère que le contrôle du virus se fait à travers d'autres mécanismes chez ces patients comme par une plus forte réponse ADCC (Antibody dependent cellular cytotoxicity) [382].

## **Le rôle des facteurs de transcription Eomes et T-bet dans la meilleure réponse T CD8<sup>+</sup>**

T-bet et Eomes jouent un rôle important dans l'induction et la régulation des LT CD8<sup>+</sup>. La meilleure réponse de ces cellules chez les HIC met en avant l'idée que ces facteurs de transcription jouent un rôle important. Il apparaît donc primordial d'étudier l'expression de ces deux facteurs de transcription et la fonctionnalité des cellules exprimant des niveaux différents de ces facteurs chez les patients infectés par le VIH qui soit présentent une plus faible fonctionnalité des LT CD8<sup>+</sup> comme chez les patients virémiques soit présentent une bonne fonctionnalité comme chez les HIC. Cependant, peu d'études se sont intéressées à l'expression d'Eomes et de son rôle chez les HIC. De précédentes études se sont focalisées sur l'expression d'Eomes au sein des différentes sous populations T CD8<sup>+</sup> des différents patients infectés par le VIH, virémiques et sous traitement comparés aux donneurs sains. Une étude de l'équipe du Dr B. Rocha a montré qu'au sein de la sous population T CD8<sup>+</sup> mémoire effectrice, CCR7<sup>-</sup>, l'expression en ARN<sub>m</sub> de *T-bet* et d'*Eomes* est plus faible chez les patients virémiques comparés aux donneurs sains et donc que l'infection chronique du VIH entraîne une forte diminution d'expression de T-bet et d'Eomes [357]. Une autre étude a montré que l'expression d'Eomes au sein des cellules mémoires, centrales et effectrices, CD27<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup>, l'expression en protéine d'Eomes et de T-bet est par contre plus forte chez les patients virémiques que chez les patients sous traitement ou les donneurs sains [356]. Cette différence au niveau de l'expression d'Eomes et de T-bet peut s'expliquer par le fait qu'ils n'analysent

pas exactement les mêmes sous populations T CD8<sup>+</sup> mais également que l'expression est étudiée à des niveaux différents l'un en ARN<sub>m</sub> et l'autre en protéine. La plus forte fréquence de cellules exprimant Eomes chez les patients virémiques peut être associée à l'augmentation de l'inflammation et de l'IFN- $\gamma$  chez ces patients. En effet, dans les modèles murins, l'IFN- $\gamma$  régule le niveau d'expression d'Eomes dans les LT CD8<sup>+</sup> lors de la réponse immune [383] et l'IL-2 joue également un rôle important dans l'expression d'Eomes dans les réponses T CD8<sup>+</sup> [384] et la modification de sa disponibilité lors de l'infection VIH peut expliquer l'augmentation d'expression d'Eomes.

Nous nous sommes intéressés dans notre étude aux paramètres qui permettent de définir les cellules avec une bonne capacité cytotoxique. CD57 étant un marqueur fortement associé à l'expression des molécules cytotoxiques telles que perforine et granzyme B, nous avons évalué l'expression de Eomes et de CD57 au sein des LT CD8<sup>+</sup> et nous avons ainsi pu mettre en évidence une hétérogénéité de l'expression d'Eomes et de CD57 avec l'identification de quatre sous populations avec des caractéristiques différentes: Eomes<sup>-</sup>CD57<sup>-</sup>, Eomes<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup>, Eomes<sup>hi</sup>CD57<sup>+</sup> et Eomes<sup>int</sup>CD57<sup>+</sup>. Alors que les sous populations Eomes<sup>-</sup>CD57<sup>-</sup> et Eomes<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> possèdent de faibles réponses effectrices avec une absence d'expression des molécules cytotoxiques *ex vivo*, les deux sous populations Eomes<sup>hi</sup>CD57<sup>+</sup> et Eomes<sup>int</sup>CD57<sup>+</sup> expriment la perforine et le granzyme B avec une plus forte fréquence de cellules perforine<sup>+</sup>granzyme B<sup>+</sup> pour la sous population Eomes<sup>int</sup>CD57<sup>+</sup>. La sous population Eomes<sup>int</sup>CD57<sup>+</sup> présente également une expression plus importante de CD57 et une fréquence plus importante de cellules de différenciation terminale (CD27<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup>) que la sous population Eomes<sup>hi</sup>CD57<sup>+</sup>. Ces résultats semblent en contradiction avec ceux de l'étude de Paley et al. En effet, dans leur étude, ils montrent qu'il existe deux sous populations T CD8<sup>+</sup> spécifiques du LCMV T-bet<sup>high</sup> et Eomes<sup>high</sup> avec des caractéristiques différentes chez la souris. La sous population Eomes<sup>high</sup> présente un épuisement plus important, une fréquence de cellules sécrétant des cytokines plus faible et une fréquence de cellules produisant le granzyme B plus importante que la sous population T-bet<sup>high</sup> [130] alors que dans notre étude, la sous population Eomes<sup>int</sup>CD57<sup>+</sup> exprime de façon plus importante la perforine et le granzyme B comparée à la sous population Eomes<sup>hi</sup>CD57<sup>+</sup>. L'épuisement semble en outre plus important chez les cellules avec le profil Eomes<sup>int</sup>CD57<sup>+</sup> que les cellules avec le profil Eomes<sup>hi</sup>CD57<sup>+</sup> puisque les cellules Eomes<sup>int</sup>CD57<sup>+</sup> ont une prolifération *ex vivo* plus faible et une expression du marqueur de sénescence CD57 plus importante que les cellules Eomes<sup>hi</sup>CD57<sup>+</sup>. Il est possible que le niveau d'expression d'Eomes n'ait pas la même

conséquence fonctionnelle sur les LT CD8<sup>+</sup> chez la souris et chez l'homme. Il pourrait être intéressant d'associer d'autres marqueurs d'épuisement comme PD-1 pour étudier la corrélation entre le niveau d'expression d'Eomes et l'épuisement des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH.

Nous avons montré que les HIC présentent des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH avec un profil Eomes<sup>hi</sup>CD57<sup>+</sup> plus important que les patients HAART et les patients virémiques et que la fréquence de cette sous population corrèle inversement avec la charge virale. Ceci suggère tout d'abord qu'il y a une hétérogénéité d'expression d'Eomes dans les LT CD8<sup>+</sup> et que cette sous population Eomes<sup>hi</sup>CD57<sup>+</sup> est responsable des fortes réponses T CD8<sup>+</sup> observées et du contrôle de l'infection par le VIH chez les HIC. On peut émettre l'hypothèse que la plus forte expression d'Eomes chez les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH chez ces patients leur permet de maintenir une fonctionnalité accrue [311,315,316,346].

Concernant l'expression de T-bet, il existe également une hétérogénéité de son expression. En effet, son expression est faible au sein de la sous population Eomes<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup>, forte au sein des cellules exprimant le phénotype Eomes<sup>hi</sup>CD57<sup>+</sup> et très forte au sein des cellules Eomes<sup>int</sup>CD57<sup>+</sup>. Les HIC qui présentent *ex vivo* des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH avec le phénotype Eomes<sup>hi</sup>CD57<sup>+</sup> semblent donc avoir une plus faible expression de T-bet que les patients virémiques et sous traitement qui eux présentent des cellules avec le phénotype Eomes<sup>int</sup>CD57<sup>+</sup> et donc une forte expression de T-bet. Ce résultat peut sembler en contradiction avec l'étude de Hersperger et al. qui montre qu'après une stimulation courte les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques des patients HIC présentent une forte expression de T-bet. Il faut cependant prendre en compte que la stimulation du TCR induit une augmentation de l'expression de T-bet ce qui suggère que les cellules Eomes<sup>hi</sup>CD57<sup>+</sup> aient pu voir leur expression de T-bet augmenter ainsi que leur niveau de molécules cytotoxiques [344].

Une étude de McLane et al. a montré outre le niveau d'expression des deux facteurs de transcription dans la cellule que la localisation dans le noyau de T-bet et d'Eomes jouent également un rôle important dans la régulation des fonctions effectrices des LT CD8<sup>+</sup> [124]. L'analyse de l'expression de T-bet et d'Eomes en ARN<sub>m</sub> et en protéine n'est donc plus suffisante pour bien caractériser la fonctionnalité des LT CD8<sup>+</sup> et les études à l'avenir devraient tenir compte à la fois du niveau d'expression mais également de la localisation de ces deux facteurs de transcription.

## **La stimulation par de faibles doses d'antigène confère une bonne fonctionnalité et semble induire des cellules capables d'inhiber la réplication virale**

La bonne fonctionnalité des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> chez les HIC peut également être associée à une activation particulière de ces cellules. Comme présenté précédemment par notre équipe [314] et dans mes travaux, les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH chez les HIC présentent un phénotype d'activation particulier avec une expression de HLA-DR sans l'expression de CD38. De fait, chez les HIC il y a une plus forte fréquence de LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH qui expriment le phénotype CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>. Ce phénotype CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> a également précédemment été corrélé à un meilleur pronostic et une plus faible progression vers la maladie [354] et il a donc été primordial d'étudier le rôle de la molécule HLA-DR et de ces cellules dans le contrôle de la maladie.

Nous avons montré que les cellules avec ce profil d'activation ont à la fois de fortes capacités mémoires comme une forte fréquence de cellules polyfonctionnelles ou une meilleure survie mais également une forte capacité cytotoxique. Nous mettons en outre en lumière l'idée que le mécanisme induisant ce phénotype est une activation avec de faibles doses d'antigène et une forte avidité des cellules. Cette hypothèse semble en accord avec le fait que les HIC présentent généralement une très faible virémie, comparable à celle utilisée dans mes travaux pour les études *in vitro* [385,386] et que ces patients présentent également une plus forte avidité fonctionnelle que les autres patients infectés par le VIH [340,349,6352]. De plus, le phénotype CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> induit par de faibles doses d'antigène semble conférer de bonnes fonctionnalités aux LT CD8<sup>+</sup>. En effet, des études chez la souris montrent que les cellules mémoires activées par de faibles doses d'antigène présentent un faible épuisement cellulaire, ont une forte capacité proliférative et sont capables de survivre sur une longue période de temps [387]. Chez l'homme, l'activation des cellules avec de faibles doses d'antigène [388] présente l'avantage de ne pas induire d'internalisation du TCR des LT CD8<sup>+</sup> activés et les cellules sont donc capables d'avoir une activité cytotoxique immédiate. Une activation avec de fortes doses d'antigène induit l'internalisation du TCR et donc une absence de réponse cytotoxique jusqu'au retour du TCR à la surface de la membrane. De plus, les cellules avec ce phénotype paradoxal n'expriment pas d'autres marqueurs d'activation comme CD69, CD25 ou Ki67 et exhibent une bonne capacité de survie suggérant que la stimulation par de faibles doses d'antigène préserve les cellules d'une activation exacerbée et d'une perte de

fonctionnalité. Cette activation a minima permet donc d'induire seulement l'expression de HLA-DR et il est intéressant de se poser la question du rôle de cette protéine à la surface des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH. L'importance de la protéine HLA-DR sur les LT CD8<sup>+</sup> est encore sujette à débat. En effet, il s'agit d'une molécule de CMH de classe II et elle est généralement exprimée par les cellules présentatrices d'antigène comme les cellules dendritiques [54]. On peut émettre l'hypothèse que les LT CD8<sup>+</sup> participent à la présentation et à l'activation des LT CD4<sup>+</sup> mais aucune étude n'a pour le moment démontré ce mécanisme pour les LT CD8<sup>+</sup>. De plus, il a été récemment montré qu'outre le TCR des LT CD4<sup>+</sup>, un autre ligand de HLA-DR est le FCRL6 exprimé à la surface des LT CD8<sup>+</sup> [78]. Les cellules dendritiques exprimant HLA-DR sont capables d'activer les LT CD8<sup>+</sup> via le CMH de classe I et HLA-DR agissant comme molécule costimulatrice. Il est donc possible que chez les HIC, la stimulation par de faible dose d'antigène induit l'expression de HLA-DR sur les cellules CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> et leur permet de pallier un défaut de stimulation des cellules dendritiques en fournissant le signal de costimulation.

Les LT CD8<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> ont donc une bonne fonctionnalité avec de fortes capacités mémoires et effectrices. On peut se demander quel rôle précis ces cellules jouent dans le contrôle du VIH. Migueles et al. et Saez Cirion et al. ont tout d'abord montré que les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH sont capables d'inhiber la réplication virale *in vitro* [312,313]. Récemment, l'équipe du Dr Blankson s'est intéressée aux sous populations T CD8<sup>+</sup> responsables de ce contrôle. Buckheit et al. montrent que les cellules CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> présentent de fortes capacités cytotoxiques très tôt et sont capables de lyser les cellules infectées [355]. Nous avons confirmé ces résultats en montrant qu'il existe une corrélation entre la fréquence de cellules présentant le phénotype CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> et la capacité *ex vivo* des LT CD8<sup>+</sup> à inhiber la réplication virale. De fait, les patients avec une faible capacité des LT CD8<sup>+</sup> à supprimer la réplication virale vont présenter une plus faible fréquence de cellules présentant le phénotype CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>. Ces cellules ont donc *ex vivo* de fortes capacités mémoires et effectrices et sont capables d'inhiber la réplication virale *in vitro*. Ces résultats pourraient expliquer que ces cellules participent activement au contrôle du VIH en répondant rapidement et efficacement sans être dans un état d'épuisement. On peut donc émettre l'hypothèse qu'une activation avec de faibles doses induit une activation optimale des cellules qui exhibent le profil particulier CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> et sont capables de répondre rapidement et de lyser les cellules infectées immédiatement.

## Traitement actuel et possibles rôles des réponses T CD8<sup>+</sup> dans l'élaboration d'un vaccin

A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement efficace pour éradiquer totalement le VIH chez un patient. Les études chez les HIC mettent en évidence qu'il existe des mécanismes permettant d'inhiber efficacement la réplication virale en l'absence de traitement *in vivo*. La plus faible fréquence de réservoirs viraux chez les HIC par rapport aux autres patients infectés suggère que le contrôle de l'infection s'établit dès la primo-infection [389]. Il est possible à l'heure actuelle de réduire la charge virale et la formation des réservoirs viraux tôt dans l'infection en initiant les traitements dès la primo-infection. En effet, des études ont montré qu'une initiation dès la phase Fiebig I ou dans les 15 premiers jours de l'infection réduit considérablement la taille des réservoirs chez ces patients [390,391]. Ces résultats sont encourageants dans la perspective d'éradiquer le VIH puisqu'il a été montré qu'un traitement précoce permet de réduire de 96% la transmission sexuelle du VIH-1 chez des couples sérodiscordants (HPTN 052, [197]).

Chez les HIC, les mécanismes mis en place dès la primo-infection sont difficiles à élucider et peu d'études se sont focalisées sur ce point dû notamment à l'impossibilité de définir le statut HIC lors de la primo-infection et donc la nécessité d'un long suivi des patients. Dans le laboratoire, Goujard et al. ont montré que 8 patients étudiés depuis la primo-infection présentent une baisse de la charge virale en dessous de 400 copies/ml sans traitement. Ce contrôle s'établit tôt environ 6 mois après l'infection et s'est maintenu en médiane 4 ans chez ces patients [392]. On peut émettre l'hypothèse que la plus forte résistance à l'infection des LT CD4<sup>+</sup> et les fortes réponses T CD8<sup>+</sup> jouent un rôle dans le contrôle de l'infection dès la primo-infection. En effet, nous avons étudié des prélèvements en primo-infection de divers patients : les LT CD8<sup>+</sup> des patients non contrôleurs issus de l'essai clinique ANRS 147 Optiprim montrent une très faible capacité d'inhiber la réplication virale *ex vivo* alors que les LT CD8<sup>+</sup> d'un patient issu de la cohorte PRIMO qui s'est avéré être un HIC démontre une forte capacité d'inhibition de la réplication virale. Ces résultats semblent confirmer cette hypothèse d'une forte réponse T CD8<sup>+</sup> dès la primo-infection. Cependant, aucune étude n'a pour le moment démontré clairement que ces mécanismes ont lieu chez tous les patients HIC dès la primo-infection et qu'ils sont responsables de la forte diminution et du maintien de la faible réplication virale. L'induction des réponses T CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1 dans la conception d'un vaccin s'est également pour le moment avérée inefficace (essai clinique par

Merck, STEP) [393,394]. L'activation du système immunitaire et des réponses T CD8<sup>+</sup> a eu l'effet contraire escompté et les patients vaccinés ont été plus susceptibles à l'infection que les patients non vaccinés. Cet essai clinique a remis en cause l'importance de la réponse T CD8<sup>+</sup> dans un contrôle de l'infection. Cependant, récemment des modèles simiens ont permis de montrer que l'induction de fortes réponses T CD8<sup>+</sup> dans les muqueuses permettent d'induire un contrôle de l'infection [395]. Le principe de cette vaccination est d'utiliser comme vecteur le virus du CMV et des protéines du SIV [396]. Cette approche a permis d'induire de façon continue des réponses T CD8<sup>+</sup> anti-SIV dans les muqueuses, d'éliminer les cellules infectées très tôt et ainsi d'empêcher la grande dissémination du virus dans l'organisme et l'établissement des réservoirs viraux. Cette étude permet donc de renforcer l'idée qu'un contrôle précoce de l'infection est nécessaire et qu'il peut passer par une induction des réponses T CD8<sup>+</sup> efficaces dans les muqueuses. Il peut donc s'avérer intéressant d'évaluer l'efficacité d'un vaccin qui permettrait d'induire de bonnes réponses T CD8<sup>+</sup> dans les muqueuses. On pourrait envisager d'utiliser de faibles doses d'antigènes afin d'induire des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH avec le profil CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> capables d'inhiber rapidement la réplication virale dès la primo-infection.

## Perspectives

Il serait intéressant de poursuivre les études des cellules portant le phénotype CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> et Eomes<sup>hi</sup>CD57<sup>+</sup> et d'évaluer si les deux sous populations correspondent à la même sous population T CD8<sup>+</sup> spécifique du VIH. Nos études montrent que les SR présentent une fréquence de LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH avec le profil CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> plus importante que chez les WR. Cependant, nous ne retrouvons pas cette tendance entre SR et WR avec le profil Eomes<sup>hi</sup>CD57<sup>+</sup> mais cela probablement dû à un faible nombre de patients étudiés avec le co-marquage tétramère, Eomes et CD57. La suite de ce travail consistera donc d'une part à augmenter le nombre de patients étudiés pour y répondre clairement et d'autre part à évaluer si les sous populations CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> et Eomes<sup>hi</sup>CD57<sup>+</sup> correspondent à la même sous population T CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH en combinant tous ces marquages. On pourrait également envisager de mieux caractériser les cellules présentant le phénotype Eomes<sup>hi</sup>CD57<sup>+</sup> concernant leur capacité de prolifération *in vitro* et de capacité cytotoxique et voir si elles présentent les mêmes caractéristiques que les cellules CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> mais le tri cellulaire suivi d'un test *in vitro* est pour le moment impossible dû à la nécessité d'un marquage intracellulaire pour détecter Eomes.

On pourrait poursuivre les études concernant l'induction de la protéine HLA-DR. En étudiant le mécanisme d'expression du phénotype particulier CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>, nous avons montré que la faible dose d'antigène induit ce phénotype préférentiellement chez des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'EBV. Il serait intéressant de voir si l'induction de ce phénotype a lieu également chez les différents patients VIH<sup>+</sup>. En triant les cellules spécifiques CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>, nous pourrions suivre la cinétique d'expression en ARN<sub>m</sub> et protéique de CD38 et de HLA-DR lors des premiers temps d'activation. Nous pourrions ainsi étudier plus en profondeur le mécanisme d'expression de HLA-DR. En effet, HLA-DR est inducible par l'IFN- $\gamma$  sur les lymphocytes B et sur les monocytes comme décrit dans la revue suivante [397]. Nos études préliminaires montrent que la stimulation seule de l'IFN- $\gamma$  sur les LT CD8<sup>+</sup> n'induit pas l'expression de HLA-DR à la surface (data not shown). Il serait intéressant donc de voir sur les LT CD8<sup>+</sup> si l'expression de HLA-DR est dépendante de la voie d'activation de l'IFN- $\gamma$  en activant les cellules spécifiques après tri cellulaire et en bloquant la voie de l'IFN- $\gamma$ . Nous pourrions également étudier le mécanisme d'expression de CD38. Cette molécule est inducible via la voie IFN- $\gamma$  et également suite à une activation avec une forte dose d'antigène. L'étude de Hervas et al. montre qu'il existe deux voies d'induction de l'expression de CD38 et qu'elles peuvent agir en synergie [398]. Nous pourrions donc envisager de mieux étudier les voies d'activation et de voir si une voie est privilégiée dans le cas de l'infection par le VIH et s'il existe un mécanisme de régulation de cette voie présent chez les HIC. Les futures études pourraient également porter sur le rôle de HLA-DR sur les cellules portant le phénotype CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>. Ainsi, il pourrait être intéressant d'étudier l'interaction entre HLA-DR et FCRL6 et évaluer l'importance de cette interaction sur l'activation et la fonctionnalité des LT CD8<sup>+</sup>.

L'étude des différentes sous population CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> et Eomes<sup>hi</sup>CD57<sup>+</sup> n'a pas encore été décrite chez le macaque. L'infection par une faible dose d'antigène induisant un contrôle de la maladie, l'analyse phénotypique des LT CD8<sup>+</sup> chez ces macaques pourrait renforcer l'idée que ces cellules jouent un rôle primordial. Les marqueurs CD38 et HLA-DR sont également retrouvés chez le macaque et on pourrait envisager que les macaques contrôleurs présentent ce phénotype particulier d'activation. Une déplétion de ces lymphocytes T CD8<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> permettrait d'infirmer ou de confirmer leur rôle dans le contrôle de la maladie. Concernant le phénotype Eomes<sup>hi</sup>CD57<sup>+</sup>, il faudrait tout d'abord vérifier la présence du facteur de transcription Eomes et voir s'il existe une telle hétérogénéité des sous populations Eomes/CD57.

Chez les HIC non porteurs d'un HLA protecteur, le contrôle de la réplication virale chez les WR malgré la faible réponse T CD8<sup>+</sup> semblent questionner le rôle des réponses T CD8<sup>+</sup> chez ces patients. Il serait intéressant de voir si la corrélation trouvée chez les HIC porteur d'un HLA protecteur sur la réponse NK et T CD8<sup>+</sup> dans l'étude de Tomescu et al. est retrouvée chez les HIC avec un HLA non protecteur. Nous pourrions aussi envisager d'étudier plus précisément les réponses du système immunitaire inné comme l'action des facteurs de restriction ou les réponses des macrophages et voir si ces acteurs sont responsables de la faible réplication virale *in vivo*. Comme discuté précédemment, la protéine p21 semble jouer un rôle important dans la plus faible susceptibilité à l'infection des LT CD4<sup>+</sup> des HIC. Nous pourrions envisager d'évaluer plus précisément le mécanisme qui induit cette plus forte expression et activité de la protéine p21 chez les HIC et de vérifier s'il est possible de les induire sur des LT CD4<sup>+</sup> de patients virémiques.

L'élaboration d'un vaccin préventif et thérapeutique contre le VIH est toujours d'actualité. Les dernières découvertes sur l'importance d'un contrôle précoce de l'infection par le VIH et sur le potentiel rôle des LT CD8<sup>+</sup> dès la primo-infection chez le macaque nous amènent à évaluer le rôle des LT CD8<sup>+</sup> en primo-infection chez le modèle humain de contrôle de l'infection : les HIV contrôleurs. Chez ces patients, la faible dose d'antigène et la faible activation des lymphocytes pourraient être impliquées dans l'induction et la persistance de fortes réponses T CD8<sup>+</sup> anti-VIH. L'utilisation de faibles doses d'antigènes permettant d'induire dans les muqueuses des LT CD8<sup>+</sup> avec une forte capacité d'inhibition de la réplication virale devrait être envisagée dans de futurs essais cliniques vaccinaux.

# Bibliographie

1. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783–801. doi:10.1016/j.cell.2006.02.015.
2. Delneste Y, Beauvillain C, Jeannin P (2007) [Innate immunity: structure and function of TLRs]. *Médecine Sci MS* 23: 67–73.
3. Hornef MW, Wick MJ, Rhen M, Normark S (2002) Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 3: 1033–1040. doi:10.1038/ni1102-1033.
4. Dranoff G (2004) Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4: 11–22. doi:10.1038/nrc1252.
5. Anderson G, Moore NC, Owen JJ, Jenkinson EJ (1996) Cellular interactions in thymocyte development. *Annu Rev Immunol* 14: 73–99. doi:10.1146/annurev.immunol.14.1.73.
6. Carlyle JR, Zúñiga-Pflücker JC (1998) Requirement for the thymus in alphabeta T lymphocyte lineage commitment. *Immunity* 9: 187–197.
7. Shortman K, Wu L (1996) Early T lymphocyte progenitors. *Annu Rev Immunol* 14: 29–47. doi:10.1146/annurev.immunol.14.1.29.
8. Shortman K, Egerton M, Spangrude GJ, Scollay R (1990) The generation and fate of thymocytes. *Semin Immunol* 2: 3–12.
9. Surh CD, Sprent J (1994) T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 372: 100–103. doi:10.1038/372100a0.
10. Jameson SC (2002) Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2: 547–556. doi:10.1038/nri853.
11. Heath WR, Carbone FR (2001) Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 19: 47–64. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.47.
12. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC (2003) Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21: 685–711. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141040.
13. Badovinac VP, Harty JT (2006) Programming, demarcating, and manipulating CD8+ T-cell memory. *Immunol Rev* 211: 67–80. doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00384.x.
14. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R (2002) Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2: 251–262. doi:10.1038/nri778.
15. Williams MA, Bevan MJ (2007) Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol* 25: 171–192. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141548.
16. Harty JT, Badovinac VP (2008) Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nat Rev Immunol* 8: 107–119. doi:10.1038/nri2251.

17. Bajénoff M, Granjeaud S, Guerder S (2003) The strategy of T cell antigen-presenting cell encounter in antigen-draining lymph nodes revealed by imaging of initial T cell activation. *J Exp Med* 198: 715–724. doi:10.1084/jem.20030167.
18. Norbury CC, Malide D, Gibbs JS, Bennink JR, Yewdell JW (2002) Visualizing priming of virus-specific CD8+ T cells by infected dendritic cells in vivo. *Nat Immunol* 3: 265–271. doi:10.1038/ni762.
19. Schaefer BC, Schaefer ML, Kappler JW, Murrack P, Kedl RM (2001) Observation of antigen-dependent CD8+ T-cell/ dendritic cell interactions in vivo. *Cell Immunol* 214: 110–122. doi:10.1006/cimm.2001.1895.
20. Banchereau J, Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245–252. doi:10.1038/32588.
21. Villadangos JA, Schnorrer P (2007) Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* 7: 543–555. doi:10.1038/nri2103.
22. Klein J, Sato A (2000) The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* 343: 702–709. doi:10.1056/NEJM200009073431006.
23. Klein J, Sato A (2000) The HLA system. Second of two parts. *N Engl J Med* 343: 782–786. doi:10.1056/NEJM200009143431106.
24. Cresswell P, Ackerman AL, Giodini A, Peaper DR, Wearsch PA (2005) Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol Rev* 207: 145–157. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00316.x.
25. Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, Lins DC, Kedl RM, et al. (1999) Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol Baltim Md* 162: 3256–3262.
26. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH (2005) The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 23: 515–548. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115611.
27. Mescher MF, Curtsinger JM, Agarwal P, Casey KA, Gerner M, et al. (2006) Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol Rev* 211: 81–92. doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00382.x.
28. Watts TH (2005) TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol* 23: 23–68. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115839.
29. Summers deLuca L, Gommerman JL (2012) Fine-tuning of dendritic cell biology by the TNF superfamily. *Nat Rev Immunol* 12: 339–351. doi:10.1038/nri3193.
30. Henrickson SE, von Andrian UH (2007) Single-cell dynamics of T-cell priming. *Curr Opin Immunol* 19: 249–258. doi:10.1016/j.coi.2007.04.013.
31. Bevan MJ (2004) Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat Rev Immunol* 4: 595–602. doi:10.1038/nri1413.
32. Jiang J, Lau LL, Shen H (2003) Selective depletion of nonspecific T cells during the early stage of immune responses to infection. *J Immunol Baltim Md* 171: 4352–4358.

33. Chen L, Flies DB (2013) Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 13: 227–242. doi:10.1038/nri3405.
34. Saito T, Yokosuka T, Hashimoto-Tane A (2010) Dynamic regulation of T cell activation and co-stimulation through TCR-microclusters. *FEBS Lett* 584: 4865–4871. doi:10.1016/j.febslet.2010.11.036.
35. Liu Y, Wenger RH, Zhao M, Nielsen PJ (1997) Distinct costimulatory molecules are required for the induction of effector and memory cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 185: 251–262.
36. Shedlock DJ, Whitmire JK, Tan J, MacDonald AS, Ahmed R, et al. (2003) Role of CD4 T cell help and costimulation in CD8 T cell responses during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol Baltim Md 1950* 170: 2053–2063.
37. Kündig TM, Shahinian A, Kawai K, Mittrücker HW, Sebzda E, et al. (1996) Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells. *Immunity* 5: 41–52.
38. Takahashi C, Mittler RS, Vella AT (1999) Cutting edge: 4-1BB is a bona fide CD8 T cell survival signal. *J Immunol Baltim Md 1950* 162: 5037–5040.
39. Bertram EM, Lau P, Watts TH (2002) Temporal segregation of 4-1BB versus CD28-mediated costimulation: 4-1BB ligand influences T cell numbers late in the primary response and regulates the size of the T cell memory response following influenza infection. *J Immunol Baltim Md 1950* 168: 3777–3785.
40. Cannons JL, Lau P, Ghumman B, DeBenedette MA, Yagita H, et al. (2001) 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. *J Immunol Baltim Md 1950* 167: 1313–1324.
41. Tan JT, Whitmire JK, Ahmed R, Pearson TC, Larsen CP (1999) 4-1BB ligand, a member of the TNF family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses. *J Immunol Baltim Md 1950* 163: 4859–4868.
42. Tan JT, Whitmire JK, Murali-Krishna K, Ahmed R, Altman JD, et al. (2000) 4-1BB costimulation is required for protective anti-viral immunity after peptide vaccination. *J Immunol Baltim Md 1950* 164: 2320–2325.
43. Kroccek RA, Mages HW, Hutloff A (2004) Emerging paradigms of T-cell co-stimulation. *Curr Opin Immunol* 16: 321–327. doi:10.1016/j.coi.2004.03.002.
44. Zhu Y, Yao S, Chen L (2011) Cell surface signaling molecules in the control of immune responses: a tide model. *Immunity* 34: 466–478. doi:10.1016/j.immuni.2011.04.008.
45. Chattopadhyay K, Lazar-Molnar E, Yan Q, Rubinstein R, Zhan C, et al. (2009) Sequence, structure, function, immunity: structural genomics of costimulation. *Immunol Rev* 229: 356–386. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00778.x.
46. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14: 233–258. doi:10.1146/annurev.immunol.14.1.233.
47. Sharpe AH, Freeman GJ (2002) The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2: 116–126. doi:10.1038/nri727.

48. Schmidt CS, Mescher MF (1999) Adjuvant effect of IL-12: conversion of peptide antigen administration from tolerizing to immunizing for CD8+ T cells in vivo. *J Immunol Baltim Md* 1950 163: 2561–2567.
49. Kolumam GA, Thomas S, Thompson LJ, Sprent J, Murali-Krishna K (2005) Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J Exp Med* 202: 637–650. doi:10.1084/jem.20050821.
50. Haring JS, Badovinac VP, Harty JT (2006) Inflaming the CD8+ T cell response. *Immunity* 25: 19–29. doi:10.1016/j.immuni.2006.07.001.
51. Thomas S, Kolumam GA, Murali-Krishna K (2007) Antigen presentation by nonhemopoietic cells amplifies clonal expansion of effector CD8 T cells in a pathogen-specific manner. *J Immunol Baltim Md* 1950 178: 5802–5811.
52. Way SS, Haveran-Daughton C, Kolumam GA, Orgun NN, Murali-Krishna K (2007) IL-12 and type-I IFN synergize for IFN-gamma production by CD4 T cells, whereas neither are required for IFN-gamma production by CD8 T cells after *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol Baltim Md* 1950 178: 4498–4505.
53. Badovinac VP, Porter BB, Harty JT (2004) CD8+ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nat Immunol* 5: 809–817. doi:10.1038/ni1098.
54. Janeway C, Travers P, Murphy K, Walport M, Masson PL (2009) *Immunobiologie*. Édition : 3e édition. Bruxelles: De Boeck. 890 p.
55. Bourgeois C, Rocha B, Tanchot C (2002) A Role for CD40 Expression on CD8+ T Cells in the Generation of CD8+ T Cell Memory. *Science* 297: 2060–2063. doi:10.1126/science.1072615.
56. Cebrián M, Yagüe E, Rincón M, López-Botet M, de Landázuri MO, et al. (1988) Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J Exp Med* 168: 1621–1637.
57. Cosulich ME, Rubartelli A, Risso A, Cozzolino F, Bargellesi A (1987) Functional characterization of an antigen involved in an early step of T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 4205–4209.
58. Testi R, Phillips JH, Lanier LL (1989) T cell activation via Leu-23 (CD69). *J Immunol Baltim Md* 1950 143: 1123–1128.
59. Yokoyama WM, Koning F, Kehn PJ, Pereira GM, Stingl G, et al. (1988) Characterization of a cell surface-expressed disulfide-linked dimer involved in murine T cell activation. *J Immunol Baltim Md* 1950 141: 369–376.
60. Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR (1994) The activation antigen CD69. *Stem Cells Dayt Ohio* 12: 456–465. doi:10.1002/stem.5530120502.
61. Critchley-Thorne RJ, Yan N, Nacu S, Weber J, Holmes SP, et al. (2007) Down-regulation of the interferon signaling pathway in T lymphocytes from patients with metastatic melanoma. *PLoS Med* 4: e176. doi:10.1371/journal.pmed.0040176.
62. Caruso A, Licenziati S, Corulli M, Canaris A d., De Francesco M a., et al. (1997) Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell

- proliferation. *Cytometry* 27: 71–76. doi:10.1002/(SICI)1097-0320(19970101)27:1<71::AID-CYTO9>3.0.CO;2-O.
63. Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182: 311–322. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9.
  64. Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, Ferrero E, Horenstein AL, et al. (2008) Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev* 88: 841–886. doi:10.1152/physrev.00035.2007.
  65. Savarino A, Bottarel F, Malavasi F, Dianzani U (2000) Role of CD38 in HIV-1 infection: an epiphenomenon of T-cell activation or an active player in virus/host interactions? *AIDS Lond Engl* 14: 1079–1089.
  66. Morra M, Zubiaur M, Terhorst C, Sancho J, Malavasi F (1998) CD38 is functionally dependent on the TCR/CD3 complex in human T cells. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 12: 581–592.
  67. Deaglio S, Morra M, Mallone R, Ausiello CM, Prager E, et al. (1998) Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member. *J Immunol Baltim Md* 160: 395–402.
  68. Deterre P, Gelman L, Gary-Gouy H, Arrieumerlou C, Berthelie V, et al. (1996) Coordinated regulation in human T cells of nucleotide-hydrolyzing ecto-enzymatic activities, including CD38 and PC-1. Possible role in the recycling of nicotinamide adenine dinucleotide metabolites. *J Immunol Baltim Md* 157: 1381–1388.
  69. Benito JM, López M, Lozano S, Martínez P, González-Lahoz J, et al. (2004) CD38 expression on CD8 T lymphocytes as a marker of residual virus replication in chronically HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20: 227–233. doi:10.1089/088922204773004950.
  70. Hunt PW, Brenchley J, Sinclair E, McCune JM, Roland M, et al. (2008) Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J Infect Dis* 197: 126–133. doi:10.1086/524143.
  71. Murray MF, Srinivasan A (1995) Nicotinamide inhibits HIV-1 in both acute and chronic in vitro infection. *Biochem Biophys Res Commun* 210: 954–959. doi:10.1006/bbrc.1995.1749.
  72. Savarino A, Pugliese A, Martini C, Pich PG, Pescarmona GP, et al. (1996) Investigation of the potential role of membrane CD38 in protection against cell death induced by HIV-1. *J Biol Regul Homeost Agents* 10: 13–18.
  73. Savarino A, Bottarel F, Calosso L, Feito MJ, Bensi T, et al. (1999) Effects of the human CD38 glycoprotein on the early stages of the HIV-1 replication cycle. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 13: 2265–2276.
  74. Mach B, Steimle V, Martínez-Soria E, Reith W (1996) REGULATION OF MHC CLASS II GENES: Lessons from a Disease. *Annu Rev Immunol* 14: 301–331. doi:10.1146/annurev.immunol.14.1.301.
  75. Boss JM (1997) Regulation of transcription of MHC class II genes. *Curr Opin Immunol* 9: 107–113.

76. Imamichi H, Lempicki RA, Adelsberger JW, Hasley RB, Rosenberg A, et al. (2012) The CD8+ HLA-DR+ T cells expanded in HIV-1 infection are qualitatively identical to those from healthy controls. *Eur J Immunol* 42: 2608–2620. doi:10.1002/eji.201142046.
77. Speiser DE, Migliaccio M, Pittet MJ, Valmori D, Liénard D, et al. (2001) Human CD8(+) T cells expressing HLA-DR and CD28 show telomerase activity and are distinct from cytolytic effector T cells. *Eur J Immunol* 31: 459–466. doi:10.1002/1521-4141(200102)31:2<459::AID-IMMU459>3.0.CO;2-Y.
78. Schreeder DM, Pan J, Li FJ, Vivier E, Davis RS (2008) FCRL6 distinguishes mature cytotoxic lymphocytes and is upregulated in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Immunol* 38: 3159–3166. doi:10.1002/eji.200838516.
79. Davis RS (2007) Fc receptor-like molecules. *Annu Rev Immunol* 25: 525–560. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141541.
80. Wilson TJ, Presti RM, Tassi I, Overton ET, Cella M, et al. (2007) FcRL6, a new ITIM-bearing receptor on cytolytic cells, is broadly expressed by lymphocytes following HIV-1 infection. *Blood* 109: 3786–3793. doi:10.1182/blood-2006-06-030023.
81. Arstila TP, Casrouge A, Baron V, Even J, Kanellopoulos J, et al. (1999) A direct estimate of the human alpha beta T cell receptor diversity. *Science* 286: 958–961.
82. Blattman JN, Antia R, Sourdive DJD, Wang X, Kaech SM, et al. (2002) Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J Exp Med* 195: 657–664.
83. Bouso P, Casrouge A, Altman JD, Haury M, Kanellopoulos J, et al. (1998) Individual variations in the murine T cell response to a specific peptide reflect variability in naive repertoires. *Immunity* 9: 169–178.
84. Casrouge A, Beaudoin E, Dalle S, Pannetier C, Kanellopoulos J, et al. (2000) Size estimate of the alpha beta TCR repertoire of naive mouse splenocytes. *J Immunol Baltim Md* 1950 164: 5782–5787.
85. Kedzierska K, Day EB, Pi J, Heard SB, Doherty PC, et al. (2006) Quantification of repertoire diversity of influenza-specific epitopes with predominant public or private TCR usage. *J Immunol Baltim Md* 1950 177: 6705–6712.
86. Pewe LL, Netland JM, Heard SB, Perlman S (2004) Very diverse CD8 T cell clonotypic responses after virus infections. *J Immunol Baltim Md* 1950 172: 3151–3156.
87. Kedl RM, Mescher MF (1998) Qualitative differences between naive and memory T cells make a major contribution to the more rapid and efficient memory CD8+ T cell response. *J Immunol Baltim Md* 1950 161: 674–683.
88. Hou S, Hyland L, Ryan KW, Portner A, Doherty PC (1994) Virus-specific CD8+ T-cell memory determined by clonal burst size. *Nature* 369: 652–654. doi:10.1038/369652a0.
89. Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive DJ, Zajac AJ, et al. (1998) Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 8: 177–187.

90. Peters PJ, Borst J, Oorschot V, Fukuda M, Krähenbühl O, et al. (1991) Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med* 173: 1099–1109.
91. Stinchcombe JC, Bossi G, Booth S, Griffiths GM (2001) The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 15: 751–761.
92. Harari A, Enders FB, Cellerai C, Bart P-A, Pantaleo G (2009) Distinct profiles of cytotoxic granules in memory CD8 T cells correlate with function, differentiation stage, and antigen exposure. *J Virol* 83: 2862–2871. doi:10.1128/JVI.02528-08.
93. Cullen SP, Martin SJ (2008) Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ* 15: 251–262. doi:10.1038/sj.cdd.4402244.
94. Keefe D, Shi L, Feske S, Massol R, Navarro F, et al. (2005) Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity* 23: 249–262. doi:10.1016/j.immuni.2005.08.001.
95. Motyka B, Korbitt G, Pinkoski MJ, Heibein JA, Caputo A, et al. (2000) Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* 103: 491–500.
96. Lopez JA, Susanto O, Jenkins MR, Lukoyanova N, Sutton VR, et al. (2013) Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack. *Blood* 121: 2659–2668. doi:10.1182/blood-2012-07-446146.
97. Raja SM, Metkar SS, Höning S, Wang B, Russin WA, et al. (2005) A novel mechanism for protein delivery: granzyme B undergoes electrostatic exchange from serglycin to target cells. *J Biol Chem* 280: 20752–20761. doi:10.1074/jbc.M501181200.
98. Kägi D, Vignaux F, Ledermann B, Bürki K, Depraetere V, et al. (1994) Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 265: 528–530.
99. Beresford PJ, Xia Z, Greenberg AH, Lieberman J (1999) Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation. *Immunity* 10: 585–594.
100. Lieberman J (2010) Granzyme A activates another way to die. *Immunol Rev* 235: 93–104. doi:10.1111/j.0105-2896.2010.00902.x.
101. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J (2005) Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 22: 355–370. doi:10.1016/j.immuni.2005.02.004.
102. Kryworuchko M, Thèze J (2006) Interleukin-2: From T Cell Growth and Homeostasis to Immune Reconstitution of HIV Patients. In: Gerald Litwack, editor. *Vitamins & Hormones. Interleukins*. Academic Press, Vol. Volume 74. pp. 531–547. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0083672906740213>. Accessed 27 June 2014.
103. Chan KF, Siegel MR, Lenardo JM (2000) Signaling by the TNF receptor superfamily and T cell homeostasis. *Immunity* 13: 419–422.

104. Lenardo M, Chan KM, Hornung F, McFarland H, Siegel R, et al. (1999) Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol* 17: 221–253. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.221.
105. Siegel RM, Chan FK, Chun HJ, Lenardo MJ (2000) The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat Immunol* 1: 469–474. doi:10.1038/82712.
106. Früh K, Yang Y (1999) Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma. *Curr Opin Immunol* 11: 76–81.
107. Harty JT, Tvinnereim AR, White DW (2000) CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol* 18: 275–308. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.275.
108. Dorner BG, Steinbach S, Hüser MB, Kroczeck RA, Scheffold A (2003) Single-cell analysis of the murine chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES and ATAC/lymphotactin by flow cytometry. *J Immunol Methods* 274: 83–91.
109. Ortiz BD, Krensky AM, Nelson PJ (1996) Kinetics of transcription factors regulating the RANTES chemokine gene reveal a developmental switch in nuclear events during T-lymphocyte maturation. *Mol Cell Biol* 16: 202–210.
110. Walzer T, Marçais A, Saltel F, Bella C, Jurdic P, et al. (2003) Cutting edge: immediate RANTES secretion by resting memory CD8 T cells following antigenic stimulation. *J Immunol Baltim Md* 1950 170: 1615–1619.
111. Molon B, Gri G, Bettella M, Gómez-Moutón C, Lanzavecchia A, et al. (2005) T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat Immunol* 6: 465–471. doi:10.1038/ni1191.
112. Taub DD, Turcovski-Corrales SM, Key ML, Longo DL, Murphy WJ (1996) Chemokines and T lymphocyte activation: I. Beta chemokines costimulate human T lymphocyte activation in vitro. *J Immunol Baltim Md* 1950 156: 2095–2103.
113. Badovinac VP, Tvinnereim AR, Harty JT (2000) Regulation of antigen-specific CD8+ T cell homeostasis by perforin and interferon-gamma. *Science* 290: 1354–1358.
114. Slifka MK, Whitton JL (2000) Antigen-specific regulation of T cell-mediated cytokine production. *Immunity* 12: 451–457.
115. Lertmemongkolchai G, Cai G, Hunter CA, Bancroft GJ (2001) Bystander activation of CD8+ T cells contributes to the rapid production of IFN-gamma in response to bacterial pathogens. *J Immunol Baltim Md* 1950 166: 1097–1105.
116. Sullivan BM, Juedes A, Szabo SJ, von Herrath M, Glimcher LH (2003) Antigen-driven effector CD8 T cell function regulated by T-bet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15818–15823. doi:10.1073/pnas.2636938100.
117. Way SS, Wilson CB (2004) Cutting edge: immunity and IFN-gamma production during *Listeria monocytogenes* infection in the absence of T-bet. *J Immunol Baltim Md* 1950 173: 5918–5922.
118. Intlekofer AM, Takemoto N, Wherry EJ, Longworth SA, Northrup JT, et al. (2005) Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol* 6: 1236–1244. doi:10.1038/ni1268.

119. Pearce EL, Mullen AC, Martins GA, Krawczyk CM, Hutchins AS, et al. (2003) Control of effector CD8<sup>+</sup> T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science* 302: 1041–1043. doi:10.1126/science.1090148.
120. Townsend MJ, Weinmann AS, Matsuda JL, Salomon R, Farnham PJ, et al. (2004) T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity* 20: 477–494.
121. Jenner RG, Townsend MJ, Jackson I, Sun K, Bouwman RD, et al. (2009) The transcription factors T-bet and GATA-3 control alternative pathways of T-cell differentiation through a shared set of target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 17876–17881. doi:10.1073/pnas.0909357106.
122. Kao C, Oestreich KJ, Paley MA, Crawford A, Angelosanto JM, et al. (2011) Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses during chronic infection. *Nat Immunol* 12: 663–671. doi:10.1038/ni.2046.
123. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, et al. (2000) A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100: 655–669.
124. McLane LM, Banerjee PP, Cosma GL, Makedonas G, Wherry EJ, et al. (2013) Differential localization of T-bet and Eomes in CD8 T cell memory populations. *J Immunol Baltim Md* 1950 190: 3207–3215. doi:10.4049/jimmunol.1201556.
125. Banerjee A, Gordon SM, Intlekofer AM, Paley MA, Mooney EC, et al. (2010) Cutting edge: The transcription factor eomesodermin enables CD8<sup>+</sup> T cells to compete for the memory cell niche. *J Immunol Baltim Md* 1950 185: 4988–4992. doi:10.4049/jimmunol.1002042.
126. Kaech SM, Hemby S, Kersh E, Ahmed R (2002) Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* 111: 837–851.
127. Intlekofer AM, Banerjee A, Takemoto N, Gordon SM, Dejong CS, et al. (2008) Anomalous type 17 response to viral infection by CD8<sup>+</sup> T cells lacking T-bet and eomesodermin. *Science* 321: 408–411. doi:10.1126/science.1159806.
128. Rao RR, Li Q, Gubbels Bupp MR, Shrikant PA (2012) Transcription factor Foxo1 represses T-bet-mediated effector functions and promotes memory CD8(+) T cell differentiation. *Immunity* 36: 374–387. doi:10.1016/j.immuni.2012.01.015.
129. Smith C, Elhassen D, Gras S, Wynn KK, Dasari V, et al. (2012) Endogenous antigen presentation impacts on T-box transcription factor expression and functional maturation of CD8<sup>+</sup> T cells. *Blood* 120: 3237–3245. doi:10.1182/blood-2012-03-420182.
130. Paley MA, Kroy DC, Odorizzi PM, Johnnidis JB, Dolfi DV, et al. (2012) Progenitor and terminal subsets of CD8<sup>+</sup> T cells cooperate to contain chronic viral infection. *Science* 338: 1220–1225. doi:10.1126/science.1229620.
131. Badovinac VP, Porter BB, Harty JT (2002) Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol* 3: 619–626. doi:10.1038/ni804.
132. Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, et al. (2000) Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 12: 611–620.

133. Bodmer JL, Holler N, Reynard S, Vinciguerra P, Schneider P, et al. (2000) TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat Cell Biol* 2: 241–243. doi:10.1038/35008667.
134. Herbeuval J-P, Boasso A, Grivel J-C, Hardy AW, Anderson SA, et al. (2005) TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in HIV-1-infected patients and its in vitro production by antigen-presenting cells. *Blood* 105: 2458–2464. doi:10.1182/blood-2004-08-3058.
135. Brenner D, Krammer PH, Arnold R (2008) Concepts of activated T cell death. *Crit Rev Oncol Hematol* 66: 52–64. doi:10.1016/j.critrevonc.2008.01.002.
136. Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, Lefrançois L (2000) Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 1: 426–432. doi:10.1038/80868.
137. Schluns KS, Williams K, Ma A, Zheng XX, Lefrançois L (2002) Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 168: 4827–4831.
138. Cui W, Kaech SM (2010) Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells. *Immunol Rev* 236: 151–166. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00926.x.
139. Veiga-Fernandes H, Walter U, Bourgeois C, McLean A, Rocha B (2000) Response of naïve and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nat Immunol* 1: 47–53. doi:10.1038/76907.
140. Wherry EJ, Teichgräber V, Becker TC, Masopust D, Kaech SM, et al. (2003) Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol* 4: 225–234. doi:10.1038/ni889.
141. Fearon DT, Manders P, Wagner SD (2001) Arrested differentiation, the self-renewing memory lymphocyte, and vaccination. *Science* 293: 248–250. doi:10.1126/science.1062589.
142. Chang JT, Palanivel VR, Kinjyo I, Schambach F, Intlekofer AM, et al. (2007) Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* 315: 1687–1691. doi:10.1126/science.1139393.
143. Huster KM, Busch V, Schiemann M, Linkemann K, Kerksiek KM, et al. (2004) Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8+ memory T cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 5610–5615. doi:10.1073/pnas.0308054101.
144. Jacob J, Baltimore D (1999) Modelling T-cell memory by genetic marking of memory T cells in vivo. *Nature* 399: 593–597. doi:10.1038/21208.
145. Kaech SM, Wherry EJ (2007) Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8+ T cell differentiation during viral infection. *Immunity* 27: 393–405. doi:10.1016/j.immuni.2007.08.007.
146. Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ, Konieczny BT, Surh CD, et al. (2003) Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* 4: 1191–1198. doi:10.1038/ni1009.

147. Sarkar S, Kalia V, Haining WN, Konieczny BT, Subramaniam S, et al. (2008) Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. *J Exp Med* 205: 625–640. doi:10.1084/jem.20071641.
148. Ahmed R, Gray D (1996) Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272: 54–60.
149. Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, Gillespie GM, Dong T, et al. (2000) HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* 192: 63–75.
150. Kostense S, Ogg GS, Manting EH, Gillespie G, Joling J, et al. (2001) High viral burden in the presence of major HIV-specific CD8(+) T cell expansions: evidence for impaired CTL effector function. *Eur J Immunol* 31: 677–686. doi:10.1002/1521-4141(200103)31:3<677::AID-IMMU677>3.0.CO;2-M.
151. Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, et al. (2000) Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 191: 1499–1512.
152. Betts MR, Ambrozak DR, Douek DC, Bonhoeffer S, Brenchley JM, et al. (2001) Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection. *J Virol* 75: 11983–11991. doi:10.1128/JVI.75.24.11983-11991.2001.
153. Edwards BH, Bansal A, Sabbaj S, Bakari J, Mulligan MJ, et al. (2002) Magnitude of functional CD8+ T-cell responses to the gag protein of human immunodeficiency virus type 1 correlates inversely with viral load in plasma. *J Virol* 76: 2298–2305.
154. McKay PF, Schmitz JE, Barouch DH, Kuroda MJ, Lifton MA, et al. (2002) Vaccine protection against functional CTL abnormalities in simian human immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *J Immunol Baltim Md 1950* 168: 332–337.
155. Tanchot C, Barber DL, Chiodetti L, Schwartz RH (2001) Adaptive tolerance of CD4+ T cells in vivo: multiple thresholds in response to a constant level of antigen presentation. *J Immunol Baltim Md 1950* 167: 2030–2039.
156. Masopust D, Vezys V, Marzo AL, Lefrançois L (2001) Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* 291: 2413–2417. doi:10.1126/science.1058867.
157. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401: 708–712. doi:10.1038/44385.
158. Akbar AN, Fletcher JM (2005) Memory T cell homeostasis and senescence during aging. *Curr Opin Immunol* 17: 480–485. doi:10.1016/j.coi.2005.07.019.
159. Gett AV, Sallusto F, Lanzavecchia A, Geginat J (2003) T cell fitness determined by signal strength. *Nat Immunol* 4: 355–360. doi:10.1038/ni908.
160. Goldrath AW, Sivakumar PV, Glaccum M, Kennedy MK, Bevan MJ, et al. (2002) Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells. *J Exp Med* 195: 1515–1522.

161. Kieper WC, Tan JT, Bondi-Boyd B, Gapin L, Sprent J, et al. (2002) Overexpression of interleukin (IL)-7 leads to IL-15-independent generation of memory phenotype CD8+ T cells. *J Exp Med* 195: 1533–1539.
162. Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, et al. (2000) Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* 191: 771–780.
163. Berard M, Brandt K, Bulfone-Paus S, Tough DF (2003) IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8+ T cells. *J Immunol Baltim Md* 170: 5018–5026.
164. Fehniger TA, Caligiuri MA (2001) Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 97: 14–32.
165. Zhang X, Sun S, Hwang I, Tough DF, Sprent J (1998) Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8: 591–599.
166. Prlic M, Lefrançois L, Jameson SC (2002) Multiple choices: regulation of memory CD8 T cell generation and homeostasis by interleukin (IL)-7 and IL-15. *J Exp Med* 195: F49–F52.
167. Rubinstein MP, Kovar M, Purton JF, Cho J-H, Boyman O, et al. (2006) Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 9166–9171. doi:10.1073/pnas.0600240103.
168. Stoklasek TA, Schluns KS, Lefrançois L (2006) Combined IL-15/IL-15R $\alpha$  immunotherapy maximizes IL-15 activity in vivo. *J Immunol Baltim Md* 177: 6072–6080.
169. Carson WE, Fehniger TA, Haldar S, Eckhert K, Lindemann MJ, et al. (1997) A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J Clin Invest* 99: 937–943. doi:10.1172/JCI119258.
170. Prlic M, Blazar BR, Farrar MA, Jameson SC (2003) In vivo survival and homeostatic proliferation of natural killer cells. *J Exp Med* 197: 967–976. doi:10.1084/jem.20021847.
171. Von Freeden-Jeffrey U, Vieira P, Lucian LA, McNeil T, Burdach SE, et al. (1995) Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* 181: 1519–1526.
172. Maraskovsky E, Teepe M, Morrissey PJ, Braddy S, Miller RE, et al. (1996) Impaired survival and proliferation in IL-7 receptor-deficient peripheral T cells. *J Immunol Baltim Md* 157: 5315–5323.
173. Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, Ramsdell FJ, Maraskovsky E, et al. (1994) Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 180: 1955–1960.
174. Khaled AR, Durum SK (2002) Lymphocide: cytokines and the control of lymphoid homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2: 817–830. doi:10.1038/nri931.
175. De Goër de Herve MG, Jaafoura S, Vallée M, Taoufik Y (2012) FoxP3+ regulatory CD4 T cells control the generation of functional CD8 memory. *Nat Commun* 3: 986. doi:10.1038/ncomms1992.

176. Badovinac VP, Messingham KAN, Griffith TS, Harty JT (2006) TRAIL deficiency delays, but does not prevent, erosion in the quality of “helpless” memory CD8 T cells. *J Immunol Baltim Md* 1950 177: 999–1006.
177. Veiga-Fernandes H, Rocha B (2004) High expression of active CDK6 in the cytoplasm of CD8 memory cells favors rapid division. *Nat Immunol* 5: 31–37. doi:10.1038/ni1015.
178. Cho BK, Wang C, Sugawa S, Eisen HN, Chen J (1999) Functional differences between memory and naive CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2976–2981.
179. Byers AM, Kemball CC, Moser JM, Lukacher AE (2003) Cutting edge: rapid in vivo CTL activity by polyoma virus-specific effector and memory CD8+ T cells. *J Immunol Baltim Md* 1950 171: 17–21.
180. Bachmann MF, Wolint P, Schwarz K, Jäger P, Oxenius A (2005) Functional Properties and Lineage Relationship of CD8+ T Cell Subsets Identified by Expression of IL-7 Receptor  $\alpha$  and CD62L. *J Immunol* 175: 4686–4696. doi:10.4049/jimmunol.175.7.4686.
181. Pihlgren M, Arpin C, Walzer T, Tomkowiak M, Thomas A, et al. (1999) Memory CD44(int) CD8 T cells show increased proliferative responses and IFN-gamma production following antigenic challenge in vitro. *Int Immunol* 11: 699–706.
182. Gallo RC, Montagnier L (2003) The Discovery of HIV as the Cause of AIDS. *N Engl J Med* 349: 2283–2285. doi:10.1056/NEJMp038194.
183. Friedman-Kien AE (1981) Disseminated Kaposi’s sarcoma syndrome in young homosexual men. *J Am Acad Dermatol* 5: 468–471.
184. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, et al. (1981) Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* 305: 1425–1431. doi:10.1056/NEJM198112103052401.
185. Siegal FP, Lopez C, Hammer GS, Brown AE, Kornfeld SJ, et al. (1981) Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. *N Engl J Med* 305: 1439–1444. doi:10.1056/NEJM198112103052403.
186. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, et al. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868–871.
187. Miyoshi I, Kubonishi I, Yoshimoto S, Akagi T, Ohtsuki Y, et al. (1981) Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells. *Nature* 294: 770–771.
188. Levy JA (1993) Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev* 57: 183–289.
189. De Silva TI, Cotten M, Rowland-Jones SL (2008) HIV-2: the forgotten AIDS virus. *Trends Microbiol* 16: 588–595. doi:10.1016/j.tim.2008.09.003.

190. Van der Loeff MFS, Larke N, Kaye S, Berry N, Ariyoshi K, et al. (2010) Undetectable plasma viral load predicts normal survival in HIV-2-infected people in a West African village. *Retrovirology* 7: 46. doi:10.1186/1742-4690-7-46.
191. WHO | Data and statistics (n.d.) WHO | Data and statistics. WHO. Available: <http://www.who.int/hiv/data/en/>. Accessed 16 April 2014.
192. De Clercq E (2009) Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *Int J Antimicrob Agents* 33: 307–320. doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.10.010.
193. FDA | Anti-HIV Drugs (n.d.) HIV and AIDS Activities - Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection. Available: <http://www.fda.gov/ForConsumers/byAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSActivities/ucm118915.htm>. Accessed 16 April 2014.
194. Greene WC, Peterlin BM (2002) Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* 8: 673–680. doi:10.1038/nm0702-673.
195. Klimas N, Koneru AO, Fletcher MA (2008) Overview of HIV. *Psychosom Med* 70: 523–530. doi:10.1097/PSY.0b013e31817ae69f.
196. Shattock RJ, Moore JP (2003) Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol* 1: 25–34. doi:10.1038/nrmicro729.
197. Cohen MS, Shaw GM, McMichael AJ, Haynes BF (2011) Acute HIV-1 Infection. *N Engl J Med* 364: 1943–1954. doi:10.1056/NEJMra1011874.
198. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, et al. (2000) DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100: 587–597.
199. Kwon DS, Gregorio G, Bitton N, Hendrickson WA, Littman DR (2002) DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity* 16: 135–144.
200. Pöhlmann S, Baribaud F, Doms RW (2001) DC-SIGN and DC-SIGNR: helping hands for HIV. *Trends Immunol* 22: 643–646.
201. Fong L, Mengozzi M, Abbey NW, Herndier BG, Engleman EG (2002) Productive infection of plasmacytoid dendritic cells with human immunodeficiency virus type 1 is triggered by CD40 ligation. *J Virol* 76: 11033–11041.
202. Fonteneau J-F, Larsson M, Beignon A-S, McKenna K, Dasilva I, et al. (2004) Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *J Virol* 78: 5223–5232.
203. Zhang J, Crumpacker C (2013) Eradication of HIV and Cure of AIDS, Now and How? *Front Immunol* 4: 337. doi:10.3389/fimmu.2013.00337.
204. Belyakov IM, Berzofsky JA (2004) Immunobiology of mucosal HIV infection and the basis for development of a new generation of mucosal AIDS vaccines. *Immunity* 20: 247–253.

205. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, et al. (2004) CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 200: 749–759. doi:10.1084/jem.20040874.
206. Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, et al. (2005) Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* 434: 1093–1097. doi:10.1038/nature03501.
207. Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV, Shvets DE, Pauley DR, et al. (1998) Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* 280: 427–431.
208. Naif HM (2013) Pathogenesis of HIV Infection. *Infect Dis Rep* 5: e6. doi:10.4081/idr.2013.s1.e6.
209. Giorgi JV, Liu Z, Hultin LE, Cumberland WG, Hennessey K, et al. (1993) Elevated levels of CD38+ CD8+ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 6: 904–912.
210. Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, Johnson TD, Owens B, et al. (1999) Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis* 179: 859–870. doi:10.1086/314660.
211. Hazenberg MD, Otto SA, van Benthem BHB, Roos MTL, Coutinho RA, et al. (2003) Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *AIDS Lond Engl* 17: 1881–1888. doi:10.1097/01.aids.0000076311.76477.6e.
212. Koning FA, Otto SA, Hazenberg MD, Dekker L, Prins M, et al. (2005) Low-level CD4+ T cell activation is associated with low susceptibility to HIV-1 infection. *J Immunol Baltim Md* 1950 175: 6117–6122.
213. Leng Q, Borkow G, Weisman Z, Stein M, Kalinkovich A, et al. (2001) Immune activation correlates better than HIV plasma viral load with CD4 T-cell decline during HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999 27: 389–397.
214. Sousa AE, Carneiro J, Meier-Schellersheim M, Grossman Z, Victorino RMM (2002) CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J Immunol Baltim Md* 1950 169: 3400–3406.
215. Broussard SR, Staprans SI, White R, Whitehead EM, Feinberg MB, et al. (2001) Simian immunodeficiency virus replicates to high levels in naturally infected African green monkeys without inducing immunologic or neurologic disease. *J Virol* 75: 2262–2275. doi:10.1128/JVI.75.5.2262-2275.2001.
216. Chahroudi A, Bosinger SE, Vanderford TH, Paiardini M, Silvestri G (2012) Natural SIV hosts: showing AIDS the door. *Science* 335: 1188–1193. doi:10.1126/science.1217550.
217. Gordon SN, Klatt NR, Bosinger SE, Brenchley JM, Milush JM, et al. (2007) Severe depletion of mucosal CD4+ T cells in AIDS-free simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *J Immunol Baltim Md* 1950 179: 3026–3034.

218. Kaur A, Grant RM, Means RE, McClure H, Feinberg M, et al. (1998) Diverse host responses and outcomes following simian immunodeficiency virus SIVmac239 infection in sooty mangabeys and rhesus macaques. *J Virol* 72: 9597–9611.
219. Liovat A-S, Jacquelin B, Ploquin MJ, Barré-Sinoussi F, Müller-Trutwin MC (2009) African non human primates infected by SIV - why don't they get sick? Lessons from studies on the early phase of non-pathogenic SIV infection. *Curr HIV Res* 7: 39–50.
220. Silvestri G, Sodora DL, Koup RA, Paiardini M, O'Neil SP, et al. (2003) Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity* 18: 441–452.
221. Choudhary SK, Vrisekoop N, Jansen CA, Otto SA, Schuitemaker H, et al. (2007) Low immune activation despite high levels of pathogenic human immunodeficiency virus type 1 results in long-term asymptomatic disease. *J Virol* 81: 8838–8842. doi:10.1128/JVI.02663-06.
222. Rotger M, Dalmau J, Rauch A, McLaren P, Bosinger SE, et al. (2011) Comparative transcriptomics of extreme phenotypes of human HIV-1 infection and SIV infection in sooty mangabey and rhesus macaque. *J Clin Invest* 121: 2391–2400. doi:10.1172/JCI45235.
223. Pereyra F, Lo J, Triant VA, Wei J, Buzon MJ, et al. (2012) Increased coronary atherosclerosis and immune activation in HIV-1 elite controllers. *AIDS* 26: 2409–2412. doi:10.1097/QAD.0b013e32835a9950.
224. Sauce D, Larsen M, Fastenackels S, Pauchard M, Ait-Mohand H, et al. (2011) HIV disease progression despite suppression of viral replication is associated with exhaustion of lymphopoiesis. *Blood* 117: 5142–5151. doi:10.1182/blood-2011-01-331306.
225. Klatt NR, Chomont N, Douek DC, Deeks SG (2013) Immune activation and HIV persistence: implications for curative approaches to HIV infection. *Immunol Rev* 254: 326–342. doi:10.1111/imr.12065.
226. Betts MR, Casazza JP, Koup RA (2001) Monitoring HIV-specific CD8+ T cell responses by intracellular cytokine production. *Immunol Lett* 79: 117–125.
227. Papagno L, Appay V, Sutton J, Rostron T, Gillespie GMA, et al. (2002) Comparison between HIV- and CMV-specific T cell responses in long-term HIV infected donors. *Clin Exp Immunol* 130: 509–517.
228. Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, et al. (2002) HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature* 417: 95–98. doi:10.1038/417095a.
229. Rieckmann P, Poli G, Fox CH, Kehrl JH, Fauci AS (1991) Recombinant gp120 specifically enhances tumor necrosis factor-alpha production and Ig secretion in B lymphocytes from HIV-infected individuals but not from seronegative donors. *J Immunol Baltim Md* 1950 147: 2922–2927.
230. Swingler S, Mann A, Jacqué J, Brichacek B, Sasseville VG, et al. (1999) HIV-1 Nef mediates lymphocyte chemotaxis and activation by infected macrophages. *Nat Med* 5: 997–103. doi:10.1038/12433.
231. Wang JK, Kiyokawa E, Verdin E, Trono D (2000) The Nef protein of HIV-1 associates with rafts and primes T cells for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 394–399.

232. Doisne J-M, Urrutia A, Lacabaratz-Porret C, Goujard C, Meyer L, et al. (2004) CD8+ T cells specific for EBV, cytomegalovirus, and influenza virus are activated during primary HIV infection. *J Immunol Baltim Md 1950* 173: 2410–2418.
233. Papagno L, Spina CA, Marchant A, Salio M, Rufer N, et al. (2004) Immune Activation and CD8+ T-Cell Differentiation towards Senescence in HIV-1 Infection. *PLoS Biol* 2: e20. doi:10.1371/journal.pbio.0020020.
234. Parrinello CM, Sinclair E, Landay AL, Lurain N, Sharrett AR, et al. (2012) Cytomegalovirus immunoglobulin G antibody is associated with subclinical carotid artery disease among HIV-infected women. *J Infect Dis* 205: 1788–1796. doi:10.1093/infdis/jis276.
235. Sacre K, Hunt PW, Hsue PY, Maidji E, Martin JN, et al. (2012) A role for cytomegalovirus-specific CD4+CX3CR1+ T cells and cytomegalovirus-induced T-cell immunopathology in HIV-associated atherosclerosis. *AIDS Lond Engl* 26: 805–814. doi:10.1097/QAD.0b013e328351f780.
236. Wittkop L, Bitard J, Lazaro E, Neau D, Bonnet F, et al. (2013) Effect of cytomegalovirus-induced immune response, self antigen-induced immune response, and microbial translocation on chronic immune activation in successfully treated HIV type 1-infected patients: the ANRS CO3 Aquitaine Cohort. *J Infect Dis* 207: 622–627. doi:10.1093/infdis/jis732.
237. Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Epling L, Teague J, et al. (2011) Valganciclovir reduces T cell activation in HIV-infected individuals with incomplete CD4+ T cell recovery on antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 203: 1474–1483. doi:10.1093/infdis/jir060.
238. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, et al. (2006) Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 12: 1365–1371. doi:10.1038/nm1511.
239. Brenchley JM, Douek DC (2008) HIV infection and the gastrointestinal immune system. *Mucosal Immunol* 1: 23–30. doi:10.1038/mi.2007.1.
240. Birx DL, Redfield RR, Tencer K, Fowler A, Burke DS, et al. (1990) Induction of interleukin-6 during human immunodeficiency virus infection. *Blood* 76: 2303–2310.
241. Emilie D, Peuchmaur M, Maillot MC, Crevon MC, Brousse N, et al. (1990) Production of interleukins in human immunodeficiency virus-1-replicating lymph nodes. *J Clin Invest* 86: 148–159. doi:10.1172/JCI114678.
242. Molina JM, Scadden DT, Byrn R, Dinarello CA, Groopman JE (1989) Production of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta by monocytic cells infected with human immunodeficiency virus. *J Clin Invest* 84: 733–737. doi:10.1172/JCI114230.
243. Sandler NG, Douek DC (2012) Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities. *Nat Rev Microbiol* 10: 655–666. doi:10.1038/nrmicro2848.
244. Brenchley JM, Paiardini M, Knox KS, Asher AI, Cervasi B, et al. (2008) Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood* 112: 2826–2835. doi:10.1182/blood-2008-05-159301.

245. Favre D, Lederer S, Kanwar B, Ma Z-M, Proll S, et al. (2009) Critical loss of the balance between Th17 and T regulatory cell populations in pathogenic SIV infection. *PLoS Pathog* 5: e1000295. doi:10.1371/journal.ppat.1000295.
246. Brandt L, Benfield T, Mens H, Clausen LN, Katzenstein TL, et al. (2011) Low level of regulatory T cells and maintenance of balance between regulatory T cells and TH17 cells in HIV-1-infected elite controllers. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999 57: 101–108. doi:10.1097/QAI.0b013e318215a991.
247. Ciccone EJ, Greenwald JH, Lee PI, Biancotto A, Read SW, et al. (2011) CD4+ T cells, including Th17 and cycling subsets, are intact in the gut mucosa of HIV-1-infected long-term nonprogressors. *J Virol* 85: 5880–5888. doi:10.1128/JVI.02643-10.
248. Salgado M, Rallón NI, Rodés B, López M, Soriano V, et al. (2011) Long-term non-progressors display a greater number of Th17 cells than HIV-infected typical progressors. *Clin Immunol Orlando Fla* 139: 110–114. doi:10.1016/j.clim.2011.02.008.
249. Cecchinato V, Trindade CJ, Laurence A, Heraud JM, Brenchley JM, et al. (2008) Altered balance between Th17 and Th1 cells at mucosal sites predicts AIDS progression in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *Mucosal Immunol* 1: 279–288. doi:10.1038/mi.2008.14.
250. Klatt NR, Estes JD, Sun X, Ortiz AM, Barber JS, et al. (2012) Loss of mucosal CD103+ DCs and IL-17+ and IL-22+ lymphocytes is associated with mucosal damage in SIV infection. *Mucosal Immunol* 5: 646–657. doi:10.1038/mi.2012.38.
251. Raffatellu M, Santos RL, Verhoeven DE, George MD, Wilson RP, et al. (2008) Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes Salmonella dissemination from the gut. *Nat Med* 14: 421–428. doi:10.1038/nm1743.
252. Oehen S, Brduscha-Riem K (1999) Naïve cytotoxic T lymphocytes spontaneously acquire effector function in lymphocytopenic recipients: A pitfall for T cell memory studies? *Eur J Immunol* 29: 608–614. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199902)29:02<608::AID-IMMU608>3.0.CO;2-A.
253. Ge Q, Rao VP, Cho BK, Eisen HN, Chen J (2001) Dependence of lymphopenia-induced T cell proliferation on the abundance of peptide/ MHC epitopes and strength of their interaction with T cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1728–1733. doi:10.1073/pnas.98.4.1728.
254. Catalfamo M, Di Mascio M, Hu Z, Srinivasula S, Thaker V, et al. (2008) HIV infection-associated immune activation occurs by two distinct pathways that differentially affect CD4 and CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 19851–19856. doi:10.1073/pnas.0810032105.
255. Catalfamo M, Wilhelm C, Tcheung L, Proschan M, Friesen T, et al. (2011) CD4 and CD8 T cell immune activation during chronic HIV infection: roles of homeostasis, HIV, type I IFN, and IL-7. *J Immunol Baltim Md* 1950 186: 2106–2116. doi:10.4049/jimmunol.1002000.
256. Cohen Stuart JW, Hazebergh MD, Hamann D, Otto SA, Borleffs JC, et al. (2000) The dominant source of CD4+ and CD8+ T-cell activation in HIV infection is antigenic stimulation. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999 25: 203–211.
257. Hazenberg MD, Stuart JW, Otto SA, Borleffs JC, Boucher CA, et al. (2000) T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: a

- longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Blood* 95: 249–255.
258. Gougeon M-L (2005) To kill or be killed: how HIV exhausts the immune system. *Cell Death Differ* 12 Suppl 1: 845–854. doi:10.1038/sj.cdd.4401616.
259. Badley AD, McElhinny JA, Leibson PJ, Lynch DH, Alderson MR, et al. (1996) Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocytes. *J Virol* 70: 199–206.
260. Medrano FJ, Leal M, Arienti D, Rey C, Zagliani A, et al. (1998) Tumor necrosis factor beta and soluble APO-1/Fas independently predict progression to AIDS in HIV-seropositive patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14: 835–843.
261. Silvestri G, Munoz-Calleja C, Bagnarelli P, Piedimonte G, Clementi M, et al. (1998) Early increase of CD4+ CD45RA+ and CD4+ CD95- cells with conserved repertoire induced by anti-retroviral therapy in HIV-infected patients. *Clin Exp Immunol* 111: 3–11.
262. Lafeuillade A, Poizot-Martin I, Quilichini R, Gastaut JA, Kaplanski S, et al. (1991) Increased interleukin-6 production is associated with disease progression in HIV infection. *AIDS Lond Engl* 5: 1139–1140.
263. Weiss L, Haeffner-Cavaillon N, Laude M, Gilquin J, Kazatchkine MD (1989) HIV infection is associated with the spontaneous production of interleukin-1 (IL-1) in vivo and with an abnormal release of IL-1 alpha in vitro. *AIDS Lond Engl* 3: 695–699.
264. Canque B, Rosenzweig M, Gey A, Tartour E, Fridman WH, et al. (1996) Macrophage inflammatory protein-1alpha is induced by human immunodeficiency virus infection of monocyte-derived macrophages. *Blood* 87: 2011–2019.
265. Moir S, Fauci AS (2009) B cells in HIV infection and disease. *Nat Rev Immunol* 9: 235–245. doi:10.1038/nri2524.
266. Müller-Trutwin M, Hosmalin A (2005) Role for plasmacytoid dendritic cells in anti-HIV innate immunity. *Immunol Cell Biol* 83: 578–583. doi:10.1111/j.1440-1711.2005.01394.x.
267. Dion M-L, Bordi R, Zeidan J, Asaad R, Boulassel M-R, et al. (2007) Slow disease progression and robust therapy-mediated CD4+ T-cell recovery are associated with efficient thymopoiesis during HIV-1 infection. *Blood* 109: 2912–2920. doi:10.1182/blood-2006-09-047308.
268. Zeng M, Haase AT, Schacker TW (2012) Lymphoid tissue structure and HIV-1 infection: life or death for T cells. *Trends Immunol* 33: 306–314. doi:10.1016/j.it.2012.04.002.
269. McCune JM (1997) Thymic function in HIV-1 disease. *Semin Immunol* 9: 397–404. doi:10.1006/smim.1997.0098.
270. Kreiss JK, Koech D, Plummer FA, Holmes KK, Lightfoote M, et al. (1986) AIDS virus infection in Nairobi prostitutes. Spread of the epidemic to East Africa. *N Engl J Med* 314: 414–418. doi:10.1056/NEJM198602133140704.
271. Fowke KR, Nagelkerke NJ, Kimani J, Simonsen JN, Anzala AO, et al. (1996) Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. *Lancet* 348: 1347–1351. doi:10.1016/S0140-6736(95)12269-2.

272. Poudrier J, Thibodeau V, Roger M (2012) Natural Immunity to HIV: a delicate balance between strength and control. *Clin Dev Immunol* 2012: 875821. doi:10.1155/2012/875821.
273. Horton RE, McLaren PJ, Fowke K, Kimani J, Ball TB (2010) Cohorts for the Study of HIV-1–Exposed but Uninfected Individuals: Benefits and Limitations. *J Infect Dis* 202: S377–S381. doi:10.1086/655971.
274. Marmor M, Hertzmark K, Thomas SM, Halkitis PN, Vogler M (2006) Resistance to HIV Infection. *J Urban Health* 83: 5–17. doi:10.1007/s11524-005-9003-8.
275. Lifson AR, Buchbinder SP, Sheppard HW, Mawle AC, Wilber JC, et al. (1991) Long-term human immunodeficiency virus infection in asymptomatic homosexual and bisexual men with normal CD4+ lymphocyte counts: immunologic and virologic characteristics. *J Infect Dis* 163: 959–965.
276. Pantaleo G, Fauci AS (1996) Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol* 50: 825–854. doi:10.1146/annurev.micro.50.1.825.
277. Goudsmit J, Bogaards JA, Jurriaans S, Schuitemaker H, Lange JMA, et al. (2002) Naturally HIV-1 seroconverters with lowest viral load have best prognosis, but in time lose control of viraemia. *AIDS Lond Engl* 16: 791–793.
278. Okulicz JF, Marconi VC, Landrum ML, Wegner S, Weintrob A, et al. (2009) Clinical Outcomes of Elite Controllers, Viremic Controllers, and Long-Term Nonprogressors in the US Department of Defense HIV Natural History Study. *J Infect Dis* 200: 1714–1723. doi:10.1086/646609.
279. Candotti D, Costagliola D, Joberty C, Bonduelle O, Rouzioux C, et al. (1999) Status of long-term asymptomatic HIV-1 infection correlates with viral load but not with virus replication properties and cell tropism. French ALT Study Group. *J Med Virol* 58: 256–263.
280. Grabar S, Selinger-Leneman H, Abgrall S, Pialoux G, Weiss L, et al. (2009) Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV. *AIDS Lond Engl* 23: 1163–1169. doi:10.1097/QAD.0b013e32832b44c8.
281. Hubert JB, Burgard M, Dussaix E, Tamalet C, Deveau C, et al. (2000) Natural history of serum HIV-1 RNA levels in 330 patients with a known date of infection. The SEROCO Study Group. *AIDS Lond Engl* 14: 123–131.
282. Lambotte O, Boufassa F, Madec Y, Nguyen A, Goujard C, et al. (2005) HIV Controllers: A Homogeneous Group of HIV-1—Infected Patients with Spontaneous Control of Viral Replication. *Clin Infect Dis* 41: 1053–1056. doi:10.1086/433188.
283. Lefrère JJ, Mariotti M, Morand-Joubert L, Thauvin M, Roudot-Thoraval F (1999) Plasma human immunodeficiency virus RNA below 40 Copies/mL is rare in untreated persons even in the first years of infection. *J Infect Dis* 180: 526–529. doi:10.1086/314906.
284. Boufassa F, Saez-Cirion A, Lechenadec J, Zucman D, Avettand-Fenoel V, et al. (2011) CD4 dynamics over a 15 year-period among HIV controllers enrolled in the ANRS French observatory. *PLoS One* 6: e18726. doi:10.1371/journal.pone.0018726.
285. Sedaghat AR, Rastegar DA, O’Connell KA, Dinoso JB, Wilke CO, et al. (2009) T cell dynamics and the response to HAART in a cohort of HIV-1-infected elite suppressors. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 49: 1763–1766. doi:10.1086/648081.

286. Migueles SA, Connors M (2010) Long-term nonprogressive disease among untreated HIV-infected individuals: clinical implications of understanding immune control of HIV. *JAMA J Am Med Assoc* 304: 194–201. doi:10.1001/jama.2010.925.
287. Sajadi MM, Constantine NT, Mann DL, Charurat M, Dadzan E, et al. (2009) Epidemiologic characteristics and natural history of HIV-1 natural viral suppressors. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999 50: 403–408. doi:10.1097/QAI.0b013e3181945f1e.
288. Walker BD, Yu XG (2013) Unravelling the mechanisms of durable control of HIV-1. *Nat Rev Immunol* 13: 487–498. doi:10.1038/nri3478.
289. Alexander L, Weiskopf E, Greenough TC, Gaddis NC, Auerbach MR, et al. (2000) Unusual polymorphisms in human immunodeficiency virus type 1 associated with nonprogressive infection. *J Virol* 74: 4361–4376.
290. Mariani R, Kirchoff F, Greenough TC, Sullivan JL, Desrosiers RC, et al. (1996) High frequency of defective nef alleles in a long-term survivor with nonprogressive human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 70: 7752–7764.
291. Michael NL, Chang G, d' Arcy LA, Ehrenberg PK, Mariani R, et al. (1995) Defective accessory genes in a human immunodeficiency virus type 1-infected long-term survivor lacking recoverable virus. *J Virol* 69: 4228–4236.
292. Bailey JR, O'Connell K, Yang H-C, Han Y, Xu J, et al. (2008) Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a patient who developed AIDS to an elite suppressor. *J Virol* 82: 7395–7410. doi:10.1128/JVI.00800-08.
293. Blankson JN, Bailey JR, Thayil S, Yang H-C, Lassen K, et al. (2007) Isolation and characterization of replication-competent human immunodeficiency virus type 1 from a subset of elite suppressors. *J Virol* 81: 2508–2518. doi:10.1128/JVI.02165-06.
294. Julg B, Pereyra F, Buzón MJ, Piechocka-Trocha A, Clark MJ, et al. (2010) Infrequent recovery of HIV from but robust exogenous infection of activated CD4(+) T cells in HIV elite controllers. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 51: 233–238. doi:10.1086/653677.
295. Lamine A, Caumont-Sarcos A, Chaix M-L, Saez-Cirion A, Rouzioux C, et al. (2007) Replication-competent HIV strains infect HIV controllers despite undetectable viremia (ANRS EP36 study). *AIDS Lond Engl* 21: 1043–1045. doi:10.1097/QAD.0b013e3280d5a7ac.
296. Miura T, Brockman MA, Brumme CJ, Brumme ZL, Carlson JM, et al. (2008) Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in elite controllers: lack of gross genetic defects or common amino acid changes. *J Virol* 82: 8422–8430. doi:10.1128/JVI.00535-08.
297. Miura T, Brockman MA, Brumme ZL, Brumme CJ, Pereyra F, et al. (2009) HLA-associated alterations in replication capacity of chimeric NL4-3 viruses carrying gag-protease from elite controllers of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 83: 140–149. doi:10.1128/JVI.01471-08.
298. Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, et al. (1996) Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 273: 1856–1862.

299. Meyer L, Magierowska M, Hubert JB, Rouzioux C, Deveau C, et al. (1997) Early protective effect of CCR-5 delta 32 heterozygosity on HIV-1 disease progression: relationship with viral load. The SEROCO Study Group. *AIDS Lond Engl* 11: F73–F78.
300. Stewart GJ, Ashton LJ, Biti RA, Ffrench RA, Bennetts BH, et al. (1997) Increased frequency of CCR-5 delta 32 heterozygotes among long-term non-progressors with HIV-1 infection. The Australian Long-Term Non-Progressor Study Group. *AIDS Lond Engl* 11: 1833–1838.
301. Pereyra F, Addo MM, Kaufmann DE, Liu Y, Miura T, et al. (2008) Genetic and Immunologic Heterogeneity among Persons Who Control HIV Infection in the Absence of Therapy. *J Infect Dis* 197: 563–571. doi:10.1086/526786.
302. Chen H, Li C, Huang J, Cung T, Seiss K, et al. (2011) CD4+ T cells from elite controllers resist HIV-1 infection by selective upregulation of p21. *J Clin Invest* 121: 1549–1560. doi:10.1172/JCI44539.
303. Sáez-Cirión A, Hamimi C, Bergamaschi A, David A, Versmisse P, et al. (2011) Restriction of HIV-1 replication in macrophages and CD4+ T cells from HIV controllers. *Blood* 118: 955–964. doi:10.1182/blood-2010-12-327106.
304. Huang J, Burke PS, Cung TDH, Pereyra F, Toth I, et al. (2010) Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptors Maintain Unique Antigen-Presenting Properties of Circulating Myeloid Dendritic Cells in HIV-1-Infected Elite Controllers. *J Virol* 84: 9463–9471. doi:10.1128/JVI.01009-10.
305. Barblu L, Machmach K, Gras C, Delfraissy J-F, Boufassa F, et al. (2012) Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) from HIV controllers produce interferon- $\alpha$  and differentiate into functional killer pDCs under HIV activation. *J Infect Dis* 206: 790–801. doi:10.1093/infdis/jis384.
306. Lanier LL (2005) NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23: 225–274. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115526.
307. Moretta L, Bottino C, Pende D, Vitale M, Mingari MC, et al. (2005) Human natural killer cells: Molecular mechanisms controlling NK cell activation and tumor cell lysis. *Immunol Lett* 100: 7–13. doi:10.1016/j.imlet.2005.07.004.
308. Carrington M, O'Brien SJ (2003) The influence of HLA genotype on AIDS. *Annu Rev Med* 54: 535–551. doi:10.1146/annurev.med.54.101601.152346.
309. Goulder PJR, Walker BD (2012) HIV and HLA class I: an evolving relationship. *Immunity* 37: 426–440. doi:10.1016/j.immuni.2012.09.005.
310. Loffredo JT, Maxwell J, Qi Y, Glidden CE, Borchardt GJ, et al. (2007) Mamu-B\*08-positive macaques control simian immunodeficiency virus replication. *J Virol* 81: 8827–8832. doi:10.1128/JVI.00895-07.
311. Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, Sabbaghian MS, Rabin R, et al. (2002) HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat Immunol* 3: 1061–1068. doi:10.1038/ni845.
312. Migueles SA, Weeks KA, Nou E, Berkley AM, Rood JE, et al. (2009) Defective human immunodeficiency virus-specific CD8+ T-cell polyfunctionality, proliferation, and cytotoxicity are not restored by antiretroviral therapy. *J Virol* 83: 11876–11889. doi:10.1128/JVI.01153-09.

313. Sáez-Ciri3n A, Lacabaratz C, Lambotte O, Versmisse P, Urrutia A, et al. (2007) HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 6776–6781. doi:10.1073/pnas.0611244104.
314. Sáez-Ciri3n A, Sinet M, Shin SY, Urrutia A, Versmisse P, et al. (2009) Heterogeneity in HIV suppression by CD8 T cells from HIV controllers: association with Gag-specific CD8 T cell responses. *J Immunol Baltim Md 1950* 182: 7828–7837. doi:10.4049/jimmunol.0803928.
315. Hersperger AR, Pereyra F, Nason M, Demers K, Sheth P, et al. (2010) Perforin expression directly ex vivo by HIV-specific CD8 T-cells is a correlate of HIV elite control. *PLoS Pathog* 6: e1000917. doi:10.1371/journal.ppat.1000917.
316. Zimmerli SC, Harari A, Cellerai C, Vallelian F, Bart P-A, et al. (2005) HIV-1-specific IFN-gamma/IL-2-secreting CD8 T cells support CD4-independent proliferation of HIV-1-specific CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 7239–7244. doi:10.1073/pnas.0502393102.
317. Altfeld M, Addo MM, Rosenberg ES, Hecht FM, Lee PK, et al. (2003) Influence of HLA-B\*57 on clinical presentation and viral control during acute HIV-1 infection. *AIDS Lond Engl* 17: 2581–2591. doi:10.1097/01.aids.0000096870.36052.b6.
318. Dalmaso C, Carpentier W, Meyer L, Rouzioux C, Goujard C, et al. (2008) Distinct Genetic Loci Control Plasma HIV-RNA and Cellular HIV-DNA Levels in HIV-1 Infection: The ANRS Genome Wide Association 01 Study. *PLoS ONE* 3: e3907. doi:10.1371/journal.pone.0003907.
319. Fellay J, Shianna KV, Ge D, Colombo S, Ledergerber B, et al. (2007) A Whole-Genome Association Study of Major Determinants for Host Control of HIV-1. *Science* 317: 944–947. doi:10.1126/science.1143767.
320. Carrington M, Walker BD (2012) Immunogenetics of spontaneous control of HIV. *Annu Rev Med* 63: 131–145. doi:10.1146/annurev-med-062909-130018.
321. Emu B, Sinclair E, Hatano H, Ferre A, Shacklett B, et al. (2008) HLA Class I-Restricted T-Cell Responses May Contribute to the Control of Human Immunodeficiency Virus Infection, but Such Responses Are Not Always Necessary for Long-Term Virus Control. *J Virol* 82: 5398–5407. doi:10.1128/JVI.02176-07.
322. International HIV Controllers Study, Pereyra F, Jia X, McLaren PJ, Telenti A, et al. (2010) The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science* 330: 1551–1557. doi:10.1126/science.1195271.
323. Boulet S, Kleyman M, Kim JY, Kamya P, Sharafi S, et al. (2008) A combined genotype of KIR3DL1 high expressing alleles and HLA-B\*57 is associated with a reduced risk of HIV infection. *AIDS Lond Engl* 22: 1487–1491. doi:10.1097/QAD.0b013e3282ffde7e.
324. Jennes W, Verheyden S, Demanet C, Adjé-Touré CA, Vuylsteke B, et al. (2006) Cutting edge: resistance to HIV-1 infection among African female sex workers is associated with inhibitory KIR in the absence of their HLA ligands. *J Immunol Baltim Md 1950* 177: 6588–6592.
325. Long BR, Ndhlovu LC, Oksenberg JR, Lanier LL, Hecht FM, et al. (2008) Conferral of enhanced natural killer cell function by KIR3DS1 in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 82: 4785–4792. doi:10.1128/JVI.02449-07.

326. Martin MP, Gao X, Lee J-H, Nelson GW, Detels R, et al. (2002) Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* 31: 429–434. doi:10.1038/ng934.
327. Martin MP, Qi Y, Gao X, Yamada E, Martin JN, et al. (2007) Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat Genet* 39: 733–740. doi:10.1038/ng2035.
328. Carr WH, Pando MJ, Parham P (2005) KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. *J Immunol Baltim Md 1950* 175: 5222–5229.
329. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little A-M, Partheniou F, et al. (2006) Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med* 203: 633–645. doi:10.1084/jem.20051884.
330. Hansen SG, Piatak M Jr, Ventura AB, Hughes CM, Gilbride RM, et al. (2013) Immune clearance of highly pathogenic SIV infection. *Nature* 502: 100–104. doi:10.1038/nature12519.
331. Yant LJ, Friedrich TC, Johnson RC, May GE, Maness NJ, et al. (2006) The high-frequency major histocompatibility complex class I allele Mamu-B\*17 is associated with control of simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication. *J Virol* 80: 5074–5077. doi:10.1128/JVI.80.10.5074-5077.2006.
332. Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, et al. (1999) Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* 283: 857–860.
333. Demers KR, Reuter MA, Betts MR (2013) CD8+ T-cell effector function and transcriptional regulation during HIV pathogenesis. *Immunol Rev* 254: 190–206. doi:10.1111/imr.12069.
334. Killian MS, Roop J, Ng S, Hecht FM, Levy JA (2009) CD8+ Cell Anti-HIV Activity Rapidly Increases Upon Discontinuation of Early Antiretroviral Therapy. *J Clin Immunol* 29: 311–318. doi:10.1007/s10875-009-9275-y.
335. Killian MS, Johnson C, Teque F, Fujimura S, Levy JA (2011) Natural Suppression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication Is Mediated by Transitional Memory CD8+ T Cells. *J Virol* 85: 1696–1705. doi:10.1128/JVI.01120-10.
336. Wong JK, Strain MC, Porrata R, Reay E, Sankaran-Walters S, et al. (2010) In Vivo CD8+ T-Cell Suppression of SIV Viremia Is Not Mediated by CTL Clearance of Productively Infected Cells. *PLoS Pathog* 6: e1000748. doi:10.1371/journal.ppat.1000748.
337. Stranford SA, Skurnick J, Louria D, Osmond D, Chang S-Y, et al. (1999) Lack of infection in HIV-exposed individuals is associated with a strong CD8+ cell noncytotoxic anti-HIV response. *Proc Natl Acad Sci* 96: 1030–1035. doi:10.1073/pnas.96.3.1030.
338. Levy JA (2003) The search for the CD8+ cell anti-HIV factor (CAF). *Trends Immunol* 24: 628–632. doi:10.1016/j.it.2003.10.005.
339. Mackewicz CE, Blackbourn DJ, Levy JA (1995) CD8+ T cells suppress human immunodeficiency virus replication by inhibiting viral transcription. *Proc Natl Acad Sci* 92: 2308–2312.
340. Lécuroux C, Sáez-Cirión A, Girault I, Versmisse P, Boufassa F, et al. (2014) Both HLA-B\*57 and plasma HIV RNA levels contribute to the HIV-specific CD8+ T cell response in HIV controllers. *J Virol* 88: 176–187. doi:10.1128/JVI.02098-13.

341. Quigley M, Pereyra F, Nilsson B, Porichis F, Fonseca C, et al. (2010) Transcriptional analysis of HIV-specific CD8+ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nat Med* 16: 1147–1151. doi:10.1038/nm.2232.
342. Chen H, Ndhlovu ZM, Liu D, Porter LC, Fang JW, et al. (2012) TCR clonotypes modulate the protective effect of HLA class I molecules in HIV-1 infection. *Nat Immunol* 13: 691–700. doi:10.1038/ni.2342.
343. Migueles SA, Osborne CM, Royce C, Compton AA, Joshi RP, et al. (2008) Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity* 29: 1009–1021. doi:10.1016/j.immuni.2008.10.010.
344. Hersperger AR, Martin JN, Shin LY, Sheth PM, Kovacs CM, et al. (2011) Increased HIV-specific CD8+ T-cell cytotoxic potential in HIV elite controllers is associated with T-bet expression. *Blood* 117: 3799–3808. doi:10.1182/blood-2010-12-322727.
345. Emu B, Sinclair E, Favre D, Moretto WJ, Hsue P, et al. (2005) Phenotypic, functional, and kinetic parameters associated with apparent T-cell control of human immunodeficiency virus replication in individuals with and without antiretroviral treatment. *J Virol* 79: 14169–14178. doi:10.1128/JVI.79.22.14169-14178.2005.
346. Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, et al. (2006) HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* 107: 4781–4789. doi:10.1182/blood-2005-12-4818.
347. Ndhlovu ZM, Proudfoot J, Cesa K, Alvino DM, McMullen A, et al. (2012) Elite controllers with low to absent effector CD8+ T cell responses maintain highly functional, broadly directed central memory responses. *J Virol* 86: 6959–6969. doi:10.1128/JVI.00531-12.
348. Viganò S, Utzschneider DT, Perreau M, Pantaleo G, Zehn D, et al. (2012) Functional avidity: a measure to predict the efficacy of effector T cells? *Clin Dev Immunol* 2012: 153863. doi:10.1155/2012/153863.
349. Berger CT, Carlson JM, Brumme CJ, Hartman KL, Brumme ZL, et al. (2010) Viral adaptation to immune selection pressure by HLA class I-restricted CTL responses targeting epitopes in HIV frameshift sequences. *J Exp Med* 207: 61–75. doi:10.1084/jem.20091808.
350. Berger CT, Frahm N, Price DA, Mothe B, Ghebremichael M, et al. (2011) High-functional-avidity cytotoxic T lymphocyte responses to HLA-B-restricted Gag-derived epitopes associated with relative HIV control. *J Virol* 85: 9334–9345. doi:10.1128/JVI.00460-11.
351. Mothe B, Llano A, Ibarondo J, Zamarreño J, Schiaulini M, et al. (2012) CTL responses of high functional avidity and broad variant cross-reactivity are associated with HIV control. *PloS One* 7: e29717. doi:10.1371/journal.pone.0029717.
352. Almeida JR, Price DA, Papagno L, Arkoub ZA, Sauce D, et al. (2007) Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J Exp Med* 204: 2473–2485. doi:10.1084/jem.20070784.
353. Sáez-Cirión A, Shin SY, Versmisse P, Barré-Sinoussi F, Pancino G (2010) Ex vivo T cell-based HIV suppression assay to evaluate HIV-specific CD8+ T-cell responses. *Nat Protoc* 5: 1033–1041. doi:10.1038/nprot.2010.73.

354. Giorgi JV, Ho HN, Hirji K, Chou CC, Hultin LE, et al. (1994) CD8+ lymphocyte activation at human immunodeficiency virus type 1 seroconversion: development of HLA-DR+ CD38- CD8+ cells is associated with subsequent stable CD4+ cell levels. The Multicenter AIDS Cohort Study Group. *J Infect Dis* 170: 775–781.
355. Buckheit RW 3rd, Salgado M, Silciano RF, Blankson JN (2012) Inhibitory potential of subpopulations of CD8+ T cells in HIV-1-infected elite suppressors. *J Virol* 86: 13679–13688. doi:10.1128/JVI.02439-12.
356. Hasley RB, Hong C, Li W, Friesen T, Nakamura Y, et al. (2013) HIV immune activation drives increased Eomes expression in memory CD8 T cells in association with transcriptional downregulation of CD127. *AIDS Lond Engl* 27: 1867–1877. doi:10.1097/QAD.0b013e3283618487.
357. Ribeiro-dos-Santos P, Turnbull EL, Monteiro M, Legrand A, Conrod K, et al. (2012) Chronic HIV infection affects the expression of the 2 transcription factors required for CD8 T-cell differentiation into cytolytic effectors. *Blood* 119: 4928–4938. doi:10.1182/blood-2011-12-395186.
358. Chattopadhyay PK, Betts MR, Price DA, Gostick E, Horton H, et al. (2009) The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression. *J Leukoc Biol* 85: 88–97. doi:10.1189/jlb.0208107.
359. Borrow P, Lewicki H, Wei X, Horwitz MS, Peffer N, et al. (1997) Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med* 3: 205–211.
360. Price DA, Goulder PJ, Klenerman P, Sewell AK, Easterbrook PJ, et al. (1997) Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 1890–1895.
361. Migueles SA, Sabbaghian MS, Shupert WL, Bettinotti MP, Marincola FM, et al. (2000) HLA B\*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2709–2714. doi:10.1073/pnas.050567397.
362. Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, et al. (2003) CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 421: 852–856. doi:10.1038/nature01441.
363. Vingert B, Perez-Patrigeon S, Jeannin P, Lambotte O, Boufassa F, et al. (2010) HIV controller CD4+ T cells respond to minimal amounts of Gag antigen due to high TCR avidity. *PLoS Pathog* 6: e1000780. doi:10.1371/journal.ppat.1000780.
364. Chevalier MF, Jülg B, Pyo A, Flanders M, Ranasinghe S, et al. (2011) HIV-1-Specific Interleukin-21+ CD4+ T Cell Responses Contribute to Durable Viral Control through the Modulation of HIV-Specific CD8+ T Cell Function. *J Virol* 85: 733–741. doi:10.1128/JVI.02030-10.
365. Lichtenfeld M, Kaufmann DE, Yu XG, Mui SK, Addo MM, et al. (2004) Loss of HIV-1-specific CD8+ T Cell Proliferation after Acute HIV-1 Infection and Restoration by Vaccine-induced HIV-1-specific CD4+ T Cells. *J Exp Med* 200: 701–712. doi:10.1084/jem.20041270.

366. Tomescu C, Duh F-M, Hoh R, Viviani A, Harvill K, et al. (2012) Impact of protective killer inhibitory receptor/human leukocyte antigen genotypes on natural killer cell and T-cell function in HIV-1-infected controllers. *AIDS Lond Engl* 26: 1869–1878. doi:10.1097/QAD.0b013e32835861b0.
367. Allouch A, David A, Amie SM, Lahouassa H, Chartier L, et al. (2013) p21-mediated RNR2 repression restricts HIV-1 replication in macrophages by inhibiting dNTP biosynthesis pathway. *Proc Natl Acad Sci* 110: E3997–E4006. doi:10.1073/pnas.1306719110.
368. Noel N, Boufassa F, Lécuroux C, Saez-Cirion A, Bourgeois C, et al. (2014) Elevated IP10 levels are associated with immune activation and low CD4<sup>+</sup> T-cell counts in HIV controller patients. *AIDS Lond Engl* 28: 467–476. doi:10.1097/QAD.0000000000000174.
369. Hatano H, Delwart EL, Norris PJ, Lee T-H, Dunn-Williams J, et al. (2009) Evidence for persistent low-level viremia in individuals who control human immunodeficiency virus in the absence of antiretroviral therapy. *J Virol* 83: 329–335. doi:10.1128/JVI.01763-08.
370. Lyons JL, Uno H, Ancuta P, Kamat A, Moore DJ, et al. (2011) Plasma sCD14 is a biomarker associated with impaired neurocognitive test performance in attention and learning domains in HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999 57: 371–379. doi:10.1097/QAI.0b013e3182237e54.
371. Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, et al. (2003) Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8<sup>+</sup> T cells. *Blood* 101: 2711–2720. doi:10.1182/blood-2002-07-2103.
372. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, et al. (2006) PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443: 350–354. doi:10.1038/nature05115.
373. Lécuroux C, Girault I, Boutboul F, Urrutia A, Goujard C, et al. (2009) Antiretroviral therapy initiation during primary HIV infection enhances both CD127 expression and the proliferative capacity of HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *AIDS Lond Engl* 23: 1649–1658. doi:10.1097/QAD.0b013e32832e6634.
374. Lécuroux C, Girault I, Urrutia A, Doisne J-M, Deveau C, et al. (2009) Identification of a particular HIV-specific CD8<sup>+</sup> T-cell subset with a CD27<sup>+</sup> CD45RO<sup>-</sup>/RA<sup>+</sup> phenotype and memory characteristics after initiation of HAART during acute primary HIV infection. *Blood* 113: 3209–3217. doi:10.1182/blood-2008-07-167601.
375. Cohen GB, Gandhi RT, Davis DM, Mandelboim O, Chen BK, et al. (1999) The Selective Downregulation of Class I Major Histocompatibility Complex Proteins by HIV-1 Protects HIV-Infected Cells from NK Cells. *Immunity* 10: 661–671. doi:10.1016/S1074-7613(00)80065-5.
376. Rajapaksa US, Li D, Peng Y-C, McMichael AJ, Dong T, et al. (2012) HLA-B may be more protective against HIV-1 than HLA-A because it resists negative regulatory factor (Nef) mediated down-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 13353–13358. doi:10.1073/pnas.1204199109.
377. Leslie AJ, Pfafferott KJ, Chetty P, Draenert R, Addo MM, et al. (2004) HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat Med* 10: 282–289. doi:10.1038/nm992.

378. Techakriengkrai N, Tansiri Y, Hansasuta P (2013) Poor HIV control in HLA-B\*27 and B\*57/58 noncontrollers is associated with limited number of polyfunctional Gag p24-specific CD8+ T cells. *AIDS Lond Engl* 27: 17–27. doi:10.1097/QAD.0b013e32835ac0e1.
379. Vaidya SA, Streeck H, Beckwith N, Ghebremichael M, Pereyra F, et al. (2013) Temporal effect of HLA-B\*57 on viral control during primary HIV-1 infection. *Retrovirology* 10: 139. doi:10.1186/1742-4690-10-139.
380. Martinez-Picado J, Prado JG, Fry EE, Pfafferott K, Leslie A, et al. (2006) Fitness Cost of Escape Mutations in p24 Gag in Association with Control of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol* 80: 3617–3623. doi:10.1128/JVI.80.7.3617-3623.2006.
381. Schneidewind A, Brockman MA, Yang R, Adam RI, Li B, et al. (2007) Escape from the Dominant HLA-B27-Restricted Cytotoxic T-Lymphocyte Response in Gag Is Associated with a Dramatic Reduction in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication. *J Virol* 81: 12382–12393. doi:10.1128/JVI.01543-07.
382. Lambotte O, Ferrari G, Moog C, Yates NL, Liao H-X, et al. (2009) Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. *AIDS Lond Engl* 23: 897–906. doi:10.1097/QAD.0b013e328329f97d.
383. Agarwal P, Raghavan A, Nandiwada SL, Curtsinger JM, Bohjanen PR, et al. (2009) Gene regulation and chromatin remodeling by IL-12 and type I IFN in programming for CD8 T cell effector function and memory. *J Immunol Baltim Md* 195: 1695–1704. doi:10.4049/jimmunol.0900592.
384. Pipkin ME, Lieberman J (2007) Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol* 19: 301–308. doi:10.1016/j.coi.2007.04.011.
385. Almeida JR, Sauce D, Price DA, Papagno L, Shin SY, et al. (2009) Antigen sensitivity is a major determinant of CD8+ T-cell polyfunctionality and HIV-suppressive activity. *Blood* 113: 6351–6360. doi:10.1182/blood-2009-02-206557.
386. Varela-Rohena A, Molloy PE, Dunn SM, Li Y, Suhoski MM, et al. (2008) Control of HIV-1 immune escape by CD8 T cells expressing enhanced T-cell receptor. *Nat Med* 14: 1390–1395. doi:10.1038/nm.1779.
387. West EE, Youngblood B, Tan WG, Jin H-T, Araki K, et al. (2011) Tight regulation of memory CD8(+) T cells limits their effectiveness during sustained high viral load. *Immunity* 35: 285–298. doi:10.1016/j.immuni.2011.05.017.
388. Betts MR, Price DA, Brenchley JM, Loré K, Guenaga FJ, et al. (2004) The functional profile of primary human antiviral CD8+ T cell effector activity is dictated by cognate peptide concentration. *J Immunol Baltim Md* 172: 6407–6417.
389. Graf EH, Mexas AM, Yu JJ, Shaheen F, Liszewski MK, et al. (2011) Elite suppressors harbor low levels of integrated HIV DNA and high levels of 2-LTR circular HIV DNA compared to HIV+ patients on and off HAART. *PLoS Pathog* 7: e1001300. doi:10.1371/journal.ppat.1001300.
390. Persaud D, Gay H, Ziemniak C, Chen YH, Piatak M, et al. (2013) Absence of detectable HIV-1 viremia after treatment cessation in an infant. *N Engl J Med* 369: 1828–1835. doi:10.1056/NEJMoa1302976.

391. Jintanat Ananworanich, C Vandergeeten, N Chomchey, N Phanuphak, V Ngauy, et al. (2013) Early ART Intervention Restricts the Seeding of the HIV Reservoir in Long-lived Central Memory CD4 T Cells.
392. Goujard C, Chaix M-L, Lambotte O, Deveau C, Sinet M, et al. (2009) Spontaneous control of viral replication during primary HIV infection: when is “HIV controller” status established? *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 49: 982–986. doi:10.1086/605504.
393. Buchbinder SP, Mehrotra DV, Duerr A, Fitzgerald DW, Mogg R, et al. (2008) Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet* 372: 1881–1893. doi:10.1016/S0140-6736(08)61591-3.
394. Robb ML (2008) Failure of the Merck HIV vaccine: an uncertain step forward. *Lancet* 372: 1857–1858. doi:10.1016/S0140-6736(08)61593-7.
395. Picker LJ, Hansen SG, Lifson JD (2012) New paradigms for HIV/AIDS vaccine development. *Annu Rev Med* 63: 95–111. doi:10.1146/annurev-med-042010-085643.
396. Hansen SG, Ford JC, Lewis MS, Ventura AB, Hughes CM, et al. (2011) Profound early control of highly pathogenic SIV by an effector memory T-cell vaccine. *Nature* 473: 523–527. doi:10.1038/nature10003.
397. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75: 163–189. doi:10.1189/jlb.0603252.
398. Hervas-Stubbs S, Riezu-Boj J-I, Gonzalez I, Mancheño U, Dubrot J, et al. (2010) Effects of IFN- $\alpha$  as a signal-3 cytokine on human naïve and antigen-experienced CD8(+) T cells. *Eur J Immunol* 40: 3389–3402. doi:10.1002/eji.201040664.

## Résumé :

Lors de l'infection par le VIH, la réponse immunitaire notamment la réponse T CD8<sup>+</sup> présente des défauts dans la reconnaissance et l'élimination du pathogène. L'activation excessive des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> semble jouer un rôle déterminant puisque ce paramètre est celui qui est le plus associé à la progression de la maladie. Il existe un rare groupe de patients infectés par le VIH qui parvient à contrôler spontanément l'infection (les patients HIV-contrôleurs) et dont les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH présentent une activation particulière et de bonnes fonctionnalités contre le VIH. L'objectif de ces travaux a été de caractériser les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH des patients HIV-contrôleurs en mettant en évidence la surreprésentation de deux sous populations T CD8<sup>+</sup> et de définir les paramètres nécessaires à l'établissement d'une réponse CD8 optimale au cours de l'infection par le VIH.

Mots-clefs : LT CD8<sup>+</sup> spécifiques - VIH ó HIV-contrôleurs - Activation

Laboratoire de rattachement :

INSERM

Unité mixte 1012 Régulation de la réponse immune, Infection VIH-1 et auto-immunité

Directeur : Pr. Marc Tardieu

Faculté de Médecine Paris-Sud

63, rue Gabriel Péri

94276 Le Kremlin-Bicêtre Cedex

PÔLE : IMMUNOLOGIE ET BIOTHERAPIES

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

UFR « FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »

5, rue Jean Baptiste Clément

92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex