



HAL
open science

Analyses phénotypique et fonctionnelle des cellules T CD4+ spécifiques du VIH chez les patients contrôlant spontanément l'infection à VIH

Mathieu Claireaux

► **To cite this version:**

Mathieu Claireaux. Analyses phénotypique et fonctionnelle des cellules T CD4+ spécifiques du VIH chez les patients contrôlant spontanément l'infection à VIH. Virologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2017. Français. NNT : 2017USPCC264 . tel-02293985

HAL Id: tel-02293985

<https://theses.hal.science/tel-02293985>

Submitted on 23 Sep 2019

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.

Thèse de doctorat
de l'Université Sorbonne Paris Cité
Préparée à l'Université Paris Diderot

Ecole doctorale BioSPC – Bio Sorbonne Paris Cité – ED157

Unité de Pathogénie Virale de l'Institut Pasteur

**Analyses phénotypique et fonctionnelle des
cellules T CD4+ spécifiques du VIH chez les
patients contrôlant spontanément l'infection à VIH**

Par **Mathieu CLAIREAUX**

Thèse de doctorat de Virologie

Dirigée par le Dr. Lisa Chakrabarti

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 22 septembre 2017

Pr. Pierre-Emmanuel CECCALDI, Professeur de l'Université Paris Diderot	Président
Pr. Arnaud MARCHANT, Directeur de l'IMI, Bruxelles	Rapporteur
Dr. Arnaud MORIS, Directeur de Recherche, CNRS, Paris	Rapporteur
Dr. Nathalie SCHMITT, Chargé de Recherche, CNRS, Bordeaux	Examineur
Dr. Lisa CHAKRABARTI, Directeur de Recherche, Institut Pasteur, Paris	Directrice de thèse

Thèse de doctorat
de l'Université Sorbonne Paris Cité
Préparée à l'Université Paris Diderot

Ecole doctorale BioSPC – Bio Sorbonne Paris Cité – ED157

Unité de Pathogénie Virale de l'Institut Pasteur

**Analyses phénotypique et fonctionnelle des
cellules T CD4+ spécifiques du VIH chez les
patients contrôlant spontanément l'infection à VIH**

Par **Mathieu CLAIREAUX**

Thèse de doctorat de Virologie

Dirigée par le Dr. Lisa Chakrabarti

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 22 septembre 2017

Pr. Pierre-Emmanuel CECCALDI, Professeur de l'Université Paris Diderot	Président
Pr. Arnaud MARCHANT, Directeur de l'IMI, Bruxelles	Rapporteur
Dr. Arnaud MORIS, Directeur de Recherche, CNRS, Paris	Rapporteur
Dr. Nathalie SCHMITT, Chargé de Recherche, CNRS, Bordeaux	Examineur
Dr. Lisa CHAKRABARTI, Directeur de Recherche, Institut Pasteur, Paris	Directrice de thèse

RESUME EN FRANÇAIS

Analyses phénotypique et fonctionnelle des cellules T CD4+ spécifiques du VIH chez les patients contrôlant spontanément l'infection à VIH

Les Contrôleurs du VIH sont de rares individus capables de contrôler spontanément la réplication virale en l'absence de traitement. De nombreuses études montrent que les Contrôleurs développent des réponses T antivirales remarquablement efficaces. Les cellules T CD4+ spécifiques de Gag pourraient jouer un rôle particulier car cette population est préservée en comparaison aux patients traités et corrèle négativement avec la charge virale.

Afin d'étudier cette population, nous avons réalisé une analyse transcriptionnelle et protéique multiplexée sur cellule unique, à partir de cellules T CD4+ détectées ex vivo par marquage tétramère de CMH-II contre le peptide Gag293 (Tet+). Nous avons comparé l'expression de 44 gènes et 6 protéines membranaires chez 9 patients Contrôleurs et 9 patients traités. Nous avons d'une part validé la forte fréquence de cellules T CD4+ Tet+ chez les Contrôleurs en comparaison aux patients traités et, d'autre part, montré que les cellules T CD4+ Tet+ des Contrôleurs, étaient activées et engagées dans une différenciation Th1 avancée et présentant un profil cytotoxique. De plus, les cellules T CD4+ Tet+ de Contrôleurs ont montré un état d'épuisement limité, reflété par une expression faible de PD-1, qui pourrait être l'une des raisons du maintien de leur fréquence et de leurs fonctions.

Dans une deuxième étude, nous avons étudié les cellules T folliculaires « helper » (Tfh) dans la population T CD4+ spécifique de Gag chez les Contrôleurs du VIH. Les Tfh jouent un rôle essentiel dans la maturation d'affinité des anticorps en aidant les cellules B. Afin de déterminer si ce sous-type cellulaire joue un rôle dans le contrôle de l'infection à VIH, nous avons analysé le phénotype et la fonction des Tfh circulantes (cTfh) : cellules T CD4+ CD45RA- CXCR5+). Nous avons utilisé un marquage tétramère de CMH-II contre le peptide Gag293, pour détecter les cTfh spécifiques du VIH (cTfh Tet+), et nous avons montré que cette population est préférentiellement maintenue chez les Contrôleurs du VIH. L'analyse phénotypique de la population cTfh Tet+ a montré une intensité d'expression (MFI) de PD-1 plus importante dans le groupe de patients traités, suggérant une activation immune anormale chez ces patients. La fonction des cTfh, analysée pour leur capacité à induire la sécrétion d'IgG en coculture avec des cellules B mémoires autologues, n'a pas montré de différences

majeures entre les groupes en terme de production d'IgG totales. Cependant, la production d'IgG spécifiques anti-VIH est significativement plus efficace chez les Contrôleurs, en particulier pour la réponse anti-Env qui est plus de 30 fois supérieure à celle des patients traités. Enfin, la fréquence des cTfh Tet⁺ a corrélé positivement avec la production d'IgG spécifiques, supportant l'idée d'un rôle important de la fonction Tfh dans la réponse humorale anti-VIH.

L'ensemble de ces résultats indique que la population T CD4⁺ spécifique de Gag supporte chez les Contrôleurs les deux bras de la réponse immunitaire antivirale : d'une part, une réponse de type cellulaire Th1 montrant un profil cytotoxique et, d'autre part, une réponse de type humorale, reflétée par des interactions cTfh/B préservées, résultant en une réponse B mémoire vigoureuse. Le maintien de la fonction et de la fréquence de ces cellules spécifiques de Gag pourrait donc jouer un rôle important dans le contrôle du VIH.

Mots clefs :

Virus de l'immunodéficience Humaine (VIH), Contrôleurs du VIH, Cellules T CD4⁺, Th1, Cytotoxique, Lymphocyte T folliculaire « helper » (Tfh), Anticorps.

ABSTRACT IN ENGLISH

Phenotypic and functional analysis of HIV-specific CD4⁺ T cells in spontaneously controlled HIV infection

HIV Controllers are rare individuals able to spontaneously control viral replication in the absence of treatment. Several studies showed that controllers develop effective anti-viral T cell responses. Gag-specific CD4⁺ T cells could play a particular role in HIV control, because this population is preserved in comparison with the treated patients and correlates negatively with the viral load.

In order to study this population, we performed a multiplexed single cell transcriptional and protein analysis from CD4⁺ T cells detected ex vivo by MHC-II tetramer labeling against the Gag293 peptide (Tet⁺). We compared the expression of 44 genes and 6 surface proteins in 9 Controllers patients and 9 treated patients. Firstly, we validated the high frequency of Tet⁺

CD4 + T cells in controllers compared to the treated patients, then we showed that Tet + CD4 + T cells from controllers were activated and engaged in advanced Th1 differentiation with a cytotoxic profile. In addition, Tet + CD4 + T cells from controllers showed a limited state of exhaustion, reflected by a lower expression of PD-1, which could be one of the reasons for maintaining their frequency and functions.

In a second study, we studied follicular helper T cells (Tfh) among the Gag-specific CD4 + T cell population of HIV controllers. Tfh plays an essential role in the affinity maturation of the antibody response by providing help to B cells. To determine whether this CD4+ T cell subset may contribute to the spontaneous control of HIV infection, we analyzed the phenotype and function of circulating Tfh (cTfh: T cells CD4 + CD45RA - CXCR5 +). We performed a MHC-II tetramer labeling against Gag293 peptide to detect HIV-specific cTfh (cTfh Tet +), and showed that this population is preferentially maintained in HIV controllers. Phenotypic analysis of Tet + cTfh population showed a higher intensity of PD-1 expression (MFI) in the treated group suggesting abnormal immune activation in these patients. The function of cTfh, analyzed by the capacity to promote IgG secretion in cocultures with autologous memory B cells, did not show major differences between groups in terms of total IgG production. However, the production of HIV-specific IgG is significantly more efficient in the controller group, especially for the anti-Env response that is more than 30-fold greater than those of the treated patients. Finally, the frequency of Tet + cTfh correlated positively with the production of specific IgG, supporting the idea of an important role of Tfh function in the humoral anti-HIV response.

Taken together, these results indicate that Gag-specific CD4 + T cell population supports the two arms of the antiviral immune response in HIV controllers: the cell-mediated response through a preferential differentiation toward Th1 cell type showing a cytotoxic profile, and the humoral response, reflected by preserved cTfh / B interactions, resulting in a vigorous memory response. Maintaining the function and frequency of these Gag-specific CD4 + T cells could therefore play an important role in HIV control.

Key words :

Human Immunodeficiency Virus (HIV), HIV controllers, T CD4+ T cells, Th1, Cytotoxic, Antibodies.

RESUME DETAILLE

Les Contrôleurs du VIH sont de rares individus capables de contrôler spontanément la réplication virale en l'absence de traitement. Ces patients sont caractérisés par un nombre de cellules T CD4+ presque normal et une charge virale qui se maintient en dessous des limites de détection (<50 copies d'ARN par mL de plasma). De nombreuses études montrent que les Contrôleurs développent des réponses T antivirales remarquablement efficaces. Les cellules T CD4+ spécifiques de Gag pourraient jouer un rôle particulier car cette population est préservée en comparaison aux patients traités, est engagée dans une réponse antivirale de type Th1, et corrèle négativement avec la charge virale. A l'inverse, les cellules T CD4+ spécifiques du VIH chez les patients traités montrent un état d'épuisement avancé.

Afin d'étudier plus en détail le phénotype de cette population et comprendre pourquoi elle est maintenue chez les Contrôleurs du VIH, nous avons réalisé une analyse transcriptionnelle et protéique multiplexée sur cellule unique, à partir de cellules T CD4+ détectées *ex vivo* par marquage tétramère de CMH-II contre le peptide Gag293 (Tet+). Nous avons comparé l'expression de 44 gènes et 6 protéines membranaires chez 9 patients Contrôleurs et 9 patients traités. Nous avons d'une part validé la forte fréquence de cellules T CD4+ Tet+ chez les Contrôleurs en comparaison aux patients traités ($P=0,004$) et, d'autre part, montré que les cellules T CD4+ Tet+ des Contrôleurs étaient activées et engagées dans une différenciation Th1 avancée et présentant un profil cytotoxique. De plus, les cellules T CD4+ Tet+ de Contrôleurs ont montré un état d'épuisement limité, reflété par une expression faible de PD-1 ($P<0,0001$), qui pourrait être l'une des raisons du maintien de leur fréquence et de leurs fonctions.

La différence la plus marquante a été une expression membranaire limitée du corécepteur de l'entrée virale CCR5 dans la population T CD4+ Tet+ du groupe de patients Contrôleurs ($P<0,0001$). La susceptibilité à l'entrée virale a été analysée par mesure de la fusion de la souche VIH-1 JRFL de tropisme R5 dans les cellules Tet+. Les résultats montrent que la faible expression de CCR5 chez les Contrôleurs corrèle ($R=0,74$; $P<0,0001$) avec une susceptibilité à la fusion limitée ($P=0,017$). Ces différences sont encore plus marquées dans le compartiment central mémoire, régénérateur des cellules T CD4+ Tet+. Enfin, les cellules T CD4+ Tet+ de Contrôleurs expriment fortement CCL5/RANTES ($P<0,001$), ligand agoniste

de CCR5, ce qui pourrait via une production autocrine, induire l'internalisation du récepteur, et ainsi expliquer le niveau d'expression restreint de CCR5.

Chez les Contrôleurs, les cellules T CD4⁺ totales semblent également être moins susceptibles à l'entrée virale (P=0,02), ce qui est corrélée à une expression de CCR5 intrinsèquement plus faible chez ces patients (P=0,008). De nombreuses études ont établi un lien clair entre CCR5 et une protection ou bien une progression lente de la maladie. Nos résultats montrent que l'expression de CCR5 pourrait également être un élément clef dans le contrôle spontané de l'infection à VIH.

Dans une deuxième étude, nous avons étudié les cellules T folliculaires « helper » (Tfh) dans la population T CD4⁺ spécifique de Gag chez les Contrôleurs du VIH. Les Tfh jouent un rôle essentiel dans la maturation d'affinité des anticorps en aidant les cellules B. Afin de déterminer si ce sous-type cellulaire joue un rôle dans le contrôle de l'infection à VIH, nous avons analysé le phénotype et la fonction des Tfh circulantes (cTfh : cellules T CD4⁺ CD45RA⁻ CXCR5⁺). Comme dans l'étude précédente nous avons utilisé un marquage tétramère de CMH-II contre le peptide Gag293, pour cette fois détecter les cTfh spécifiques du VIH (cTfh Tet⁺). Nous avons montré que la population cTfh Tet⁺ est préférentiellement maintenue chez les Contrôleurs du VIH (P=0,002). La fréquence des cellules PD-1⁺ parmi les cTfh Tet⁺ est augmentée aussi bien chez les Contrôleurs que les patients traités (médiane >75%) par rapport aux cTfh totales (<30%), mais l'intensité d'expression (MFI) de PD-1 est plus importante dans le groupe de patients traités (p=0,02), suggérant une activation immune anormale chez ces patients. La fonction des cTfh, analysée pour leur capacité à induire la sécrétion d'IgG en co-culture avec des cellules B mémoires autologues, n'a pas montré de différences majeures entre les groupes en terme de production d'IgG totales. Cependant, la production d'IgG spécifiques anti-VIH est significativement plus efficace chez les Contrôleurs, en particulier pour la réponse anti-Env qui est plus de 30 fois supérieure à celle des patients traités (P=0,012). Enfin, la fréquence des cTfh Tet⁺ corrèle positivement avec la production d'IgG spécifiques, supportant l'idée d'un rôle important de la fonction Tfh dans la réponse humorale anti-VIH.

L'ensemble de ces résultats indique que la population T CD4⁺ spécifique de Gag supporte chez les Contrôleurs les deux bras de la réponse immunitaire antivirale : d'une part, une réponse de type cellulaire Th1 montrant un profil cytotoxique et, d'autre part, une réponse de

type humorale, reflétée par des interactions cTfh/B préservées, résultant en une réponse B mémoire vigoureuse. Le maintien de la fonction et de la fréquence de ces cellules spécifiques de Gag pourrait donc jouer un rôle important dans le contrôle du VIH, maintien qui pourrait être expliqué par une susceptibilité restreinte à l'infection due à une expression limitée de CCR5.

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION	18
A. Les cellules T CD4+ sont impliquées dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire et humorale	18
A.1. Les cellules T CD4+	18
A.1.1 Le récepteur aux cellules T et l'interaction avec le Complexe majeur d'histocompatibilité ..	18
A.1.2 La diversité du TCR et la sélection thymique	19
A.1.3 Activation des cellules T CD4+ naïves et différenciation en cellules mémoires.....	22
A.1.4 Les différents types de cellules T CD4+ effectrices.....	25
A.1.5 Les molécules de co-stimulation inhibitrices.....	26
A.2. Les Th1 et les cellules T CD4+ cytotoxiques : réponse immunitaire à médiation cellulaire	29
A.2.1 Les cellules T CD4+ Th1	29
A.2.2 Les cellules T CD4+ Cytotoxiques	31
A.3. Tfh, une réponse immunitaire à médiation humorale	32
A.3.1 Structure de l'organe lymphoïde	32
A.3.2 Différenciation des T CD4+ naïves en Tfh.....	33
34	
A.3.3 Interaction des Tfh et des cellules B à la frontière des zones T/B	35
A.3.4 La réaction du CG.....	37
A.3.5 Différenciation des cellules B des CG en plasmablastes et PC.....	39
A.3.6 Les Tfh circulantes	40
B. LE VIH	42
B.1. Découverte et épidémiologie	42
B.2. Classification et nomenclature	43
B.3. La diversité.....	44
B.4. L'origine.....	46
B.5. Le VIH-2.....	47
B.6. VIH-1 : structure et organisation génomique	47
B.6.1 Structure de la particule	47
B.6.2 Cycle de réplication.....	49
B.7. Susceptibilité des cellules T CD4+ à l'entrée du VIH.....	53
B.7.1 Le tropisme et les cellules cibles.....	53
B.7.2 Les acteurs de l'entrée virale.....	55
CD4 : le récepteur primaire de l'entrée virale.....	55
Les corécepteurs de l'entrée virale.....	55
CCR5	57
Expression de CCR5 dans les cellules T CD4+ et susceptibilité à l'infection / progression.....	60
CXCR4	65
L'entrée ne corrèle pas toujours avec infection/réplication	66
B.8. Les 3 phases de l'infection.....	70
C. L'échec du système immunitaire dans le contrôle de l'infection à VIH.....	73
C.1. La déplétion des cellules T CD4+	73
C.1.1 Mécanismes de déplétion.....	74
C.2. Echec de la réponse immunitaire durant la phase précoce	76
C.2.1 Echappement à la réponse T CD8+	76
C.2.2 La réponse T CD4+ en phase précoce	76
C.2.3 Echappement à la réponse humorale.....	78
C.3. La mise en place de réservoirs viraux	79
C.4. L'infection VIH provoque une activation du système immunitaire.....	81
C.4.1 Les causes de l'activation immunitaire	81
C.4.2 Les conséquences générales de l'activation immunitaire.....	83
C.5. Impact du VIH sur la réponse T CD8+ spécifique du VIH.....	86
C.6. Impact du VIH sur la dysfonction de l'immunité humorale.....	88
C.6.1 Perturbation des cellules B par le VIH.....	88

C.6.2 La réponse anticorps dans l'infection VIH.....	91
C.7. Impact du VIH sur la réponse T CD4+ spécifique du VIH.....	92
C.7.1 Perte de fonction : focus sur le sous type-Th1.....	92
C.7.2 Tfh dans l'infection chronique à VIH.....	94
C.7.3 Susceptibilité à l'infection des cellules T CD4+ spécifiques.....	100
D. Contrôle de l'infection à VIH.....	101
D.1. Contrôleurs du VIH – Définition.....	101
D.2. Paramètres viraux dans le contrôle de l'infection à VIH.....	102
D.2.1 Réplication virale résiduelle.....	102
D.2.2 Fitness et génétique du virus.....	104
D.3. Facteurs génétiques de l'hôte dans le contrôle de l'infection à VIH.....	105
D.3.1 HLA de classe I.....	105
D.3.2 HLA de classe II.....	105
D.4. Réponse immunitaire T CD8+ dans le contrôle de l'infection VIH.....	106
D.4.1 Les cellules T CD8+ chez les contrôleurs ne sont pas épuisées.....	106
D.4.2 Les cellules T CD8+ de Contrôleurs possèdent des capacités cytotoxiques accrues.....	106
D.4.3 La réponse T CD8+ contre Gag corrèle avec le contrôle de l'infection.....	107
D.4.4 Les cellules T CD8+ sont de forte avidité chez les Contrôleurs du VIH.....	107
D.5. Réponse immunitaire humorale dans le contrôle de l'infection VIH.....	108
D.5.1 Anticorps non neutralisants.....	108
D.5.2 Anticorps neutralisants à large spectre et diversité de neutralisation.....	108
D.5.3 Réponse B mémoire chez les Contrôleurs du VIH.....	109
D.6. Réponse immunitaire T CD4+ dans le contrôle de l'infection VIH.....	109
D.6.1 Maintien d'une réponse Th1 anti-Gag efficace de haute affinité.....	110
D.6.2 Réponse Tfh chez les Contrôleurs du VIH.....	115
D.6.3 Susceptibilité des cellules T CD4+ à l'infection VIH et réservoirs viraux chez les Contrôleurs du VIH.....	116
II. RESULTATS.....	122
A. AXE 1 : High frequency of HIV-specific circulating follicular helper T cells associates with preserved memory B cell responses in HIV controllers.....	122
A.1. Contexte.....	122
A.2. Approches et objectifs.....	123
A.3. MANUSCRIT :.....	125
B. AXE 2 : Analyse en cellule unique des cellules T CD4+ spécifiques du VIH : différenciation Th1 avancée et expression réduite de CCR5 chez les Contrôleurs.....	163
B.1. Contexte.....	163
B.1.1 L'infection à VIH.....	163
B.1.2 Les Contrôleurs du VIH.....	164
B.1.3 Les cellules T CD4+ chez les Contrôleurs du VIH.....	164
La susceptibilité à l'infection des cellules T CD4+ des Contrôleurs du VIH.....	164
La réponse T CD4+ dirigée contre le VIH chez les patients Contrôleurs.....	165
B.2. Approches et objectifs.....	167
B.3. Résultats.....	169
B.3.1 Les Contrôleurs du VIH présentent une forte proportion de cellules T CD4+ spécifiques de Gag293.....	169
B.3.2 Les cellules T CD4+ spécifiques de Gag sont activées et engagées dans une différenciation Th1 à profil cytotoxique.....	169
B.3.3 Les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 chez les Contrôleurs montrent un profil Th1 plus prononcé mais sont moins activées.....	172
B.3.4 Les cellules T CD4+ de patients Contrôleurs ont une expression de CCR5 limitée.....	174
B.3.5 La fusion du VIH dans les cellules T CD4+ non-stimulées corrèle directement avec l'expression de CCR5.....	175
B.3.6 Les cellules T CD4+ centrales mémoires spécifiques de Gag293 chez les Contrôleurs du VIH sont peu sensibles à l'entrée virale.....	176
B.4. Discussion.....	178
B.4.1 Les Contrôleurs du VIH maintiennent une fréquence élevée de cellules T CD4+ spécifiques de Gag293.....	178

B.4.2 Les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 chez les Contrôleurs sont activées et présentent un programme de différenciation Th1 avec un potentiel cytotoxique.....	178
B.4.3 Les cellules T CD4+ spécifiques de patients traités sont épuisées.....	179
B.4.4 Les cellules T CD4+ spécifiques du VIH de Contrôleurs présentent une susceptibilité à la fusion limitée due à une expression de CCR5 membranaire limitée	180
B.4.5 Les cellules T CD4+ spécifiques du VIH de Contrôleurs présentent une susceptibilité à la fusion limitée de leurs cellules Centrales mémoires.....	181
B.4.6 Les cellules T CD4+ totales expriment aussi moins de CCR5 et ont une susceptibilité à la fusion limitée.....	182
B.4.7 Susceptibilité à l'infection et à la fusion des cellules T CD4+ de Contrôleur dans les autres études	183
B.4.8 Détection de CCR5 dans la population T CD4+	184
B.4.9 Conclusion.....	185
B.5. Matériels et Méthodes.....	186
B.5.1 Matériels.....	186
B.5.2 Méthodes.....	187
B.6. Légende des figures.....	194
B.7. Résultats.....	202
III. DISCUSSION GENERALE	219
A. Maintien de la fréquence et fonction des cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 Th1 et Tfh dans l'infection à VIH naturellement contrôlée.....	219
B. Epuisement limité des cellules T CD4+ spécifiques du VIH chez les Contrôleurs	221
C. Expression limitée de CCR5 dans le compartiment spécifique de Gag293 chez les Contrôleurs du VIH.....	222
D. Expression limitée de CCR5 dans l'ensemble de la population T CD4+ des Contrôleurs	224
E. Les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 de Contrôleurs de VIH expriment des TCR de forte affinité.....	224
F. Maintien de cellules cytotoxiques de haute affinité chez les Contrôleurs.....	226
G. Les Tfh spécifiques de Gag293 produisant de l'IL-21 expriment des chaînes TCR particulières	227
H. Perspectives	227
IV. REFERENCES	231
V. ANNEXES.....	284
A. Articles.....	284
A.1. Annexe 1 : Public T cell receptors confer high avidity CD4 responses to HIV controllers	284
A.2. Annexe 2 : MHC Class II Tetramer Labeling of Human Primary CD4+ T Cells from HIV Infected Patients.....	301
B. Figures : Annexe 3 Compléments.....	308

LISTE DES FIGURES

FIGURES INTRODUCTION

Figure 1 : Représentation de la structure cristallographique du TCR d'un lymphocyte T CD4+ en interaction avec un complexe peptide / CMH-II issu d'un APC.

Figure 2 : Réarrangement des gènes du TCR

Figure 3 : Différenciation thymique des cellules T

Figure 4 : Différenciation et régénération des cellules T mémoires

Figure 5 : Différenciation des cellules T CD4+ naïves en cellules T « helper ».

Figure 6 : Différenciation et activation des cellules Tfh et B et réaction du GC

Figure 7 : Evolution du nombre de nouvelles infections dans le monde de 2005 à 2015

Figure 8 : Arbre phylogénétique des Rétrovirus

Figure 9 : Distribution globale des différents sous-types de VIH-1 et des formes recombinantes de ces derniers.

Figure 10 : Structure du VIH et composition génomique

Figure 11 : Cycle de réplication du VIH-1

Figure 12 : Mécanisme d'entrée du VIH dans ses cellules cibles

Figure 13 : Représentation schématique de CCR5

Figure 14 : Structures du noyau de gp120 liées ou non à CD4

Figure 15 : Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'inhibition de l'entrée virale par les chimiokines

Figure 16 : Histoire naturelle de l'infection par le VIH chez un patient non traité

Figure 17 : Mécanismes de déplétion des lymphocytes T CD4+ dans l'infection VIH non traitée

Figure 18 : Altération des population lymphocytaires mémoires dans l'infection à VIH

Figure 19 : Perturbation de la fonction des cellules T CD8+ durant l'infection chronique VIH

Figure 20 : Graphique décrivant la progression dans la maladie d'un Contrôleur du VIH vs un progressateur chronique

Figure 21 : Résumé des facteurs immunitaires impliqués dans le contrôle du VIH

FIGURES AXE 2 : ANALYSE EN CELLULE UNIQUE DES CELLULES T CD4+ SPECIFIQUES DU VIH : DIFFERENCIATION TH1 AVANCEE ET EXPRESSION REDUITE DE CCR5 CHEZ LES CONTROLEURS

Figure 1 : Les Contrôleurs du VIH présentent une forte proportion de cellules T CD4+ spécifiques de Gag293

Figure 2 : Les cellules T CD4+ spécifiques de Gag sont activées et engagées dans une différenciation Th1 à profil cytotoxique

Figure 3 : Les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 chez les Contrôleurs montrent un profil Th1 plus prononcé mais sont moins activées

Figure 4 : Les cellules T CD4+ totales de patients Contrôleurs ont une expression de CCR5 limitée

Figures 5 : Les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 de patients Contrôleurs ont une expression de CCR5 limitée

Figure 6 : La fusion du VIH dans les cellules T CD4+ non-stimulées corrèle avec l'expression de CCR5

Figure 7 Les cellules T CD4+ centrales mémoires spécifiques de Gag293 chez les Contrôleurs du VIH sont peu sensibles à l'entrée virale

Figure supplémentaire 1 : L'expression du programme cytotoxique est corrélée dans les cellules spécifiques de Gag, chez les Contrôleurs du VIH

Figure supplémentaire 2A-2C : « Violin plots »

Figure supplémentaire 3 : P-values pour les comparaisons d'expression ARNm avec correction pour comparaisons multiples

Figure supplémentaire 4 : P-values pour les comparaisons d'expression protéique avec correction pour comparaisons multiples

Figure supplémentaire 5 : Complément

LISTE DES ABREVIATIONS

AICD	Mort Cellulaire Induite par l'Activation
AID	Activation-induced cytidine deaminase
ADCC	Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity
Ag	Antigène
AM	Mémoires Activées
APC	Cellule Présentatrice d'Antigène
APOBEC3	Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme, Catalytic Polypeptide 3
ART	Antiretroviral Therapy
bNAbs	Broadly Neutralizing Antibodies
BS	Bridging sheet
CA	Capside
CCL	C-C chemokine Ligand
CCR	C-C chemokine Receptor
CD	Cluster of Differentiation
CDKp21	kinase dépendante de la cycline
CDR	Régions Déterminantes Complémentaires
CG	Centres Germinatifs
CLR	Récepteurs de lectine de type C
CM	T CD4+ centrales mémoires
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV	Cytomegalovirus
CP	Patients Progressseurs Chroniques
CTL	Lymphocytes T Cytotoxiques
CTLA-4	CytotoxicT-lymphocyte-associated protein 4
CXCL	C-X-C chemokine Ligand
CXCR	C-X-C chemokine Receptor
D	Segments de gènes de diversité
DC	Cellules Dendritiques
DSB	Coupsures double brin
EBV	Epstein Barr Virus
EM	T CD4+ effectrices mémoires
env	Gène de l'enveloppe
ESCRT	Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
FAS	Apoptosis Stimulating Fragment
FASL	Apoptosis Stimulating Fragment Ligand
FCR	Formes Circulantes Recombinées
FRU	Formes Recombinantes Uniques
gag	Gène codant pour la capsid
GALT	Tissu lymphoïde associé au tractus gastro-intestinal
GWAS	Association génomique à large spectre

HAART	Highly active antiretroviral therapy
HEPS	Personnes hautement exposées mais séronégatives à l'infection à VIH
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen - antigen D Related
HPC	Cellules progénitrices hématopoïétiques
ICOS	Inducible T cell Costimulator
IFITM	Interféron-Induced Transmembrane
IFN-γ	Interféron gamma
IL	Interleukine
IN	Intégrase
ISG	Induction de gènes stimulés par l'interféron
J	Segments de gènes de jonction
K_D	Constante de dissociation à l'équilibre
LC	Cellules de Langerhans
LN	Ganglions lymphatiques
LTNP	Patients non-progressifs à long terme
LTR	Long Terminal Repeat
MA	Matrice
MIP	Macrophage Inflammatory Proteins
NC	Nucléocapside
OLII	Organes lymphoïdes secondaires
PBMC	Cellules mononucléaires du sang périphérique
PD-1	Programmed Death 1
PIC	Complexe de pré-intégration
PHI	Infection très précoce non traitée
PMA	Phorbol 12-Nyristate 13-Acetate
<i>pol</i>	Gène codant pour la polymérase
PR	Protéase
RAG	Gène activant la recombinaison
R5-CHK	Chimiokines, ligands naturels de CCR5
RT	Transcriptase inverse
RM	Mémoires au repos
RhM	Rhesus macaques
RSS	Séquence signal de recombinaison
SAMHD1	SAM domain and HD domain-containing protein 1
SERINC	Serine incorporator
SHIV	Chimeric simian-human immunodeficiency virus
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
SIV	Virus de l'Immunodéficience Simien
SNP	Polymorphismes nucléotidiques

TEC	Cellules Epithéliales Thymiques
TEMRA	T effectrice Mémoire CD45 RA+
TCR	Récepteurs hautement spécifiques
Tfh	Lymphocyte T folliculaires « helpers »
TGF-β	Transforming growth factor beta
Th	T CD4 « helpers »
TLM	Mémoires « Tissue-like »
Treg	Lymphocyte T régulateur
TRIM5α	protéine 5 alpha contenant un motif tripartite
TSCM	Cellules souches T mémoires
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

A. Les cellules T CD4+ sont impliquées dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire et humorale

Les cellules T CD4+ (pour Cluster of differentiation 4) jouent un rôle central dans la fonction du système immunitaire: elles aident les cellules B à produire des anticorps, à améliorer et à maintenir les réponses des cellules T CD8+, à réguler la fonction des macrophages, à organiser les réponses immunitaires contre une grande variété de microorganismes pathogènes et à réguler / supprimer la réponse immunitaire à la fois pour contrôler l'auto-immunité et pour ajuster l'amplitude et la persistance de ces réponses. Les cellules T CD4+ sont des médiateurs importants de la mémoire immunologique, et lorsque leur nombre est diminué ou que leurs fonctions sont perdues, l'individu devient sensible à un large éventail de troubles infectieux. En effet, dans l'infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), c'est lorsque le nombre de cellules T CD4+ dans le sang diminue en-dessous de 200 / mm³ que les infections opportunistes sont les plus susceptibles de se produire (1).

A.1. Les cellules T CD4+

A.1.1 Le récepteur aux cellules T et l'interaction avec le Complexe majeur d'histocompatibilité

Une composante essentielle de la réponse immunitaire T CD4+ est leur habilité à reconnaître des antigènes (Ag) étrangers présentés sur les complexes majeurs d'histocompatibilité de classe II (CMH-II). Les molécules du CMH-II sont constitutivement exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigène (APC) professionnelles telles que les cellules dendritiques (DC), les macrophages, les cellules B et les cellules épithéliales thymiques (TEC) (2).

Afin de reconnaître l'antigène présenté par les APC, les cellules T CD4+ possèdent des récepteurs hautement spécifiques (TCR). Le TCR est une protéine hétérodimérique membranaire, constituée d'une chaîne alpha (α) et d'une chaîne bêta (β) reliées par un pont disulfure. Chaque sous-unité est composée d'une région constante et d'une région variable faisant partie de la superfamille des immunoglobulines (Ig). La région constante est

proximale à la membrane cellulaire, tandis que la région variable permet l'interaction avec le complexe peptide / CMH (**Figure 1**).

Pour un TCR donné, il existe six régions d'hypervariabilité, connues sous le nom de régions déterminantes complémentaires (CDR), avec 3 domaines hypervariables par chaîne.

Les résidus de ces domaines variables sont situés dans deux régions du TCR, à l'interface des chaînes α et β et sur la chaîne β . Le CDR3 est le CDR principal responsable de la reconnaissance de l'Ag présenté, bien que le CDR1 de la chaîne α ait également été montré pour interagir avec la partie N-terminale du peptide antigénique, tandis que le CDR1 de la chaîne β interagit avec la partie C-terminale du peptide. Le CDR2 par contre, reconnaît uniquement le CMH. Suite à l'interaction spécifique avec le complexe peptide / CMH, la transduction du signal s'effectue via l'interaction avec CD3 et la chaîne zeta, avec qui le TCR forme un complexe.

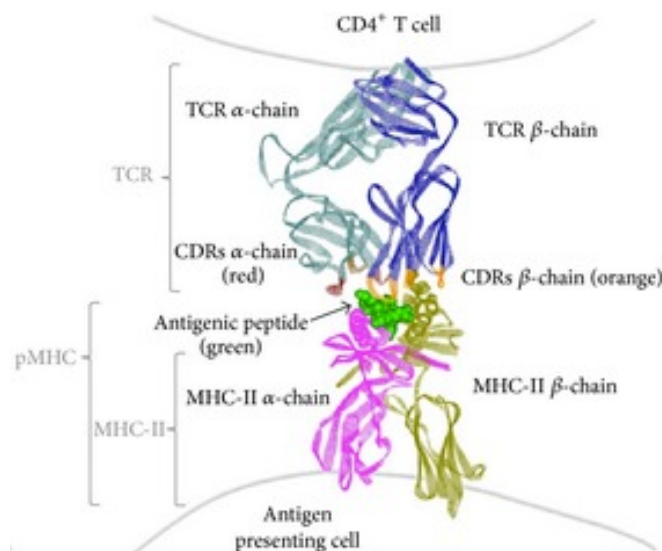


Figure 1 : Représentation de la structure cristallographique du TCR d'un lymphocyte T CD4+ en interaction avec un complexe peptide / CMH-II issu d'un APC.

Le TCR est un hétérodimère associé par un pont disulfure et est composé par une chaîne α (vert foncé) et une chaîne β (bleu). La diversité au sein des molécules de TCR est principalement concentrée dans les CDR (en rouge et orange) des chaînes α et β au niveau de la région de reconnaissance de l'Ag. Le peptide antigénique est représenté en vert. Les molécules de CMH-II sont composées d'une chaîne α (rose) et d'une chaîne β (jaune) Le sillon de présentation du peptide est formé par ces deux chaînes.

Source : D'après González. PAClin Dev Immunol. 2013

A.1.2 La diversité du TCR et la sélection thymique

Au cours du développement thymique, les cellules T acquièrent des récepteurs de cellules T $\alpha\beta$ ($\alpha\beta$ TCR). Chaque cellule T exprime un $\alpha\beta$ TCR fonctionnel unique, qui est généré par un réarrangement aléatoire des segments de gènes variables (V), de diversité (D) et de jonction (J) au niveau des loci du gène TCR β , ainsi que des segments géniques V et J au niveau des loci du gène TCR α (3). Le TCR β humain est constitué de 40-48 gènes V β (TRBV), 2 gènes D β (TRBD), 12-13 J β gènes (TRBJ) et 2 gènes C β (TRBC), alors que le locus TCR α présente 43-45 gènes V α (TRAV) 50 gènes J α (TRAJ) et un unique gène C α (TRAC) (**Figure 2**) (4).

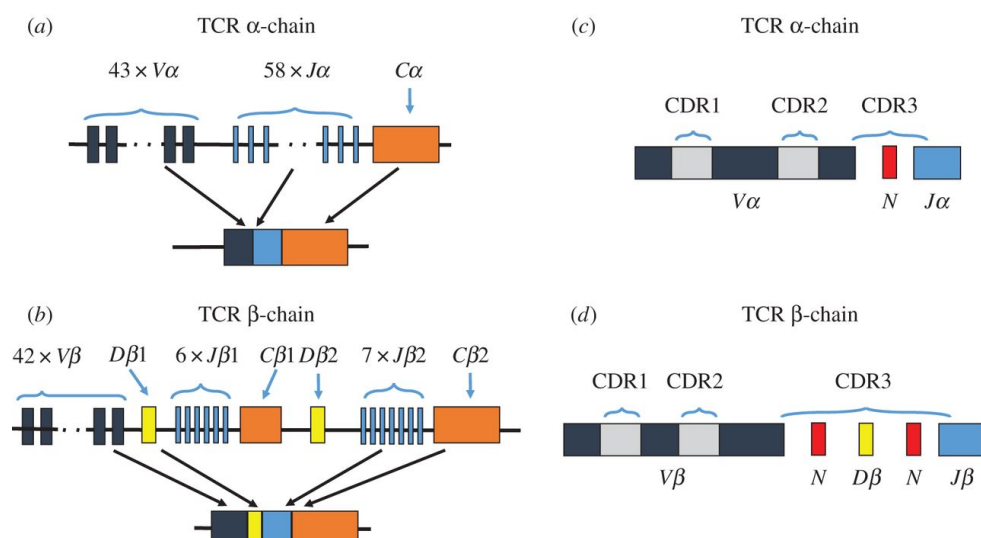


Figure 2 : Réarrangement des gènes du TCR (a) Les régions variable (V), de jonction (J) et constante (C) constituent la chaîne α . (b) Les régions variable (V), de jonction (J) et constante (C) avec l'addition d'une région de diversité (D) constituent la chaîne β . Les segments pour chaque région sont recombinaison, avec l'addition de nucléotides supplémentaires, pour générer chaque TCR réarrangé. Ces processus génèrent une importante diversité de récepteur (environ 10^{15} TCR). (c-d) Représentation des régions CDR1-3 hypervariables de la chaîne α (c) et de la chaîne β (d). Les régions CDR1 et CDR2 sont encodées au niveau de la région V, tandis que CDR3 chevauche les domaines V(D)J.

Source: D'après Laydon DJ. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2015

La recombinaison V (D) J est un événement stochastique qui est initiée lorsque le complexe protéique « gène activant la recombinaison 1 » (RAG1) et RAG2 crée des coupures double brin (DSB) dans des emplacements spécifiques appelés « séquence signal de recombinaison » (RSS) qui sont flanquants à chaque séquence codante V, D et J (5). Pour que la recombinaison V (D) J ait lieu, les sites RSS doivent être exposés dans l'euchromatine ouverte. Suite à la création des DSB par RAG, les extrémités des séquences codantes sont modifiées et reliées ensemble par des protéines de réparation de l'ADN (6, 7). Outre la combinaison de différents segments V, D, J, la diversité du répertoire TCR est aussi augmentée par l'ajout de nucléotides au niveau des jonctions V (D) J et par un manque de précision pendant le réarrangement des segments V (D) J (8, 9). Les régions hypervariables CDR1 et CDR2 sont codées par la lignée germinale, tandis que la région CDR3 est formée par la combinaison des différents segments V, (D) et J suite à la recombinaison somatique (10, 11). Le nombre hypothétique d'appariements possibles de TCR α et TCR β est estimé à 10^{15} . Les cellules capables de réarranger leurs TCR sont alors sélectionnées positivement pour leur capacité à reconnaître le CMH-I ou le CMH-II et vont devenir respectivement soit des cellules CD8, soit des cellules CD4. Dans un même temps, s'opère la sélection négative, qui correspond à une sélection des

cellules possédant des TCR se liant aux complexes CMH présentant des peptides du soi avec des affinités dépassant le seuil de sélection. Ce processus de "tolérance centrale" produit des cellules T, qui reconnaîtront efficacement les épitopes étrangers présentés par le CMH, mais pas ceux du soi. Cette sélection permettra une réponse immunitaire efficace en périphérie et ces cellules T auront un risque considérablement réduit de réagir contre des Ag du soi et de déclencher une réponse auto-immune (12-15). Après sélection thymique, la combinaison aléatoire des différentes chaînes TCR α et TCR β aboutit à environ $2 \cdot 10^7$ TCR distincts, au sein d'un même individu. Ces cellules T sélectionnées matures deviennent alors des cellules T naïves et migrent vers les organes lymphoïdes (**Figure 3**).

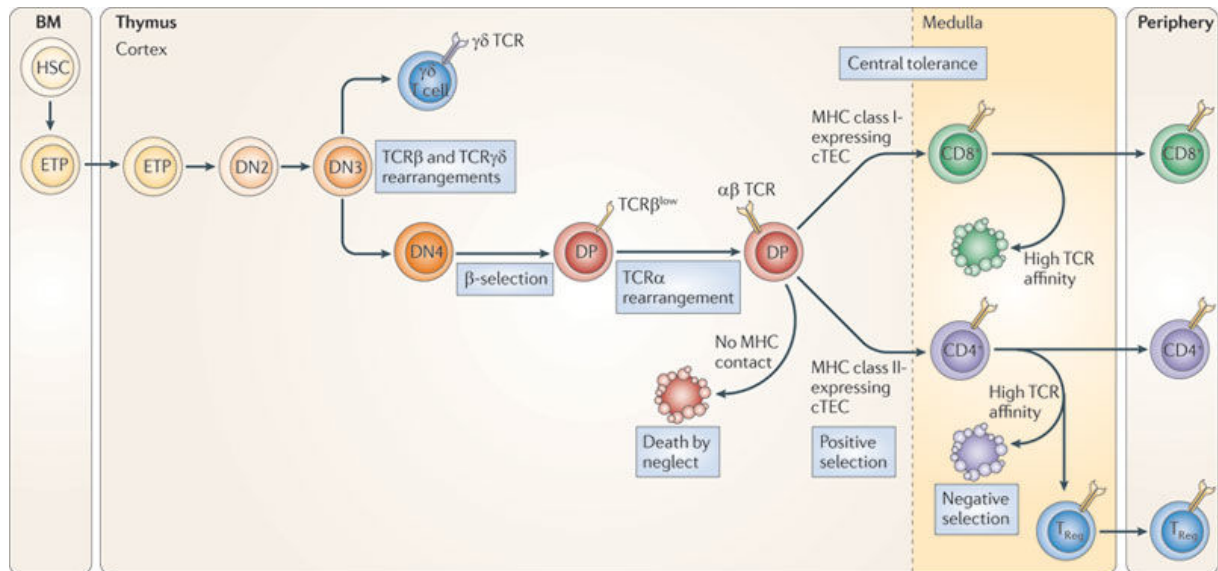


Figure 3 : Différenciation thymique des cellules T. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) de la moelle osseuse donnent naissance à des progéniteurs thymiques précoces (ETP), qui ont encore un potentiel de différenciation en cellules B et en cellules dendritiques. Suite à leur migration dans le thymus les ETP perdent un tel potentiel, ils deviennent alors des cellules thymocytes double négative (DN), qui n'expriment pas le récepteur des lymphocytes T (TCR) ou les co-récepteurs CD4 et CD8. Ils procèdent par la suite au réarrangement de leurs chaînes β et $\gamma\delta$. Les thymocytes dont le réarrangement β est productif sont sélectionnés et passent au stade Double Positif pendant lequel la chaîne α se réarrange. Une fois les chaînes associées et le TCR complet exprimé, une non reconnaissance par le CMH conduit à la mort de la cellule. Par la suite deux vagues de sélection, dites positive et négative, permettent d'éliminer les thymocytes auto-réactifs. Les thymocytes matures sélectionnées deviennent alors des cellules T naïves et migrent vers les organes lymphoïdes.

Source: D'après Miller JF. Nat Rev Immunol. 2011

A.1.3 Activation des cellules T CD4+ naïves et différenciation en cellules mémoires

Les cellules T CD4+ naïves expriment des récepteurs membranaires caractéristiques de cette population, CD62L et CCR7. Ces récepteurs favorisent la localisation des cellules T CD4+ naïves, au niveau des zones de surveillance centrale et locale, permettant une circulation continue à travers les organes lymphoïdes secondaires (OLII) via le sang (16). Les cellules T CD4+ naïves sont adressées au niveau des régions paracorticales des ganglions lymphatiques et des régions parafolliculaires de la rate où elles scannent les APC pour leurs Ag correspondants, en particulier les DC. Les cellules T CD4+ naïves expriment aussi CD45RA, mais pas le marqueur d'activation CD45RO (17). La réponse T CD4+ s'effectue en trois phases, et commence par l'activation des cellules T CD4+ naïves. L'activation d'une cellule T naïve requiert trois signaux. Le premier signal correspond à la reconnaissance du complexe CMH-II / peptide, présent à la surface des APC, par le TCR des cellules T CD4+. Le déclenchement ou non d'une réponse immunitaire à travers ce premier signal fait intervenir trois paramètres : (i) la fréquence des précurseurs spécifiques d'épitopes, (ii) la quantité d'épitopes présentés par les APC et (iii) l'avidité des TCR du lymphocyte pour le complexe CMH-II / peptide. Le deuxième signal est donné par les molécules de co-stimulation exprimées par les APC. L'expression des ligands de ces molécules par les cellules T est décisive pour le devenir de la réponse immunitaire. Le plus courant est CD28, qui se lie à CD80 et CD86 (ou B7) exprimés par les DC matures, et CD40-CD40L. Cette liaison induit l'expression de différents marqueurs d'activation aux fonctions diverses, comme CD25 (sous-unité du récepteur à l'Interleukine 2 (IL-2)), OX40 (membre de la superfamille des récepteurs du TNF), CD69 (membre de la famille des lectines dépendantes du calcium), HLA-DR ou ICOS (famille des récepteurs membranaires de CD28), mais aussi parfois des protéines à potentiel inhibiteur telles que PD-1 et CTLA-4. Enfin le dernier signal met en jeu le microenvironnement cellulaire et cytokinique déterminant la polarisation des cellules T CD4+ par les APC (18).

L'activation est suivie d'une phase d'expansion, qui est caractérisée par la prolifération et la différenciation clonales rapides des cellules naïves en cellules T CD4+ effectrices fonctionnelles. L'activation primaire des cellules T CD4+ naïves est souvent appelée phase d'amorçage pour la différencier de l'activation secondaire des cellules mémoires, plus rapide. L'amorçage optimal nécessite une cascade complexe d'événements de signalisation initiée par la reconnaissance de l'Ag et complétée par la signalisation via les corécepteurs et certaines

cytokines. Chez les cellules T CD4+, l'amorçage se produit sur 1 à 2 jours ou plus, et culmine avec l'installation d'un nouveau programme transcriptionnel qui confère aux cellules T CD4+ des fonctions effectrices et une capacité proliférative robuste (19). L'élimination de la menace immunologique est suivie par une phase de contraction qui entraîne la mort de la majorité des cellules effectrices qui ont proliférées. Néanmoins, durant la phase mémoire, un faible nombre de cellules survivent et persistent en tant que population dite au repos. Les cellules T CD4+ mémoires sont maintenues en plus grand nombre que les cellules naïves originelles et peuvent persister pendant de longues périodes de temps. Ces phases sont répétées lors d'une nouvelle rencontre avec le même Ag, induisant une nouvelle phase d'expansion des cellules mémoires, qui est remarquablement plus rapide que l'expansion primaire, et produisant des cellules effectrices secondaires avec une fonctionnalité améliorée. Si l'expansion secondaire contrôle rapidement la menace, elle est à nouveau suivie d'une phase de contraction, améliorant encore la taille de la population de cellules mémoires secondaires et sa capacité à répondre ultérieurement (18).

La maintenance des cellules T CD4+ mémoires n'est pas complètement comprise, et il est probable que de multiples mécanismes contribuent de façon différentielle aux renouvellements prolifératif et homéostatique des diverses populations mémoires. La maintenance des cellules T CD4+ mémoires dépend de la signalisation via le TCR et de la production de cytokines dont l'IL-7 et l'IL-15 (**Figure 4**) (20).

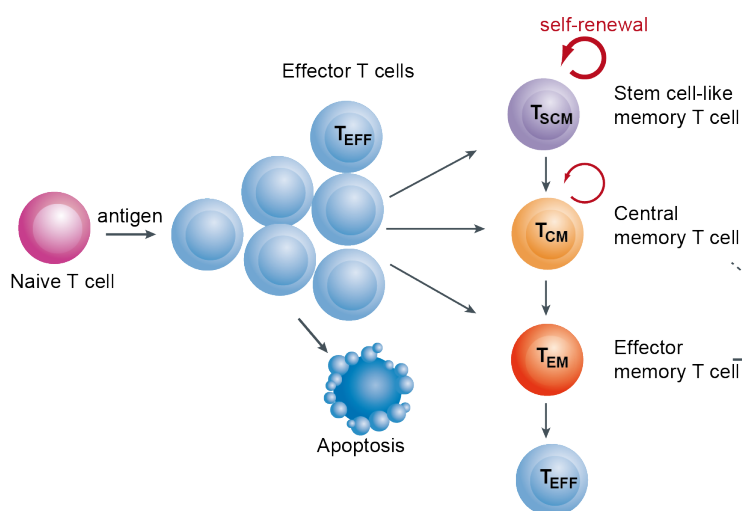


Figure 4: Différenciation et régénération des cellules T mémoires. Les cellules T CD4+ naïves se différencient après stimulation par l'antigène en cellules effectrices. Lorsque l'infection est résolue, une grande part des cellules effectrices rentre en apoptose. Une partie cependant se différencie en cellules mémoires TSCM (transitional stem cell memory), CM (centrale mémoire) et Effecteur Mémoire (EM). Les cellules mémoires montrent une capacité de renouvellement et de plasticité variable: TSCM>CM>EM>Eff.
Source: D'après Lisa Chakrabarti

Cellules T CD4+ mémoires

Le premier système de classification des cellules T mémoires exprimant CD45RA a été montré par Sallusto et al. Le pool de cellules T CD4+ mémoires est représenté par deux populations : les cellules T CD4+ centrales mémoires (CM) et les cellules T CD4+ effectrices mémoires (EM). Les cellules T CD4+ CM se caractérisent par leur capacité à circuler entre les OLII via le sang. Les marqueurs des cellules T CD4+ CM incluent une expression élevée des récepteurs membranaires CD62L et CCR7, leur permettant d'être « chimio-attiré » et d'entrer dans les OLII.

Elles ont un pouvoir effecteur faible, mais ont un fort potentiel de prolifération en réponse à l'antigène. Ces cellules sécrètent peu de cytokines effectrices comparées aux cellules EM mais peuvent néanmoins être polarisées en sous-type helper (21). Les cellules T CD4+ CM produisent essentiellement de l'IL-2 à faible niveau. Comme les cellules T CD4+ naïves, elles expriment fortement l'IL7R permettant leur renouvellement et ont une forte plasticité (22). Les CM ont une longue durée de vie et participent à la mémoire immunitaire à long terme.

En revanche, les EM sont caractérisées par une capacité à circuler entre la rate et les tissus non-lymphoïdes, en provenance des tissus lymphoïdes via le sang et le retour par les voies lymphatiques. CD62L et CCR7 sont absents ou mal exprimés chez ces cellules, tandis que les molécules d'adhésion alternatives qui vont faciliter l'entrée dans les tissus cibles non-lymphoïdes, sont régulées à la hausse. Elles expriment aussi plus fortement les chimiorécepteurs leur permettant d'être attirées vers les tissus non-lymphoïdes lors d'une inflammation tels que CXCR3 et CCR5. Elles prolifèrent peu mais sont plus différenciées, et expriment de manière plus prononcée les programmes de transcription des sous-type helpers Th1, Th2, Th17 (cf partie **A.1.4**) et sécrètent les cytokines liées à ces sous-types suite à une restimulation. Elles ont donc une forte capacité effectrice et sont très utiles pour une réponse rapide en périphérie (23).

Les cellules T CD4+ CM sont auto-renouvelables, peuvent maintenir l'homéostasie des lymphocytes T mémoires, et suite à une restimulation être capables de se différencier pour reconstituer le pool de cellules T CD4+ EM et effectrices à courte durée de vie et non renouvelables (24). Le dernier sous-type T CD4+ mémoire à avoir été montré sont les cellules T « stem like memory » (TSCM), ce sont des cellules T mémoires humaines à longue durée de vie qui affichent un fort niveau d'auto-renouvellement et une capacité de multipotence, et

peuvent se différencier en CM et EM, ainsi qu'en cellules T effectrices. Ces cellules montrent un phénotype de type CD45RO-, CCR7+, CD45RA+, CD62L+, CD27+, CD28+ et IL-7R α + caractéristique des cellules T naïves. Cependant, ces cellules expriment des niveaux accrus de CD95, IL-2R β , et CXCR3 ainsi que LFA-1, par rapport aux autres populations, ces cellules T montrent une capacité proliférative accrue, et sont capables de reconstituer le système immunitaire d'hôtes immunodéficients plus efficacement (25) (**Figure 4**)

A.1.4 Les différents types de cellules T CD4+ effectrices

Les cellules T CD4+ « helpers » se différencient en plusieurs sous-types de populations effectrices selon l'intensité du signal médié par l'interaction TCR/CMH-II peptide durant la présentation de l'Ag, l'environnement cytokinique et la nature des molécules de co-stimulation. Ces trois signaux vont induire l'expression de facteurs de transcription typiques à l'origine du programme de différenciation. Il existe quatre principaux sous-types de cellules T CD4+ effectrices, :les Th1, Th2, Th17, et les T folliculaires « helpers » (Tfh) ainsi qu'un sous type dit régulateur, les Treg (**Figure 5**).

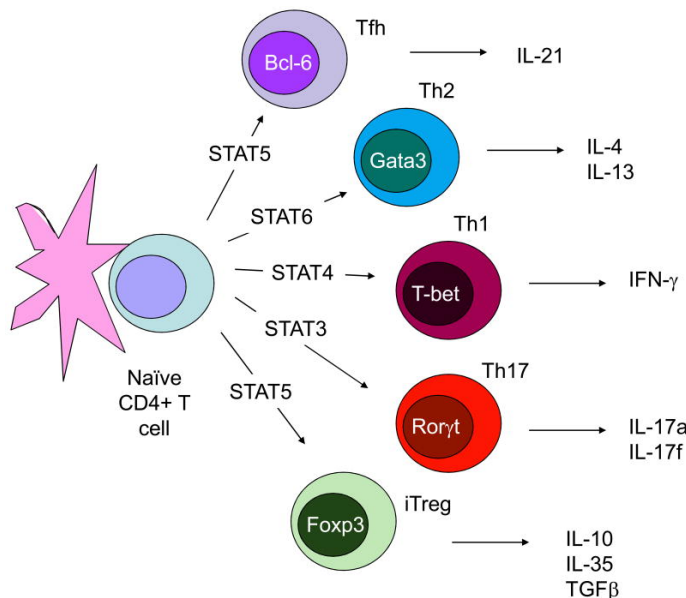


Figure 5 : Différenciation des cellules T CD4+ naïves en cellules T « helper ». Schéma représentant les processus de différenciation d'un T CD4+ naïf après la rencontre avec un APC. En fonction des cytokines produites, la cellule naïve s'orientera vers un sous-type « helper » particulier. Chaque T helper exprimera des facteurs de transcription qui leur seront propres.
Source: D'après O'Shea JJ Science. 2010

Les cellules Th1 sont caractérisées par leur production d'Interféron gamma (IFN- γ) et par l'expression du facteur de transcription T-bet, et interviennent également dans l'immunité contre les microorganismes intracellulaires, notamment les virus. La production d'IL-12 par les cellules de l'immunité potentialise la différenciation vers ce sous-type (26). Nous

reviendrons plus en détail sur ce sous-type cellulaire dans la partie **A.2.1**. Les cellules Th2 se différencient en présence d'IL-4 et requièrent le facteur de transcription GATA-3. Ces cellules produisent les cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 et interviennent dans l'immunité contre les parasites comme les helminthes et les nématodes. Les cellules Th17 produisent de l'IL-17 et de l'IL-22 et jouent un rôle important dans l'élimination des bactéries extracellulaires et des champignons à la surface des muqueuses. La différenciation en cellules Th17 requiert le facteur de transcription ROR γ t, induit par le facteur de croissance transformant (TGF- β) et par les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-21 chez la souris. Chez l'homme cette différenciation nécessite en plus la présence de l'IL-23 et de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β . Les cellules Tfh constituent une sous-population de cellules T CD4+ « helper » qui régulent la maturation des lymphocytes B. Leur différenciation est dépendante du répresseur de transcription Bcl-6, notamment induit par l'IL-21 et l'IL-6. Ces cellules productrices d'IL-21 ont la capacité de migrer au niveau des follicules des OLII et d'aider les cellules B dans la production d'anticorps hautement maturés. Nous discuterons plus en détail cette population dans la partie **A3**.

Les cellules Treg possèdent la propriété d'inhiber la prolifération d'autres lymphocytes T effecteurs. Ils sont nécessaires au maintien de la tolérance immunitaire et participent donc au maintien de l'homéostasie. Ces cellules ont un facteur de transcription primordial Foxp3, expriment CD25 et sécrètent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et TGF- β .

Le point de vue classique de lignées strictement distinctes a récemment été remis en question et il est intéressant de noter que les cellules T CD4+ différenciées possèdent une certaine plasticité et peuvent ainsi changer de profil de sécrétion cytokinique en fonction de leur environnement. (27)

A.1.5 Les molécules de co-stimulation inhibitrices

CTLA-4

CTLA-4 est une molécule homologue de CD28 présentant une plus forte affinité pour le ligand B7 présent à la surface des APC, cependant contrairement à CD28, l'interaction CTLA-4 / B7 ne conduit pas à la production de signaux de stimulation. En revanche, cette compétition de la liaison avec CD28 peut empêcher les signaux de co-stimulation induits par

cette dernière (28). Le rapport entre la liaison CD28 / B7 vs CTLA-4 / B7 va déterminer ou non si une cellule T va passer dans un état d'activation ou d'anergie.

Par ailleurs, certains travaux suggèrent que la liaison de CTLA-4 à B7 pourrait en fait induire des signaux d'inhibition qui contrecarreraient les signaux de stimulation issus des interactions de CD28 / B7 et de TCR / CMH. Les mécanismes qui pourraient expliquer ces signaux d'inhibition incluent l'inhibition directe du TCR au niveau de la synapse immunologique, l'inhibition de CD28 ou de sa voie de signalisation, ou bien encore une augmentation de la mobilité des cellules T conduisant à une diminution de leur capacité à interagir avec les APC (29).

CTLA-4 est capable d'être régulée, notamment par sa localisation au sein de la cellule. Dans des lymphocytes T CD4⁺ naïfs au repos, CTLA-4 est retrouvée principalement dans le compartiment intracellulaire. Les signaux de stimulation, induits à la fois par le TCR et la liaison CD28 / B7, conduisent à une régulation positive de CTLA-4 à la surface cellulaire via l'exocytose de vésicules contenant CTLA (30). Ce processus s'opère dans une boucle de régulation, où une forte signalisation par le TCR conduit à une plus grande translocation de CTLA-4 à la surface des cellules. Dans le cas d'un signal négatif conséquent via l'interaction CTLA-4 / B7, l'activation totale des cellules T est bloquée par l'inhibition de la production d'IL-2 et de la poursuite du cycle cellulaire (31).

CTLA-4 est également impliquée dans d'autres aspects du contrôle immunitaire. Les Treg contrôlent les fonctions des cellules T effectrices, et ont ainsi un rôle principal dans le maintien de la tolérance périphérique. Contrairement aux cellules T effectrices, les Treg expriment de manière constitutive CTLA-4, et des travaux émettent l'hypothèse que cette expression est importante pour les fonctions immunosuppressives de ces cellules. Dans les modèles animaux, une déficience génétique en CTLA-4 dans les Treg détériore leurs fonctions suppressives. Un des mécanismes pour lequel les Treg sont supposées contrôler les cellules T effectrices est la régulation négative des ligands de B7 sur les APC, amenant à une diminution de la co-stimulation par CD28 (32).

PD-1

Les liaisons de CTLA-4 et PD-1 ont chacune des effets négatifs similaires sur l'activité des cellules T, cependant, la cinétique de régulation négative, les mécanismes de signalisation

impliqués, ainsi que les lieux d'inhibition immunitaire diffèrent pour ces deux acteurs du contrôle immunitaire. Contrairement à CTLA-4, qui est confinée aux cellules T, PD-1 est plus largement exprimée, dans les cellules T activées, les cellules B et les cellules myéloïdes. Alors que les fonctions de CTLA-4 se produisent pendant la phase d'amorçage de l'activation des cellules T, principalement dans les ganglions lymphatiques, celles de PD-1 s'exercent pendant la phase effectrice, essentiellement dans les tissus périphériques (33). De plus, il a été montré que la fonction de PD-1 joue un rôle important dans la régulation des Tfh et de leur fonction, dans les centres germinatifs. PD-1 est augmenté après l'engagement du TCR ou BCR des cellules naïves et une stimulation antigénique persistante maintient l'expression de PD-1 à de fort niveau (34).

La distribution des ligands de PD-1 diffère également de celle pour ceux de CTLA-4. Les ligands B7 de CTLA-4 sont exprimés par les APC, qui sont de manière générale retrouvées dans les LN ou dans la rate, cependant, les ligands de PD-1, PD-L1 et PD-L2, sont plus largement exprimés (35). PD-L1 est exprimé sur les leucocytes, des cellules non hématopoïétiques et dans des tissus non lymphoïdes, et peut être induit sur les cellules parenchymateuses par des cytokines inflammatoires telle que l'IFN- γ ou des voies de signalisation impliquées dans des voies tumorales (36). L'expression de PD-L1 est aussi retrouvée dans différents types de tumeurs, et est associée à une augmentation du nombre de lymphocytes infiltrant les tumeurs et à un diagnostic vital négatif (37).

PD-L2 quant à lui, est principalement exprimé sur les DC et les monocytes, mais peut être induit sur une plus large variété de cellules immunitaires et non immunitaires, en fonction du microenvironnement local. PD-1 présente une plus forte affinité pour PD-L2 que pour PD-L1, et cette différence pourrait être responsable pour les contributions distinctes de ces ligands dans les réponses immunes. Du fait que les ligands de PD-1 soient exprimés dans les tissus périphériques, il est supposé que les interactions PD-1 / PD-L1 et PD-1 / PD-L2 maintiennent la tolérance immunitaire au sein des tissus infiltrés localement (35).

Il existe de nombreux autres récepteurs inhibiteurs décrits pour être impliqués dans la régulation de la réponse T : CD160, KLRG-1, TIM-3, 2B4, BTLA et LAG-3 (38).

A.2. Les Th1 et les cellules T CD4+ cytotoxiques : réponse immunitaire à médiation cellulaire

A.2.1 Les cellules T CD4+ Th1

Différenciation des cellules Th1

L'interleukine 12 (IL-12) et l'interféron γ (IFN γ) sont les cytokines critiques qui initient la cascade de signalisation induisant le développement des cellules Th1. L'IL-12 est sécrétée en grande quantité par les APC après leur activation via les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires. La production d'IL-12 va induire l'activation des cellules tueuses naturelles (NK) qui produisent de l'IFN γ (26). Plusieurs facteurs de transcription agissent de manière coordonnée pour induire la différenciation complète des cellules Th1 (T-bet, STAT1, STAT4, Runx 3, Eomes, Hlx) (27). Le régulateur principal, T-box 21 (T-bet), est défini non seulement par sa capacité à activer l'ensemble des gènes favorisant la différenciation Th1, mais aussi par sa capacité à supprimer le développement des autres sous-types. L'expression de T-bet dépend fortement du « signal transducer and activator of transcription 1 » (STAT1) qui est activé par l'IFN γ . T-bet induit la production d'IFN γ en différenciant les cellules T CD4+ en Th1, amplifiant ainsi l'expression de T-bet lui-même et régulant à la hausse l'expression de IL12R β 2. Ces cellules peuvent alors être sélectionnées par l'IL-12 sécrétée par les APC, assurant ainsi l'expansion sélective des cellules Th1 différenciées (39).

Fonction des cellules Th1

Les cellules Th1 sont spécialisées dans l'élimination des agents pathogènes intracellulaires, et notamment des virus. Elles sécrètent principalement de l'IFN γ , du « Tumor Necrosis Factor α » (TNF α) et de l'IL-2. L'IFN γ est essentiel pour l'activation des phagocytes mononucléaires, y compris les macrophages et les cellules microgliales, permettant d'améliorer l'activité phagocytaire. On pense que l'IFN γ exerce son effet par l'activation de gènes de réponse à l'IFN, qui représentent plus de 200 gènes (40). L'un des mieux étudiés est le gène codant pour la GTPase induite par l'IFN (IGTP). L'IGTP est un membre de la famille des GTPase p47, également connue sous le nom de famille IRG, est fortement régulée par l'IFN γ et permet l'élimination des agents pathogènes intracellulaires (41). Le TNF α est un médiateur important de l'inflammation (27). L'IL-2 favorise la prolifération des lymphocytes T CD8+ avec

l'acquisition d'un phénotype cytolytique, est cruciale pour la maintenance des Treg, et joue un rôle important dans la différenciation des cellules T CD4+ en cellules T effectrices (42).

Les cellules Th1 expriment les chimiorécepteurs CXCR3 et CCR5, permettant leur migration vers les sites d'inflammation en périphérie (43).

Aide aux cellules T CD8+

L'importance de l'aide aux cellules T CD8+ par le biais des cellules T CD4+ a été bien documentée dans les modèles murins d'infections bactériennes et virales. Ces études montrent la nécessité des cellules T CD4+ durant l'infection primaire dans l'induction de réponses CD8+ mémoires efficaces. Dans ces modèles, lors d'une réponse immunitaire rappel, la déplétion des cellules T CD4+ impacte directement le nombre de cellules T CD8+ spécifiques de l'Ag suite à une restimulation. De plus, en l'absence de cellules T CD4+, les cellules mémoires T CD8+ perdent leur capacité à produire des cytokines effectrices et leur capacité cytolytique (44-47). Une publication ultérieure a identifié la phase exacte de l'infection primaire, où les cellules T CD4+ sont essentielles pour l'expansion et la maintenance des cellules T CD8+ mémoires. Cette étude prouve, par des systèmes de transfert adoptif, que la présence de cellules T CD4+ n'est pas nécessaire pendant la phase d'amorçage initiale permettant la génération du pool de cellules mémoire. En revanche, les cellules T CD4+ sont plutôt impliquées dans la maintenance des cellules mémoires T CD8+ à longue durée de vie, via une forte production d'IL-2. En effet, la production de cellules mémoires T CD8+ à longue durée de vie s'effectue au pic de la réponse T CD8+, qui dépend strictement de l'aide apportée par les cellules T CD4+ (48). La stimulation répétée du TCR dans les infection de type chroniques conduit à la perte du sous-type Th1 au dépend du sous-type Tfh. Il a récemment été montré que ce phénomène est associé à une perte progressive ainsi qu'à la dysfonction des cellules T CD8+. Ceci suggère un rôle important du sous-type T CD4+ Th1 dans le maintien de la réponse T CD8+ (49).

A.2.2 Les cellules T CD4+ Cytotoxiques

Les cellules T CD4+ avec activité cytotoxique (CTL) ont été observées dans diverses réponses immunitaires. Ces cellules sont caractérisées par leur capacité à tuer les cellules cibles exprimant le CMH de classe II comme les APC.

La cytotoxicité des cellules T CD4+

Les cellules T CD4+ CTL utilisent deux mécanismes effecteurs cytotoxiques principaux qui sont également utilisés par les cellules T CD8+ CTL et les cellules NK. Le premier mécanisme est induit par l'interaction Fas-Ligand (FasL) / Fas, qui implique la liaison de FasL exprimé à la surface des cellules effectrices, à son récepteur apparenté Fas (CD95) exprimé à la surface des cellules cibles. La trimérisation de Fas sur la cellule cible conduit au recrutement du complexe intracellulaire de signalisation de mort induite (DISC) activant la voie de signalisation qui induit la mort cellulaire par apoptose via la caspase 3 (50). Le deuxième mécanisme majeur de cytotoxicité se produit via une exocytose dirigée de granules spécialisés entrant dans les cellules cibles et induisant l'apoptose. L'exocytose des granules cytotoxiques se produit en réponse à une signalisation par le TCR. Il existe différents types de granules comme la perforine qui va produire des pores dans la cellule (51) permettant l'entrée de molécules cytotoxiques telles que les granzymes (Gzm) et granulysines. Il existe cinq types de granzymes connues (A, B, H, K et M) qui ont diverses spécificités de substrat. Les Granzymes A et B sont les plus étudiés et les plus abondantes (52).

Différenciation et phénotype

Bien que l'activité cytolytique des cellules T CD4+ soit fréquemment observée chez les cellules Th1, les cellules T CD4+ CTL peuvent être générées *in vitro* en absence d'IFN- γ (53). L'IL-2, cependant, semble être critique dans la génération des cellules T CD4+ CTL (54). Il semble que la présence de signaux inflammatoires tel que l'IFN- α ou l'IL-6 pendant l'infection peut compenser, des niveaux d'IL-2 faibles. La réponse à l'IL-15 semble être aussi un trait partagé par les T CD4+ CTL et CD8. La modulation de l'antigène influe également sur la fonctionnalité des cellules T CD4+ CTL. De faibles niveaux d'Ag génèrent des cellules T CD4+ CTL avec des taux de cytotoxicité plus élevés. En revanche, les CTL générées avec des niveaux plus élevés de peptides produisent presque exclusivement de l'IFN- γ et du TNF (55).

Les facteurs de transcription de la famille T-box comme T-bet et Eomesodermin (Eomes) sont connus depuis un certain temps comme des régulateurs de la cytotoxicité dans les cellules T CD8+ CTL (56). Récemment, les études ont aussi confirmé un rôle pour ces deux molécules dans la régulation de la cytotoxicité des cellules T CD4+. Alors que l'expression de T-bet est requise pour l'induction des cellules T CD4+ Th1 et de la production IFN- γ , elle peut également se lier aux promoteurs de GzmB et Prf1 dans les cellules T CD4+ et CD8+ (57). T-bet n'est cependant pas le seul facteur de transcription impliqué dans l'acquisition de la cytotoxicité dans les cellules T CD4+. En effet, Eomes est aussi requis pour l'expression de GzmB, perforine, FasL par des cellules T CD4+ (58). Récemment il a été montré qu'un facteur de transcription CRTAM pourrait agir en amont d'EOMES dans les voies de signalisation de la différenciation en CTL (59).

Ces cellules, chez des adultes en bonne santé, sont des cellules effectrices mémoires CD45RA- CCR7- qui expriment fortement les intégrines CD11a et CD11b et qui n'expriment pas les co-récepteurs CD27 ou CD28. Les cellules T CD4+ CTL sont distinctes des cellules T NK car elles n'expriment pas CD16, CD56 ou CD161. L'expression de CD57, marqueur de la différenciation terminale, semble être régulée à la hausse chez les cellules T CD4+ CTL.

Il y a toujours un débat pour savoir si les cellules T CD4+ CTL représentent une nouvelle lignée ou simplement un sous-ensemble de cellules qui ont acquis une fonction cytotoxique en plus des caractéristiques T auxiliaires classiques (55).

A.3. Tfh, une réponse immunitaire à médiation humorale

Les Tfh sont un sous type de T CD4+ spécialisé dans la régulation de la réaction du CG et sont essentielles dans l'aide aux cellules B, notamment dans le processus de maturation et la commutation isotypique. La dysfonction ou la perturbation de ces cellules Tfh est impliquée dans de nombreuses pathologies dont l'auto-immunité (60-62), l'immunodéficience primaire (63), le cancer (64), et l'infection VIH (65-70).

A.3.1 Structure de l'organe lymphoïde

Les ganglions, aussi appelés nœuds lymphatiques (LN), se situent à la jonction des vaisseaux lymphatiques et sont répartis dans tout l'organisme. Ils sont majoritairement constitués de lymphocytes et d'APC chargées d'Ag, qui entrent dans les LN par les vaisseaux lymphatiques

afférents. Les cellules T et B accèdent aux LN par des vaisseaux sanguins particuliers, HEV (« high endothelial venules ») et vont se répartir dans des zones distinctes de l'organe: le cortex (zone B) et le paracortex (zone T). La répartition dans ces différentes zones est dictée par des gradients de chimiokines (CXCL13 pour la zone B et CCL19/CCL21 pour la zone T). La zone T est le lieu d'interactions entre les cellules T et les DC. La zone B, riche en lymphocytes B et DC folliculaires (FDC), s'organise en follicules lymphoïdes où les cellules B se différencient et prolifèrent. Des CG se forment au sein de ces follicules lors de l'activation des cellules B (**Figure 6**). Les lymphocytes T et B peuvent quitter les LN par les vaisseaux lymphatiques efférents.

A.3.2 Différenciation des T CD4+ naives en Tfh

Ces dernières années, l'identification du chimiorécepteur CXCR5, du facteur de transcription majeur Bcl-6 (71-73), ainsi que la compréhension du rôle clef joué par les molécules de co-stimulation telles que CD40L, ICOS, PD-1 et les cytokines comme l'IL-21 (74-81) ont permis l'identification et l'étude des Tfh.

Présentation de l'antigène et différenciation en Tfh

Durant la présentation de l'Ag, il a été montré que les cellules Tfh requièrent un signal fort médié par le TCR et des interactions prolongées avec les DC en comparaison aux autres sous-types (82). De plus la signalisation via ICOS et son ligand (ICOSL) joue un rôle important dans le développement précoce des Tfh (78). Le signal ICOS, délivré par les DC exprimant ICOSL au niveau de la zone T, induit l'expression de Bcl-6 par les cellules T CD4+ murines et l'induction de l'expression de CXCR5. L'expression de ce chimiorécepteur va permettre la migration des Tfh précurseurs, via un gradient de la chimiokine CXCL13, vers les follicules B (80).

Les cytokines impliquées dans l'initiation du programme de différenciation Tfh.

Des études menées chez l'Homme et la souris ont montré des différences dans le rôle des cytokines impliquées dans le développement précoce des Tfh. Chez les souris, l'IL-6, IL-21, et IL-27 sont critiques pour la différenciation Tfh (83). L'IL-12 pourrait en revanche être plus important chez l'humain que l'IL-6, IL-21 ou l'IL-27 (84) (85) pour la différenciation en Tfh.

En effet, la présence d'IL-12 induit l'expression des marqueurs typiques de Tfh : IL-21 (86) (87), CXCR5, ICOS et Bcl-6 (86). Bien que l'IL-6 soit un faible inducteur de ces marqueurs, il a été observé que son absence et /ou celle d'IL-21 impacte le nombre de cellules Tfh (88) (89). De plus, TGF- β en combinaison avec l'IL-12 et l'IL-23 a été montré comme induisant l'expression de CXCR5, ICOS, IL-21, Bcl-6, BATF et c-Maf à partir de cellules T CD4+ naïves, impliquant donc TGF- β dans le développement précoce des cellules Tfh (90).

Les facteurs de transcription importants pour la différenciation Tfh

Bcl-6 est le facteur de transcription majeur pour la différenciation en Tfh chez l'humain (91) et la souris (71) (72) (73), et il est aussi important pour la survie des cellules B des CG et l'hypermutation somatique (SHM) (92). Bcl-6 régule l'expression de nombreuses molécules, incluant CXCR5, CXCR4, CCR7, « signaling lymphocyte activation molecule » (SLAM) associée à la protéine (SAP), PD-1, ICOS et CD40L, qui sont critiques pour la migration des Tfh vers les follicules B, ainsi que pour leur développement et leur fonction (91).

BATF est induit dans les cellules T CD4+ par l'IL-4 et l'IL-6 (93) (94). BATF est considéré comme un régulateur global du programme de différenciation Tfh, et joue un rôle clef dans la commutation de classe des cellules B, en régulant l'expression de l'« Activation-induced cytidine deaminase » (AID) (95).

Chez la souris, **c-Maf** induit la production d'IL-21 dans les cellules T CD4+ activées, de manière dépendante de la voie de signalisation d'ICOS. L'absence de c-Maf provoque une réduction de la fréquence des Tfh (96). Chez l'Homme, c-Maf induit l'expression d'IL-21 et CXCR5 chez les cellules T CD4+ naïves, de plus sa co-expression avec Bcl-6 provoque une augmentation de l'expression de CXCR4, ICOS et PD-1 (91). IL-6 ou IL-27 peuvent induire l'expression de c-Maf dans les cellules T CD4+ (97).

La suppression des facteurs de transcription dédiés aux autres lignées T CD4+ et impliqués dans le développement des Th1, Th2, et Th17, est aussi requise pour induire la différenciation précoce des Tfh, notamment la suppression de Blimp1, impliqué dans la voie de différenciation Th1, qui inhibe l'expression de Bcl-6 et c-Maf (98).

A.3.3 Interaction des Tfh et des cellules B à la frontière des zones T/B

Point de vue Tfh

La seconde étape de la différenciation Tfh implique l'interaction des cellules T CD4⁺ activées avec des cellules B spécifiques de l'antigène à la frontière des zones T/B (Figure 6). La régulation à la hausse de l'expression de CXCR5, la perte de CCR7 et de la P-selectin glycoprotein ligand 1 facilitent l'adressage des cellules activées vers la zone B. La « orphan G-protein-coupled receptor, Epstein Barr virus induced molecule-2 » (EBI2) joue aussi un rôle dans la position des cellules durant l'interaction T/B. EBI2 provoque la localisation des cellules B en dehors des follicules, où elles peuvent interagir avec les Tfh (99). L'expression de CXCR5 n'est pas seulement limitée aux cellules Tfh, et les cellules T CD4⁺ activées qui expriment fortement CXCR5 et qui ont perdu l'expression de CCR7, ne sont pas nécessairement localisées à la frontière des zones T/B du follicule B (100).

Point de vue des cellules B

Les cellules B peuvent reconnaître et répondre à des Ag solubles ou fixés à la membrane d'autres cellules (101). Quand une cellule B naïve rencontre l'Ag dans la zone B, elle s'active puis migre vers la frontière des zones T/B où elle dégrade l'Ag, puis présente des peptides issus de celui-ci via son CMH-II. Les cellules B activées peuvent ainsi recruter des cellules T « helper » spécifiques de l'Ag (101, 102). La migration des cellules B vers la frontière T/B est induite par une augmentation de l'expression du chimiorécepteur CCR7 permettant de migrer vers la zone T.

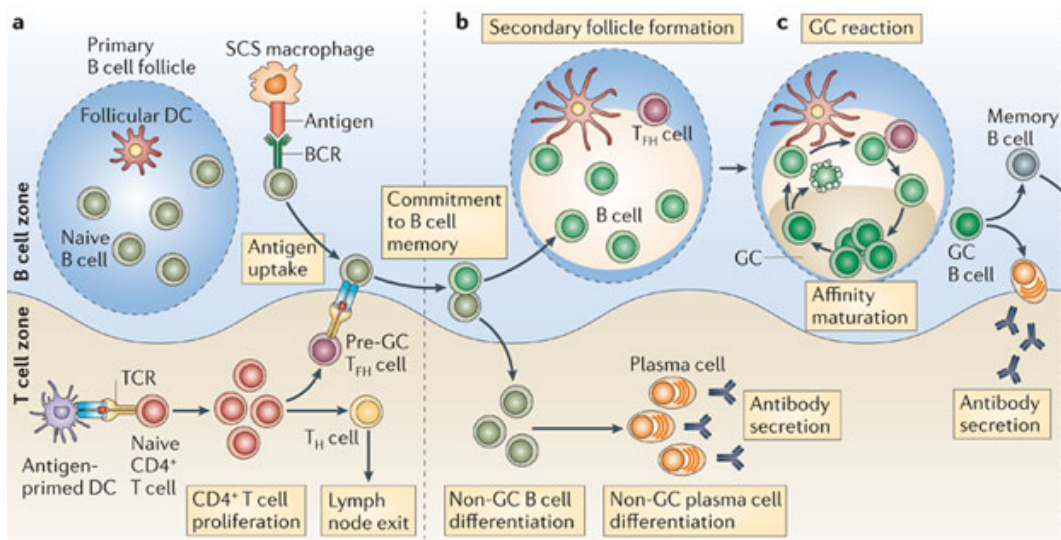


Figure 6 : Différentiation et activation des cellules Tfh et B et réaction du GC. (a) DC qui exprime un complexe CMH-II/peptide qui engage une cellule T CD4+ naïve spécifique pour l'antigène présenté, induisant ainsi sa prolifération et sa différenciation en cellules T « helper ». Dans la zone B, l'antigène complet est capturé par les macrophages et présenté aux cellules B naïves. Les cellules B spécifiques pour l'antigène s'activent, dégradent et présentent les peptides antigéniques puis migrent vers la frontière des zones T/B. Les cellules Tfh se relocalisent à la frontière T/B et dans les régions interfolliculaires. Des contacts entre les cellules pré-GC Tfh et cellules B activées sont nécessaires pour poursuivre la différenciation des Tfh et pour définir le devenir des cellules B. (b) L'expansion clonale, la commutation de classe et le développement des cellules plasmiques non-GC se produisent dans la région extrafolliculaire des ganglions lymphatiques. La formation de follicules secondaires, et la commutation de classe précède l'initiation de la réaction du GC, qui est la voie principale pour la génération des cellules B mémoires. (c) La polarisation des follicules secondaires, indique l'initiation de la réaction du GC. La DZ est le lieu de prolifération des centroblastes, de la commutation de classe et de la diversification du BCR via l'hypermutation somatique. Les centrocytes qui ne prolifèrent pas, se déplacent vers la LZ et scannent le réseau de FDC. Les centrocytes qui perdent la capacité de fixer l'antigène présenté subissent l'apoptose, alors que ceux qui expriment un BCR de haute affinité peuvent rentrer en compétition pour interagir avec les Tfh des GC. Une interaction spécifique avec les Tfh des GC requiert une présentation du peptide sur le CMHII des centrocytes. Ce contact peut induire une nouvelle entrée dans la DZ et un nouveau cycle dans le GC, ou la sortie du GC en une cellule B mémoire ayant subi la maturation, ou encore cellule plasmique.
Source: d'après Michael McHeyzer-Williams. Dec 2011 · Nature Reviews Immunology

Suite à l'interaction avec les cellules T spécifiques, les cellules B activées, peuvent continuer leur différenciation dans deux voies bien distinctes. Elles peuvent soit migrer dans la zone extra-folliculaire pour subir une différenciation en plasmablastes de courte durée de vie, soit migrer dans les follicules B secondaires et subir une différenciation en cellules B mémoires ou cellules B plasmiques (PC) (103). Les signaux permettant à la cellule B naïve d'entrer dans l'une ou l'autre de ces voies, ne sont pas clairs, néanmoins plusieurs études suggèrent que l'affinité du BCR pour l'Ag, la quantité de récepteurs engagés, ainsi que les signaux reçus via les molécules de co-stimulation portées par les Tfh sont impliqués (104, 105) (**Figure 6**)

La réponse anticorps extra-folliculaire

Les cellules B ayant migrées dans les zones extrafolliculaires, après stimulation antigénique, subissent le réarrangement isotypique et quittent le LN en tant que plasmablastes de courte durée de vie. Ces plasmablastes fournissent la première réponse anticorps contre l'Ag, bien que cette réponse soit de modeste affinité comparée aux anticorps générés dans le GC (106, 107). L'expression de marqueurs de cellules plasmiques tel que CD138 facilite la migration des plasmablastes vers la zone extrafolliculaire, et l'expression de B lymphocyte maturation protein-1 (blimp-1) est requise pour la formation de cellules plasmiques (108). Bien qu'il ait été suggéré que la réponse anticorps extrafolliculaire ne nécessitait pas d'aide des cellules T, il semble que les Tfh engagées dans la réponse extrafolliculaire soient importantes (109). Ces

Tfh extrafolliculaires expriment faiblement CXCR5 et sécrètent de l'IL-21 (110). Ces cellules sont situées à l'interface des zones T/B et n'expriment que peu de PD-1 en contraste aux cellules Tfh des CG, et pourraient représenter des précurseurs des cellules Tfh des CG. (Figure 6)

A.3.4 La réaction du CG

L'étape finale de différenciation des Tfh est leur localisation dans les CG, où elles aident les cellules B à se différencier en cellules B mémoire spécifiques de l'Ag ou PC. La majorité des CG Tfh acquièrent le phénotype CXCR5+PD-1+Bcl6+ (91, 111-115), et expriment un haut niveau de « B and T lymphocyte attenuator » (BTLA), ICOS, et CD57 (83, 116). D'autres molécules ont été montrées comme étant importantes dans le développement des cellules CG Tfh, comme celles de la famille des récepteurs SLAM et SAP. ICOS est aussi important dans cette étape, et permet de réguler l'expression de « Kruppel factor 2 ». Le blocage d'ICOS induit la perte du phénotype Tfh et la relocalisation des Tfh dans la zone T. Suite à leur différenciation terminale en cellules CG Tfh effectrices, les cellules Tfh peuvent alors induire la réaction des CG.

La génération d'une immunité à long terme dépend du micro-environnement spécialisé des CG, qui permet la production de cellules B mémoires et PC de haute affinité. Les CG sont des structures transitoires qui se développent dans les follicules B des OLII en réponse à une stimulation antigénique (117, 118). Le CG est très efficace, et dans les 7 jours après qu'une cellule B naïve ait rencontrée l'Ag, il y a formation de cellules B mémoires et PC (118). Les CG sont composés principalement de cellules B en prolifération, de cellules Tfh et de FDC, ainsi que de cellules stromales.

Les CG sont organisés en deux zones bien distinctes histologiquement. La zone sombre (DZ) qui est proximale de la zone T et contient une population dense de cellules B en train de proliférer, et qu'on appelle les centroblastes. La zone claire (LZ) qui est localisée au pôle distal du CG, où les cellules appelées centrocytes, sont plus petites et moins serrées, due à la présence du réseau de FDC (118, 119) qui occupe la majorité de la LZ. Les FDC sont capables de présenter des Ag non dégradés sous forme de complexes immuns. Les cellules

Tfh sont une autre population majeure localisée dans la LZ du CG et sont cruciales pour délivrer des signaux aux cellules B permettant leur maturation et leur différenciation (117).

La séparation du CG en deux zones (LZ et DZ) est dépendante des chimiokines CXCL12 et CXCL13, et de l'expression de CXCR4 (récepteur de CXCL12) et CXCR5 (récepteur de CXCL13) sur les centroblastes et centrocytes. Il semble que CXCR5 soit exprimé de manière constante entre les centroblastes et centrocytes, alors que les centroblastes montre une expression plus forte de CXCR4 en comparaison aux centrocytes. CXCL13 est sécrétée par les cellules stromales et les Tfh à partir de la LZ, créant un gradient de concentration de CXCL13 à partir de la LZ jusqu'à la DZ. A l'opposé, les cellules stromales de la DZ sécrètent CXCL12 créant un gradient de concentration de la DZ vers la LZ (120). L'expression plus importante du récepteur CXCR4 sur les centroblastes provoque leur localisation dans la DZ, tandis que les centrocytes sont attirées dans la LZ.

Prolifération des cellules B, hypermutation somatique et maturation d'affinité

Dans la DZ, les cellules B spécifiques de l'Ag subissent une expansion clonale s'accompagnant de la SHM de leur BCR (118). La maturation d'affinité du BCR consiste en l'apport de SHM par l'enzyme AID au niveau des régions variables des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines, changeant l'affinité pour l'Ag reconnu et diversifiant le répertoire (121). Dans la LZ, les Tfh et FDC sélectionnent les clones B de haute affinité. D'une part, les cellules B montrant des Ig de faible affinité pour l'Ag, ne vont pas recevoir de signaux de survie via leur BCR et mourir par apoptose (103) et d'autre part, les clones B avec une forte affinité, vont présenter plus de peptides sur leur CMH-II et donc être préférentiellement sélectionnés par les Tfh (120). La sélection par les Tfh des cellules B va induire une augmentation de l'expression de CXCR4 et donc une migration vers la DZ où elles vont proliférer et subir la SHM. Les cellules B subissent plusieurs allers-retours entre la DZ et LZ, provoquant ainsi plusieurs cycles de prolifération, mutation puis sélection (105), permettant à terme d'induire des cellules B portant des Ig de haute affinité dirigés contre l'antigène.

En plus de l'interaction spécifique CMH-II / peptide, de nombreux signaux sont à l'origine de l'aide apportée par les Tfh aux cellules B, notamment l'interaction des molécules de co-

stimulation CD40/CD40L, OX40/OX40L, ICOS/ICOSL, PD-1/PD-L1, PD-L2, ainsi que les cytokines, dont l'IL-21 qui participe à la maturation d'affinité des cellules B des CG ainsi qu'au maintien de leur expression de Bcl-6 (122).

L'AID est aussi impliquée dans le changement d'isotypes durant la réaction du CG. La commutation de classe est dépendante de l'interaction des cellules B avec les Tfh, notamment via les molécules de co-stimulation, comme CD40 / CD40L, et des cytokines sécrétées (121).

A.3.5 Différenciation des cellules B des CG en plasmablastes et PC

Le processus dynamique qui se déroule dans le CG induit la génération de cellules mémoires de haute affinité et de PC. Ces deux populations représentent les cellules effectrices de la réponse humorale secondaire. Durant une réponse humorale secondaire, les PC sont impliqués dans la sécrétion d'Ig préexistantes, tandis que les cellules B mémoires ayant déjà rencontré l'Ag se différencient en PC (123, 124).

La décision de différenciation vers des cellules B mémoires ou PC est dépendante de différents facteurs, notamment la durée passée dans le CG et le nombre de cycles de prolifération subi dans le CG (125). Plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans la différenciation des cellules B activées en cellules B mémoires ou PC.

Les cellules B mémoires vont être capables de répondre plus rapidement que les cellules naïves après une stimulation antigénique secondaire (126). Ces cellules seront situées dans les sites antigéniques de drainage (rate, épithélium des amygdales ou moelle osseuse (BM) (127), et jusqu'à 40% seront dans la circulation (128). Les cellules B mémoires peuvent être aussi générées via une voie indépendante de celle des CG (129).

Les cellules B mémoires peuvent être identifiées par l'expression de CD19, CD27, CD38, CD21, CD25 et de leur isotype (127, 130, 131).

Les cellules plasmatisques

Les plasmablastes et PC sont deux populations montrant une différenciation terminale produite durant la réaction du CG. Les plasmablastes sont des cellules prolifératives de courte durée de vie, impliquées dans la réponse anticorps précoce, alors que les PC sont des cellules

de longue durée de vie qui ne prolifèrent plus (132). Les deux types cellulaires sont des cellules productrices d'anticorps (ASC). Les plasmablastes sont les précurseurs des PC. Suite à leur différenciation, les PC vont se loger pour la majorité dans la BM. L'attraction des PC et leur rétention dans la BM impliquent notamment le récepteur aux chimiokines CXCR4 et la production de CXCL12 à partir de la BM. L'expression du facteur de transcription Blimp-1 est requise pour la différenciation en plasmocytes à longue durée de vie, Blimp-1 permettant également le maintien de ces cellules à un état quiescent dans la BM (133). Ces cellules seront mobilisables en cas de réexposition à l'Ag et produiront rapidement des anticorps de haute affinité.

A.3.6 Les Tfh circulantes

Il a été montré que la population de cellules T CD4⁺ CXCR5⁺ circulantes, qui représente environ 10-15% des cellules T CD4⁺ périphériques chez l'homme, partage plusieurs caractéristiques avec les CG Tfh. Ces cellules périphériques CXCR5⁺ sont à présent dénommées Tfh circulantes, ou cTfh, car elles possèdent la capacité fonctionnelle d'aider les cellules B. Les cTfh stimulées *in vitro* sécrètent de l'IL-21 et induisent ainsi la commutation de classe des Ig, avec la sécrétion d'IgG et d'IgA (134, 135).

Les cTfh possèdent toutefois un phénotype distinct des CG Tfh, avec un phénotype plus CM, une très faible expression du facteur de transcription Bcl-6, et une plus faible expression des marqueurs de co-stimulation PD-1 et ICOS. La population cTfh apparaît donc au repos par rapport aux CG Tfh, mais est capable de réacquérir les marqueurs PD-1 et Bcl-6 suite à une activation *in vitro* ou une réactivation *in vivo* par vaccination (136).

Les cTfh forment une population hétérogène de cellules, qui ont été appelées Tfh1, Tfh2 ou Tfh17 en lien avec l'expression de leurs chimiorécepteurs, ainsi que leur capacité à sécréter différentes cytokines, qui rappellent les sous-types traditionnels (Th1, Th2, et Th17). De plus, la qualité de l'aide fournie aux cellules B dépend du sous-type Tfh. Alors que les cellules Tfh1 semblent avoir perdu leur capacité d'aide, les cellules Tfh2 induisent la production d'IgG et d'IgE, tandis que les Tfh17 promeuvent la production d'IgG et d'IgA (134). Une récente étude a montré que les cellules T CD4⁺ circulantes exprimant l'IL-21 après stimulation sont les cellules les plus proches phénotypiquement et fonctionnellement des CG Tfh (137).

La question de savoir si les cTfh représentent des cellules effectrices, relarguées des organes lymphoïdes, ou des cellules mémoires de longue durée de vie capables de recirculer, reste toujours d'actualité (138). Cependant, une série d'études convergentes montrent le parallèle entre Tfh et cTfh, chez la souris comme chez l'homme. Ainsi, il a été observé une augmentation parallèle des Tfh et cTfh dans les modèles murins et humains d'auto-immunité (60, 139, 140). Par ailleurs, plusieurs publications ont également mis en évidence une augmentation de la fréquence des cTfh au pic de la réponse au vaccin anti-grippal, avec la fréquence des cTfh corrélant avec le titre de la réponse anticorps spécifique (66, 137, 141).

L'essai vaccinal Thaïlandais, connu sous le nom RV144, a été conçu pour tester l'efficacité d'une solution vaccinale contre l'infection par le VIH sur le principe du « prime –boost » en utilisant une combinaison de deux vaccins, ALVAC (prime) et AIDSVAX (boost). L'essai a démontré que le schéma vaccinal était sûr et modérément efficace pour prévenir l'infection par le VIH. En effet, les résultats montrent que la combinaison prime-boost a abaissé le taux d'infection à VIH de 31,2% par rapport au placebo. Aujourd'hui, il s'agit du seul essai vaccinal permettant d'induire une protection à l'infection VIH, cette protection est médiée par une production d'anticorps anti-gp120 (142). Les individus ayant participé à cet essai montrent une fréquence de cTfh plus importante que les échantillons d'individus ayant participé à d'autres protocoles vaccinaux. Dans cette étude les cTfh étaient définis par la capacité des PBMC à produire de l'IL-21 suite à une stimulation par des immunogènes de Gag et Env (137). Enfin, les Tfh des CG sont particulièrement susceptibles à l'infection / réplication par le VIH et forment l'un des réservoirs majeur de l'infection à VIH. Une étude montre que les virus détectés dans la population cTfh correspondent aux virus détectés dans les Tfh des CG, suggérant donc un lien fort entre la population des Tfh des GC et la population circulante cTfh (143).

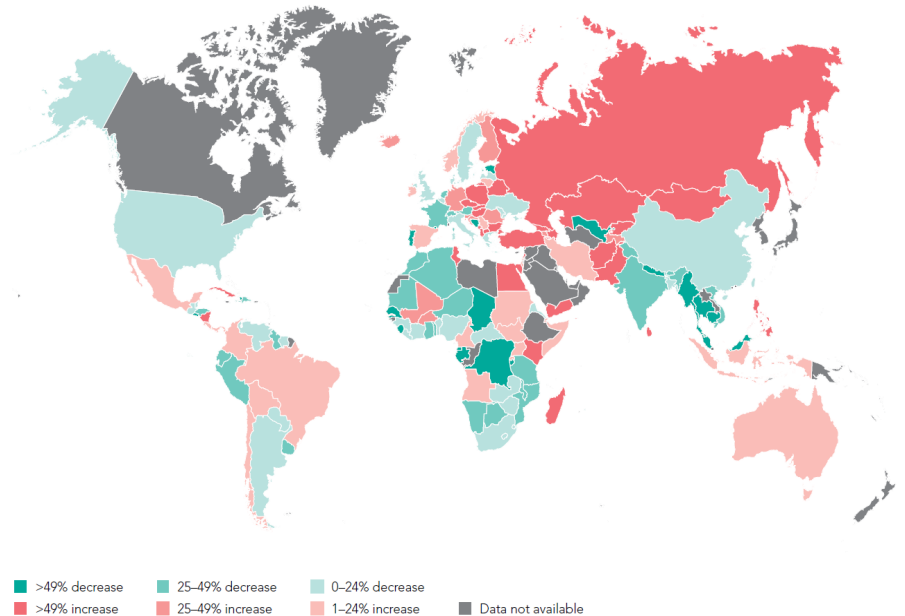
Nous discuterons des cTfh impliquées dans la réponse VIH dans la partie, réponse Tfh associée à une réponse anticorps anti-VIH (cf. C.7.2).

B. LE VIH

B.1. Découverte et épidémiologie

Le VIH a été originalement découvert en 1983 sous son nom original, Lymphadenopathy Associated Virus (144). Suite à l'infection, le VIH induit une déplétion massive de ses principales cibles, les cellules T CD4+, ce qui conduit en définitif au stade du Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquisée (SIDA). Certaines études rapportant les effets du VIH sur les cellules T CD4+ précèdent la découverte du virus (145). En 2008, lors du 25^{ème} anniversaire de la découverte, le prix Nobel a été décerné au Professeur Luc Montagnier et au Professeur Françoise Barré-Sinoussi. Depuis cette découverte, le VIH est devenu un problème de santé publique global menant à plus de 3 décennies de recherche. Les dernières études épidémiologiques rapportent que depuis le début de l'épidémie, plus de 35 millions de personnes sont décédées suite à l'infection par le VIH, et qu'environ 37 millions de personnes vivent aujourd'hui avec le virus. La prévalence du VIH varie significativement en fonction de la région concernée, en effet l'Afrique subsaharienne est particulièrement touchée, représentant 50% des individus vivant avec le virus et 66% des nouveaux cas d'infection se produisant dans le monde selon le dernier rapport de l'ONUSIDA GAP 2016. 2,1 millions de personnes ont été infectées par le VIH-1 en 2015, ce qui représente une baisse de 35% au cours des quinze dernières années (**Figure 7**). Les taux de déclin de l'incidence du VIH varient selon les différentes parties du monde, soulignant l'importance des différents modes de transmission. Par exemple, en Amérique latine, la source prédominante de nouveaux cas d'infection par le VIH est les rapports sexuels entre hommes (HSH), représentant 33% des infections en République dominicaine et 56% au Pérou. En Afrique subsaharienne cependant, la transmission hétérosexuelle est le principal facteur contribuant à la propagation du VIH, avec notamment 80% de la population mondiale de femmes séropositives de plus de 15 ans résidant dans cette région. Les utilisateurs de drogues injectables représentent 5-10% de la population mondiale infectée par le VIH, avec un pourcentage de nouvelles infections variant de 5% en Europe de l'Est à 28% en Asie. Un rapport du « Centre pour le contrôle et la prévention des maladies » (CDC) indique qu'au Royaume-Uni, en 2011, 79% de l'incidence du VIH chez les hommes était attribuable aux HSH, tandis que chez les femmes, le contact hétérosexuel était le facteur prédominant et représentait 86% des infections totales à VIH. La régression globale de l'incidence du VIH peut être attribuée à de meilleures mesures préventives et à un traitement antiviral hautement actif (HAART) de plus en plus accessible. Des études ont signalé différentes mesures prises pour prévenir l'acquisition du VIH telles que

l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre le VIH pour prévenir la transmission verticale du VIH de la mère à l'enfant, tandis qu'une autre étude démontre l'efficacité protectrice à long terme de la circoncision masculine (146) (147).



Sources: UNAIDS 2016

Figure 7 : Evolution du nombre de nouvelles infections dans le monde de 2005 à 2015

B.2. Classification et nomenclature

Le VIH fait partie de la famille des *Retroviridae*. Les membres de cette famille sont définis principalement par leur mode de répllication. Leur génome constitué d'ARN est transcrit en ADN grâce à la transcriptase inverse (ou RT) puis intégré sous cette forme dans le génome de la cellule infectée. Cette famille est elle-même divisée en 7 sous-familles (ou genres), selon des critères spécifiques liés à la morphologie, la structure, les propriétés antigéniques et la pathogénicité des virus (selon « the International Committee on Taxonomy of Viruses »). On distingue ainsi les Alpha-, les Beta-, les Gamma-, les Delta-, les Epsilon-rétrovirus, les Spumavirus et enfin les Lentivirus (**Figure 8**). Le VIH appartient à cette dernière sous-famille, laquelle comprend des virus généralement cytopathogènes, non oncogènes et responsables de maladies à évolution lente présentant une longue période d'incubation.

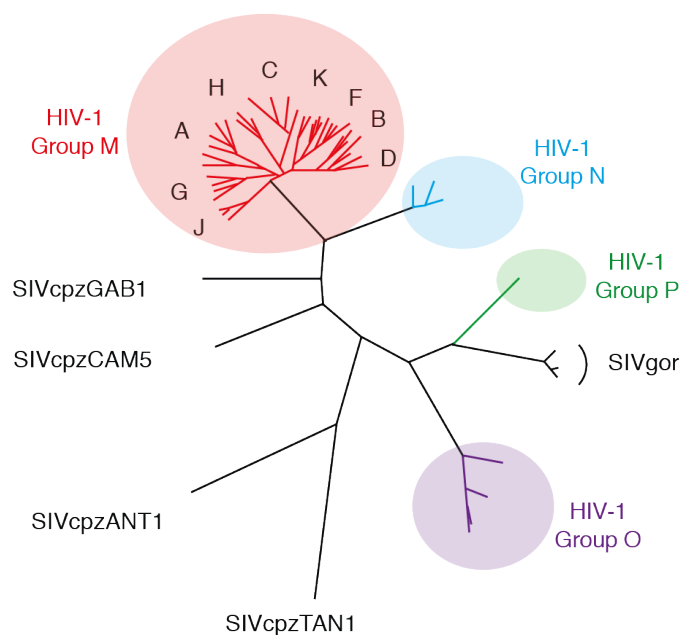


Figure 8: Arbre phylogénétique des Rétrovirus.

Arbre représentant la relation de phylogénie entre différentes souches de SIV ainsi que l'émergence du VIH et sa diversification. Les couleurs désignent les différents groupes VIH.

Source: Adapté de Hemelaar J., 2012, Trends in Molecular Medicine

Les lentivirus infectent principalement les cellules du système immunitaire (macrophages et cellules T CD4+), ce qui conduit généralement à des immunodéficiences sur des périodes relativement longues (148). Un autre caractère distinctif des membres de cette sous-famille, et notamment le VIH, est leur capacité à infecter des cellules quiescentes et/ou en phase de différenciation terminale. Une fois le génome viral intégré à celui de la cellule cible, une phase de latence peut s'établir avant l'expression des protéines virales, cela permettant au virus d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. L'existence de ces cellules réservoirs (infectées de façon latente) est considérée comme un obstacle majeur à l'éradication du VIH chez les patients sous thérapie antirétrovirale (149). Les génomes viraux peuvent alternativement être traduits et exprimer l'ensemble des protéines essentielles et accessoires requises à la formation de nouvelles particules virales.

B.3. La diversité

Le VIH-1 est un rétrovirus (150) qui peut être classé en quatre groupes, en fonction des quatre transmissions zoonotiques répertoriées, trois à partir des chimpanzés (groupe M, N, et O) et une provenant des gorilles (groupe P). La principale pandémie provient du groupe M qui a divergé en neuf clades : A-D, F-H, J et K (151). Dans ce groupe M, la variabilité génétique entre les différents clades est d'environ 15% pour le gène codant pour la capsid *gag*, et 25% pour le gène de l'enveloppe *env* (152). De plus, les clades A et F sont séparés en groupes d'isolats viraux formant des clades soeurs génétiquement apparentés, dénommés sous-

soustypes A1-A2 et F1-F2 respectivement (153, 154). Les nouvelles méthodes de séquençage ont révélé des événements de recombinaison entre les sous-types, qui sont censés provenir d'individus infectés par de multiples clades. Les formes circulantes recombinées (FCR) sont définies comme des souches recombinantes si elles sont identifiées au moins dans trois individus non liés épidémiologiquement (155). La circulation de multiples souches parentales et de FCR au sein de la même population augmente le risque de « superinfection » d'un individu. L'infection par plusieurs souches du VIH-1 peut induire la génération de multiples formes recombinantes chez cet individu. Ces nouveaux recombinants appelés formes recombinantes uniques (FRU) deviennent FCR si ils se propagent dans la population (156). A l'exception de l'Afrique subsaharienne où la plupart des clades, les FCR et plusieurs FRU ont été détectés, chaque clade a un profil de distribution géographique spécifique. Le clade C du VIH-1, qui prédomine en Afrique et en Inde, était responsable de 48% des cas d'infection en 2007. Dans les Amériques, l'Europe de l'ouest, l'Australie et le Japon les virus du clade B sont dominants (157). Le clade A est prédominant dans les régions d'Afrique centrale et de l'Est (Kenya, Uganda, Tanzanie et Rwanda) mais aussi dans les pays de l'Europe de l'Est constituant autrefois l'Union Soviétique. Les FCR représentent plus de 18% de l'infection par VIH-1 et représentent la forme virale prédominante en Asie du Sud-Est ainsi qu'en Afrique de l'Ouest (**Figure 9**) (158-161).

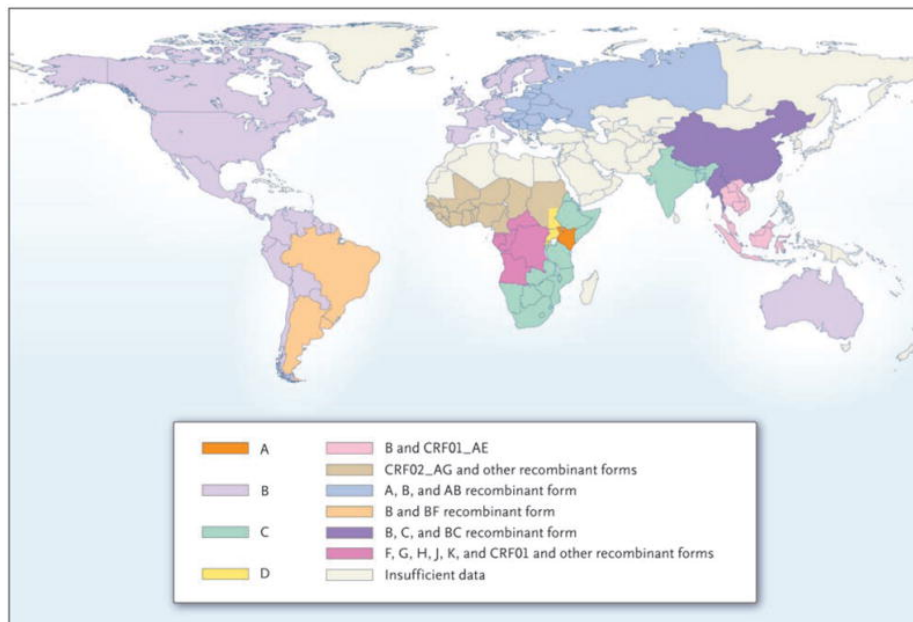


Figure 9: Distribution globale des différents sous-types de VIH-1 et des formes recombinantes de ces derniers.

Source: D'après Taylor BS. N Engl J Med

B.4. L'origine

L'importante hétérogénéité génétique du VIH-1, résultant des erreurs de la transcription inverse lors des étapes précoces du cycle de réplication (162), de la réplication rapide du virus (163), de la pression de sélection du système immunitaire (164), et des événements de recombinaison durant la réplication, nous indique que le virus doit circuler chez l'humain depuis de nombreuses années.

L'épicentre de la diversité du groupe M est situé à Kinshasa, capitale de la République démocratique du Congo (165). Les études d'évolution moléculaire du VIH-1 suggèrent que l'ancêtre du groupe M remonte aux années 1920. L'étude se base sur la caractérisation moléculaire de deux virus identifiés dans les années 60 à Kinshasa qui s'étaient déjà considérablement diversifiés à ce moment-là (166).

L'origine des groupes VIH-1 M, N et O a été identifiée comme provenant de souches du Virus de l'Immunodéficience Simien (SIV) infectant une sous-espèce de chimpanzés dans le sud-est du Cameroun (SIVcpz, sous-espèce *Pan troglodytes*) (167). Ce modèle de transmission zoonotique est soutenu par plusieurs études démontrant que: (i) les groupes M, N et O co-circulent dans des populations humaines en Afrique équatoriale de l'Ouest et que (ii) des souches virales étroitement liées ont été isolées à partir de chimpanzés infectés (168). Les analyses phylogénétiques prédisent que différentes lignées SIVcpz sont à l'origine des différents groupes VIH-1 M, N et O, suggérant ainsi que le saut entre espèces doit avoir eu lieu sur au moins trois événements de transmission SIVcpz distincts (155). Le groupe M du VIH-1 semble s'être efficacement adapté à l'hôte humain, comme en témoigne sa diffusion mondiale et la génération de multiples sous-types génétiques. Les groupes N et O, cependant, se sont adaptés moins efficacement aux humains et restent endémiques au niveau du Cameroun et des pays voisins de l'Afrique centrale occidentale (169, 170). De plus, c'est la recombinaison de SIVcpz avec des virus similaires au VIH-1, qui a donné naissance au groupe VIH-1 N (171), et le degré élevé d'homologie de séquences entre le groupe N du VIH-1 et SIVcpz indique que ce saut zoonotique est assez récent. L'hypothèse la plus probable est que la transmission zoonotique s'est produite par l'exposition au sang et aux fluides corporels contaminés pendant la chasse (172). La diversification précoce du VIH-1 s'est produite à Kinshasa, on pense alors que le virus s'est propagé dans ces régions par des voies navigables tel que des fleuves ou rivières, qui servaient de routes principales de voyage et commerce à

l'époque (173). Le SIVcpz lui-même est issu de la recombinaison entre les ancêtres du SIVrcm (Mangabey enfumé, *Cercocebus torquatus*) et du SIVgsn (Hôteur, *Cercopithecus nictitans*) chez des chimpanzés ou un hôte intermédiaire (174).

Les transmissions virales des primates non humains aux hôtes humains se produisent depuis des siècles. Cependant, ce n'est qu'au vingtième siècle que ces virus sont devenus manifestes au niveau de la population humaine. Parmi les facteurs contribuant à la large diffusion du VIH, citons la colonisation, l'urbanisation et l'utilisation généralisée d'aiguilles injectables (175-177).

B.5. Le VIH-2

Le VIH-2, un rétrovirus étroitement lié au VIH-1, qui aurait été issu des sooty mangabeys, a d'abord été confiné à l'Afrique de l'Ouest (178). Cependant, le VIH-2 a commencé à migrer vers d'autres régions d'Afrique, l'Inde, l'Europe et les États-Unis (179). Phylogénétiquement, le VIH-2 peut être classé en deux grands groupes, A et B, qui se sont propagés parmi la population humaine. Six lignées supplémentaires du VIH-2 ont été identifiées, mais ces souches restent confinées à des cas isolés (180). Malgré l'homologie de séquence avec le VIH-1 et les modes de transmission similaires, le VIH-2 est connu pour être cliniquement moins agressif avec une progression plus lente de la maladie et une phase asymptomatique plus longue (181, 182). La transmission du VIH-2 à partir des souches de SIV de sooty mangabeys semble plus récente que celle du VIH-1 groupe M, datant des années 1940-50 (183).

B.6. VIH-1 : structure et organisation génomique

B.6.1 Structure de la particule

La particule virale du VIH contient deux copies d'ARN monocaténaire de polarité positive, et les enzymes nécessaires au cycle de réplication virale: la protéase (PR), la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN) (184). Le génome du VIH, d'une taille d'environ 9 kb, est situé dans la capsid virale, qui est composée de protéines Gag p24. Le génome contient trois gènes structurels (*gag*, *pol* et *env*), ainsi que deux gènes régulateurs (*tat* et *rev*) et quatre accessoires (*vif*, *vpr*, *vpu* et *nef*) (185). Les séquences LTR (Long Terminal Repeat) en 5' et 3'

flanquent le génome du VIH et sont essentielles pour l'initiation et la fin de la transcription. Le processus de maturation du virion implique le clivage via la protéase du précurseur polyprotéique Gag en ses composants de base: matrice (MA), capsid (CA), nucléocapsid (NC) et une séquence peptidique supplémentaire (p6) (186).

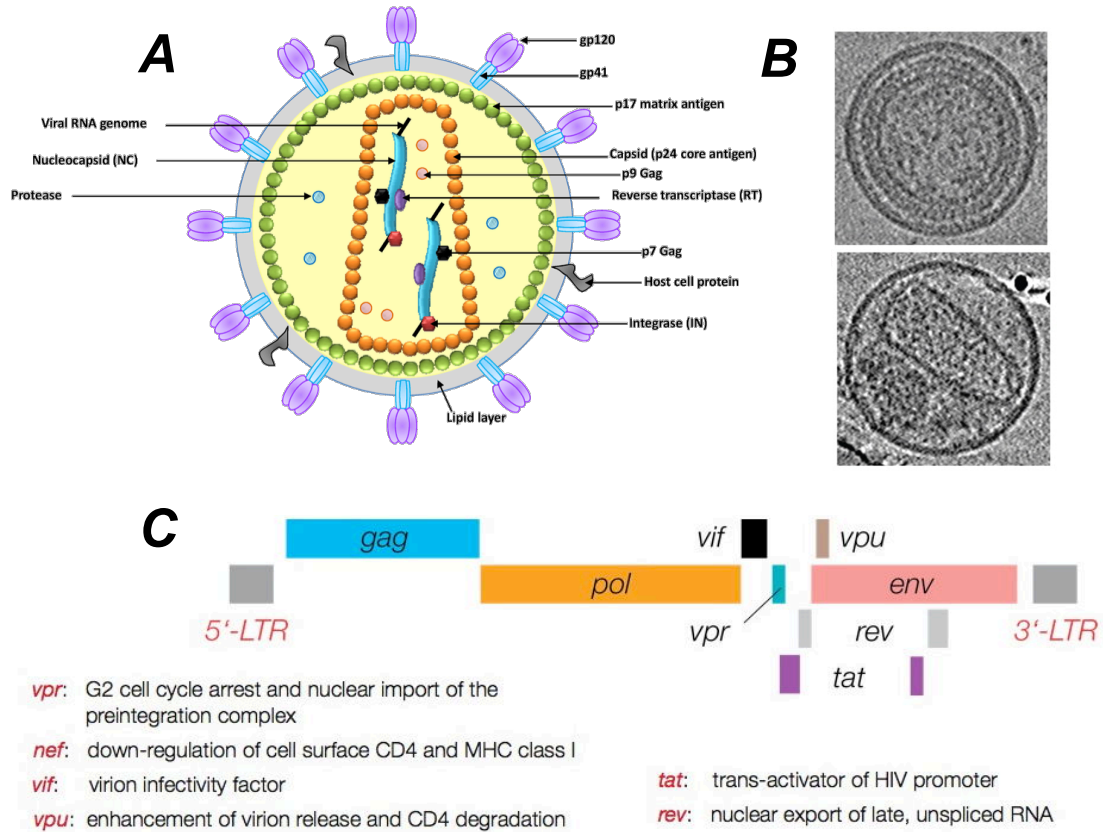


Figure 10: Structure du VIH et composition génomique.

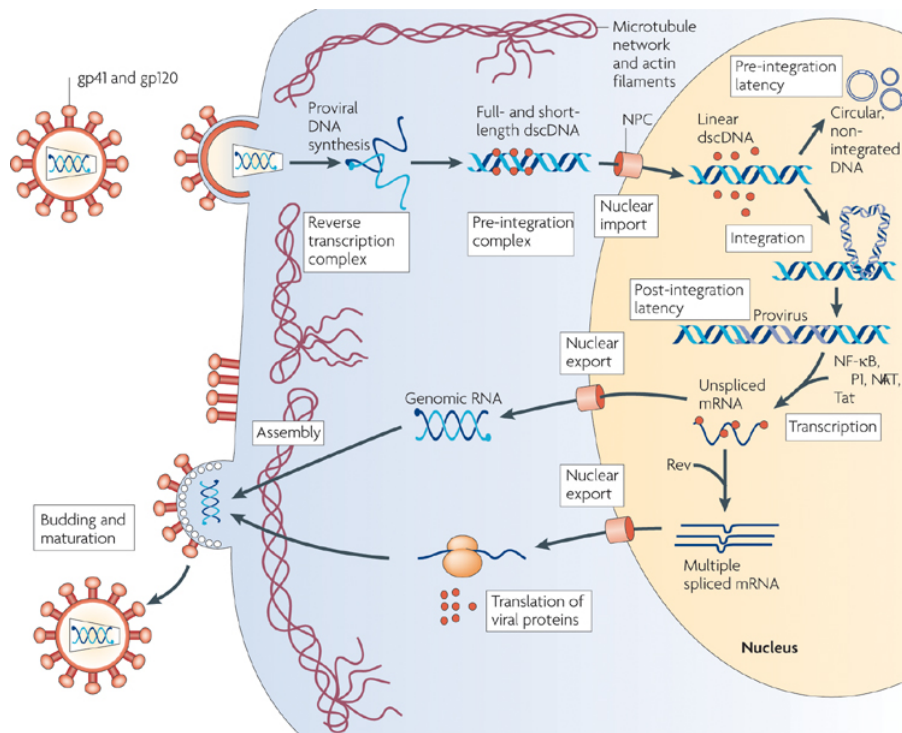
(A) Représentation schématique d'un virion VIH mature. Le VIH est composé d'une enveloppe virale qui entoure des protéines virales de matrice, qui elles même enferment la capsid virale. Au sein de la capsid se trouvent le génome viral et ses enzymes. (B) Coupes centrales d'une particule virale immature (panel haut) et mature (panel bas) observées par microscopie électronique. Le virion, en forme de sphère, mesure approximativement 130 nm de diamètre. (C) Carte génomique décrivant les fonctions des gènes accessoires et régulateurs.

Source: Shum KT Pharmaceuticals (Basel). 2013 et Ganser-Pornillos BK Curr Opin Struct Biol. 2008

Dans les virions matures du VIH, la capsid est entourée par la matrice virale, qui est composée de la protéine Gag p17 et d'une membrane en bicouche lipidique dérivée de l'hôte cellulaire. L'enveloppe virale du VIH, la glycoprotéine 160 (gp160) est clivée par les endonucléases cellulaires pour produire ses deux sous-unités: la gp41 transmembranaire et la gp120 de surface (187). Ces deux sous-unités d'enveloppe sont associées par des liaisons non covalentes et sont nécessaires pour l'initiation d'un nouveau cycle infectieux en induisant la fusion de la membrane virale avec celle de la cellule hôte (Figure 10).

B.6.2 Cycle de réplication

Le cycle de réplication du VIH se compose de sept étapes, qui comprennent : la liaison des récepteurs / corécepteurs, la fusion et l'entrée, la décapsidation, la transcription inverse, l'intégration des provirus dans le génome de l'hôte, la transcription des provirus, la synthèse des protéines virales, l'assemblage et le bourgeonnement (**Figure 11**).



Nature Reviews | Microbiology

Figure 11: Cycle de réplication du VIH-1

L'infection démarre quand les trimères des glycoprotéines d'enveloppe engagent CD4 et le corécepteur CCR5 ou CXCR4, ce qui conduit à la fusion des membranes virale et cellulaire et à l'entrée de la nucléocapside dans la cellule. La décapsidation partielle facilite la rétrotranscription qui à son terme conduit à la formation du complexe de pré-intégration (PIC). Faisant suite à son import dans le noyau cellulaire, l'intégrase associée au PIC orchestre l'intégration de l'ADN proviral au sein du génome cellulaire. La transcription du provirus, réalisée par l'ARN polymérase II cellulaire, conduit à la formation d'ARNm viraux de différentes tailles. L'ARNm sert de modèle pour la production des protéines virales, et le génome ARN est incorporé dans les particules virales en formation avec les composants protéiques. Le bourgeonnement de la particule virale et son relargage à partir de la membrane cellulaire sont réalisés par la machinerie ESCRT. Le cycle se termine par la maturation des précurseurs polyprotéiques du virus par la protéase virale afin de créer les particules virales matures infectieuses.

Source: D'après Coiras M Nat Rev Microbiol. 2009

L'entrée et la fusion

L'entrée virale est initiée par la liaison de la gp120 au récepteur primaire CD4. Cette interaction conduit à des changements conformationnels de la gp120 et à l'exposition de sites de liaison à l'un ou l'autre des deux récepteurs de chimiokines CCR5 ou CXCR4 utilisés comme corécepteur. La liaison au corécepteur permet le rapprochement des membranes virale et cellulaire et l'insertion de la partie N-terminale de la gp41, contenant le peptide de fusion, dans la membrane de la cellule cible. La gp41 se replie alors, rapprochant ainsi davantage les membranes virale et cellulaire et favorisant leur fusion (**Figure 12**). L'entrée virale est un processus coopératif régulé par différents paramètres. Elle dépend en premier lieu de la température, celle-ci ne pouvant se dérouler en dessous de 25°C et étant maximale à 37°C (188, 189). Elle dépend de la densité surfacique des récepteurs du virus à la surface de la cellule cible. Plusieurs molécules de CD4 et de corécepteurs sont requises lors de l'entrée virale. Il a été estimé que 5 molécules de corécepteurs sont nécessaires à l'entrée (190), ce nombre est variable en fonction de l'expression de CD4 (191), et de l'affinité des enveloppes pour le corécepteur (192). Plusieurs trimères d'enveloppe sont également nécessaires pour former le pore de fusion (193), deux à trois en moyenne pour réaliser une infection productive (194). Ce nombre peut cependant augmenter dans le cas de virus dont l'infectivité est faible (194). L'entrée virale se conclut enfin par la pénétration de la nucléocapside dans le cytoplasme de la cellule cible (pour revue voir (195)).

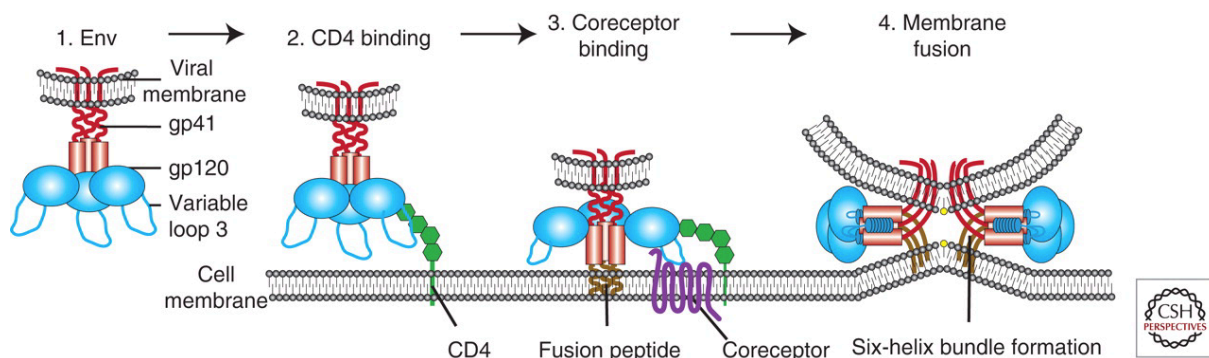


Figure 12: Mécanisme d'entrée du VIH dans ses cellules cibles. L'entrée virale débute par la liaison de la gp120 au récepteur primaire CD4. Cette interaction induit une modification conformationnelle de la gp120 qui révèle un site de liaison pour un corécepteur (CCR5 ou CXCR4). La liaison au corécepteur rapproche les membranes virale et cellulaire, ce qui permet au peptide de fusion à l'extrémité N-ter de la gp41 de s'insérer dans la membrane plasmique de la cellule cible. La gp41 se replie et se forme alors un faisceau de 6 hélices (le « 6-helix bundle ») permettant le rapprochement et la fusion des membranes virale et cellulaire.
Source: D'après [Wilén CB. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012](#)

La transcription inverse

Une fois que l'ARN viral et que les enzymes sont entrés dans le cytoplasme de la cellule, le processus de transcription inverse est initié. Cette étape est réalisée par la RT codée par le virus, qui est une enzyme multifonctionnelle possédant à la fois une activité polymérase et RNase. Ce processus est constitué de trois étapes séquentielles. Tout d'abord, la RT, en utilisant l'amorce tRNA cellulaire, transcrit l'ARN viral monocaténaire en un hybride double brin ARN / ADNc. Ensuite, l'ARN proviral est dégradé par l'activité RNase de la RT. Enfin, l'étape finale de la synthèse de l'ADN proviral implique l'extension du brin d'ADNc positif avec comme matrice l'ADNc négatif néosynthétisé. Cette extension requiert comme amorce la polypurine (PPT) de la région 3' de l'ARN dégradé (196).

Le processus de transcription inverse est très enclin aux erreurs, en moyenne une substitution par génome se produit lors d'une étape de réplication complète (197, 198). Ceci contribue à la grande diversité du génome du VIH, ce qui facilite l'évasion aux mécanismes de défense immunitaire de l'hôte. La phase de transcription inverse est également une cible pour les facteurs de restriction de l'hôte, tels que APOBEC3G et SAMHD1 (pour le VIH-2) (199), visant à empêcher la réplication virale (C.f B.7.2 - Les acteurs de l'entrée virale - l'entrée ne corrèle pas toujours avec infection/ réplication – Les facteurs de restriction).

L'ADN viral nouvellement synthétisé forme un vaste complexe de nucléoprotéines composé de protéines virales et cellulaires, connu sous le nom de complexe de pré-intégration (PIC), avec notamment la capsid, Vpr et l'intégrase comme composants viraux.

Intégration et transcription

L'intégrase utilise ses propriétés caryophiles pour favoriser la migration de ce complexe dans le noyau de l'hôte et catalyse l'intégration de l'ADN viral dans le génome de l'hôte (200, 201). Les monocytes, les macrophages et les cellules T CD4+ quiescentes infectées de manière latente contiennent des virus intégrés et sont des réservoirs cellulaires importants du VIH (202). L'ADN viral est ainsi transmis aux cellules filles à chaque mitose. Lors de l'activation cellulaire, l'ADN viral intégré est transcrit par l'ARN polymérase II cellulaire. Elle démarre à partir du promoteur LTR en 5' et conduit à la synthèse d'un ARN messager entier d'environ 9 kb qui sera multi-épissé en plusieurs transcrits permettant la synthèse précoce dans le

cytoplasme des protéines régulatrices Tat, Nef et Rev qui seront réimportées dans le noyau. Tat y régulera l'élongation de la transcription et Rev jouera un rôle dans le transport de l'ARN génomique complet ou épissé vers le cytoplasme (203, 204). Des ARNm viraux mono et non-épissés seront enfin synthétisés tardivement et traduits en précurseurs protéiques à l'origine des protéines structurales et enzymatiques nécessaires à la formation de nouveaux virions. Après la transcription, certains ARN viraux seront également capables d'échapper aux phénomènes d'épissage. Ces derniers seront alors exportés vers le cytoplasme, puis acheminés vers les sites d'assemblage des virus auxquels ils serviront de génome.

Assemblage, bourgeonnement et maturation

L'assemblage de nouvelles particules se déroule au niveau de la membrane plasmique, au sein de microdomaines membranaires riches en cholestérol (205). Les protéines virales Pr55^{gag} et Pr160^{gag/pol} contrôleront cet assemblage, impliquant la formation de particules sphériques, le recrutement des protéines Env au site de bourgeonnement du virus et l'empaquetage de l'ARN génomique (206, 207). Tous ces événements sont concomitants. La partie N-terminale de Gag (MA, p17) sera responsable de l'adressage de la polyprotéine Gag à la membrane plasmique. Elle jouera aussi un rôle dans le recrutement des protéines Env *via* les interactions qu'elle établit avec la gp41 (208, 209). L'oligomérisation du domaine central de Gag (CA, p24) conduira à la formation de la capsid virale. La partie NC de Gag capturera le génome viral pendant l'assemblage (210). Les virions acquièrent leur membrane lipidique au sein de laquelle se trouvent les spicules trimériques de leur glycoprotéine d'enveloppe au moment de leur bourgeonnement de la surface cellulaire notamment sous la dépendance de la machinerie cellulaire ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport) (211). Parallèlement à cela, le clivage des polyprotéines Pr55^{gag} et Pr160^{gag/pol} en protéines matures MA, CA, NC et p6 par la protéase virale complètera la maturation du virion en une particule infectieuse mature.

B.7. Susceptibilité des cellules T CD4+ à l'entrée du VIH

B.7.1 Le tropisme et les cellules cibles

Tropisme

Le tropisme d'un virus se définit comme sa capacité à infecter de manière préférentielle tel ou tel type de cellule. La découverte des corécepteurs du VIH-1 (212-214) dans le courant du milieu des années 1990 a permis de définir cette notion de tropisme viral, les virus interagissant avec CCR5 étant qualifiés de virus à tropisme R5, ceux utilisant CXCR4 de virus à tropisme X4, et enfin ceux pouvant interagir avec les deux types de corécepteurs de virus à tropisme double R5/X4. La présence d'un corécepteur donné à la surface d'une cellule ne suffit pas toujours à prédire le tropisme cellulaire d'un virus (215-217). Le tropisme d'un virus n'est donc pas seulement dépendant du type de corécepteur utiliser, mais également de l'environnement cellulaire dans lequel ce corécepteur est présent.

Les cellules cibles

Différents types de cellules du système immunitaire effectrices et présentatrices de l'antigène vont être la cible du VIH-1. Les cellules T CD4+ représentent la population cellulaire cible principale du VIH-1. La diminution de leur quantité, à l'origine de l'immunodéficience, constitue la principale manifestation immunopathologique induite par le virus. La susceptibilité à l'infection des cellules T CD4+ dépend de leur niveau d'expression de CCR5 relatif à leur état d'activation et de différenciation.

Les DC sont une autre catégorie de cellules cibles du VIH-1 qui représentent une population cruciale dans l'infection par le VIH, car elles influencent la transmission virale, l'infection des cellules cibles et la présentation de l'antigène des antigènes du VIH.

Les tissus de la peau et des muqueuses sont peuplés par des DC immatures, qui sont caractérisées par leur localisation spécifique et l'expression de leurs récepteurs de surface cellulaire. Les DCs expriment de nombreux récepteurs de reconnaissance de motifs qui interagissent avec des molécules moléculaires associés à des agents pathogènes. Chez les DC les récepteurs de lectine de type C (CLR) sont une classe majeure de récepteurs de reconnaissance de motifs permettant de discriminer les sous-

populations de DC. Trois sous-populations de DC ont été identifiées: les cellules de Langerhans épidermiques CD207+, les DC CD14 + dermiques, et les DC CD14-CD207-CD1a+. Les cellules de Langerhans exprimant spécifiquement le CLR CD207 (Langerin) sont principalement retrouvées dans la couche épidermique alors que la sous-population de DC dermiques, dont certaines expriment le CLR DC-SIGN, sont présentes dans tout le derme. Dans le sang périphérique il y a au moins deux populations majeurs de DC, les DC myéloïdes CD11c+ ou les DC plasmocytoïdes (CD11c- CD123+) qui produisent de L'IFN de type I en réponse à une stimulation antigénique {Ahmed, 2015 #20}.

Lors de la rencontre d'un agent pathogène, les DC subissent leur maturation. Au cours de la maturation, les DC régulent positivement les molécules sur leur surface telles que le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, CD80, CD83, CD86 et CD40, qui sont importants pour la présentation de l'antigène et la stimulation des cellules T. Les DC migrent alors de la périphérie vers les organes lymphoïdes secondaires où ils peuvent induire des réponses T CD8 + et CD4 + {Banchereau, 1998 #21}.

Les cellules DC immatures présentes au niveau des muqueuses épithéliales (muqueuses vaginales et anales) sont les premières cibles du VIH. Suite à leur maturation les DC infectées migrent jusqu'aux LN et vont participer à la dissémination de l'infection, notamment via un mécanisme de trans-infection des cellules T CD4+, durant la présentation de l'antigène, via la synapse immunologique (218).

Les cellules DC immatures expriment peu de récepteurs CD4 et CCR5 à leur surface (219), la molécule DC-SIGN qui interagit avec les glycoprotéines d'enveloppes du VIH avec une haute affinité, jouerait un rôle clef pour concentrer le virus à la surface cellulaire (220). Suite à la maturation des DC, DC-SIGN est régulée à la baisse, pourtant la capture et la trans-infection par le VIH-1 sont fortement renforcées. Ce phénomène s'effectue par une voie de capture indépendante des glycoprotéines, il a été montré que la lectine 1 de type Ig (Siglec-1, CD169), qui est fortement exprimée sur les DC matures pouvait fixer spécifiquement les gangliosides membranaires contenant du sialyllactose incorporé dans la membrane virale (221).

Les macrophages sont un autre type important de cellules cibles. Comme les DC, ces cellules sont présentes au sein des muqueuses. Il existe deux types de macrophages, les cellules dérivées de monocytes circulant qui sont indivisibles et les macrophages résidants capables d'auto-renouvellement. La différenciation des monocytes en macrophages s'accompagne d'une augmentation de l'expression de CCR5 à la surface cellulaire, et donc d'une augmentation de la susceptibilité de ces dernières à l'infection (222). Pour autant, nombre de virus R5 sont incapables d'infecter les macrophages. Le facteur de restriction SAMHD1, est un élément clef limitant la réplication du VIH dans ces cellules (223).

B.7.2 Les acteurs de l'entrée virale

CD4 : le récepteur primaire de l'entrée virale

CD4 est une glycoprotéine transmembranaire de la superfamille des immunoglobulines (224). Elle est exprimée à la surface de très nombreux types cellulaires, les lymphocytes T CD4+, (225), les monocytes et les macrophages (226), les DC et les cellules de Langerhans (LC) (227), des cellules du CNS comme les cellules microgliales (226), et les cellules progénitrices myéloïdes et lymphoïdes issues des cellules souches hématopoïétiques (228). La molécule CD4 est composée d'un domaine N-terminal extracellulaire de 370 acides aminés constitué de quatre domaines de type immunoglobuline (D1 à D4), d'un segment transmembranaire de 25 acides aminés, et d'un domaine C-terminal cytoplasmique de 38 résidus pouvant lier la tyrosine kinase p56lck.

Des études de mutagenèse dirigée ont montré que les déterminants moléculaires de CD4 impliqués dans son interaction avec la gp120 se situent au niveau de son domaine D1, et plus particulièrement au niveau de son domaine CDR2 (229-231). À ce niveau, deux résidus semblent plus particulièrement impliqués, Phe43 et Arg59, dont les mutations réduisent drastiquement l'affinité du récepteur pour la gp120 (jusqu'à 500 fois pour Phe43).

Les corécepteurs de l'entrée virale

Les corécepteurs de l'entrée virale CCR5 et CXCR4 sont des récepteurs de chimiokines appartenant à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) (**Figure 13**).

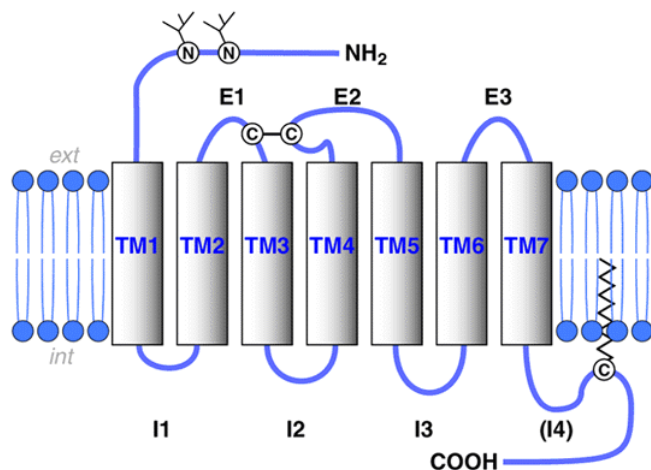


Figure 13: Représentation schématique de CCR5. Le récepteur contient sept domaines transmembranaires hydrophobes (TM1 à TM7), reliés par trois boucles intracellulaires (I1, I2, I3) et trois extracellulaires (E1, E2, E3). Un pont disulfure relie E1 à E2. L'extrémité aminoterminal (NH₂) est extracellulaire, l'extrémité carboxy-terminale (COOH) est intracellulaire. Cette dernière peut présenter un ou plusieurs ancres lipidiques dans la membrane, cela créant une quatrième boucle, I4.
 Source: Bockaert J. EMBO J. 1999

Ces récepteurs possèdent un domaine N-terminal extracellulaire, un domaine C-terminal intracellulaire et sept hélices α transmembranaires connectées par trois boucles intracellulaires (ICL1-3) et trois boucles extracellulaires (ECL1-3). Les récepteurs de chimiokines appartiennent au sous-groupe gamma de la classe A des RCPGs. Les chimiokines dont ils sont les récepteurs sont une famille de cytokines généralement solubles de faible poids moléculaire (8 à 12 kDa) dont la fonction principale est d'induire la chimiotaxie des cellules. Les chimiokines sont impliquées dans la régulation de nombreuses fonctions homéostatiques (*e.g.* organogenèse, contrôle du trafic leucocytaire) et/ou inflammatoires (recrutement de leucocytes au site d'inflammation ou de blessure) dans l'organisme (232).

Au plan structural, ces chimiokines se subdivisent en quatre sous-groupes, en fonction du nombre et de la position des deux premières cystéines de leur extrémité N-terminale. C'est ainsi que l'on distingue la famille CC à laquelle appartiennent les chimiokines de CCR5, et dans laquelle les deux résidus cys sont adjacents, et la famille CXC, à laquelle appartient la chimiokine de CXCR4 CXCL12 et dans laquelle les deux cystéines sont séparées par un résidu quelconque.

CCR5

Structure

La protéine, dont la structure en complexe avec l'agoniste inverse MVC a été rapportée récemment (233), se compose de 352 acides aminés pour un poids moléculaire de 40,6 kDa.

Diverses modifications post-traductionnelles de CCR5 sont importantes pour son fonctionnement, notamment au niveau de son extrémité carboxy-terminale. Trois cystéines sont palmitoylées (234, 235). Ces palmitoylations ancrent l'extrémité C-terminale à la membrane plasmique (236). L'extrémité N-terminale est également un domaine du récepteur largement modifiée post-traductionnellement. Ce domaine est impliqué dans la liaison des chimiokines et de la glycoprotéine d'enveloppe du VIH (237-243). L'extrémité N-terminale en particulier contient 4 tyrosines dont la sulfatation est critique pour la liaison du VIH (244, 245).

CCR5 existe sous différentes formes/conformations.

Différentes données ont montré que CCR5 est en équilibre entre des conformations inactives et actives, dépendantes notamment du couplage aux protéines G (246-248).

Colin et al. ont montré que les chimiokines et les virus via leurs gp120 reconnaissent avec différentes affinités ces différentes conformations de récepteurs. La gp120 était capable de reconnaître les conformations actives et inactives de CCR5 avec la même efficacité, alors que les chimiokines naturelles ne reconnaissent efficacement que les formes actives, expliquant l'échappement viral à l'action inhibitrice des chimiokines (249).

Par ailleurs, des expériences de saturation de la liaison d'anticorps monoclonaux dirigés contre différents épitopes de CCR5 ont révélé l'existence de nombreuses populations de CCR5 différentes dont les propriétés antigéniques varient (240, 250, 251). La reconnaissance par différents anticorps monoclonaux des différentes populations de CCR5 est dépendante de la conformation et des modifications post-traductionnelles de CCR5. Certains de ces auteurs ont par ailleurs montré que les proportions relatives de ces différentes populations varient d'un type cellulaire à l'autre et que celles-ci sont différenciellement utilisées par différentes souches de VIH-1 (250, 252).

Ces nombreuses conformations sont non seulement régulées par les protéines G, mais également par l'intermédiaire d'autres facteurs tels que l'interaction avec les β -arrestines, la dimérisation des récepteurs, l'interaction avec CD4, l'environnement lipidique... (253-255), dont les mécanismes de régulation reste encore inconnus.

Les ligands de CCR5

Les chimiokines

Les ligands naturels de CCR5 (R5-CHK) sont représentés par plus d'une dizaine de chimiokines de type CC, à savoir CCL2 (aussi appelé suivant l'ancienne nomenclature utilisée pour nommer les chimiokines MCP-1 pour Monocyte Chemoattractant Protein-1), CCL3 (MIP-1 α pour Macrophage Inflammatory Protein-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES pour Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted), CCL7 (MCP-3), CCL8 (MCP-2), CCL11 (Eotaxine-1), CCL13 (MCP-4), CCL14 (HCC-1) et CCL16 (232, 256).

Ces R5-CHKs sont sécrétées par différents types de cellules immunitaires, dont certaines sont la cible du VIH, mais aussi par les cellules épithéliales (257). CCL3 et CCL4 sont par exemple synthétisées en forte quantité par les macrophages, les lymphocytes (T et B), les DC, les mastocytes et les cellules NK. La protéine CCL5 sera elle produite abondamment par les cellules T CD8⁺ et les cellules T CD4⁺ Th1. La production de certaines de ces chimiokines au site de l'inflammation jouera un rôle clé dans le recrutement de cellules immunitaires effectrices ou APC.

La plupart des R5-CHK sont des agonistes, c'est à dire que leur liaison à CCR5 conduit à l'activation de protéines G et à l'induction de sa voie de signalisation (258). L'activation des protéines G suite à la fixation des chimiokines conduit à l'internalisation du récepteur par un mécanisme β -arrestine dépendant (259). Trois de ces R5-CHK, *i.e.* CCL3, CCL4 et CCL5 ont des affinités extrêmement élevées pour CCR5, avec des constantes de dissociation K_D pour l'interaction avec CCR5 inférieures à 1 nM (256). Ces chimiokines se lient principalement sur les parties extracellulaires du récepteur, l'extrémité N-terminale et ECL2 (243, 260).

La glycoprotéine d'enveloppe de VIH-1 gp120

La gp120 est la sous-unité de surface de la glycoprotéine d'enveloppe de VIH-1. Elle est ainsi nommée en raison de son poids moléculaire d'environ 120 kDa. La gp120 est divisée en 5 régions conservées (C1 à C5) et 5 régions hypervariables (V1 à V5) (261, 262).

La première structure cristallographique publiée d'une gp120 fut celle du noyau (core en anglais) de la glycoprotéine de la souche de VIH-1 HXBc2 en 1998 (263) (**Figure 14**). Cette structure a permis de comprendre le rôle de la gp120 dans l'entrée virale, son interaction avec

CD4, la nature des changements conformationnels de la gp120 induits par cette interaction et sa liaison au corécepteur.

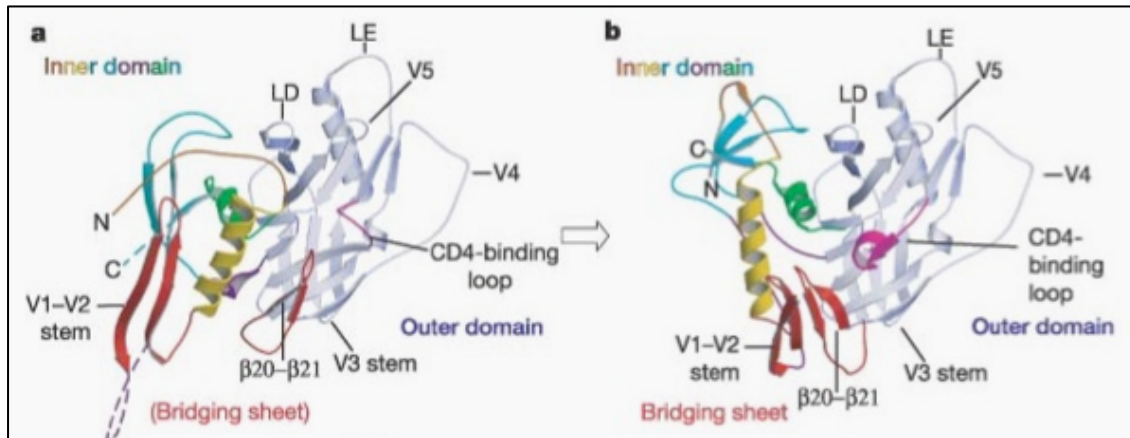


Figure 14 : Structures du noyau de gp120 liées ou non à CD4 -

D'après (263, 264).

Les panels a et b figurent une gp120 de SIV non liée à CD4 (a) (d'après Chen et al., 2005) et le core de la gp120 de la souche de VIH-1 HXB2 liée à CD4 (b) (d'après Kwong et al., 1998). La gp120 est formée de 5 régions variables (V1 à V5) séparant 5 régions conservées (C1 à C5) qui s'organisent en un domaine interne et un domaine externe. La liaison au CD4 induit d'importants changements conformationnels qui entraînent la formation et l'exposition de sites de liaison au corécepteur notamment le « *bridging sheet* » constitué d'une structure en 4 feuillets β antiparallèles séparant les domaines interne et externe de la glycoprotéine.

Les résidus de la gp120 en contact de CD4 sont issus de segments distincts de la gp120, en particulier la tige de la boucle V1/V2, les domaines C2, C4 (incluant les feuillets $\beta 20$ et $\beta 21$ du « *bridging sheet* » (BS)) et C5. L'interaction de ces résidus avec CD4 va induire une modification conformationnelle de la gp120 via la formation et l'exposition de sites de liaison au corécepteur notamment le BS.

L'interaction avec CD4 conduit à des changements conformationnels et une réorientation des gp120 aboutissant à une conformation ouverte du trimère (265). L'ouverture du trimère conduit en premier lieu à un réarrangement conformationnel de la gp41 la préparant à la fusion proprement dites et amenant à rapprocher les membranes virale et cellulaire (266). Une autre conséquence majeure de la liaison à CD4 est l'exposition de la boucle V3 de la gp120 pour interagir avec le corécepteur (267, 268).

Les différents modèles d'interaction de la gp120 à CCR5 suggèrent que la pointe de la boucle V3 de la gp120 interagit avec ECL2, alors que la base de V3 et le BS lient le domaine N-terminal du corécepteur (267-270). La sulfatation des tyrosines du domaine N-terminal du récepteur est essentielle à la liaison de la glycoprotéine d'enveloppe du virus, notamment

par les interactions qu'elles établissent avec des groupements cationiques de la boucle V3 et du BS (237, 271).

Fonction de CCR5

CCR5 est impliqué dans la chimiotaxie et l'activation des leucocytes et ce faisant joue un rôle clé dans la réponse immunitaire innée et l'initiation de réponses adaptatives (272). Lors du recrutement aux sites de l'inflammation, CCR5 contrôlera la migration des leucocytes à l'intérieur des vaisseaux sanguins ainsi que le processus de diapédèse au cours duquel, les cellules traversent la paroi des capillaires pour s'accumuler dans les tissus émettant les signaux de l'inflammation (273, 274). La stimulation par les chimiokines provoquera dans les secondes qui suivent un changement radical et immédiat dans la forme de la cellule nécessaire au processus de chimiotactisme. Des réarrangements du cytosquelette sont à la base de ces transformations. La polymérisation et la dissociation simultanée des filaments d'actine mèneront à la formation de lamellipodes qui représentent des extrusions du cytoplasme qui servent d'appuis à la cellule pour son déplacement lors de son recrutement (275, 276).

Expression de CCR5 dans les cellules T CD4+ et susceptibilité à l'infection / progression

La densité de récepteurs CD4 et CCR5 à la surface des cellules est un important facteur dans l'infection à VIH. Alors que les cellules T CD4+ circulantes du sang ont une densité membranaire pour CD4 relativement constante (277), l'expression de CCR5 est très variable entre les individus (278). Platt et al. démontrent l'importance de la densité de CCR5, en montrant qu'en dessous de 10000 récepteurs CCR5 par cellule, il y a une forte diminution de l'infectivité du VIH (191).

Le lien entre l'expression de CCR5 et la progression vers le SIDA est maintenant clair, CCR5 étant l'un des seuls marqueurs génétiques de protection avéré dans le contrôle de l'infection à VIH.

En effet, les individus portant la mutation delta 32 ($\Delta 32$) sur CCR5, mutation qui abolit toute expression de CCR5 à la surface cellulaire, ne progressent pas dans la maladie. De plus, dans le modèle singe, la non progression des sooty mangabeys dans l'infection à SIV est associée avec une fréquence réduite des cellules T CD4+ exprimant CCR5. Les cellules T CD4+ de ces singes ont un défaut de régulation de l'expression de CCR5 (279).

Chez les patients progressifs, une forte expression de CCR5 durant la phase aiguë corrèle avec la progression vers le SIDA (280), et la densité de CCR5 corrèle directement avec la charge virale du VIH (281, 282).

La régulation de l'expression de CCR5 peut se faire à trois niveaux : (i) les facteurs génétiques, (ii) les facteurs impliquant l'activation, la signalisation, l'internalisation et le recyclage et (iii) l'environnement.

Les facteurs génétiques

Les mutations dans les régions codantes et du promoteur du gène CCR5 ont été bien documentées en ce qui concerne l'infection et la progression du VIH. Les mutations de la région codante affectent la structure de la protéine CCR5, ce qui peut affecter la production, le transport, la liaison aux chimiokines, la signalisation et l'expression du récepteur CCR5. Les mutations dans la région du promoteur peuvent affecter les sites de liaison ou de régulation de facteurs de transcriptions conduisant à des aberrations dans la production d'ARNm de CCR5. Certaines de ces mutations empêchent l'infection à VIH, d'autres la favorisent, ceci en fonction de leur impact sur l'expression de CCR5 à la membrane et de son efficacité de liaison à la gp120 ou aux chimiokines (pour revue voir (259)).

La mutation de CCR5 la plus célèbre est CCR5 Δ 32, qui est présente chez 10% de la population caucasienne. Elle a été découverte en 1996 (283), et décrite comme une mutation génétique qui confère une protection aux cellules de l'infection VIH. Il s'agit d'une délétion de 32 pb introduisant un codon stop au niveau de la région codante pour l'ECL2 (284) et supprimant les 3 derniers domaines transmembranaires. La protection envers le VIH est une conséquence de l'inhibition de l'expression de cette protéine à la surface cellulaire chez les homozygotes. Chez les hétérozygotes WT/ Δ 32, la protéine Δ 32, localisée dans le réticulum endoplasmique, exerce un effet négatif trans-dominant sur la protéine CCR5 WT, inhibant son transport vers la surface cellulaire (285). Une autre étude d'Agrawal et al. a montré que la protéine mutante réduit l'expression de CCR5 et CXCR4 de type sauvage par dimérisation à la surface cellulaire (286).

Effet des R5-CHK sur l'entrée du VIH

Suite à l'interaction du VIH avec le corécepteur CCR5, il n'a pour le moment pas été montré de rôles de la signalisation ou de l'internalisation de CCR5 dans l'entrée du virus dans la cellule.

Par contre, les cytokines de par leur liaison vont induire l'endocytose et diminuer la disponibilité du récepteur. Les altérations immunologiques ou génétiques qui affectent les niveaux de chimiokines pourraient ainsi avoir un impact sur la susceptibilité à l'infection par le VIH ou son taux de progression une fois que l'infection est établie. L'inhibition de l'entrée du VIH par les chimiokines dépend de deux mécanismes possibles: un encombrement stérique qui consiste en un blocage compétitif de l'entrée virale par fixation directe du ligand à son récepteur, du fait que les chimiokines et la gp120 reconnaissent des déterminants communs du corécepteur, ou par l'internalisation du récepteur après la liaison des chimiokines (**Figure 15**).

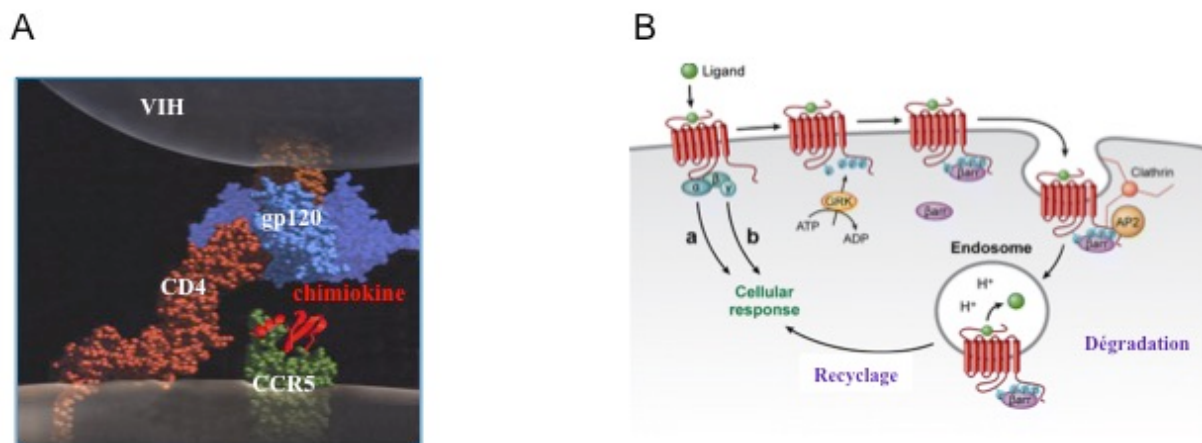


Figure 15: Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'inhibition de l'entrée virale par les chimiokines.

(A) La chimiokine (en rouge) inhibe stériquement la liaison de la gp120 (en bleu) au corécepteur (en vert). (B) La liaison d'une chimiokine agoniste sur CCR5 induit la phosphorylation de son extrémité C-terminale et son interaction avec les β-arrestines. A terme, ces β-arrestines adressent le récepteur CCR5 dans des puits de clathrine dans lesquels il sera internalisé. Le récepteur sera alors soit dégradé dans les lysosomes, soit recyclé. Cela conduit à diminuer l'expression de CCR5 à la surface cellulaire et donc la susceptibilité de la cellule cible à l'infection.

Source: D'après [Wyatt R. Science. 1998](#) et [Hanyaloglu AC Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2008](#)

Une étude a montré qu'une libération plus élevée de ligands de CCR5 après stimulation des cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) *in vitro* par des peptides du VIH (287),

corrèle négativement avec la progression vers le stade SIDA et positivement avec les taux de cellules T CD4+.

Par ailleurs, plusieurs études ont montré que les cellules T CD4+ de personnes hautement exposées mais séronégatives à l'infection à VIH (HEPS) étaient moins sensibles à l'infection par des souches R5, ce qui était associé à un niveau significativement plus élevé de CCL5, CCL3 et CCL4 produites par leurs PBMC en comparaison avec d'autres individus séronégatifs et séropositifs. Ces études suggèrent que la libération de chimiokines est une réponse très précoce à l'exposition au VIH (288) (289, 290).

Il est également rapporté que des niveaux élevés de R5-CHK sont associés à une progression plus lente de la maladie (291). La production de ces chimiokines serait originaire des cellules T CD8+. En effet les cellules T CD8+ d'individus asymptomatiques produisent des niveaux supérieurs de CCL3 et CCL4, par rapport aux cellules T CD8+ provenant de donneurs sains ou de patients à progression rapide (292). Par contre d'autres études n'ont trouvé aucune corrélation entre la production de chimiokines et la résistance au VIH chez les personnes infectées, y compris chez les individus HEPS (293, 294). D'autres ont même suggéré que CCL5, CCL3 et CCL4 pouvaient favoriser la replication du VIH dans les macrophages et les monocytes en recrutant des cellules cibles activées au niveau du site d'infection (295, 296). Enfin Colin et al. ont montré que les chimiokines et les virus via leurs gp120 reconnaissaient avec différentes affinités des conformations distinctes de récepteurs. La gp120 était capable de reconnaître les conformations actives et inactives de CCR5 avec la même efficacité, alors que les chimiokines naturelles ne reconnaissent efficacement que les formes actives, suggérant que les chimiokines ne pouvaient que partiellement inhiber l'entrée du VIH, expliquant l'échappement viral à l'action inhibitrice des chimiokines (249).

Le rôle exact des chimiokines dans la pathogenèse du VIH-1 reste donc encore obscur, probablement en raison du fait que de multiples chimiokines peuvent avoir des effets différents sur la replication virale et la pathogenèse.

Facteurs environnementaux

Des facteurs environnementaux affectent l'expression de CCR5 telles que l'infection par *Mycobacterium tuberculosis* et l'infection VIH. Les endotoxines tels que les lipopolysaccharides peuvent aussi augmenter l'expression de CCR5. Ostrowski et al. ont montré qu'il y a une corrélation directe entre la progression vers le stade SIDA et l'expression

de CCR5, les individus en phase SIDA montrant un fort pourcentage de cellules T CD4+ exprimant CCR5 (297).

Le niveau cytokinique peut aussi affecter l'expression de CCR5, telles que les cytokines pro-inflammatoires IL-2, IFN- γ , IL-12 et TNF- α qui augmentent l'expression de CCR5. La cytokine anti-inflammatoire IL-10 augmente aussi la densité d'expression de CCR5 via la stabilisation de l'ARNm de CCR5.

L'environnement cytokinique ainsi que la stimulation antigénique induite lors d'infections, peuvent provoquer l'activation et la différenciation des cellules T CD4+ et induire une régulation de l'expression de CCR5.

En effet, l'expression de CCR5 dépend aussi du type cellulaire. Comme nous l'avons précédemment décrits, les cellules T humaines sont classées en deux sous-ensembles, les naïves et les mémoires basées sur l'expression des isoformes CD45RA et CD45RO, respectivement (219, 297). Les cellules T mémoires sont constituées de sous-ensembles distincts qui peuvent être identifiés en fonction d'autres marqueurs de surface et de leurs fonctions effectrices (298), les cellules T CD4+ CM et EM. Des études antérieures indiquent que le VIH-1 infecte préférentiellement les cellules T CD4+ mémoires, plutôt que des cellules T CD4+ naïves (299, 300), en raison de l'expression préférentielle du corécepteur CCR5 du VIH-1 sur les cellules T CD4+ mémoires. Dans la population mémoire, les cellules T EM sont enrichies pour l'expression de CCR5 par rapport aux autres cellules T CD4+ mémoires (301), ce qui suggère qu'elles peuvent être des cibles primaires pour les virus de tropisme CCR5 qui prédominent dans la plupart des personnes infectées.

Il a été montré une corrélation entre l'état d'activation et l'expression de CCR5, avec les cellules T CD4+ qui présentent les marqueurs d'activation HLA-DR et CD38 exprimant fortement CCR5 (297, 302).

L'infection à VIH induit une activation chronique du système immunitaire via différents processus engendrant un environnement cytokinique pro-inflammatoire avec une forte antigénémie, ce qui conduit à la différenciation des cellules T CD4+ en cellules T CD4+ EM activées qui expriment fortement CCR5. Il a été montré des associations entre l'avancement dans la maladie, la différenciation/activation des cellules T CD4+ en cellules T EM et l'expression de CCR5 (302-305) (cf **C.4.2**). Parmi les sous-types de cellules T CD4+ EM, les cellules Th1 sont celles qui expriment le plus CCR5 (306).

Enfin, bien que la régulation des conformations de CCR5 ne soit pas encore bien comprise, des études montrent qu'il y a une stabilisation préférentielle des conformations de CCR5 en

fonction de l'environnement et des types cellulaires, et que celles-ci sont différenciellement utilisées par différentes souches de VIH-1.

CXCR4

CXCR4 est le corécepteur de l'entrée des souches de VIH-1 de tropisme X4 ou R5X4 qui émergent chez environ la moitié des individus infectés dans les stades tardifs de l'infection (213, 214, 307). La comparaison des séquences des gp120 des virus X4 et R5 a permis d'identifier les résidus au niveau de la boucle V3 qui conditionnent l'utilisation de l'un ou l'autre des deux corécepteurs.

L'expression de CXCR4 est quasiment ubiquitaire. Il est notamment exprimé par un large spectre de cellules hématopoïétiques incluant les neutrophiles, les monocytes, les lymphocytes B et T, les précurseurs des lymphocytes B, les macrophages, les LC (213, 308). Le ligand principal de CXCR4 est la chimiokine CXCL12/SDF-1 α (Stromal Cell Derived Factor) (214, 309). A la différence de l'inactivation du gène codant pour CCR5 (310, 311), celle de l'un ou l'autre des gènes codant pour CXCL12 ou CXCR4 est létale chez la souris (308, 312, 313). CXCR4 et CXCL12 sont impliqués dans la formation du système cardiovasculaire, du système gastro-intestinal, du cervelet, des gonades, dans la myélopoïèse et la lymphopoïèse B (308, 312, 314, 315). Chez l'adulte, le couple CXCR4/CXCL12 joue un rôle clé dans la migration des leucocytes, leur domiciliation et leur rétention au sein des organes lymphoïdes primaires et d'une manière générale dans l'homéostasie leucocytaire en périphérie (316, 317).

Alors que l'expression de CCR5 est principalement associée aux cellules mémoires T CD4⁺ et particulièrement les cellules T CD4⁺ EM, l'expression de CXCR4 est ubiquitaire, et notamment dans les cellules T CD4⁺ naïves et mémoires (219, 318-320). Chez les individus infectés chez lesquels n'émergent pas de virus X4 (environ la moitié des individus infectés), il a été proposé que les propriétés des virus R5 évoluent de telle manière qu'ils puissent infecter les cellules T CD4⁺ naïfs (215).

L'entrée ne corrèle pas toujours avec infection/réplication

Suite à l'entrée du virus de nombreux déterminants vont réguler la productivité de l'infection dans les cellules T CD4+. Notamment les facteurs de restriction qui sont des protéines antivirales produites par l'hôte et qui contrecarrent ou "restreignent" la réplication virale. Ces protéines sont considérées comme une première ligne de défense contre les virus. Les facteurs de restriction sont induits par la voie des interférons de type I et II (321). Il existe un grand nombre de facteurs de restrictions, capables de bloquer l'infection/réplication à différentes étapes du cycle viral.

Les Facteurs de restrictions

APOBEC

Les protéines APOBEC3 (Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme, Catalytic Polypeptide 3) sont exprimées dans de multiples types de cellules, telles que les lymphocytes T CD4+ et les macrophages. Le locus du gène de APOBEC3 contient sept gènes chez les primates: A3A, A3C, A3H, A3B, A3D, A3F, A3G (322, 323). Les protéines APOBEC3 agissent comme des cytidine désaminases. Elles agissent en désaminant la désoxycytidine en désoxyuridine du premier brin d'ADN viral généré lors de la transcription inverse, ce qui génère de nombreuses mutations G⇒A dans l'ADN double brin (324-326). Ces mutations se traduisent par des produits de RT, reconnus comme aberrants et dégradés par la suite. Alternativement, l'ADNc viral s'intègre dans le génome de l'hôte, mais ne produit pas de virus infectieux en raison de codons STOP ou de mutations non-sens. Pour exécuter leur activité, les protéines APOBEC3 doivent être incorporées dans les virions nouvellement formés, de sorte que l'inhibition ait lieu durant le prochain cycle de réplication (325, 327). La protéine virale Vif contrecarre l'activité APOBEC3 en recrutant le complexe ubiquitine ligase et en induisant sa dégradation médiée par le protéasome (328).

IFITM

La famille de protéines IFITM (Interféron-Induced Transmembrane) est composée de cinq protéines distinctes, dont trois pourraient exercer une activité antivirale contre un large éventail de virus, y compris le VIH-1. Ces facteurs de restriction (IFITM1, IFITM2, IFITM3) montrent une expression constitutive et omniprésente et sont régulés positivement par les interférons de type I et de type II. Les protéines IFITM se localisent

sur les membranes cellulaires et inhibent l'infection par le VIH-1. Plusieurs rapports ont montré que les IFITM représentent la première ligne de défense contre le VIH-1 et d'autres virus car ils bloquent l'infection au stade le plus précoce, c'est-à-dire la fusion et l'entrée. L'effet inhibiteur des IFITM sur la réplication du VIH est relativement modeste comparé à celui observé pour d'autres virus tels que le virus Influenza A et les flavivirus et son mécanisme moléculaire exact de restriction n'est toujours pas clair (329). Un mécanisme d'action possible de ces protéines implique l'altération de la composition de la membrane et des changements dans la courbure et la fluidité de la membrane (Doyle et al., 2015, Lu et al., 2011). Une étude récente a montré que les protéines IFITM co-localisent avec Gag et Env et sont incorporées dans des particules virales nouvellement formées, produisant des virions avec une infectivité réduite (330).

SAMHD1

SAMHD1 (domaine SAM et domaine HD contenant la protéine 1) appartient à une classe d'enzymes cellulaires qui contiennent un signal de localisation nucléaire consensus (NLS) N-terminal et se localisent dans le noyau des cellules myéloïdes et cellules T CD4+ au repos (331). SAMHD1 inhibe l'infection par le VIH-1 en interférant avec l'étape RT. Il le fait en hydrolysant le groupe tri-phosphate à partir de dNTPs, ce qui appauvrit le pool cellulaire de dNTP, et limite ainsi la transcription inverse du VIH (223). En raison de l'activité de SAMHD1, le VIH-1 se réplique mal dans cellules myéloïdes et cellules T CD4+ au repos (332). Cependant, le VIH-2 et certaines souches de SIV codent pour la protéine accessoire Vpx. Vpx contrecarre l'activité SAMHD1 en le redirigeant dans la voie du protéasome pour le dégrader (333).

SERINC5

Il a été montré, que l'un de ces facteurs de restriction, SERINC5, est un inhibiteur de l'entrée du VIH. SERINC5 se localise dans la membrane plasmique, où elle est incorporée efficacement dans les virions VIH-1 lors de leur bourgeonnement et entrave la pénétration subséquente du virion dans une cellule cible susceptible (334). Plus récemment il a été montré que SERINC5 inhibe la formation du pore de fusion du VIH-1 en favorisant l'inactivation fonctionnelle des glycoprotéines d'enveloppe (335). Ce facteur de restriction est contrecarré par la protéine accessoire du VIH Nef.

La Tetherin

La Tetherin, également appelé BST2, attache des virions nouvellement formés à la membrane plasmique, les empêchant ainsi de bourgeonner. La Tetherin est un ISG transmembranaire, qui forme des ponts protéiques entre les membranes virales et cellulaires (336). La protéine accessoire Vpu est une protéine transmembranaire, qui est exprimée dans le VIH-1 et certaines souches de SIV, mais pas par le VIH-2 (337). VPU empêche la localisation de Tetherin à la surface cellulaire et favorise la dégradation de la Tetherin dans les endolysosomes (338). La tetherin a également été montré pour fonctionner comme un senseur viral. La tetherin expose deux résidus tyrosine dans son domaine cytoplasmique lors de la liaison aux virions. Ces résidus sont phosphorylés par la tyrosine kinase Syk, ce qui conduit à l'expression de NF- κ B (339). Ceci déclenche une cascade de signalisation en aval, qui induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Vpu est également capable de contrecarrer l'activité de détection virale de Tetherin (340).

TRIM5 α

La TRIM5 α (protéine 5 alpha contenant un motif tripartite) est une ubiquitine ligase qui inhibe l'infection rétrovirale en se liant à la capsid lors de l'entrée virale et provoque la dissociation prématurée du noyau viral. TRIM5 α interfère avec la formation du complexe de transcription inverse et inhibe la synthèse d'ADNc virale (Campbell, 2014, Doyle et al., 2015, Luban, 2012). Cependant, la TRIM5 α humain n'inhibe pas le VIH-1 en raison de la reconnaissance inefficace de la capsid. Des études suggèrent que la pression de sélection évolutive a modifié la capsid du VIH, de sorte qu'elle est liée de manière inefficace par le domaine SPRY du TRIM5 α humain, ce qui conduit à un échec de l'inhibition du VIH-1 (336, 341, 342). Néanmoins, les capsides de certaines souches cliniques de VIH-1 peuvent présenter une restriction de 4 à 6 fois en présence de TRIM5 α humain fonctionnelle (343). Les capsides sensibles au TRIM5 α portent les mutations typiques de résistance aux CTL associées aux allèles HLA B * 57 et B * 27, suggérant que la pression immunitaire médiée par les CTL peut forcer le virus à muter vers des conformations de capsides vulnérables. De plus, une étude a montré que la sensibilité de TRIM5 α était inversement corrélée avec les niveaux de charge virale chez 56 patients infectés par le VIH étudiés (344).

Susceptibilité à l'infection en fonction du sous-type cellulaire

Les cellules T CD4⁺ quiescentes sont réfractaires à l'infection par le VIH (345-347), alors que les cellules T CD4⁺ activées y sont fortement sensibles (348, 349). Il y a plusieurs explications : (i) les cellules T CD4⁺ au repos expriment à un moindre niveau le corécepteur CCR5 (350), (ii) elles présentent un niveau de dNTP plus bas que dans les cellules T CD4⁺ activées, ce qui limite la transcription inverse du VIH (351, 352). Il a été montré que SAMHD1 restreint aussi l'infection VIH dans les cellules T CD4⁺ au repos, en réduisant le pool de dNTP disponibles pour le virus (223, 331, 332).

Les cellules Th1 expriment fortement CCR5, mais pourtant ce n'est pas le sous-type le plus susceptible, et certains rapports suggèrent que les cellules Th2 sont plus susceptibles que les Th1 à l'infection (353, 354), bien que cette notion puisse être disputée (355). Moonis et al. ont montré que les cellules Th2 sont plus enclins à la réplication d'un virus R5 même si les taux d'entrée et d'infection étaient plus importants dans les cellules Th1 exprimant plus de CCR5. (356). Les cellules Th1 expriment l'IFN γ permettant l'expression des gènes dépendants de l'IFN et notamment les facteurs de restriction. En effet, une étude plus récente a démontré que les cellules Th1 expriment de manière plus importante les facteurs de restriction APOBEC3G et APOBEC3F et que les virus produits par les cellules Th1 étaient moins infectieux que ceux des cellules Th2 (357).

Les cellules T CD4⁺ TEMRA expriment fortement CCR5, mais pourtant la fréquence de ces cellules est augmentée chez certains patients infectés par le VIH. Une étude montre que ce compartiment cellulaire est résistant à l'infection par les virus R5. Les auteurs suggèrent une résistance post-entrée, mais avant les étapes précoces de transcription inverse, plus précisément au moment de la décapsidation. Ces cellules dans l'infection VIH ont un profil Th1, et donc l'induction de gènes stimulés par l'interféron (ISG) pourrait être une autre explication (358).

B.8. Les 3 phases de l'infection

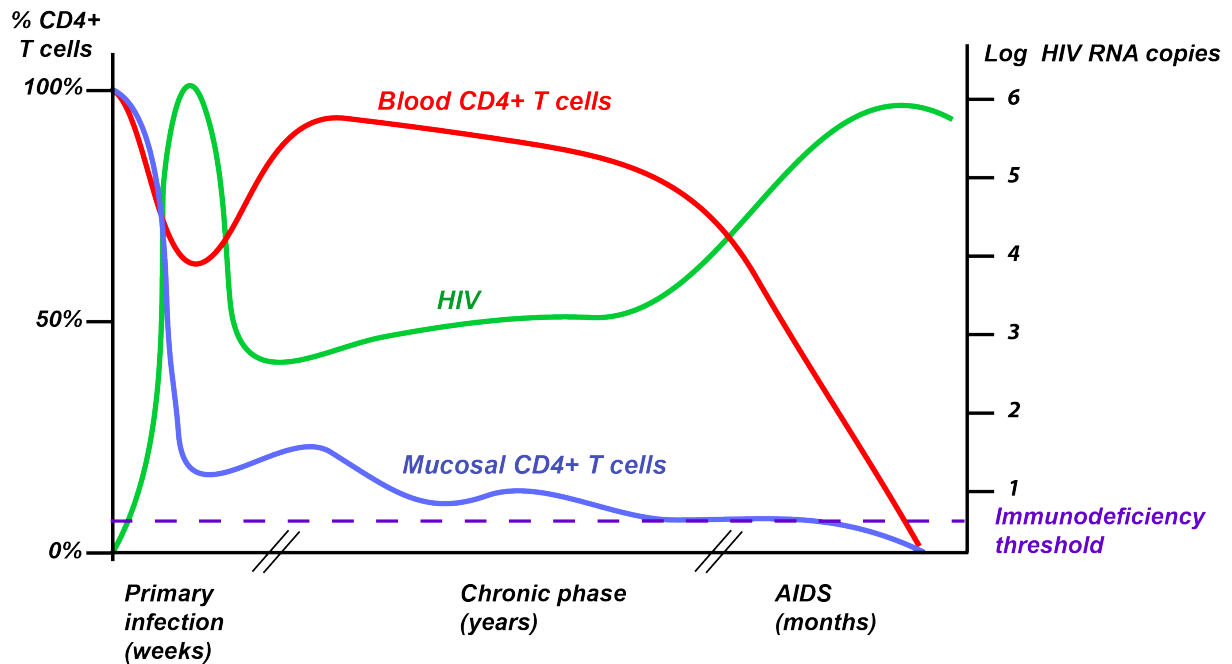


Figure 16: Histoire naturelle de l'infection par le VIH chez un patient non traité. La figure montre l'évolution de la charge virale et du nombre de lymphocytes T CD4+ au cours du temps. Les trois stades de l'infection sont représentés: la phase aiguë ou primo-infection, la phase asymptomatique ou chronique et le stade SIDA. Immunodeficiency threshold: seuil de la proportion de cellules T CD4+ sous-lequel l'individu est considéré comme immunodéficient.

Source: Lisa Chakrabarti

L'infection par le VIH entraîne une pathologie chronique qui conduit à une immunodépression profonde, le SIDA. Le temps de progression vers le SIDA est variable, habituellement entre 5 et 10 ans, mais des évolutions variables sont décrites. L'histoire naturelle de la maladie se déroule en trois phases : la primo-infection regroupant la transmission et la phase d'infection aiguë souvent symptomatique, la phase de latence clinique aussi appelée phase chronique, qui est asymptomatique, et la phase terminale SIDA, symptomatique (**Figure 16**).

Transmission du VIH et infection précoce

La transmission du VIH par voie sexuelle est la plus commune, et se produit à la surface des muqueuses via des particules libres ou associées à des cellules infectées (sperme ou cellules de la muqueuse). Plusieurs études utilisant des modèles *in vivo* de l'infection à SIV ont permis de comprendre les premiers stades de l'infection par le VIH (revue dans (359, 360)). Après l'exposition initiale, les virus libres ou les cellules infectées peuvent traverser la barrière de la muqueuse de multiples façons. Les cellules infectées dites « donneuses » présentes à la surface de la muqueuse peuvent soit briser la barrière épithéliale de l'hôte en s'insérant via de

micro-abrasions, soit déposer des particules de VIH à la surface de la muqueuse. Les particules virales libres peuvent alors traverser l'épithélium par transcytose ou passer entre les cellules en cas d'absence de jonctions serrées. D'autres études décrivent que les particules libres peuvent directement infecter les LC résidentes du tissu, les DC ou les cellules T CD4+ intra-épithéliales (361),(362). En quelques heures, le VIH traverse la barrière épithéliale, il va ainsi pouvoir rencontrer des cellules T CD4+ partiellement activées dans le stroma. La réplication productive du virus transmis / fondateur peut alors s'initier (363). Les complexes formés entre les LC / DC, qui abritent le virus, et les cellules T CD4+ cibles, sont appelés synapses virologiques et facilitent l'établissement d'une infection productive (364). Une étude montrant que la circoncision confère un certain degré de protection à l'infection a souligné l'importance des LC, DC et cellules T CD4+ résidentes du prépuce dans l'efficacité de la transmission (365).

Après quelques jours, le VIH se propage localement dans les cellules T CD4+ mémoires plus fortement activées, qui expriment le corécepteur CCR5. Le virus commence à migrer en périphérie, et cette phase précoce de propagation à bas bruit, appelée également éclipse, s'étend sur environ dix jours, avec l'ARN viral restant indétectable dans le plasma (<100 copies d'ARN viral par mL) (360).

Phase aiguë

Les syndromes de la phase aiguë commencent deux à quatre semaines à la suite de l'exposition initiale. Cette période est accompagnée de symptômes grippaux, fièvre et lymphadénopathie.

La sévérité de ces symptômes varie en fonction des individus (366).

A la fin de la phase éclipse, les virus ou les cellules infectées atteignent les LN, où ils rencontrent des cellules T CD4+ CCR5+ fortement activées, ce processus de propagation étant augmenté par les DC qui internalisent et transportent le virus jusqu'aux cellules T CD4+ activées. Le virus se réplique alors rapidement et se propage dans tout le corps jusqu'aux autres organes lymphoïdes, et particulièrement dans le tissu lymphoïde associé au tractus gastro-intestinal (GALT) où les cellules T CD4+ CCR5+ mémoires activées sont omniprésentes. Environ 20% des cellules T CD4+ sont infectées dans ce compartiment et jusqu'à 60% des cellules non infectées s'activent et meurent par apoptose. 80% des cellules du GALT peuvent être déplétées durant les 3 premières semaines de l'infection à VIH. Alors que la réplication dans le GALT et les autres tissus lymphoïdes (particulièrement les LN) s'accroît, la charge virale plasmatique augmente exponentiellement pour atteindre un pic,

généralement plus d'un million de copies d'ARN viral par mL de sang à trois ou quatre semaines post exposition.

Etablissement du « viral set point »

En parallèle, la réponse immunitaire se met en place, avec la réponse innée précoce caractérisée par une « cascade cytokinique » (367) et le développement de la réponse adaptative, une séroconversion et une activation des cellules T. Cette réponse précoce du système immunitaire, notamment la réponse T CD8+ contribue à la diminution de la charge virale. On observe alors une disparition de la symptomatologie, le pic de la charge virale plasmatique initial diminue puis se stabilise au niveau du « viral set point » tandis que dans une certaine mesure le nombre de cellules T CD4+ du sang périphérique rebondit, alors que la déplétion dans les muqueuses est quasi irrémédiable en l'absence de traitement. Le « viral set point » est prédictif de la progression vers le SIDA, plus celui-ci est haut, plus le risque est élevé. Les événements en phase précoce de l'infection, telle que la réponse immune, sont donc déterminants.

Phase chronique

Le nombre de cellules T CD4+ diminue lentement vers des niveaux inférieurs à la normale, variant entre 200 et 500 cellules par mm³ (368). La réplication virale chronique dans les tissus lymphoïdes (GALT et LN) provoque un état d'activation et d'épuisement chronique du système immunitaire (369). Cette phase asymptomatique se caractérise par un équilibre, entre le système immunitaire et le VIH. Le système immunitaire est constamment en retard sur le virus, les réponses des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et les anticorps neutralisants sont généralement inefficaces car le virus s'adapte et développe des mutations d'évasion, le rendant résistant à la réponse immune et permettant ainsi la persistance virale.

Le SIDA

L'infection par le VIH conduit à une immunodéficience associée à une chute importante des cellules T CD4+ (<200 cellules/mm³) qui est, à ce stade associée à une élévation de la charge virale plasmatique (369). Au niveau clinique, les patients développent des infections opportunistes associées à l'immunodépression. Ce sont des pathologies d'origines bactériennes, virales ou cancéreuses qui conduisent au décès des patients.

C. L'échec du système immunitaire dans le contrôle de l'infection à VIH

C.1. La déplétion des cellules T CD4+

La déplétion des cellules T CD4+, telle que l'on peut la mesurer au niveau du sang, est caractéristique de la maladie. Ce paramètre est couramment utilisé en clinique, parallèlement à la mesure de la charge virale, pour suivre l'évolution naturelle ou sous traitement antirétroviral de l'infection virale. Cependant, depuis plusieurs années, il est clair que ce paramètre périphérique n'est pas le reflet quantitatif direct de la déplétion des cellules T CD4+ qui apparaît dès le début de l'infection par le VIH. En effet, le compartiment sanguin ne contient que 2 à 5 % de l'ensemble des lymphocytes de l'organisme. La plus grande partie des lymphocytes est située dans la muqueuse du tractus intestinal, les LN ou d'autres tissus lymphatiques (370). Mais, le GALT contient la plus grande part du tissu lymphoïde de l'organisme, et de plus, la proportion de cellules mémoires y est très largement majoritaire (> 95 %), à la différence de leur répartition sanguine ou ganglionnaire (50-70 %) (371). Un nombre important de ces cellules T CD4+ présentes dans le GALT exprime le corécepteur CCR5, et ce tissu lymphoïde a de fait été identifié comme le site majeur de réplication du virus et comme un réservoir important du virus *in vivo* (372). Ainsi, la muqueuse intestinale, de par la présence en son sein de cellules T CD4+ exprimant CCR5, est le site privilégié de l'infection par le VIH ou le SIV (373).

Lors de la primo-infection par le VIH, les compartiments muqueux sont la cible (préférentielle et importante quantitativement) d'une déplétion en cellules T CD4+, bien supérieure à celle observée au niveau sanguin. Cette déplétion est visualisée dans les muqueuses digestives bien avant la déplétion sanguine. Elle peut être observée dans les 4 à 6 semaines après l'infection. La perte prédomine au niveau du GALT (374) et c'est uniquement dans ce tissu lymphoïde qu'elle est pratiquement totale (comparativement aux tissus lymphoïdes ganglionnaires ou sanguins). De plus, cette perte n'est pas réversible mais persiste tout au long de l'évolution de la maladie (375).

De façon intéressante, chez les patients non progresseurs à long terme, aucune déplétion au niveau du compartiment muqueux n'a été rapportée (376). Au total, le tissu lymphoïde intestinal est un organe crucial en ce qui concerne les événements initiaux participant à la pathogénicité de l'infection par le VIH. La déplétion importante du nombre de cellules T

CD4+ CCR5 observée au niveau du GALT implique que le nombre total de cellules T CD4+ de l'organisme est sévèrement réduit de façon très précoce après l'infection. Ces cellules sont une arme considérable dans la défense de l'organisme contre les infections et cette atteinte initiale est d'une importance capitale dans l'évolution clinique de la maladie. Une telle perte impose secondairement la mise en place de moyens homéostasiques afin de compenser la réduction du compartiment T CD4+ mémoires. S'ils ne peuvent pas être mis en place, l'équilibre entre l'agent pathogène et l'hôte est gravement perturbé au détriment de ce dernier (690).

C.1.1 Mécanismes de déplétion

Les effets cytopathiques directs de l'infection par le VIH ne sont que partiellement impliqués dans la diminution du nombre des cellules T CD4+ qui est caractéristique de l'infection à VIH (377). En effet, le nombre de cellules infectées n'est pas égal à la perte totale de cellules T CD4+, suggérant que d'autres mécanismes sont impliqués. La perte constante des cellules T CD4+ mémoires cibles est non seulement médiée par la réponse CTL, la cytopathogénicité virale, mais aussi par des effets indirects de l'activation immunitaire chronique.

L'activation immunitaire massive induit l'épuisement et l'apoptose des cellules infectées, ainsi que la mort de cellules non infectées par des effets « bystanders » (378). Ceci est soutenu par le fait que le nombre total de cellules apoptotiques dépasse le nombre de cellules infectées par le VIH (379). Des preuves directes de l'apoptose par effet « bystander » ont été fournies par Finkel et al., qui ont montré que pendant l'infection à VIH, la majorité des cellules subissant une apoptose dans les LN étaient non infectées mais à proximité immédiate des cellules infectées productrices de virus (380).

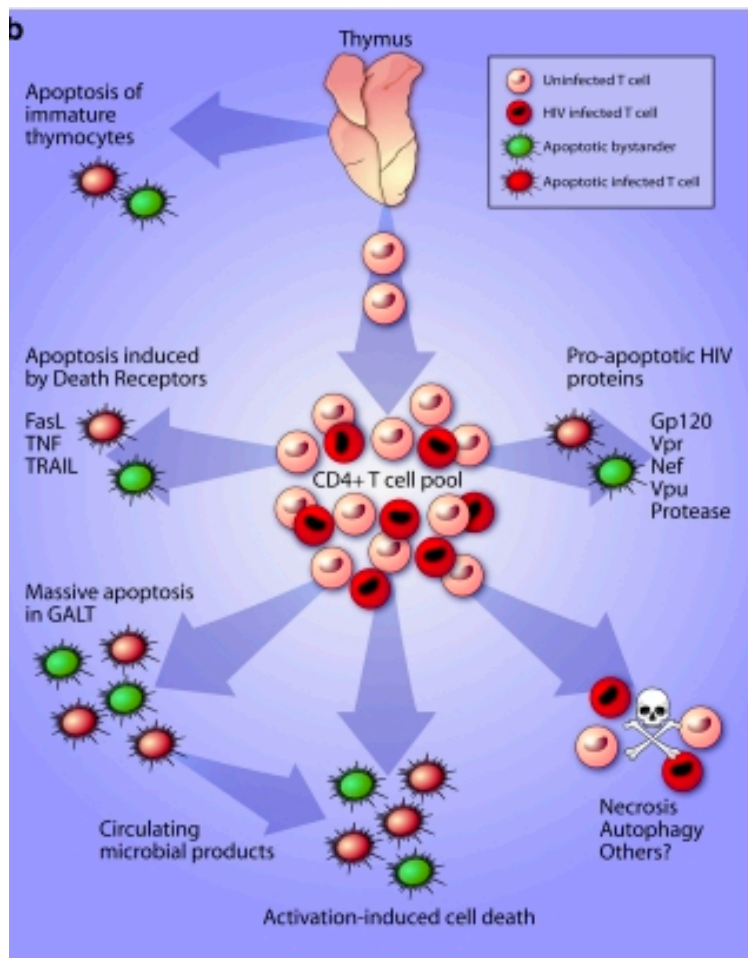


Figure 17: Mécanismes de déplétion des lymphocytes T CD4+ dans l'infection VIH non traitée.

Ce schéma décrit les mécanismes de décès des cellules T CD4+ dans l'infection à VIH non traitée. Le pool de cellules T CD4+ périphériques est épuisé par une diminution de la thymopoïèse et une apoptose excessive à travers de multiples mécanismes directement lié au virus et des mécanismes indirectes. Source: D'après Cummins NW. Cell Death Dis. 2010

Plus récemment, la glycoprotéine virale Env a été impliquée dans le processus de l'apoptose « bystander ». L'inhibition des interactions Env-CD4 entraîne une diminution des niveaux d'apoptose « bystander » (381). Il a été rapporté que la liaison à la surface cellulaire de CD4 par la gp120 du VIH-1 entraîne une augmentation de la mort cellulaire via un processus associé aux interactions FAS-FASL et TRAIL-DR (récepteur de la mort cellulaire) (382, 383). De plus, Boasso et al. suggèrent que les cellules T CD4+ CCR5+ expriment les récepteurs à l'IFN α / IFN β et peuvent donc présenter une susceptibilité accrue à l'apoptose induite par l'interféron de type 1 (384). Un autre facteur contribuant à l'apoptose « bystander » semble être l'infection avortée. L'accumulation de transcrits inverse incomplets dans les cellules T CD4+ au repos, qui sont non permissives, conduit à l'activation de réponses pro-apoptotiques et pro-inflammatoires impliquant l'activation de la caspase-3 et de la caspase-1 (385).

L'apoptose médiée par la caspase-1 est induite par pyroptose, qui correspond à une forme intensément inflammatoire de la mort cellulaire programmée où le contenu du cytoplasme et les cytokines pro-inflammatoires, y compris l'IL-1 β , sont libérés. La mort cellulaire par

pyroptose crée un cycle vicieux où les cellules T CD4+ libèrent des signaux inflammatoires qui attirent plus de cellules à mourir (386) (**Figure 17**).

C.2. Echec de la réponse immunitaire durant la phase précoce

C.2.1 Echappement à la réponse T CD8+

Les cellules T CD8+ sont des "tueurs en série", qui reconnaissent des antigènes viraux et tumoraux et lysent efficacement les cellules cibles par la sécrétion de facteurs solubles ou en induisant directement l'apoptose via des interactions mettant en œuvre FAS-FASL (387, 388). Cependant, dans le contexte de l'infection productive à VIH, elles échouent, et la grande majorité des individus développent une maladie progressive. Une étude récente montre l'expansion d'une population de cellules T CD8+ inefficace durant la phase aiguë de l'infection (389). Néanmoins, de nombreuses études ont prouvé l'importance de la réponse T CD8+ spécifique du VIH dans le contrôle de la réplication virale (390-393). Les patients dépourvus de réponse CTL spécifique à Gag montrent une probabilité accrue de progression vers le SIDA (394). La perte des cellules T CD8+ chez les Rhesus macaques (RhM) entraîne une augmentation rapide de la charge virale du SIV (391). De plus, il a été bien documenté que les réponses T CD8+ spécifiques du VIH émergent au moment du pic de la virémie sont associées au déclin progressif et à la stabilisation éventuelle de la charge virale (395, 396). Une étude suggère qu'entre 15 à 35% des cellules infectées sont éliminées par les réponses CTL d'une seule spécificité, en un jour, pendant l'infection aiguë (397). Cependant, les réponses T CD8+ spécifiques sont étroitement focalisées, ciblant souvent quelques épitopes immunodominants dans Env et Nef, ce qui entraîne des mutations d'échappement, et donne lieu à une évolution du virus fondateur initial (398, 399). Le coût de « fitness » résultant de ces mutations est souvent surmonté par des mutations compensatoires.

C.2.2 La réponse T CD4+ en phase précoce

Alors que la phase précoce de l'infection à VIH, est marquée par une infection massive des cellules T CD4+ activées dans le GALT (377), les réponses T CD4+ spécifiques au VIH émergent simultanément, voire plus tôt que les réponses T CD8+ spécifiques au VIH, mais diminuent après les premiers mois d'infection. Cette contraction de la réponse T CD4+ peut être expliquée par une infection préférentielle, cependant, l'étude des autres infections virales

chroniques suggère que les réponses T CD4⁺ se contractent souvent après le déclenchement initial de la virémie. Il a été suggéré que cette réponse T CD4⁺ durant la phase aiguë, notamment la réponse spécifique à Gag, est associée à un contrôle ultérieur de la réplication virale (400). De plus, il est observé un échappement viral au niveau des épitopes ciblés par la réponse T CD4⁺ suggérant que cette réponse T CD4⁺ exerce une pression de sélection sur le virus (401, 402).

Th1 / CTL

Il a été montré que les cellules T CD4⁺ avec un profil Th1/CTL sont plus représentées chez les patients infectés, et que cette expansion commence durant la phase précoce de l'infection. En effet, par rapport aux individus non-infectés, Appay et al. ont montré que les personnes infectées par le VIH présentaient un nombre plus élevé de cellules T CD4⁺ exprimant la perforine, GzmA et GMP-17 / TIA-1 (des marqueurs de cytotoxicité) pendant la phase d'infection précoce (403). Durant l'infection très précoce non traitée (PHI), Zaunders et al. ont détecté une augmentation de la proportion des cellules T CD4⁺ de l'ordre de 10 à 20 fois, ainsi qu'une forte activation (CD38 +++), prolifération (Ki-67 +) de ces cellules qui expriment à la fois le corécepteur CCR5 ainsi que GMP-17 / TIA-1, perforine et GzmB. Dans le même groupe d'individus PHI, les cellules T CD4⁺ IFN- γ ⁺ spécifiques de Gag présentaient un phénotype similaire (404). Récemment, Johnson et al. ont caractérisé des cellules T CD4⁺ CD107a⁺ spécifiques du VIH chez des patients en phase PHI, et ont constaté que ces cellules partageaient un profil transcriptionnel proche des cellules T CD8 CTL spécifiques du VIH. De plus, ces cellules T CD4⁺ CD107a⁺ spécifiques du VIH montraient une activité de "killing" similaire à celles des cellules T CD8⁺ CTL spécifiques du VIH. Il est important de noter que ces cellules T CD4⁺ CTL apparaissent très tôt durant l'infection, et que leur proportion est négativement corrélée avec le « viral set point » (405). Soghoian et al. ont effectué une étude longitudinale des personnes non traitées en phase PHI et ont aussi constaté que les individus qui contrôlaient leur charge virale dans les 12 mois après l'infection montraient une expansion de leurs cellules T CD4⁺ CTL spécifiques du VIH durant la phase aiguë de l'infection, par rapport aux individus qui progressaient à des « viral set point » plus élevés. Les individus contrôlant leur charge virale avaient une expression plus élevée du marqueur de dégranulation CD107a sur leurs cellules T CD4⁺ spécifiques de Gag par rapport aux non-contrôleurs. De plus, ils ont pu associer les réponses T CD4⁺ CTL spécifiques du VIH durant la phase aiguë de l'infection et la progression plus lente de la maladie (406).

Ensemble, ces études montrent clairement l'importance d'une réponse T CD4+ durant la phase précoce de l'infection, et leur implication dans le contrôle de la réplication virale précoce ainsi que leur contribution dans le retardement de la progression vers la maladie (55).

Tfh

De récentes études montrent une perte des cellules Tfh durant la phase aiguë de l'infection. Notamment une étude du groupe de Estaquier J., montre une diminution des Tfh (CXCR5+ PD-1hi) de la rate durant la phase précoce de l'infection à SIV-mac251 chez des RhMs. Cette perte est notamment associée à un échec de la différenciation Tfh, c'est à dire une perte de l'expression des facteurs de transcription typiques (Bcl-6 et c-Maf) des Tfh dans cette population. Dans ce contexte, il montre une altération de l'architecture de la rate, et une détérioration des interactions Tfh / cellules B conduisant à la perte des cellules B mémoires ainsi que de la production d'anticorps spécifiques anti-SIV (407). Un autre groupe montre que la fonction Tfh est altérée durant la phase tardive de l'infection aiguë à VIH. Dans cette étude, il compare la fonction des Tfh circulantes (CXCR5+ CXCR3-) en réalisant des co-cultures avec des cellules B mémoires, et montre que, durant la phase 3 de l'infection aiguë, il y a une perte de la fonction Tfh se reflétant par une perte de la quantité de cellules B mémoires, de la production d'anticorps totaux et spécifiques contre le VIH, et que ces paramètres corrèlent avec l'augmentation de la charge virale (408). Hong et al. montrent qu'une hyperplasie des follicules précoces durant la phase aiguë ou lors de la phase précoce de l'infection chronique est associée avec une accumulation des Tfh et corrèle avec un « viral set point » bas et un meilleur pronostic de l'évolution de l'infection à SIV (409).

C.2.3 Echappement à la réponse humorale

La réponse anticorps durant la phase aiguë

La première vague de réponses anticorps est dirigée contre la gp41 et apparaît dans la deuxième semaine suivant l'exposition initiale au VIH. Il s'agit d'IgM formant des complexes immunitaires avec les virions du VIH, bien que seulement 20% des virions soient opsonisés (410). Les premiers anticorps libres anti-gp41 apparaissent 3-4 semaines après l'exposition au virus. La production des anticorps anti-gp120 est différée de 2 semaines supplémentaires et ils ne sont pas neutralisants. Les anticorps anti-gp120 sont moins dominants au cours de

l'infection aiguë. La réponse anti-gp120 constitue la principale réponse humorale anti-VIH suite à la transition vers la phase chronique. Ces vagues précoces d'anticorps anti-Env n'affectent pas la charge virale et n'induisent pas la sélection de mutants d'échappement, indiquant que la réponse anticorps anti-VIH pendant la phase aiguë est inefficace pour contenir la replication et la dissémination du VIH (411). Les anticorps dirigés contre d'autres protéines du VIH, comme Gag, apparaissent suite au déclin initial de la virémie, qui succède à la charge virale maximale.

Pour la plupart des personnes infectées par le VIH, les anticorps anti-VIH neutralisants surviennent environ trois mois après l'infection et leur apparition coïncide avec celle de mutations dans la région de l'enveloppe virale. Cette neutralisation est généralement inefficace à mesure que le virus s'adapte et développe des mutations d'échappement qui le rendent résistant à la neutralisation par les anticorps (412, 413). Les glycoprotéines de l'enveloppe du virus résistant sont protégées par un "bouclier glycanique" qui empêche la liaison des anticorps et favorise la persistance du virus (414).

Les cellules B

Durant la phase précoce, l'infection VIH affecte profondément les cellules B du sang et des tissus. Le VIH induit une commutation de classe précoce qui est associée avec une augmentation des cellules B mémoires et des plasmablastes ainsi qu'à une diminution du nombre de cellules B naïves, environ 50% des cellules B circulantes sont des plasmablastes, mais seulement une petite fraction est spécifique du VIH. Ces plasmablastes sont spécifiques de la gp41 mais leurs anticorps ne montrent qu'une activité neutralisante limitée malgré le fait qu'ils soient hautement maturés. De récentes études ont montré que ces plasmablastes proviennent de précurseurs B mémoires qui prédatent l'infection et sont cross-réactifs avec des Ag du microbiote (415)

Le VIH peut induire la lyse des cellules B folliculaires, une apoptose massive et la perte de 50% des CG dans les 80 premiers jours de l'infection. Cette perte des CG pourrait être à l'origine du défaut de capacité à générer rapidement des anticorps de haute affinité contre le VIH, et donc différer la production des anticorps neutralisants (416).

C.3. La mise en place de réservoirs viraux

La réplication massive du VIH dans le GALT s'accompagne d'une dissémination du virus vers les organes lymphoïdes périphériques, en particulier vers les LN, induisant l'établissement de

réservoirs viraux persistants dans les tissus lymphoïdes (417). Une petite fraction des cellules T CD4⁺ mémoires quiescentes porte des génomes viraux intégrés. A l'état quiescent ces cellules ne libèrent pas de virus infectieux, mais peuvent le faire suite à une activation cellulaire (418, 419). Cette population de cellules T CD4⁺ infectées constitue les réservoirs viraux latents, qui sont présents dans différents sites anatomiques, tels que le GALT et le CNS. Ces réservoirs présentent un obstacle majeur au développement de cures permettant l'éradication complète du virus (420). Les réservoirs viraux latents persistent même chez les patients HAART pour lesquels les niveaux plasmatiques de virémie sont indétectables (<50 copies de l'ARN du VIH par mL). Des patients qui ont été traités pendant des années peuvent connaître un rebond viral quelques semaines après l'interruption du traitement (421, 422). Il a été proposé que le phénomène de latence virale s'établisse lorsqu'une cellule T CD4⁺ activée infectée évolue en cellule quiescente (423, 424). Le fait que le VIH puisse être trouvé dans des cellules T CD4⁺ mémoire quiescentes, mais très rarement dans des cellules T CD4⁺ naïves, qui n'expriment pas le corécepteur CCR5 soutient cette hypothèse. Dans les cellules T CD4⁺ quiescentes, le changement d'environnement transcriptionnel réduit au silence l'expression des gènes du VIH. Par exemple, les facteurs de transcription NF- κ B et NFAT, impliqués dans la régulation des gènes du VIH, sont séquestrés dans le cytoplasme (425, 426). Cet état transcriptionnel silencieux protège les cellules infectées par le VIH de la surveillance immunitaire.

Le rôle des autres types cellulaires, tels que les macrophages et les cellules progénitrices hématopoïétiques (HPC) dans la latence et la formation de réservoir, n'a pas été concluant. Les macrophages infectés sont capables de répliquer le virus à bas bruit, et sont donc susceptibles à l'élimination par le système immunitaire. Mais il a été montré que les macrophages sont capables de se renouveler et de repeupler les tissus, dans le cas où une partie de la population infectée échappe à la cytotoxicité médiée par les CTL, la population infectée restante pourra persister par auto-renouvellement. Il est toutefois important de faire la différence entre les modes de persistance du VIH. Les cellules T CD4⁺ au repos sont dans un véritable état de latence dans lequel l'expression du génome viral est totalement silencieuse alors que les macrophages survivent pendant de longues périodes, le génome viral persistant alors à l'état de non-latence avec une réplication du virus à bas bruit (427). Il existe un autre mécanisme de persistance virale dans les cellules myéloïdes, comme pour les macrophages et les monocytes, qui implique leur capacité à circuler systémiquement dans différents sites anatomiques où les antirétroviraux ne peuvent pas bien pénétrer (428).

Il a également été suggéré que le VIH pourrait persister dans les HPC car ces cellules expriment à de faibles taux CD4, CCR5 et CXCR4. Un rapport a montré que l'ARN viral pouvait être détecté à faible niveau dans les CD34+ HPC provenant de patients traités par HAART. Ces cellules demeurent latentes jusqu'à leur différenciation (429).

La dissémination dans les organes lymphoïdes notamment via les DC infectées provoque l'infection des cellules T CD4+ activées résidentes des LN, mais surtout l'infection des cellules Tfh qui ont été décrites comme le compartiment majeur du réservoir viral chez les patients progressifs, traités et Contrôleurs. Les cellules Tfh sont des cellules activées, et représentent le premier site d'infection, de réplication et de production virale. Malgré une diminution du réservoir Tfh associée au temps de traitement, l'ARN viral est détectable jusqu'à 12 ans après l'initiation du traitement chez certains patients. Le fait que ces cellules soient amplifiées, activées et qu'elle soient localisées dans le CG, qui est un site privilégié pour l'infection et la réplication, peut expliquer cette forte susceptibilité pour l'infection. (430) (431).

C.4. L'infection VIH provoque une activation du système immunitaire

L'une des caractéristiques les plus admises de la phase chronique de l'infection VIH est l'activation immunitaire généralisée, dont les conséquences sont assez bien connues. Parmi celles ci, on retrouve : l'augmentation du renouvellement cellulaire, l'activation et la différenciation biaisée des lymphocytes en cellules effectrices, l'induction de l'épuisement cellulaire, la senescence, et la perte du potentiel régénératif, l'hypergammaglobulinémie et l'augmentation d'autres marqueurs du sérum...

C.4.1 Les causes de l'activation immunitaire

Les cytokines

En terme d'activation immunitaire, l'infection VIH est caractérisée par l'induction d'une réponse immunitaire innée qui est marquée par une cascade de cytokines pro-inflammatoires : TNF α , IFN α , IFN γ , IL-1 β , IL-10 and IP-10... Plusieurs de ces facteurs sont produits durant la phase d'infection aiguë, et certains sont maintenus durant la phase chronique d'infection. Paradoxalement, cette inflammation systémique facilite l'infection en recrutant et activant des

cibles du VIH comme les cellules T CD4+, macrophages et DC et favorise l'expansion du VIH (363, 367).

La translocation microbienne

L'origine de cette intense cascade de cytokines est en partie liée à l'augmentation du niveau de lipopolysaccharide (LPS) durant l'infection VIH. Le LPS est un puissant activateur du système immunitaire capable de se fixer aux macrophages et aux DC, induisant la production de cytokines pro-inflammatoires. L'hypothèse la plus soutenue est que la destruction du GALT est à l'origine de la perte de l'immunité permettant le maintien de la barrière intestinale (432). En effet, les cellules T CD4+ Th17 jouent un rôle important dans la réponse immunitaire de l'hôte contre les agents pathogènes extracellulaires tels que les bactéries et les champignons, ainsi que dans le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale de la muqueuse intestinale (305). Dans le contexte de l'infection VIH, les cellules Th17 sont susceptibles à l'infection et la perte substantielle des cellules Th17 dans le GALT entraîne un déséquilibre de la représentation des sous-types CD4+ avec une transition d'un phénotype Th17 prédominant à un phénotype Th1(433). Ce phénomène a également été décrit dans les modèles de primates non humains (NHP) de l'infection à SIV. Chez les animaux en bonne santé, la population de cellules T CD4+ Th17 est plus abondante dans les tissus muqueux que dans la périphérie. À mesure que l'infection SIV progresse, la population de cellules T CD4+ Th1 commence à prendre le dessus sur la population Th17, qui est massivement déplétée (434). Donc, dans l'infection à VIH/SIV, la population Th17 est diminuée induisant une augmentation de la susceptibilité de l'hôte à des infections bactériennes et fongiques et conduisant à la destruction de la barrière intestinale, ce qui favorise la translocation microbienne sous la forme de LPS circulant. Le niveau de LPS dans le plasma est maintenue à un fort niveau durant la phase chronique de l'infection (435, 436).

Stimulation antigénique chronique

Au cours de l'infection précoce, le VIH induit de fortes réponses lymphocytaires, en particulier chez les cellules T CD8+, et ces réponses persistent pendant la phase d'infection chronique en raison de la réplication continue du virus. Jusqu'à 20% des cellules T CD8+ circulantes peuvent être spécifiques du VIH chez les patients chroniquement infectés non traités. Les réponses T CD4+ spécifiques du VIH sont généralement présentes mais moins

importantes (3% des cellules T CD4+ circulantes), ce qui peut être une conséquence de leur déplétion préférentielle par le virus (437, 438).

La stimulation antigénique lors de l'infection par le VIH peut être aussi induite par d'autres virus, tels que le Cytomegalovirus (CMV) et l'Epstein Barr Virus (EBV). La réactivation du CMV semble se produire de façon récurrente chez les donneurs sains. Pendant l'infection VIH, l'épuisement des cellules T CD4+ peut alors entraîner une perte du contrôle immunitaire sur ces virus persistants, et induire leur réactivation et leur réplication (439). De plus, les conditions inflammatoires présentes durant l'infection à VIH (par exemple, la libération de cytokines pro-inflammatoires) peuvent également participer à la réactivation de formes latentes de CMV et EBV. Des études récentes ont montré une activation significative des cellules T CD8+ spécifiques de l'EBV et du CMV pendant l'infection aiguë à VIH (440, 441). Par conséquent, la stimulation antigénique chronique du système immunitaire se produisant chez les patients infectés par le VIH est dirigée en grande partie contre le VIH, mais aussi contre d'autres pathogènes.

C.4.2 Les conséquences générales de l'activation immunitaire

Perturbation de l'homéostasie cellulaire

Différenciation biaisée en cellules mémoires activées

La déplétion massive des cellules T CD4+ du GALT, mais aussi dans le sang périphérique et dans les OL durant les phases précoces de l'infection par le VIH, est compensée par une augmentation du renouvellement des cellules T CD4+. Ce processus est aussi constaté sur des cellules non cibles du VIH telles que les cellules T CD8+ et les cellules B. Le renouvellement cellulaire est induit dans les phases précoces et persiste durant la phase chronique de l'infection.

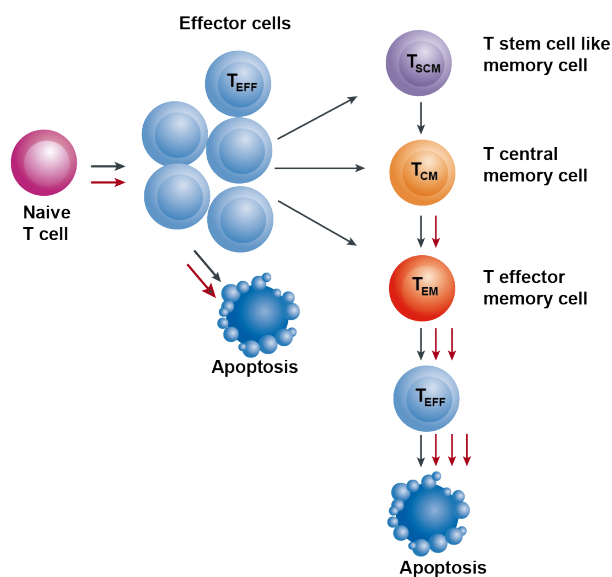


Figure 18: Altération des population lymphocytaires mémoires dans l'infection à VIH. L'infection par le VIH induit une différenciation préférentielle des cellules naïves en cellules effectrices, ainsi qu'une différenciation des cellules présentant un fort pouvoir de renouvellement et de plasticité (TSCM et CM), en cellules effectrices mémoires et effectrices. L'infection VIH engendre l'apoptose des cellules effectrices, fortement activées.

Source: Adapté de Lisa Chakrabarti

La réplication virale induit aussi un changement qualitatif des populations lymphocytaires. Durant la phase aiguë de l'infection, on observe une infection et une déplétion des cellules effectrices mémoires exprimant fortement CCR5, alors que la phase chronique de l'infection est associée avec une extension relative des cellules T CD4+ et CD8+ effectrices mémoires aux dépens des cellules T CD4+ Naïves, des TSCM et des CM.

La cause principale de l'altération des populations lymphocytaires dans l'infection VIH, est l'activation immunitaire systémique et plus précisément la stimulation antigénique chronique, qui induit une augmentation du renouvellement et de la différenciation lymphocytaire, ce qui provoque à terme une perte du potentiel de régénération, qui est la clef du maintien d'un système immunitaire compétent.

D'autres raisons évoquées pour expliquer ce biais de différenciation sont la réduction de la fonction thymique, c'est à dire du renouvellement des cellules T, et la destruction progressive des OL. La réplication persistante du VIH est également associée à la perturbation des cellules B, notamment une surreprésentation du sous-type de cellules mémoires qui sont activées, particulièrement pendant la phase chronique de l'infection (432).

IL-7

La déplétion des cellules T durant l'infection VIH est associée à une augmentation de l'IL-7 dans le plasma, suggérant que l'IL-7 est impliquée dans l'homéostasie de la régulation du nombre de cellules T. Il est supposé que la diminution du nombre de cellules T provoque la diminution de cellules T exprimant l'IL-7R et donc de la disponibilité de récepteurs à l'IL-7,

induisant ainsi l'augmentation de l'IL-7 libre, alors production d'IL-7 est constante. Dans l'infection VIH il y a une corrélation inverse entre la perte des cellules T CD4+ et l'augmentation de cellules T CD4+ mémoires chez les patients montrant une déplétion profonde de ces sous-types. La restauration de ces sous-types cellulaires induit une normalisation du niveau de l'IL-7 et une perte de la corrélation inverse. L'augmentation d'IL-7 chez les patients avec une forte déplétion de leurs cellules T CD4+ contribue à l'expansion, et à l'accumulation des cellules T CD4+ activées en périphérie (442, 443).

Les cellules T CD4+ activées alimentent le pool de cellules cibles du VIH

Un mécanisme par lequel l'activation immunitaire généralisée peut endommager le système immunitaire est en fournissant des cellules cibles pour la réplication du VIH. En effet, l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules T CD4 naïves en cellules T CD4+ EM conduisent à une augmentation de l'expression de CCR5 qui rend ces cellules plus susceptibles à l'infection. La présence concomitante de niveaux élevés d'activation des lymphocytes T CD4+, et d'un virus infectant et tuant les cellules T CD4+ activées peut aider à maintenir un cercle vicieux, dans lequel l'infection stimule l'activation qui elle même stimule l'infection, ce qui peut entraîner une perte sévère des lymphocytes T CD4+. Ce phénomène est encore plus prononcé pour les lymphocytes T CD4+ spécifiques au VIH qui sont en effet particulièrement sensibles à l'infection par le VIH.

L'activation induit la mort cellulaire par l'apoptose

Pendant la phase terminale de la réponse immunitaire, la mort des lymphocytes activés sert à limiter la réponse immunitaire en tuant des cellules qui ne sont plus nécessaires, on parle alors de mort cellulaire induite par l'activation (AICD). Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'apoptose des cellules T périphériques dépendent de l'expression de ligands de la superfamille de TNF et de leurs récepteurs, par exemple FAS / FASL et TRAIL-DR5 (444). Les cellules T Naïves expriment peu ou pas de FASL à leur surface cellulaire, alors qu'ils sont exprimés en relativement grande quantité par les cellules T mémoires activées. L'activation immune chronique durant l'infection VIH biaise la différenciation vers un sous-type mémoire activé plus propice à l'AICD, ce qui induit une forte perte des cellules T CD4+ par apoptose. Cette perte de cellules T CD4+ reflète l'amplification d'un processus physiologique permettant normalement la régulation homéostatique. Les sous-types T CD4+ ont des

sensibilités différentes à l'AICD. Les cellules Th1 expriment des niveaux plus importants de FASL et subissent donc plus l'AICD médiée par FAS que les cellules Th2 (445). Par contre l'AICD médiée par TRAIL-DR5 n'a été observée que dans la population Th2 (446). Curieusement, les cellules infectées sont plus résistantes à l'apoptose que les cellules non-infectées (447). Cela a pour conséquence la destruction indirecte des cellules activées non infectées, tout en épargnant la fraction de cellules infectées (448).

L'épuisement du système immunitaire

On définit le terme «d'épuisement immunitaire» par la perte de fonctions effectrices et de la capacité proliférative des cellules T mémoires. Au cours de la réponse immunitaire adaptative, les cellules T naïves sont activées par les APC, telles que les DC, via l'interaction avec des molécules CMH-peptide et costimulatrices. Cette activation entraîne une prolifération et une acquisition robustes des fonctions effectrices, accompagnées de changements phénotypiques à la surface cellulaire qui reflètent à la fois l'activation et l'état de différenciation des cellules T. La plupart des cellules T activées sont différenciées en cellules T effectrices à relativement faible durée de vie, tandis qu'une petite partie devient des T CM à longue durée de vie. On pense que l'activation chronique induite par des Ag viraux ou par d'autres mécanismes entraîne la persistance de certaines cellules T effectrices ou cellules T activées, mais qui sont fonctionnellement insensibles à une stimulation supplémentaire par l'Ag, ce qui est généralement appelée épuisement immunitaire (449). L'épuisement des cellules B dans l'infection par le VIH est très similaire à celui décrit pour les cellules T CD4+ et CD8+ dans l'infection VIH ou d'autres infections virales persistantes. Les cellules B ont une capacité proliférative réduite en réponse à des stimuli *de-novo* et sont caractérisées phénotypiquement par une augmentation de l'expression de multiples récepteurs inhibiteurs.

C.5. Impact du VIH sur la réponse T CD8+ spécifique du VIH

A mesure que l'infection progresse vers le stade chronique, les réponses T CD8+ anti-VIH initialement étroites commencent à se diversifier, avec en moyenne 14 épitopes qui sont ciblés simultanément, et jusqu'à 19% des lymphocytes T CD8+ qui sont spécifiques du VIH (438, 450). Étant donnée l'abondance de cellules T CD8+ circulantes spécifiques du VIH, il est étonnant que l'infection VIH ne soit pas enrayée chez la plupart des individus infectés de

manière efficace. L'explication pourrait résider dans le fait que les réponses T CD8⁺ sont dysfonctionnelles en raison de l'infection persistante à VIH (**Figure 19**). Plusieurs études ont montré que les cellules T CD8⁺ spécifiques du VIH ont une capacité réduite à éliminer les cellules cibles infectées (451, 452). Dans une expérience de relargage de Cr51 sur 4 heures, les PBMC isolées d'un individu infecté par le VIH-1 ont montré une activité cytolytique, qui était comparable au bruit de fond de la réponse provoquée par des PBMC de donneurs sains (394). De plus, la comparaison avec l'activité cytolytique spécifique à CMV a révélé que les cellules T CD8⁺ spécifiques du VIH étaient considérablement moins efficaces pour "tuer" leurs cibles, malgré un nombre comparable de cellules spécifiques, détectées par des tétramères de CMH de classe I chargés avec des Ag respectifs (451). Une explication possible de cette capacité cytotoxique réduite peut résider dans le fait que les cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH sécrètent des niveaux inférieurs de perforines, en raison de leurs phénotypes de différenciation biaisés. L'état d'activation constant du système immunitaire au cours de l'infection chronique à VIH entraîne l'épuisement progressif des cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH. Ces cellules fortement activées sont caractérisées par une expression accrue des marqueurs CD38, HLA-DR, 2B4, CD160 et CD57, tandis que l'expression de CD28 et CD27 est réduite (369, 453). Le développement de l'épuisement immunitaire suit un ordre hiérarchique clair. Tout d'abord, les cellules perdent leur capacité de prolifération, puis leur potentiel à sécréter des cytokines et des chimiokines. La perte de l'activité cytolytique marque l'état d'épuisement complet (454, 455). Les cellules T CD8⁺ spécifiques du VIH épuisées surexpriment alors les molécules inhibitrices telles que PD-1, Tim3, CTLA4 et KLRG1 (456). Enfin, la perte de fonctionnalité est suivie par l'apoptose. Il a été montré que les cellules T CD8⁺ spécifiques du VIH avaient une expression réduite de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, ce qui les rend plus sensibles à la mort cellulaire programmée (457). Cette notion est soutenue par une étude montrant que les cellules T CD8⁺ sont particulièrement sensibles à l'apoptose médiée par FAS lors de l'interaction avec des cellules infectées exprimant FASL (458). En plus de l'apoptose, les cellules T CD8⁺ provenant de patients infectés par le VIH en phase chronique subissent également l'immuno-senescence, en raison de nombreux cycles de réplication, un phénomène où les télomères de l'ADN chromosomique se raccourcissent (459). La signalisation médiée par le TCR est également altérée dans les cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH, qui subissent une régulation négative des molécules clés telles que CD3 ζ et CD28 (460, 461). Le phénotype épuisé / sénescence des cellules T CD8⁺ décrit ci-dessus, résultant de l'antigénémie persistante, est associé à la progression de la maladie.

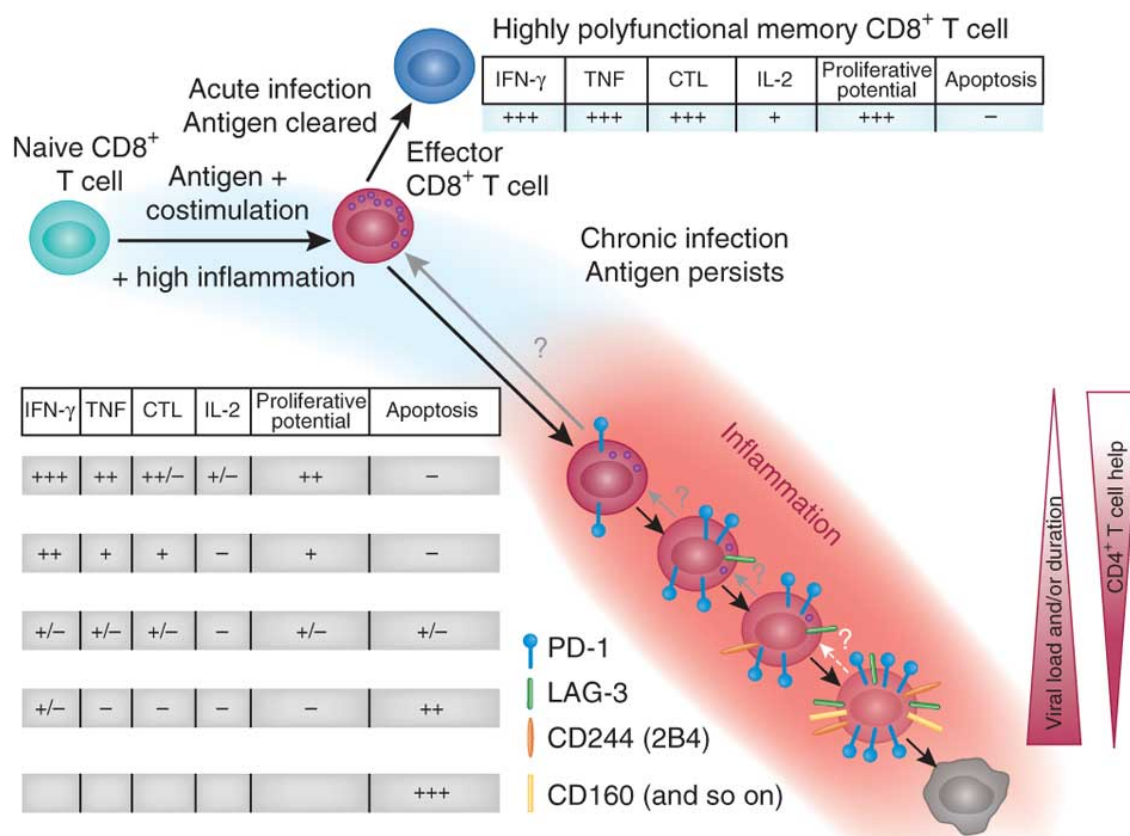


Figure 19: Perturbation de la fonction des cellules T CD8⁺ durant l'infection chronique VIH. La progression de l'infection VIH est marquée par une perturbation du système immunitaire. Les cellules T CD8⁺ échouent à procurer une protection anti-virale efficace en raison de leur phénotype d'épuisement. Celui-ci se manifeste par une perte de la capacité de sécrétion de cytokines, de la prolifération et une augmentation de la susceptibilité à l'apoptose. *Source:* Wherry EJ, 2011, Nature Immunology

C.6. Impact du VIH sur la dysfonction de l'immunité humorale

C.6.1 Perturbation des cellules B par le VIH

L'activation des cellules immunitaires induites par le VIH est l'une des rares caractéristiques largement acceptées de la pathogenèse du VIH et dans la progression vers la maladie. Alors que nous avons discuté de l'activation immune et de ses impacts dans la population T, celle-ci affecte aussi fortement la réponse humorale.

L'hyperactivation des cellules B par le VIH est caractérisée par une hyperplasie des follicules B (462) induite par une prolifération anormale des cellules B des CG (463) (464), une

hypergammaglobulinémie non-spécifique du VIH (465), qui s'explique par une augmentation anormale des cellules B montrant une différenciation terminale (plasmablastes) dans le sang périphérique, dont la plupart ne sont pas spécifiques du VIH. La fréquence de ces cellules corrèle avec l'hypergammaglobulinémie et la sécrétion de cytokines inflammatoires (466). De plus dans l'infection VIH, les cellules B montrent un très fort taux de renouvellement et expriment des marqueurs d'activation tels que CD70, CD71, CD80, et CD86 (467). Cette hyperactivation conduit à la production d'anticorps auto-immuns (468) et à l'augmentation de la fréquence de cellules B malignes (469).

L'infection VIH est aussi associée à la perte des cellules mémoires (470) et donc de la perte de la mémoire immunitaire à long terme, ce qui peut avoir des conséquences importantes pour la réponse à l'immunisation, naturelle ou par vaccination, chez les patients infectés par le VIH (471). La perte des cellules durant l'infection chronique à VIH est induite par apoptose notamment via le mécanisme Foxo3a et TRAIL (472).

Il avait été suggéré que la protéine VIH-1 Nef pourrait affecter les cellules B. Les macrophages infectés qui expriment Nef produisent la protéine ferritine, qui induit l'activation des cellules B, et les taux d'IgG dans le sérum corrélerent avec la ferritine et la charge virale (473). Cependant, les récentes découvertes sur les Tfh dans l'infection par le VIH suggèrent plutôt un rôle de ces cellules dans l'hyperactivité des cellules B. En effet, l'expansion des Tfh typiques de l'infection VIH est corrélée à l'hyperplasie des follicules, l'augmentation de la fréquence des cellules B des CG et des cellules B plasmatiques, ainsi qu'à la perte des cellules B mémoires. Enfin, l'expansion des cellules Tfh est corrélée avec l'hypergammaglobulinémie (463, 464) (cf C.7.2).

Altération des compartiments B mémoires

En plus d'une différenciation préférentielle des cellules B en cellules plasmablastes et d'une perte des cellules B mémoires, il est aussi observé une altération des compartiments B mémoires. Ceci est représenté par des surreprésentations de certains sous-types B. Parmi les cellules mémoires ayant subi la commutation de classe, on peut discriminer 3 classes de cellules en fonction de l'expression de CD27 et CD21 : Resting Memory (RM : CD27+ CD21+), Activated Memory (AM : CD27+ CD21-) et Tissue-Like Memory (TLM : CD27- CD21-).

Chez les individus non infectés la population RM, représente la population B mémoire conventionnelle, les autres populations étant quasi inexistantes.

Chez les personnes infectées par le VIH-1, la fréquence des cellules B RM diminue au cours de l'infection et corrèle avec des niveaux réduits d'anticorps contre différents Ag de vaccination (tétanos, Pneumocoque et rougeole) (474, 475), suggérant que cette population est à l'origine d'une réponse anticorps efficace, nécessaire au maintien de la mémoire sérologique qui se perd chez les patients progresseurs.

Dans l'infection progressive à VIH, il y a un enrichissement des cellules B mémoires CD21- (AM et TLM) aux dépens des populations RM. Les cellules B mémoires AM expriment de nombreux marqueurs d'activation comme CD80 et CD95 et sont fortement sujettes à l'apoptose. Les AM exprimant fortement CD38 représentent le compartiment plasmablaste amplifié dans l'infection VIH, qui est l'une des origines de la production d'anticorps dérégulés (476).

Les cellules TLM expriment les récepteurs inhibiteurs FcRL4 et Siglec-6, montrent un phénotype épuisé et une plus faible diversité de reconnaissance d'épitopes. Ces cellules répondent mal à la stimulation et montrent une capacité de prolifération faible, un nombre réduit de division cellulaire (477) et une maturation limitée (478).

De plus, chez les patients progresseurs la réponse B mémoire spécifique de la gp140 est enrichie parmi les cellules B anormales, particulièrement chez le sous-type TLM qui s'épuise. Le maintien des cellules spécifiques de la gp140 dans le compartiment RM (compartiment prédominant chez les donneurs sains) corrèle négativement avec la charge virale et avec le niveau d'activation immunitaire. La prise de traitement permet de normaliser, au moins partiellement, le profil phénotypique des cellules B mémoires (479).

La perte des cellules B mémoires dépend donc de plusieurs processus, comme l'enrichissement préférentiel des cellules B AM et TLM aux dépens des RM. Les cellules AM montrent une susceptibilité accrue à l'apoptose due à la forte expression de CD95. L'expression accrue de ce récepteur de mort corrèle avec la virémie et la progression dans la maladie (480), et d'un autre côté avec un épuisement profond des cellules TLM, ciblant particulièrement les cellules spécifiques du VIH. L'anomalie des cellules B pourrait donc contribuer à l'inefficacité de la réponse anticorps anti-VIH chez les patients progresseurs.

C.6.2 La réponse anticorps dans l'infection VIH

Anticorps neutralisants (NAb)

Les réponses B à l'infection VIH-1 se développent lors de la première semaine de virémie détectable et sont initialement détectées sous forme de complexes antigène-anticorps (481). Cette phase est suivie par des anticorps anti-gp41 qui circulent quelques jours plus tard, les anticorps anti-gp120 arrivent quelques semaines plus tard et ciblent principalement la boucle V3. Cependant, ces anticorps contraignants n'ont aucun effet détectable sur la virémie (481) et n'exercent apparemment aucune pression immunitaire sélective sur l'enveloppe (482). Les NAb contre la souche infectieuse (virus autologue) apparaissent des mois plus tard mais ne sont pas capables de neutraliser des virus plus divergents isolées chez d'autres individus (virus hétérologues) (411-413, 483-485). Ces NAb autologues entraînent une évasion du virus à la neutralisation, ce qui est confirmé par la faible sensibilité des virus contemporains à la neutralisation autologue en comparaison aux virus antérieurs, bien que les virus ultérieurs demeurent sensibles aux nouvelles réponses de NAb. L'échappement se produit à travers de simples substitutions, insertions et délétions d'acides aminés, et à via un "bouclier de glycanes évolutif", dans lequel les glycanes, qui évoluent, empêchent l'accès des NAb à leurs épitopes apparentés (412, 413, 486-489).

Anticorps neutralisants à large spectre

Les bNAb se développent 2-4 ans après la primo-infection chez environ 20% des individus. Cependant, des bNAb efficaces capables de neutraliser une large proportion d'isolats viraux (>70%) sont produits seulement chez 1 à 2 % de la population. Le développement de la diversité de neutralisation est associé à de fortes charges virales et à une perte précoce des cellules T CD4+. Le développement d'une forte diversité de neutralisation ne semble pas avoir un impact sur la progression de la maladie. De nombreux patients inclus dans cette étude ont été mis sous ART, même ceux avec la plus large diversité de neutralisation (490). Cependant, les bNAb ont été montrés comme capables de diminuer fortement la virémie lorsqu'ils sont administrés aux macaques infectés par SHIV (491). Les hypermutations sont nombreuses au niveau des chaînes variables lourdes et légères des bNAb. Environ 40% des acides aminés sont substitués dans ces régions et la plupart des bNAb présentent une boucle variable de la chaîne lourde (CDRH3) inhabituellement longue permettant d'accéder à des régions peu accessibles du VIH (492).

Ces modifications supposent donc de multiples cycles de maturation des cellules B dans les CG et donc un rôle des Tfh dans la génération des bNAb (493).

Aujourd'hui, la recherche vaccinale se concentre sur l'induction de cellules B produisant des anticorps bNAb. Il a été déterminé quel était le répertoire de cellules B, avant la maturation d'affinité, à l'origine des bNAb, qu'on appelle les cellules B « germline ».

L'idée générale est donc de concevoir des enveloppes virales, qui vont permettre la stimulation de ces cellules B « germline ». Très récemment, et pour la première fois, une étude a réussi à induire des bNAb par vaccination capables de neutraliser 96% de la diversité virale, chez la vache (494).

C.7. Impact du VIH sur la réponse T CD4+ spécifique du VIH

C.7.1 Perte de fonction : focus sur le sous type-Th1

Dysfonction au niveau cellulaire

Suite à la reconnaissance initiale de l'Ag, les cellules T CD4+ naïves spécifiques du VIH surexpriment les marqueurs HLA-DR et CD25, subissent plusieurs cycles de division cellulaire, puis se différencient en cellules effectrices ou mémoire (495, 496). Les cellules T CD4+ spécifiques du VIH sont très peu fréquentes *in vivo*, et l'un des premiers signes de leur dysfonction, est leur incapacité à achever leur différenciation malgré une exposition chronique à des taux élevés d'Ag viraux (497). La fonctionnalité altérée des cellules T CD4+ spécifiques du VIH se manifeste également par une capacité proliférative diminuée (498, 499) et une polyfonctionnalité réduite (capacité à produire simultanément des cytokines multiples) (500, 501). En particulier, les cellules T CD4+ Th1 spécifiques de Gag qui présentent un profil de différenciation biaisé, perdent leurs capacités prolifératives et passent d'un phénotype CM produisant de IL-2 vers un phénotype EM avec une production d'IFN γ et de TNF α limitée (500, 501). Alors que certains marqueurs d'activation sont conservés, comme CD69 et OX40, l'expression de CD40L est altérée chez les patients infectés par le VIH. Ce défaut est attribué à la dérégulation de la production d'IL-12 observée dans l'infection à VIH, qui est médiée par l'engagement du CD4 par la gp120 (502).

Les cellules T CD4+ dans l'infection à VIH surexpriment des marqueurs d'épuisement

Les cellules T CD4+ spécifiques du VIH surexpriment la molécule PD-1, ce qui est corrélée avec la progression de la maladie (503, 504). En effet, l'expression de PD-1 chez les cellules spécifiques est positivement corrélée avec la charge virale et négativement avec le nombre de cellules T CD4+. La neutralisation *in vitro* de la voie de signalisation de PD-1 restaure la capacité de prolifération et la sécrétion de cytokines chez les cellules T CD4+ spécifiques au VIH notamment l'IL-2 et l'IFN γ (505). De plus, les cellules T CD4+ spécifiques du VIH expriment CTLA-4 à des niveaux plus élevés, CTLA-4 agissant de manière semblable à PD-1 en induisant un dysfonctionnement des lymphocytes T CD4+ (506). La co-expression de PD-1, CTLA-4 et Tim-3 a été associée au phénotype le plus sévère de dysfonction chez les cellules T CD4+ (507). La voie de signalisation de l'IL-10 est induite chez les cellules T CD4+ spécifiques du VIH épuisées, inhibant davantage leurs fonctions. Le blocage *in vitro* de PD-1 et de l'IL-10 induit une restauration de la réponse IFN γ (508, 509). Plus récemment il a été montré que LAG-3, qui interagit directement avec le CMH-II pour inhiber la réponse T, est surexprimé dans les cellules T CD4+ et T CD8+ activées dans l'infection progressive à VIH et corrèle avec la progression de la maladie. Le blocage de LAG-3 par des anticorps restaure les réponses T anti-VIH des cellules de patients dans des expériences *in vitro* (510).

Les cellules T CD4+ dans l'infection à VIH montrent une signalisation TCR aberrante

À l'instar des cellules T CD8+ spécifiques du VIH, les cellules T CD4+ spécifiques du VIH montrent également une perturbation de la voie de signalisation de leur TCR qui se manifeste par la régulation négative de la chaîne CD3z, et qui est corrélée à la progression de la maladie (511). La signalisation des cellules T CD4+ induite soit par l'interaction du TCR, soit par la stimulation par PMA / Ionomycine ou IL-2, s'est révélée atténuée chez les patients présentant une infection par le VIH progressive, mais pas chez les LTNP. Cette entrave a été associée à des niveaux accrus de phosphorylation basale (512). De plus, les cellules T CD4+ provenant de patients infectés présentent une perturbation au niveau du recrutement de Lck et de l'actine F au site de la synapse immunologique. Cette inhibition est médiée par l'engagement du récepteur CD4 par la gp120 (513).

Perte dans l'aide aux cellules T CD8+

Dans le contexte de l'infection à VIH, les anomalies fonctionnelles des cellules T CD8+ conduisent à une diminution de la prolifération et de la production de cytokines, ce qui accentue la dépendance des cellules T CD8+ à l'aide des cellules T CD4+, notamment pour la sécrétion d'IL-2. Cependant, l'appauvrissement et le dysfonctionnement préférentiel des cellules T CD4+ spécifiques au VIH entraînent une altération de l'aide apportée aux cellules T CD8+ (461, 511). Une étude de Lichtenfeld et al. souligne la nécessité de l'aide apportée par les cellules T CD4+ afin de maintenir une réponse T CD8+ spécifique du VIH effective. *In vitro*, la déplétion des cellules T CD4+, ou bien la neutralisation de l'IL-2, entraîne la suppression des capacités prolifératives des cellules T CD8+ spécifiques au VIH. L'ajout de cellules T CD4+ autologues isolées lors de la phase d'infection aiguë restaure la lymphoprolifération des cellules T CD8+ spécifiques au VIH. *In vivo*, la restauration des réponses « helpers » des cellules T CD4+ par vaccination conduit à une prolifération accrue des cellules T CD8+ spécifiques du VIH après stimulation peptidique *in vitro* (514). Les cellules T CD4+ sont essentielles pour le recrutement des CTL provenant de la circulation périphérique vers les sites d'infection via la sécrétion d'IFN γ et de chimiokines comme CXCL9 et CXCL10 (515). Ainsi, la conservation d'une réponse effective par les cellules T CD4+ au cours de l'infection à VIH peut aider au maintien du nombre de cellules T CD8+ et de leurs fonctions effectrices, contribuant ainsi à des réponses immunitaires anti-VIH efficaces. L'importance d'une réponse T CD4+ efficace dans l'établissement d'un contrôle durable de l'infection VIH est mise en évidence chez les Contrôleurs du VIH, qui maintiennent les fonctions T CD4+ et CD8+ intactes en plus d'une charge virale indétectable.

En plus d'être dysfonctionnelles, plusieurs groupes ont montré que les cellules T CD4+ spécifiques du VIH sont particulièrement susceptibles à l'infection par le VIH (498, 516, 517), jouant ainsi un rôle direct dans la perte de la réponse T CD4+ et alimentant la propagation virale.

C.7.2 Tfh dans l'infection chronique à VIH

Les caractéristiques clés de la pathogénèse de l'infection à VIH sont l'activation immune globale et la perturbation du compartiment B. Il est donc essentiel de comprendre le rôle de la réponse Tfh dans l'infection VIH et leur implication dans la perturbation du compartiment B, ainsi que leur implication dans une réponse humorale efficace et notamment dans le

développement de bNAb. La production de bNAb nécessite un nombre d'hypermutations somatiques très important, ce qui suggère que les cellules Tfh jouent un rôle critique dans la capacité du système immunitaire à générer ces anticorps.

L'accumulation des Tfh en phase chronique de l'infection VIH

Alors que l'on observe une perte des cellules Tfh durant la phase aiguë de l'infection à VIH/SIV, la phase chronique est caractérisée par une accumulation aberrante des cellules Tfh activées dans les OLII. L'expansion de cellules Tfh durant la phase chronique est en complète opposition avec la perte des cellules T CD4⁺ activées dans l'infection progressive non-traitée. (430) (409, 518) (519). Dans l'infection à VIH, Linqdvist et al., montrent qu'au sein des Tfh, les cellules spécifiques du VIH sont fortement amplifiées, particulièrement les cellules Tfh spécifiques de Gag. Leurs travaux suggèrent que la stimulation répétée des cellules Tfh due à la persistance antigénique, est l'un des facteurs permettant d'expliquer leur accumulation dans les OL (520). En effet, plusieurs études font le lien entre la charge virale et l'accumulation des Tfh dans les OL : le traitement antirétroviral induit une diminution de la fréquence des Tfh dans les OL (430) (520), tandis que l'infection contrôlée du SIV soit par vaccination, soit naturellement, présente une fréquence de Tfh modérée en comparaison avec la forte accumulation observée dans l'infection progressive à SIV (521) (522).

Plusieurs études suggèrent que la cytokine pro-inflammatoire IL-6, dont le niveau plasmatique est augmenté durant l'infection VIH, et qui permet la différenciation des Tfh, doit jouer un rôle dans l'expansion anormale de ce sous-type cellulaire. En effet, le fait qu'il y ait une expansion des Tfh durant la phase chronique de l'infection plutôt que lors de la phase aiguë, suggère que l'activation immune, plus que le niveau antigénique, puisse induire l'expansion des cellules Tfh. Les cellules Tfh proliférant peu en phase chronique, une différenciation préférentielle en Tfh des cellules T CD4⁺ pourrait être la cause de cette accumulation. (518, 523) (524).

Une autre étude a montré que la perte des cellules T folliculaires régulatrices (Tfr), permettant de réguler le degré de prolifération et d'activation des cellules folliculaires, pourrait aussi contribuer à l'accumulation des cellules Tfh durant la phase chronique de l'infection (525). A l'opposé, Boswell et al. montrent une perte des cellules Tfh durant l'infection progressive à VIH. Mais dans cette étude, les auteurs se sont intéressés non plus aux cellules Tfh des CG mais aux Tfh mémoires circulantes du sang périphérique. Les cellules étudiées sont de

phénotype CCR7^{hi} CCR6^{hi} CXCR5^{hi} PD-1^{hi}, un sous-type cellulaire qui dans cette étude possède un profil proche des Tfh des CG et qui a une meilleure capacité d'aide aux cellules B *in vitro* en co-culture (70).

L'accumulation des Tfh est corrélée avec la perturbation du compartiment B

L'expansion des Tfh est corrélée à l'hyperplasie des follicules, l'augmentation de la fréquence des cellules B des CG et des cellules B plasmatiques, ainsi qu'à la perte des cellules B mémoires. Concernant la réponse anticorps, l'expansion des cellules Tfh est corrélée avec l'hypergammaglobulinémie typique de l'infection chronique à SIV/VIH, ainsi qu'à l'augmentation d'IgG spécifiques anti-SIV. En effet, Petrovas et al. décrivent une association positive entre la fréquence des cellules Tfh, l'expansion du compartiment B, et l'augmentation d'anticorps circulants de forte affinité contre le SIV, ce qui suggère que l'infection chronique à SIV pourrait ne pas perturber la maturation et la production d'anticorps spécifiques du SIV (518, 523). Néanmoins, la maturation d'affinité pourrait malgré tout être perturbée, bien qu'une fréquence élevée de Tfh induit la prolifération des cellules B, et la stimulation antigénique constante induit une perte de compétition et conduit à la sélection de cellules B de faible affinité (493).

Dysfonction des cellules Tfh dans l'infection VIH

Dans le contexte de l'infection à VIH, une fonction Tfh inadéquate peut expliquer les anomalies fonctionnelles observées dans le compartiment B. En effet, même chez les patients traités, où l'accumulation des Tfh est modérée, une étude sur la réponse vaccinale à H1N1, montre que la fréquence de non-répondeurs au vaccin est plus importante chez les patients traités que chez des individus sains. De plus, la perte de la réponse au vaccin antigrippal corrèle avec une absence du pic de cTfh dans la circulation après vaccination. Enfin, les cTfh de patients non-répondeurs perdent leur fonction helper en comparaison aux répondeurs : perte de la production d'IL-21 et perte de l'aide à la production d'anticorps par les cellules B *in vitro* (66, 526).

Cubas et al. ont montré une augmentation de l'expression de PDL-1 sur les cellules B de patients infectés, qui a pour conséquence une inhibition de la fonction Tfh médiée par l'interaction PD-1 / PDL-1. Ils observent lors de co-cultures entre des Tfh et des cellules B mémoires de patients, une perte de l'expression d'ICOS et de la production d'IL-21 par les

cellules cTfh, ainsi qu'une perte de la survie et de la production d'IgG par des cellules B. Le blocage de PDL-1 ou l'ajout d'IL-21 permet la restauration de la production d'IgG dans le système de co-culture Tfh-B. Ces résultats suggèrent que les cellules Tfh de patients infectés par le VIH sont incapables de fournir des signaux adéquats aux cellules B, et que cela peut être expliqué par la dérégulation de l'expression de PDL-1 sur les cellules B (67).

D'autres signes d'altération des cellules Tfh ont été rapportés durant l'infection SIV chronique pouvant expliquer la dysfonction des Tfh dans l'infection, notamment l'induction de cellules Tfh avec un profil Th1, exprimant IL-21, CXCR3, CCR5 et IFN γ . Les auteurs suggèrent que l'expansion de ce sous-type Tfh-Th1 contribue à l'hypergammaglobulinémie. Une étude récente, étudiant les cTfh montre un défaut fonctionnel des cellules cTfh chez les patients traités en comparaison des patients Contrôleurs. En effet, les cTfh de patients traités ont un phénotype plus Th1, avec une production d'IFN γ et d'IL-2 perturbant la production d'anticorps par les cellules B en co-culture *in vitro*. Les auteurs montrent que ce phénotype Th1 est associé à une perte des cellules B mémoires spécifiques du VIH *ex vivo*. Colineau et al. montrent un défaut des Tfh de la rate chez des patients infectés par le VIH. En effet, l'expression de molécules de costimulation (OX40 et CD40L), nécessaires à l'interaction et l'aide des cellules B, est diminuée chez les individus infectés par le VIH comparés aux individus sains (527).

Il est donc probable que la pauvre qualité des anticorps produits durant l'infection VIH soit la résultante de plusieurs facteurs, incluant la dysfonction Tfh / B, le haut niveau d'antigénémie et l'activation immunitaire.

Les Tfh, compartiment majeur de l'infection, de la réplication, et de la production virale

L'expansion des cellules Tfh spécifiques du VIH/SIV semble en contradiction avec la profonde déplétion des cellules CD4⁺ spécifiques observée durant l'infection VIH, ce qui pourrait laisser penser que les cellules Tfh sont protégées de l'infection / déplétion. Mais au contraire, il s'est révélé que la population Tfh dans les OL est le compartiment majeur de l'infection, de la réplication, et de la production de VIH/SIV (430, 431) (519, 524). Plusieurs études montrent que les Tfh sont un compartiment réservoir de l'infection VIH/SIV, que cela soit chez les patients traités ou dans l'infection contrôlée VIH/SIV (430, 521, 522). Dans l'infection chronique à SIV, les cellules Tfh produisent en moyenne 6,5 fois plus d'ARN viral que les cellules T CD4⁺ extrafolliculaires (528) alors que dans l'infection SIV non pathogénique de sooty mangabeys, la réplication virale ne se concentre pas dans les follicules. Enfin, le compartiment mémoire circulant est aussi un réservoir majeur de l'infection VIH

chez les patients traités. Parmi les cellules circulantes CM de longue durée de vie, les cellules Tfh sont les plus susceptibles à l'infection et celles qui possèdent le plus d'ADN viral. Même en présence d'antirétroviraux efficaces qui permettent le contrôle de la virémie, le VIH persiste dans ces cellules. Les auteurs suggèrent que ces cTfh infectées proviennent des Tfh des CG (529).

Le mécanisme qui induit une forte réplication virale dans les Tfh n'est pas bien compris. Plusieurs facteurs ont néanmoins été mis en avant.

Facteurs participants à l'infection préférentielle des Tfh

Un facteur qui pourrait contribuer à une forte infection et réplication des Tfh, vient de la présence du réseau de DC folliculaires dans les follicules, qui sont fortement associées aux virions et à proximité des Tfh dans les CG.

Un autre facteur, est la présence de sanctuaires due à la faible fréquence de cellules T CD8+ spécifiques du VIH exprimant le récepteur CXCR5 leur permettant de migrer dans les CG et d'éliminer les cellules Tfh infectées (409). En effet, une étude montre un lien entre la fréquence des cellules T CD8+ exprimant CXCR5 présentes dans les follicules B suite à une vaccination et le contrôle partiel de l'infection suite à un challenge avec SIV (530).

Le groupe de Connick montre que les Tfh d'amygdales humaines sont fortement permissives *ex vivo*, mais cette forte permissivité ne peut pas être expliquée par une différence de sous-types mémoires, d'activation cellulaire ou d'expression de corécepteurs à l'entrée virale (CCR5 et CXCR4) (528). Plusieurs autres études ont référencé que malgré une forte réplication dans les cellules Tfh, il y a une perte d'expression de CCR5 et des autres corécepteurs de l'entrée dans les cellules Tfh lors de l'infection progressive à SIV. L'analyse des séquences d'enveloppes ne montre pas de mutations particulières suggérant que le virus utilise les corécepteurs habituels pour infecter les cellules Tfh. Ces deux groupes suggèrent que le SIV et le VIH infectent les précurseurs de Tfh qui expriment CCR5 afin d'établir l'infection dans les Tfh (519, 521, 524, 531).

L'infection perturbe la fonction Tfh

En opposition avec l'étude de Chowdhury et al., plusieurs groupes montrent une l'augmentation des Tfr dans les LN et dans la rate durant l'infection à VIH/SIV (527, 532). Le

groupe de Connick démontre *ex vivo* que l'augmentation de Tfr est directement liée à l'infection. Il montre que l'augmentation des Tfr dérèglent l'activité des Tfh et suggère un rôle des Tfr dans la dysfonction de la réponse Tfh dans l'infection VIH (532).

L'infection induit aussi une diminution de l'expression de CXCR5 dans la population Tfh, ce qui pourrait avoir pour conséquence la sortie des cellules infectées des CG et donc une perte de l'aide aux cellules B ainsi que la propagation de l'infection dans un contexte immunodépressif (528).

Enfin on observe une ultime déplétion des Tfh durant la phase SIDA dans l'infection progressive à SIV, cette perte étant liée à l'apoptose des cellules Tfh qui sont suractivées conduisant à la perte de l'aide aux cellules B (524).

Les réponses Tfh associées à une production efficace d'anticorps anti-VIH

Plusieurs études ont essayé de comprendre quels sont les marqueurs associés à une bonne réponse Tfh qui permettrait d'induire une réponse anticorps de bonne qualité. Schultz et al. ont montré que les cellules circulantes spécifiques du VIH sécrétant de l'IL-21 sont proches transcriptionnellement des Tfh des CG. Les patients progressifs avec une charge virale basse présentent une proportion plus importante de ces cellules spécifiques du VIH sécrétant de l'IL-21. De plus, comparées aux cellules IFN- γ +, les cellules IL-21+ étaient surtout engagées dans une réponse contre Env, et ces cellules IL-21+ spécifiques de Env sont particulièrement efficaces dans l'aide aux cellules B. Enfin, les individus vaccinés dans le cadre de l'essai vaccinal RV144, montrent une fréquence supérieure de ces cellules spécifiques pour Env sécrétant de l'IL-21 par rapport aux participants des autres essais vaccinaux qui n'étaient pas protecteurs (137).

Plusieurs études de groupes indépendants ont permis de montrer que la fréquence des cTfh chez les patients infectés corrèle avec la production de bNAb. En effet, Locci et al. ont montré que les cTfh (CXCR5+ PD-1+ CXCR3-) sont proches transcriptionnellement et fonctionnellement des cellules Tfh des CG et que leur fréquence est augmentée chez les individus capables de produire des bNAb (68). Dans une autre cohorte, la fréquence de cTfh corrèle aussi avec la capacité de neutralisation d'une grande diversité de virus (533). Enfin, l'analyse de deux cohortes additionnelles a permis de montrer une forte corrélation entre la fréquence de cTfh et la génération de bNAb (534). L'étude de l'infection SIV et SHIV dans des RhMs a fourni des preuves supplémentaires de l'association des Tfh et de la génération de

bNAbs. L'infection de RhMs avec SHIV_{AD8} induit la production de bNAbs en corrélation avec la fréquence et la réponse des Tfh spécifiques pour Env des CG (535).

Alors que l'accumulation des Tfh dans l'infection progressive à VIH est associée avec la dysfonction du compartiment B et l'hypergammaglobulinémie, de manière paradoxale, l'augmentation de la fréquence des Tfh (CG et circulants) est l'un des seuls corrélats avec le développement de bNAbs qui requièrent un grand nombre de mutations et donc une importante aide des Tfh.

C.7.3 Susceptibilité à l'infection des cellules T CD4+ spécifiques

Plusieurs processus sont à l'origine de l'infection préférentielle des cellules T CD4+ spécifiques. Les cellules T CD4+ naïves spécifiques au VIH, qui sont activées lors de la première rencontre avec des Ag du VIH *in vivo*, se trouvent à proximité immédiate des DC contenant du VIH. Ces cellules sont alors très sensibles à l'infection par le VIH puisqu'elles se divisent durant leur expansion initiale et qu'elles se différencient en cellules T effectrices. De plus, les réponses des cellules T CD4+ spécifiques au VIH sont souvent conservées en phase d'infection chronique et se propagent dans les tissus lymphoïdes périphériques, où la réplication virale et l'activation des cellules T sont prolifiques. La réplication virale locale des cellules T CD4+ spécifiques du VIH peut alors expliquer la fréquence plus élevée d'infection des cellules T CD4+ mémoires spécifiques du VIH. Douek et al. ont montré qu'après interruption du traitement, les cellules T CD4+ spécifiques du VIH sont préférentiellement infectées, suggérant que le pool de cellules T CD4+ spécifique du VIH est continuellement reconstitué et qu'intrinsèquement ces cellules sont plus susceptibles à l'infection (498, 516, 517). Moris et al. ont démontré *in vitro* le processus de transmission préférentielle des DC infectées aux cellules T CD4+ spécifiques du VIH. En réalisant des cocultures de clones T CD4+ spécifiques de Gag avec des DC infectées *in vitro*, ils ont montré que la présentation d'antigènes viraux par les DC infectées conduisait à l'activation des clones T CD4+ spécifiques de Gag favorisant ainsi la transmission du virus à ces lymphocytes (536).

Le groupe d'Harari insiste sur le fait qu'une proportion substantielle de cellules T CD4+ spécifiques au VIH-1 est présente dans les populations de cellules T CD4+ CM et qu'un pourcentage important de cellules T CD4+ EM sont CCR5+ et Ki67+. Par conséquent, l'expression du corécepteur principal pour le VIH et la capacité de prolifération peuvent

potentiellement rendre les cellules CD4+ CCR7- hautement susceptibles à l'infection par le VIH (498, 516, 517).

D. Contrôle de l'infection à VIH

D.1. Contrôleurs du VIH – Définition

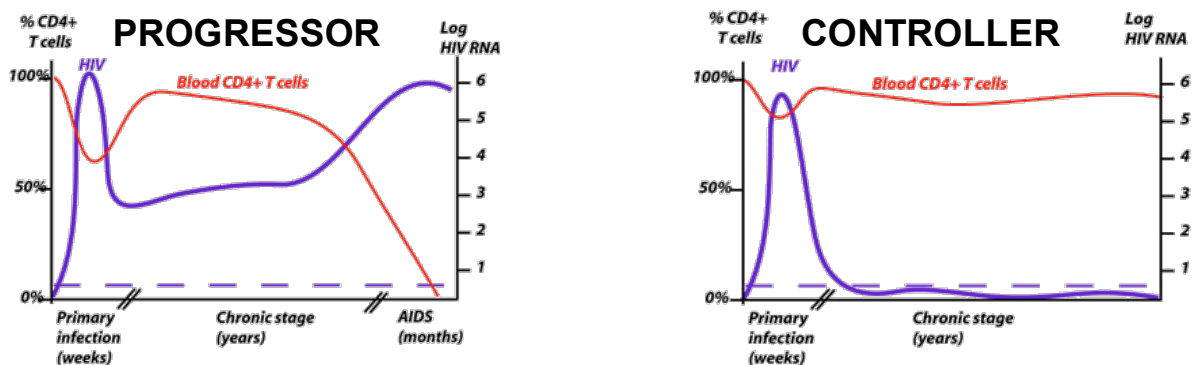


Figure 20: Graphique décrivant la progression dans la maladie d'un Contrôleur du VIH vs un progressor chronique

La comparaison du développement de l'infection par le VIH-1 révèle la différence marquée entre un chronique progressor et un Contrôleur du VIH. Les Contrôleurs du VIH maintiennent efficacement leurs charges virales inférieures au seuil de détection tout en maintenant leur taux de cellules T CD4+ à des niveaux presque normaux. (Les courbes rouges représentent le nombre de cellules T CD4+, les courbes violettes représentent des charges virales du VIH).

Long Term non progressors

La plupart des personnes infectées par le VIH développent une infection progressive conduisant au SIDA en l'absence de traitement antirétroviral. Cependant, un petit groupe d'individus se sont révélés être asymptomatiques pendant de longues périodes sans avoir besoin d'intervention thérapeutique. Ces individus, appelés Long Term Non Progressors (LTNP), ont été identifiés environ 10 ans après la découverte initiale du VIH. Les LTNP, qui représentent environ 5% des individus infectés par le VIH-1, ont été définis sur la base d'un comptage CD4 élevé et stable, correspondant généralement à des niveaux > 500 ou > 600 cellules T CD4+ / mm^3 pour une durée supérieure de 5 à 10 ans (537, 538). Cependant, avec l'émergence des techniques basées sur la PCR permettant l'évaluation de la charge virale, il est devenu évident que ce groupe de patients était plus hétérogène que ce qu'on avait pu

imaginer. Deux sous-groupes de patients bien distincts ont émergé selon des critères dits virologiques (charge virale): les Contrôleurs « viremic » et les Contrôleurs du VIH. Les Contrôleurs « viremic » (jusqu'à 7% des personnes infectées par le VIH) sont des patients infectés par le VIH qui maintiennent des charges virales faibles (<2000 copies de l'ARN VIH-1 / mL de plasma) pendant plus d'un an et en l'absence d'intervention thérapeutique.

Les Contrôleurs du VIH

Les Contrôleurs du VIH ou Contrôleurs élités représentent environ 0,5% des personnes séropositives du VIH (allant de 0,2% à 1% selon la définition choisie). La définition des Contrôleurs du VIH varie selon la cohorte étudiée, en fonction de la durée du contrôle et des seuils de charge virale (539-541). Dans notre étude, les Contrôleurs du VIH sont définis comme des individus infectés par le VIH, qui maintiennent moins de 50 copies d'ARN viral par mL de plasma pendant au moins 5 ans, en l'absence de traitement antirétroviral.

D'ailleurs, des critères plus stricts ont été associés à un meilleur résultat clinique. Comme l'ont démontré Okulicz et ses collègues (538), les Contrôleurs « viremic » (50-2000 copies d'ARN / mL) montrent des taux de progression vers la maladie ainsi qu'un déclin du nombre de leurs cellules T CD4+ plus rapide que chez les Contrôleurs du VIH (<50 copies d'ARN / mL) (542, 543). De plus, la durée du contrôle de l'infection est aussi un paramètre important, les LTNP ayant maintenu un nombre de cellules T CD4+ > 500 cellules / mm³ pendant 7 ans ont enregistré des taux de mortalité plus élevés que les LTNP qui ont maintenu des taux élevés de cellules T CD4+ pendant 10 ans (538).

Comme les Contrôleurs du VIH sont uniquement définis en fonction du critère virologique, certains de ces rares patients présentent une perte progressive de leur nombre de cellules T CD4+, avec dans certains cas des infections opportunistes mais en absence d'ARN viral détectable en périphérie.

Le fait que l'épuisement immunitaire puisse se produire en l'absence de réplication virale massive est assez intrigant et pourrait être dû à une activation immunitaire anormale et / ou une diminution de la production thymique (544, 545).

D.2. Paramètres viraux dans le contrôle de l'infection à VIH

D.2.1 Réplication virale résiduelle

La réplication virale n'est pas absente chez les Contrôleurs du VIH, mais elle est maintenue à des niveaux très faibles. Des tests de la charge virale hautement sensibles ont montré une concentration virale médiane de 2 copies d'ARN / mL, avec moins de 10% des Contrôleurs

présentant une charge virale persistante en dessous du seuil de détection de 0,2 copie / mL (546). Ces niveaux sont comparables à ceux trouvés chez les patients recevant un traitement antirétroviral efficace (547). Le matériel viral associé aux cellules (ADN et ARN) a été détecté dans la majorité des cas chez les Contrôleurs (548). Les analyses ont montré un certain degré d'évolution de la séquence virale chez ces patients, et ces études longitudinales suggèrent une réplication virale (549). Contrairement aux individus exposés séronégatifs, où le virus reste cantonné au site d'infection, il y a une répartition systémique du VIH chez les Contrôleurs (550). Mais le plus souvent, les Contrôleurs du VIH sont détectés après plusieurs années d'infection silencieuse.

La réplication virale durant le stade d'infection aiguë chez les Contrôleurs

Cependant, il a été observé des cas d'infection primaire chez des individus qui plus tard sont devenus Contrôleurs (538, 551-553). À partir de ces études, il a été établi que les Contrôleurs font un pic précoce de charge virale, qui est par la suite contrôlé, mais ce pic de réplication semble atteindre des valeurs inférieures à celles de la majorité des patients.

L'étude CASCADE, dont l'intérêt principal réside dans le suivi à long terme des patients après séroconversion, a été menée à partir de données provenant de 22 cohortes de patients vivant avec le VIH en Europe, au Canada et en Australie pendant une durée de 5 ans. Cette étude a indiqué que le Contrôle du VIH s'établit progressivement après le stade de l'infection aiguë, avec un délai médian de 10 mois (552). Le délai de contrôle du VIH variait entre les patients, allant de <1 mois à 3 ans de réplication virale détectable (538, 551, 552). Une étude publiée en 2005 a montré que 6,7% des séroconvertis contrôlent partiellement leur charge virale après la phase aiguë (<500 copies / mL) et ont réussi à maintenir de faibles taux de réplication virale pour une durée médiane de 11,9 mois (554).

Charge virale et maintien du contrôle

Une fois que le contrôle viral est maintenu pendant quelques années, il acquiert un phénotype plus stable. Par exemple, les patients de l'étude CASCADE, qui contrôlaient l'infection depuis 5 ans après la séroconversion, avaient 0,74 chance de conserver leur statut de Contrôleur jusqu'à 20 ans après la séroconversion (552). Une analyse rétrospective de plus de 15 ans indique que les Contrôleurs avec des "blips" viraux (brefs et faibles rebonds de la charge virale) ou des épisodes intermittents de réplication virale limitée sont plus susceptibles de montrer une pente de cellules T CD4+ négatives que les contrôleurs avec des charges virales

indétectables persistantes (555). Avec la disponibilité d'outils de diagnostic permettant la détection de charges virales ultra-sensibles, il est devenu évident que même des niveaux extrêmement faibles de réplication virale peuvent avoir un effet délétère à long terme, car les Contrôleurs ayant des charges virales supérieures au seuil de 1 copie / mL sont plus susceptibles d'avoir une diminution des lymphocytes T CD4+, que ceux avec une charge virale indétectable (546).

Chez les patients Contrôleurs, le statut d'activation des cellules T CD4+ et T CD8+ ainsi que le niveau d'expression de la chimiokine CXCL10 chimio-attractante des cellules T, sont associés à un risque élevé de perte du contrôle viral (556).

D.2.2 *Fitness et génétique du virus*

Si une forme d'aptitude virale réduite peut expliquer le statut de Contrôleur du VIH, ceci reste malgré tout un problème débattu. Les premiers rapports ont mis en évidence la présence de virus défectueux ou atténués dans certains LTNP. Des études suggèrent que chez certains patients, des délétions dans le gène *nef* provoquent une réplication virale de faible niveau (557-559). Cependant, ces rapports se sont révélés être l'exception plutôt que la règle, car le séquençage complet des isolats viraux de Contrôleurs n'a révélé aucune altération majeure. De plus, l'analyse de ces séquences au niveau de la population indique que les délétions importantes dans *nef* ne représentent qu'une minorité des cas de contrôle du VIH (560). Depuis, un nombre croissant d'études ont signalé l'isolement de virus VIH compétents et réplicatifs chez les Contrôleurs.

Un cas a été reporté, où un virus compétent, isolé d'un patient Contrôleur, a causé une infection progressive à VIH lorsqu'il a été transmis à d'autres patients. À l'inverse, la transmission du VIH de patients progresseurs chroniques (CP) à des patients qui sont devenus par la suite Contrôleurs du VIH a également été documentée (561, 562).

Ces résultats suggèrent que la majorité des Contrôleurs du VIH sont infectés par un virus compétent. Cela signifie donc que ce sont probablement les facteurs de l'hôte, génétiques et / ou immuno-médiés, qui régissent le contrôle de la virémie. L'étude des facteurs de l'hôte et leurs rôles dans la médiation d'une réponse immunitaire efficace peuvent contribuer au développement de nouvelles stratégies pour un vaccin thérapeutique anti-VIH-1 efficace.

D.3. Facteurs génétiques de l'hôte dans le contrôle de l'infection à VIH

D.3.1 HLA de classe I

Les Contrôleurs du VIH montrent une surreprésentation des allèles spécifiques "protecteurs" HLA de classe I par rapport aux patients progressseurs du VIH. Parmi ces allèles on trouve HLA-B * 57, HLA-B * 27, HLA-B * 58, HLA-B * 81 et HLA-B * 13 (563-567). Les allèles HLA protecteurs sont présents dans 67% des Contrôleurs, mais ne sont exprimés que dans 37% des CP, tandis que le sous-ensemble HLA-B * 35-Px et HLA-B * 07 est enrichi chez les CP (568, 569). Avec le développement des études d'association génomique à large spectre (GWAS), il est devenu possible d'analyser plus d'un million de polymorphismes nucléotidiques (SNP) dans le génome humain en association de la progression dans la maladie. Les analyses GWAS réalisées dans des cohortes à grande échelle, ont révélé que les seules associations significatives avec la progression de la maladie du VIH étaient des SNP situés dans la région du CMH sur le chromosome 6, avec une contribution claire des gènes du CMH de classe I (570) et une contribution possible des gènes de CMH de classe II (571). Bien que l'association génétique dominante avec le contrôle du VIH se trouve au sein du HLA-B, un autre polymorphisme a été détecté en amont de HLA-C (572). Ces associations entre l'expression de la molécule HLA de classe I et le contrôle de la virémie, combinées au fait que les réponses CTL restreintes HLA B * 57 / B27 semblent immunodominantes et particulièrement efficaces chez les Contrôleurs, suggèrent fortement que les cellules T CD8+ jouent un rôle clé dans la lutte contre l'infection à VIH.

D.3.2 HLA de classe II

La contribution des allèles du CMH de classe II dans le contrôle du VIH a été moins analysée. Plusieurs rapports ont montré un enrichissement de certains allèles du CMH de classe II chez les Contrôleurs du VIH. On a constaté que les patients possédant HLA DRB1 * 13 avaient de meilleures réponses T CD4+ au niveau la muqueuse (573). Dans une autre étude, les patients exprimant HLA DRB1 * 13 en association avec HLA DQB1 * 06, ont affiché de meilleurs taux de prolifération et une sécrétion d'IFN γ augmentée en réponse à une stimulation par la p24 du VIH-1 (574). Un autre exemple de l'implication de cet allèle dans le contrôle du VIH provient d'une étude démontrant que l'allèle DRB1 * 1303 était associé à des charges virales plus faibles (575). En 2013, Ranasinghe et al., ont effectué une analyse à grande échelle de l'association de certains allèles HLA-DR avec la charge virale. Les résultats de cette étude

indiquent une association entre l'expression d'HLA DRB1 * 1502 et une charge virale faible. Dans cette analyse de plus de 1000 patients infectés, DRB1 * 1303 a également montré un effet protecteur. L'analyse *ex vivo* a révélé que les patients exprimant les allèles protecteurs montraient des réponses T CD4+ contre Gag et Nef plus diverses que les patients possédant les allèles HLA-DRB1 qui sont associés à une plus forte virémie (576).

D.4. Réponse immunitaire T CD8+ dans le contrôle de l'infection VIH

D.4.1 Les cellules T CD8+ chez les contrôleurs ne sont pas épuisées

Ces dernières années, il est devenu de plus en plus clair que c'est la qualité, plutôt que la quantité de réponses antivirales médiées par les cellules T CD8+ qui régit le contrôle immunitaire du VIH. L'analyse transcriptionnelle a révélé que les cellules T CD8+ de Contrôleurs expriment des quantités inférieures du gène PD-1 qui régule l'épuisement immunitaire (577). Une étude transversale a rapporté que les CTL de Contrôleurs expriment des niveaux inférieurs de marqueurs pro-apoptotiques (tels que la caspase-3 clivée), et qu'elles surexpriment des molécules anti-apoptotiques telle que Bcl-2 (578). Les cellules T CD8+ de Contrôleurs présentent des capacités prolifératives plus élevées, par rapport à celles de patients progressseurs (579). Elles ont également des télomères plus longs, ce qui suggère un fort potentiel d'auto-renouvellement (580). De plus, les cellules T CD8+ de Contrôleurs ont des réponses polyfonctionnelles suite à une stimulation antigénique, tandis que les cellules T CD8+ de CP ont une tendance à présenter une réponse monofonctionnelles comme des cellules effectrices (581, 582).

D.4.2 Les cellules T CD8+ de Contrôleurs possèdent des capacités cytotoxiques accrues

Les cellules T CD8+ de Contrôleurs sont capables d'inhiber efficacement la réplication virale de cellules T CD4+ autologues infectées par le VIH, dans des co-cultures *ex vivo* (583). L'augmentation de cette activité suppressive chez les patients Contrôleurs est liée aux niveaux d'expression élevés de granzymes et perforines dans des cellules T CD8+ spécifiques du VIH (584). L'analyse phénotypique des sous-populations de cellules T CD8+ de Contrôleurs a montré que les cellules T CD8+ EM présentent une meilleure capacité de suppression du VIH que les cellules T CD8+ CM (585). Les cellules T CD8+ des Contrôleurs sont capables d'éliminer les cellules T CD4+ infectées de manière latente suite à leur activation *in vitro*,

tandis que les lymphocytes T CD8⁺ des patients traités n'en sont pas capables (586), ce qui pourrait expliquer comment les Contrôleurs évitent ou limitent les épisodes de réplication du VIH.

D.4.3 La réponse T CD8⁺ contre Gag corrèle avec le contrôle de l'infection

Une étude a montré que les cellules T CD8⁺ de Contrôleurs hautement fonctionnelles étaient résidentes des tissus muqueux et qu'elles sont spécifiques de Gag (587). Un grand nombre de preuves suggèrent que le niveau de la réponse T CD8⁺ anti-Gag est corrélé avec une progression plus lente de la maladie (588-590), et que l'activité suppressive anti-VIH des cellules T CD8⁺ est fortement corrélée avec une réponse spécifique anti-Gag mais pas anti-Nef (591, 592). Ces corrélations peuvent suggérer que la faible virémie observée chez les Contrôleurs est causée par des réponses CTL anti-VIH hautement efficaces.

D.4.4 Les cellules T CD8⁺ sont de forte avidité chez les Contrôleurs du VIH

Les cellules T CD8⁺ de Contrôleurs du VIH présentent une forte avidité fonctionnelle, qui se traduit par leur capacité à répondre à de faibles quantités d'Ag du VIH (593, 594). Les réponses de Contrôleurs restreintes par les HLA-B * 57 et HLA B * 27 sont associées à des réponses T CD8⁺ de forte avidité (567, 593, 595). Il a également été proposé que les clonotypes de TCR dits "publics", *i.e* plusieurs patients Contrôleurs possédant les mêmes séquences TCR, offrent des réponses fonctionnelles de forte avidité (596, 597). Cette association entre la clonalité et l'avidité fonctionnelle a également été démontrée dans le contexte de l'infection primaire SIV chez les RhM (598).

Ainsi, il semble que les cellules T CD8⁺ des Contrôleurs du VIH soient dotées d'un ensemble de fonctions immunitaires antivirales, telles que l'auto-renouvellement, les réponses polyfonctionnelles des cytokines, une capacité cytotoxique élevée, une grande avidité fonctionnelle. Cet ensemble de propriétés peut permettre aux cellules T CD8⁺ de Contrôleurs d'inhiber la réplication virale et de maintenir des charges virales indétectables chez ces patients rares.

D.5. Réponse immunitaire humorale dans le contrôle de l'infection VIH

D.5.1 *Anticorps non neutralisants*

Plusieurs études montrent la présence d'anticorps capables d'induire la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) chez les patients Contrôleurs (599).

Plus récemment une étude montre une polyfonctionnalité des anticorps anti-VIH chez les Contrôleurs du VIH. En effet, les Contrôleurs montrent des réponses immunitaires humorales polyfonctionnelles capables d'induire de manière coordonnée l'ADCC, d'autres fonctions NK, la phagocytose des monocytes et des neutrophiles, et le complément. Cette réponse fonctionnellement coordonnée est associée à des réponses IgG3 / IgG1 qualitativement supérieures, alors que les réponses IgG2 / IgG4 spécifiques au VIH, répandues parmi les sujets virémiques, étaient associées à une activité globale des anticorps plus faible (600).

D.5.2 *Anticorps neutralisants à large spectre et diversité de neutralisation*

Les sérums des patients Contrôleurs montrent peu de diversité de neutralisation (564, 601, 602), étant donné leur charge virale faible. Mais chez les Contrôleurs, l'antigénémie et l'activation semblent aussi être les moteurs de la diversité de neutralisation. En effet, le groupe de Alter et al, montre que chez les Contrôleurs, la diversité de neutralisation est associée à un profil inflammatoire, incluant de hauts niveaux plasmatiques de CXCL13, sCD40L IP10, CCL5, TNF α , et la charge virale est associée à ces profils cytokiniques (603). Mais de manière intéressante, il a été montré que des Contrôleurs infectés par deux souches du VIH présentent un spectre de neutralisation par les anticorps plus large que des Contrôleurs infectés par une seule souche (604), suggérant que chez ces patients, la production d'anticorps de large spectre dépend non seulement de la quantité mais aussi de la diversité d'Ag.

L'analyse des bNAb à partir des cellules B mémoires triées capables de fixer le « core » de la gp120 modifiée, a montré des capacités similaires de neutralisation entre les anticorps de patients Contrôleurs et non-Contrôleurs (605) (606). De plus, de puissants bNAb provenant du compartiment B mémoire ont été découverts chez des Contrôleurs, notamment l'anticorps 3BNC117 ciblant le site de fixation de CD4 (607).

D.5.3 Réponse B mémoire chez les Contrôleurs du VIH

L'étude de la population totale des cellules B mémoires chez les Contrôleurs, révèle que ces individus montrent un compartiment B mémoire préservé en comparaison aux patients traités et aux CP. En effet, les Contrôleurs du VIH montrent une fréquence préservée de la population RM qui est corrélée négativement avec la charge virale, alors que cette population est perdue chez les patients traités aux dépens des populations AM et TLM qui sont propices à l'apoptose et à l'épuisement cellulaire (608). Dans l'étude de Buckner et al., qui ont étudié les cellules B mémoires spécifiques du VIH via l'utilisation d'une gp140 marquée, les Contrôleurs montrent un enrichissement des cellules B mémoires spécifiques de la gp140 dans le compartiment RM, alors que chez les patients traités, les cellules B mémoires spécifiques sont préférentiellement enrichies dans la population épuisée TLM.

Enfin, les Contrôleurs du VIH montrent une fréquence plus importante de cellules B mémoires spécifiques de la gp140 que les patients traités (609). Ces résultats ont été confirmés par de nombreux groupes (610-613), et suggèrent donc que les Contrôleurs possèdent un compartiment B mémoire spécifique de la gp140 préservé. Néanmoins, le compartiment B mémoire et les anticorps circulants sont déconnectés et la production d'anticorps spécifiques par les cellules B mémoires stimulées est différente de la quantité d'anticorps spécifiques dans le sérum (612). Mais récemment un groupe a montré qu'il pouvait y avoir un lien entre le compartiment mémoire et la circulation. En effet la fréquence de cellules B mémoires spécifiques de la gp140, chez les patients Contrôleurs portant l'allèle de protection B57, corrèle avec la diversité de neutralisation des sérums (613).

D.6. Réponse immunitaire T CD4+ dans le contrôle de l'infection VIH

Alors que le rôle des réponses T CD8+ dans la suppression de la réplication virale a été bien établi, la contribution des cellules T CD4+ dans le contrôle du VIH a été débattue (614, 615). Les cellules T CD4+ sont des médiateurs importants des réponses immunitaires antivirales, car elles fournissent une aide aux cellules B pour la maturation des anticorps, une aide au maintien des cellules T CD8+, et peuvent également exercer des effets antiviraux directs pour maintenir le contrôle de l'infection. Cependant, les cellules T CD4+ sont également les cibles préférentielles du VIH, et peuvent ainsi alimenter la propagation du VIH (517, 616). Cette partie décrit le statut et le rôle des cellules T CD4+ dans le contrôle de l'infection VIH.

D.6.1 *Maintien d'une réponse Th1 anti-Gag efficace de haute affinité*

Les réponses T CD4+ polyfonctionnelles spécifiques de Gag corrént avec le contrôle du VIH

Corrélation de la réponse Th1 anti-Gag avec le contrôle de l'infection

En 2012, Ranasinghe et al., ont montré que les réponses T CD4+ Th1 spécifiques de Gag étaient d'une plus grande amplitude, avec une plus large diversité d'épitopes, chez les Contrôleurs du VIH par rapport aux patients traités, et ces réponses étaient fortement associées à des niveaux inférieurs de virémie. Cette étude a identifié trois épitopes majeurs du VIH-1 dans Gag qui étaient liés au contrôle du VIH. En revanche, les réponses des cellules T CD4+ à Env étaient associées à une forte virémie. Ainsi, le rapport Env / Gag était le plus bas chez les Contrôleurs du VIH et le plus élevé chez les patients progresseurs hautement virémiques (617).

Maintien de la fonction proliférative des cellules spécifiques du VIH

L'infection par le VIH se caractérise par l'épuisement cellulaire, c'est à dire une perte précoce du nombre et de la fonction des cellules T CD4+ spécifiques du VIH et plus particulièrement celles des cellules Gag spécifiques qui participent au contrôle de l'infection (406, 618, 619). En effet, la faible ou l'absence de réponse proliférative des cellules T CD4+ spécifiques du VIH est la marque de l'infection progressive à VIH, qui a été montrée comme étant principalement causée par une perte de fonction, en particulier le défaut de sécrétion d'IL-2. Les cellules T CD4+ de Contrôleurs présentent quant à elles des capacités prolifératives élevées liées à l'augmentation de la production d'IL-2, qui pourrait notamment s'expliquer par la conservation du compartiment CM (22, 400, 620, 621) (622). Notre équipe a aussi montré la capacité de renouvellement élevé *in vitro* des cellules T CD4+ spécifiques du VIH pour le peptide immunodominant Gag293 chez les patients Contrôleurs. De plus, via le marquage tétramère de classe II pour ce même peptide, les Contrôleurs du VIH montrent une proportion supérieure de cellules T CD4+ spécifiques *ex vivo* par rapport aux patients traités (623, 624). Une récente étude, montre que la fréquence élevée de cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 chez les patients Contrôleurs corréle inversement avec la charge virale soulignant leur importance dans le contrôle viral (625).

Les cellules T CD4+ de Contrôleurs du VIH sont polyfonctionnelles

Les cellules T CD4+ spécifiques de Gag chez les Contrôleurs du VIH sont particulièrement efficaces, plus polyfonctionnelles que celles des patients traités, avec une plus grande capacité à produire des cytokines Th1 comme IL-2, IFN γ , TNF α , CCL4 et à dégranuler (expression de CD107a) simultanément, dans le sang et dans la muqueuse intestinale (573, 626, 627). Notre équipe a également participé à la découverte de ce mécanisme, en montrant que les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293, préférentiellement maintenues *ex vivo*, sont hautement polyfonctionnelles et présentent un phénotype Th1 comparé aux cellules de patients traités (624).

Faible expression de récepteurs inhibiteurs chez les patients Contrôleurs

Les cellules T CD4+ de patients Contrôleurs semblent mieux protégées contre l'apoptose notamment via l'inactivation de FOXO3a (628), mais surtout contre l'épuisement cellulaire des cellules T CD4+ spécifiques du VIH. L'une des principales causes de l'épuisement cellulaire est l'expression des récepteurs inhibiteurs, comme PD-1 et CTLA-4 suite à l'activation immunitaire chronique caractéristique de l'infection à VIH. Chez les patients Contrôleurs du VIH, dont les cellules T CD4+ spécifiques maintiennent une fonction proliférative élevée et une réponse cytokinique polyfonctionnelle, l'expression de PD-1 et CTLA-4 est diminuée. L'étude de Porichis et al. montre que leur expression corrèle avec le stade de l'infection et la charge virale. Le blocage de PD-1 restaure les fonctions des cellules T CD4+ spécifiques du VIH des patients traités et des patients progressifs, à savoir l'augmentation de la prolifération et de la production de cytokines IL-2 et IFN γ . L'augmentation de la fonction est très faible chez les patients Contrôleurs qui ne sont pas bridés par PD-1 (505, 629) (504).

Les cellules T CD4+ de haute avidité pourraient jouer un rôle dans le contrôle de l'infection à VIH

Nous avons déjà démontré que les contrôleurs du VIH abritent une population de cellules T CD4+ portant des TCR de forte avidité, qui sont capables de répondre à une quantité minimale de peptides Gag293 immunodominants. En effet, les tétramères de molécules CMH-II chargés en peptide Gag293 lient plus efficacement les TCR présents à la surface des

cellules T CD4⁺ des Contrôleurs du VIH que ceux des patients traités, indiquant une différence dans l'avidité intrinsèque des TCR (623). Les modèles d'infection virale chronique indiquent que les cellules T qui portent des TCR de forte avidité sont dotées d'un ensemble de propriétés fonctionnelles qui aboutissent à des réponses immunitaires hautement efficaces. D'une part, les cellules T de forte avidité présentent une capacité proliférative plus importante que les cellules T de faible avidité, entraînant une reconstitution progressive de la population de forte avidité. D'autre part, les cellules T de haute avidité sont plus polyfonctionnelles, ce qui signifie qu'elles produisent une plus grande variété de cytokines en réponse à des stimuli antigéniques. Enfin, dans les cellules T CD8⁺, les TCR de haute avidité confèrent une activité cytotoxique plus efficace et ont été associés au contrôle viral (595, 630-633). Il est fortement intéressant de voir que l'ensemble des propriétés observées chez les cellules T de forte avidité correspond à l'ensemble des fonctions conservées chez les Contrôleurs du VIH, suggérant que bon nombre des caractéristiques immunitaires des Contrôleurs pourraient s'expliquer par la nature particulière de leur TCR spécifique du VIH.

En 2016, nous avons publié une étude (**cf Annexe 1**) où nous avons recherché les déterminants moléculaires qui sous-tendent cette réponse de haute avidité chez les cellules T CD4⁺ de patients Contrôleurs, et nous avons caractérisé le répertoire TCR des cellules T CD4⁺ spécifiques de l'épitope immunodominant Gag293. Les Contrôleurs du VIH ont montré un répertoire TCR hautement biaisé, caractérisé par une expression préférentielle des chaînes TCR Va24 et Vb2, la présence de motifs conservés au sein des régions CDR3 de ces deux chaînes, et une prévalence élevée de clonotypes publics (n=18 pour chaque chaîne de TCR), *i.e* des séquences TCR des régions CDR3 permettant la reconnaissance de Gag293, partagées entre plusieurs patients. Les clonotypes publics les plus représentés ont été capables de générer des TCR fonctionnels ayant des affinités de l'ordre du micromolaire pour le complexe peptide / CMH-II, ce qui est remarquablement élevé pour les TCR restreints par le CMH-II. Nous avons montré que les TCR de haute affinité spécifiques pour Gag293 sont capables de reconnaître jusqu'à 5 allèles différents de HLA-DR. De plus, après transduction à l'aide de lentivecteurs, ces TCR ont conféré une réponse spécifique à Gag293 très sensible et polyfonctionnelle aux cellules T CD4⁺ primaires.

En résumé, les propriétés des cellules T CD4⁺ décrites ci-dessus suggèrent que les cellules T CD4⁺ de Contrôleurs du VIH échappent à l'épuisement et conservent des fonctions Th1

optimales, notamment liées à la nature intrinsèque de leurs TCR de haute affinité, pour soutenir la réponse antivirale et contribuer au contrôle viral.

Aide aux cellules T CD8+

La cytokine IL-21, qui est produite par les lymphocytes T CD4+, joue de multiples rôles dans la mise en place des réponses immunitaires. L'IL-21 induit le développement de cellules Th17 et Tfh et bloque la différenciation des Treg. L'IL-21 entraîne également la maturation d'affinité des cellules B, la commutation de classe et est importante pour les fonctions T CD8+ (634-636). Les études sur le modèle murin d'infection à LCMV suggèrent que la production d'IL-21 par des cellules T CD4+ spécifiques de LCMV est essentielle dans le contrôle viral et pour préserver les cellules T CD8+ de l'épuisement (637-639). Dans le contexte de l'infection à VIH, on a observé que les CP maintiennent de faibles niveaux d'IL-21 plasmatique alors que les Contrôleurs préservent des niveaux normaux d'IL-21 dans leur plasma. L'analyse de l'expression d'IL-21 dans les cellules T CD4+ montre que les Contrôleurs produisent des niveaux plus élevés d'IL-21 par rapport aux CP. Par ailleurs, la prise de traitement antirétroviral ne permet pas le rétablissement complet de la production d'IL-21. Les niveaux d'IL-21 plasmatique corrélaient positivement avec le nombre de cellules T CD4+ (640, 641). Dans une autre étude, il a été rapporté que la fréquence élevée des cellules T CD4+ productrices d'IL-21 était inversement corrélée aux charges virales plasmatiques. La même étude a cependant démontré, que les cellules T CD4+ productrices d'IL-21, spécifiques du VIH, étaient présentes à de faibles niveaux chez les patients traités et les LTNP (642).

A l'opposé, Chevalier et al. ont observé que les Contrôleurs du VIH maintiennent une fréquence plus élevée de cellules T CD4+ sécrétrices d'IL-21, par rapport aux patients traités et aux patients progressifs. De plus, cette étude a montré que la production d'IL-21 par les cellules T CD4+ des Contrôleurs du VIH induit une régulation positive des marqueurs cytotoxiques, tels que Perforine, Granzyme A, Granzyme B et CD107 chez les cellules T CD8+ provenant de patients progressifs en coculture *in vitro*. La supplémentation *in vitro* en IL-21 a permis d'augmenter la capacité des cellules T CD8+ à éliminer les cibles T CD4+ infectées par le VIH (643).

Réponses T CD4+ cytotoxiques et contrôle du VIH

Dans le contexte d'infections virales chroniques, les cellules T CD4+ ont classiquement été considérées comme les cellules « helper » des cellules T CD8+, alors que leur potentiel

antiviral direct a généralement été négligé. Au cours des dernières années, un nombre croissant de preuves suggère qu'en dehors de leurs fonctions « helper », les cellules T CD4+ ont la capacité de reconnaître et d'éliminer directement les cellules infectées par le virus. Une étude de Soghoian et al., montre que l'émergence de cellules T CD4+ cytotoxiques pendant la phase aiguë de l'infection est associée à une progression plus lente de la maladie (406). Ces cellules expriment des protéines cytolytiques telles que Granzyme A, Granzyme B et perforine, qui sont les caractéristiques des réponses CTL classiques, et sont capables d'éliminer les macrophages infectés par le VIH *in vitro*. Il a été aussi démontré par d'autres travaux, que certains Contrôleurs du VIH maintiennent des cellules T CD4+ cytotoxiques (644, 645). Une étude récente a démontré que les cellules T CD4+ cytolytiques spécifiques au VIH ont une signature phénotypique et transcriptionnelle distincte. Ces cellules diffèrent des cellules Th1 classiques et présentent des caractéristiques communes aux lymphocytes T CD8+ cytotoxiques avec une forte expression de Granzymes, EOMES, perforine, LAG3, etc... Les cellules T CD4+ cytotoxiques ont la capacité d'agir en coopération avec les cellules T CD8+ pour supprimer la réplication virale, et leur émergence a été associée avec un « viral set point » précoce, ce qui suggère un rôle possible dans le contrôle précoce du VIH (646). Récemment, Laher et al. ont montré que les cellules T CD4+ spécifiques de Gag sont amplifiées chez les patients Contrôleurs infectés par des virus de clade C, qu'elles ont un phénotype cytotoxique, et que leur fréquence corrèle inversement avec la charge virale (625). Des preuves supplémentaires de l'existence de cellules T CD4+ cytotoxiques proviennent de l'étude des contrôleurs SIV. Les clones de cellules T CD4+ de contrôleurs du SIV sont capables d'éliminer les macrophages, mais pas les cellules T CD4+ infectées par SIV (647). Des cellules T CD4+ cytotoxiques ont également été rapportées dans des macaques infectés par la souche atténuée SIVmac239 Δ nef (648).

Ainsi, ces résultats dans des modèles de contrôle VIH / SIV suggèrent un rôle antiviral direct potentiel pour les lymphocytes T CD4+, ce qui peut contribuer à la réponse antivirale générale observée chez les contrôleurs du VIH.

D.6.2 Réponse Tfh chez les Contrôleurs du VIH

Accumulation de Tfh chez les patients Contrôleurs du VIH

Il a été montré que l'accumulation des Tfh est associée à la charge virale, et que les RhM Contrôleurs dans l'infection SIV ont une quantité de Tfh (CXCR5+ PD-1+) qui est réduite comparée aux macaques progresseurs (522).

Par contre, la fréquence du compartiment mémoire circulant Tfh est plus importante chez les Contrôleurs du VIH comparée aux patients progresseurs, dans l'étude de Buranapraditkun et al. Les Contrôleurs présentent une proportion de cTfh (CXCR5+) parmi les cellules T CD4+ du sang plus importante que les patients progresseurs et Contrôleurs « viremic ». Par ailleurs, dans l'étude de Martin-Gayo et al., les cTfh (CXCR5+ PD-1lo) sont présents à une fréquence plus élevée que chez les patients progresseurs (611, 649).

La fonction Tfh chez les Contrôleurs

Malgré le bénéfice avéré de la thérapie antirétrovirale, le traitement ne restaure pas complètement l'immunité cellulaire et humorale. Les patients infectés sous traitement antirétroviral montre une réduction de leur réponse immunitaire suite à la vaccination et sont incapables de monter une réponse antivirale efficace suite à l'arrêt du traitement. Par exemple, la proportion de non-répondeurs à la vaccination contre la grippe est plus importante chez les patients infectés que chez les individus sains, ce qui est corrélé avec une absence de réponse Tfh chez ces patients. L'étude de Pallikkuth et al., montre que la perte de la réponse au vaccin antigrippal est corrélée avec une absence du pic de cTfh (CXCR5+) dans la circulation après vaccination, ainsi qu'une perte de la fonction helper des cTfh *in vitro* (66). De plus, les cellules B mémoires spécifiques du VIH sont progressivement perdues chez les patients traités ce qui est également compatible avec une perte de la fonction Tfh (609) (Cf. D.5.3). Récemment l'étude des cTfh chez les Contrôleurs du VIH a permis de mettre en avant le maintien d'une réponse Tfh efficace chez ces patients. Cubas et al. ont montré qu'en co-culture avec des cellules B mémoires *in vitro*, les cTfh (CXCR5+ CXCR3-) de patients Contrôleurs étaient capables d'induire une production d'anticorps similaire à celle observée chez les donneurs sains, alors qu'ils observent une perte de la production d'anticorps chez les patients traités. De plus, alors que les patients Contrôleurs maintiennent une production d'IgG spécifiques de Env dans ce système de co-culture, celle-ci est quasiment absente chez les

patients traités. Les auteurs montrent que le défaut fonctionnel des Tfh de patients traités est lié à une polarisation en cellules Tfh-Th1 qui sécrètent de l'IL-2 et de l'IFN γ induisant ainsi une diminution de la production d'IgG, alors que les cTfh des Contrôleurs du VIH maintiennent un phénotype et une fonction Tfh, expriment à plus fort niveau CXCR5 et produisent plus d'IL-21 que les patients traités (610). Ces données sont compatibles avec d'autres études montrant un maintien de la production d'IL-21 par les cellules T CD4+ chez les Contrôleurs du VIH par rapport aux patients progresseurs et traités, ce qui est corrélé positivement avec le nombre de cellules T CD4+ et négativement avec la charge virale (640-643). (cf partie **A.2.1** aide aux cellules T CD8+ pour plus de détails). L'étude de Cubas et al. montre aussi, à l'aide d'une gp120 marquée, que la proportion de cellules B spécifiques *ex vivo* est plus importante chez les patients Contrôleurs que chez les patients traités, suggérant le rôle des cellules Tfh *in vivo* dans le maintien de cette population (610). Une étude du groupe de Streeck et al. décrit que les cTfh (CXCR5+) spécifiques de Env chez les Contrôleurs montrent une meilleure capacité à induire la commutation de classe et la maturation des cellules B par rapport aux patients progresseurs et que leur capacité à produire de l'IL-21 semble lier avec la fréquence de cellules B mémoires spécifiques de la gp120 (611). Enfin, une récente étude, montre que la large diversité de neutralisation des anticorps chez les Contrôleurs « viremic » est associée avec un enrichissement de leur population cTfh (CXCR5+ CXCR3- PD-1lo). L'enrichissement préférentiel des cTfh chez les patients Contrôleurs « viremic » est une conséquence de la fonctionnalité accrue de leurs DC à différencier les cellules T CD4+ naïves en cTfh (649).

Ces trois groupes suggèrent (via l'étude des cTfh) que la fonction Tfh pourrait être préservée chez les patients Contrôleurs du VIH. Les cellules cTfh chez les patients Contrôleurs semblent présenter une préservation phénotypique et fonctionnelle, qui permettrait la maturation d'affinité, le changement d'isotypes et la production d'anticorps par les cellules B.

D.6.3 Susceptibilité des cellules T CD4+ à l'infection VIH et réservoirs viraux chez les Contrôleurs du VIH

Susceptibilité des cellules T CD4+ à l'infection du VIH chez les Contrôleurs du VIH

Plusieurs études suggèrent que les cellules T CD4+ des Contrôleurs du VIH présentent une susceptibilité réduite à l'infection par le VIH par rapport aux cellules T CD4+ provenant de CP et d'individus non infectés. Chen et al. ont rapporté que les cellules T CD4+ de

Contrôleurs du VIH expriment des niveaux plus élevés d'inhibiteur de la kinase dépendante de la cycline (CDK) p21. La régulation positive de la p21 chez les Contrôleurs du VIH bloque la transcription inverse et l'allongement de l'ARNm du VIH. Le mécanisme sous-jacent à l'inhibition du VIH médiée par la p21 implique l'inhibition directe du CDK9, qui est un co-activateur transcriptionnel de l'expression génique du VIH-1 (650). Ces résultats sont soutenus par une étude complémentaire de Sáez-Ciri3n et al. démontrant que les cellules T CD4+ de Contrôleurs activées par anti-CD3 sont moins propices à l'infection par le VIH que les cellules de donneurs sains, et que le blocage du cycle de réplication virale s'effectuait au stade de la transcription inverse. À l'instar des résultats de Chen et al., cette étude a également montré des niveaux d'expression plus élevés de p21 dans les cellules T CD4+ de Contrôleurs par rapport aux individus sains et progresseurs du VIH, mais les niveaux élevés de p21 chez les Contrôleurs du VIH dans cette étude ne semblaient pas expliquer l'inhibition du VIH (651). Une autre étude montre qu'un sous-groupe de Contrôleurs du VIH possède des cellules résistantes pour les virus de tropisme R5. Cette protection pourrait être reliée à une surexpression des MIP, chimiokines naturelles pouvant lier CCR5, et ainsi rentrer en compétition avec le virus pour l'entrée (652). Il a aussi été montré que la proportion de cellules T CD4+ CCR5+ chez les Contrôleurs était plus basse que chez les patients progresseurs, ce qui pourrait suggérer une susceptibilité faible des cellules T CD4+ des patients Contrôleurs du VIH (653). De plus, une étude récente de Noel et al. montre que les Contrôleurs du VIH ont une fréquence très faible de cellules infectées (654).

En revanche, des études menées par le groupe de Blankson et al. ont montré une susceptibilité à l'infection par le VIH des cellules T CD4+ non stimulées de Contrôleurs plus importante que celle de patients progresseurs. Dans une première étude, la comparaison de la susceptibilité à la fusion et à l'infection *ex vivo* des lymphocytes T CD4+ non stimulés a révélé que les cellules T CD4+ de Contrôleurs étaient plus susceptibles à l'infection par un virus pseudo-typé de souche R5 que les cellules de patients progresseurs ou de donneurs sains. Ces différences d'infectivité n'étaient ni attribuables aux niveaux d'expression différentielle de CCR5 ni à l'état d'activation des lymphocytes T CD4+ (655). Une étude ultérieure a confirmé ces résultats initiaux et montré que les Contrôleurs avaient des fréquences plus élevées de cellules T CD4+ CM, qui se sont révélées être le sous-ensemble de cellules T CD4+ le plus susceptible à l'infection. En revanche, les CP ont montré des fréquences plus élevées de TEMRA, qui était le sous-ensemble de cellules T CD4+ le moins susceptible. Les auteurs suggèrent que la susceptibilité accrue des cellules T CD4+ de

Contrôleurs à l'infection peut résider dans le fait que les cellules CM sont préférentiellement épuisées dans les CP en raison de la réplication virale chronique au cours des nombreuses années d'infection. Cette étude a également démontré que les cellules T CD4+ des CP présentent des capacités plus élevées dans la production de virions VIH nouvellement synthétisés par rapport aux cellules des patients Contrôleurs, ce qui pourrait être expliqué par l'état d'activation élevé des cellules CP par rapport aux Contrôleurs. Dans cette étude, les auteurs ont comparé l'infection des cellules T CD4+ avec ou sans activation, et ont montré que l'activation induisait un biais dans la compréhension de ce mécanisme. En effet après six jours d'activation, les cellules T CD4+ de patients Contrôleurs montraient un taux d'infection comparable à celui des patients progresseurs et des donneurs sains (656).

La contradiction entre ces études pourrait être attribuée aux différences dans les méthodologies utilisées (souches virales et conditions d'activation) afin de quantifier l'infection. Ainsi, ce conflit reste à résoudre pleinement en utilisant des études supplémentaires afin d'éclairer les facteurs intrinsèques cellulaires qui pourraient contribuer au contrôle du VIH.

Alors qu'il est clair que les cellules T CD4+ spécifiques du VIH sont une cible préférentielle du VIH, une étude de Hunt et al. s'est intéressée à la susceptibilité des cellules T CD4+ spécifiques du VIH chez les patients Contrôleurs. Ils montrent une corrélation positive entre la fréquence des cellules spécifiques de Gag et le niveau de cellules T CD4+ associées à de l'ADN ou ARN viral, et suggèrent que les cellules spécifiques du VIH contribuent à la persistance virale chez les patients Contrôleurs (615).

Les Tfh, un réservoir viral chez les Contrôleurs

Alors que dans la phase chronique de l'infection VIH ou SIV la réplication virale est réduite par 10000 chez les Contrôleurs comparée aux patient progresseurs, les patients Contrôleurs présentent une réplication virale suffisante à l'évolution des séquences virales et à l'induction de l'activation du système immunitaire. Une étude montre que l'infection progressive à SIV chez les RhM Contrôleurs mais pas chez les RhM progresseurs est restreinte uniquement aux cellules Tfh, suggérant que les RhM Contrôleurs possèdent une réponse T CD8+ spécifique efficace permettant l'élimination productive de l'infection SIV des sites extrafolliculaires, mais que l'exclusion des cellules T CD8+ des follicules B empêche l'élimination des Tfh

infectés. Les follicules B constituent donc un sanctuaire pour la réplication persistante du SIV en présence d'une réponse antivirale T CD8+ chez les RhM Contrôleurs du SIV (522). Plus récemment, chez les contrôleurs, l'étude de la réplication du VIH dans divers sous-types de cellules T CD4+ a mis en évidence divers mécanismes de persistance virale selon le compartiment cellulaire. Au sein des cellules T CD4+ résidentes des organes lymphoïdes, les cellules Tfh mais aussi les non-Tfh présentent une forte réplication virale. De plus les auteurs ont observé, au niveau du sang périphérique, le maintien de cellules T CD4+ proliférant de manière clonale et arborant un provirus inducible (143) (657).

Les Contrôleurs du VIH maintiennent un contrôle durable de l'infection par le VIH, qui s'explique par des facteurs génétiques et immunitaires de l'hôte. (**Figure 21**), il a clairement été montré que le contrôle est principalement médié par les cellules T CD8+ qui sont aidées par les CD4+. En effet, ces compartiments cellulaires restent largement intacts et sont qualitativement et quantitativement supérieurs aux réponses des patients traités, suggérant que les fonctions préservées par ces cellules T ne sont pas une simple conséquence de la charge virale, mais les réponses immunitaires spécifiques du VIH chez ces patients sont probablement multiples. Récemment d'autres pistes ont été étudiées notamment celles d'une cytotoxicité directement médiée par les cellules T CD4+, la production d'anticorps induisant le phénomène l'ADCC, ainsi que la production anticorps neutralisants par les cellules B via l'aide des cellules Tfh.

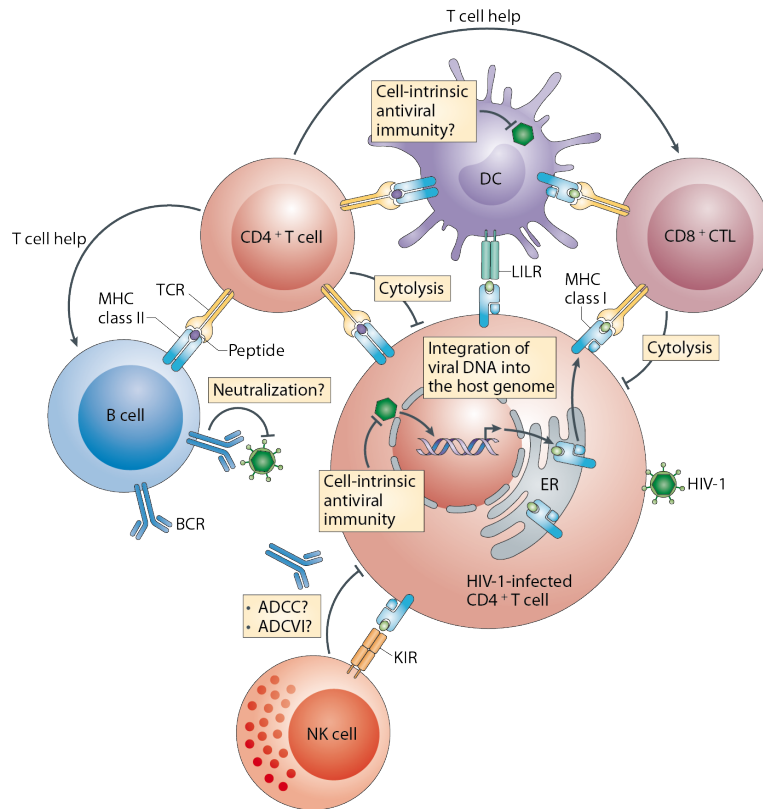


Figure 21: Résumé des facteurs immunitaires impliqués dans le contrôle du VIH.

Ce schéma représente la réponse immunitaire anti-VIH qui montre de multiples facettes, par les Contrôleurs du VIH. Ce schéma pose aussi des questions qui doivent encore être entièrement élucidées. Les cellules T CD8+ servent à lutter directement contre les cellules cibles infectées par le VIH, tandis que les lymphocytes T CD4+ fournissent une aide aux cellules T CD8+ et / ou aux cellules B produisant des anticorps ou exercent des effets cytotoxiques directs contre les cellules infectées par le VIH. L'immunité intrinsèque cellulaire peut également jouer un rôle dans la protection des cellules T CD4+ des Contrôleurs contre l'infection par le VIH. Il reste à établir si les réponses humorales neutralisantes ou l'ADCC jouent un rôle anti-viral contribuant à ces patients.

Source: Adapted from Walker B.D. and Yu X.G., 2013, Nature Reviews Immunology

RESULTATS

II. RESULTATS

A. AXE 1 : High frequency of HIV-specific circulating follicular helper T cells associates with preserved memory B cell responses in HIV controllers

A.1. Contexte

Les cellules T folliculaires « helpers » (cTfh) sont un sous-type de cellules T CD4+ capable d'aider les cellules B, permettant ainsi leur différenciation et la production d'anticorps maturés de haute affinité. Les Tfh expriment le chimiorécepteur CXCR5 permettant leur localisation dans les CG.

Les cellules T CD4+ du sang périphérique exprimant CXCR5+ représentent le compartiment circulant des Tfh. Ces cellules apparaissent au repos en comparaison des Tfh des CG, mais montrent des caractéristiques fonctionnelles similaires. Elles sont capables d'aider les cellules B dans la production d'Ig *in vitro*, et leur fréquence augmente lors de réponses vaccinales, ce qui corrèle avec le titre de la réponse anticorps spécifique. Il a été montré une association entre la fréquence des cTfh activées et l'induction d'anticorps à large spectre, soulignant la pertinence d'étudier les cTfh pour comprendre le développement des réponses anticorps efficaces dans le contexte de l'infection VIH.

Les Tfh semblent aussi contribuer à la pathogénèse du VIH et sont anormalement amplifiées dans l'infection VIH, ce qui perturbe le compartiment B et induit une activation anormale des cellules B conduisant à l'hypergammaglobulinémie non spécifique, caractéristique de l'infection progressive à VIH. De plus, les cellules B spécifiques du VIH sont épuisées et déplétées.

Dans ce contexte, la fonction Tfh est sous-optimale. Il y a ainsi une altération du développement de la réponse anticorps suite à une vaccination, ou contre d'autres pathogènes. La fonction Tfh semble aussi moins efficace dans la réponse anti-VIH. La plupart des patients sont incapables de neutraliser leur souche autologue, et rares sont les individus qui développent des bNAb, *i.e.* des anticorps hautement maturés nécessitant une aide particulière des Tfh.

Les Contrôleurs du VIH sont de rares patients, qui représentent moins de 0,5 % des individus séropositifs. Ils sont capables de contrôler spontanément l'infection à VIH en l'absence de traitement. Ces patients présentent un risque très faible de progression vers le SIDA. Les

Contrôleurs ne montrent pas de forts titres d'anticorps neutralisants, mais il a récemment été montré que le compartiment B mémoire spécifique du VIH montre de fortes réponses chez ces patients. Cette population mémoire préservée pourrait avoir la capacité de se réactiver transitoirement lors des épisodes de réactivation du VIH, ce qui pourrait contribuer à la suppression de la virémie. Une fonction Tfh préservée chez les Contrôleurs pourrait ainsi aider à expliquer la persistance d'une importante population de cellules B mémoires spécifiques du VIH.

A.2. Approches et objectifs

Notre hypothèse de travail a été de supposer que les cellules Tfh de Contrôleurs pouvaient avoir une fonction préservée, permettant le maintien d'une réponse B mémoire anti-VIH, particulièrement les cellules Tfh spécifiques du VIH qui sont responsables de l'aide apportée aux cellules B spécifiques du VIH.

Nous avons voulu comparer le phénotype et la fonction des cellules cTfh chez des patients Contrôleur et des patients traités, ces deux groupes de patients ayant une charge virale contrôlée <50 copies d'ARN/mL, afin de prévenir les différences liées à la réplication virale.

Nos objectifs ont donc été de:

Caractériser le phénotype *ex vivo* des cTfh par cytométrie en flux, chez les deux groupes de patients.

Caractériser le phénotype *ex vivo*, par cytométrie en flux, des cellules cTfh spécifiques du VIH en marquant les cellules avec des tétramère de classe II chargées avec le peptide Gag293, chez les deux groupes de patients.

Caractériser la fonction des Tfh *in vitro* chez les deux groupes de patients, en réalisant des co-cultures de cTfh avec des cellules B mémoires à partir de cellules triées *ex vivo*, puis évaluer par ELISA la production d'IgG totales dans les surnageants de culture.

Caractériser la capacité du couple cTfh/cellules B mémoires à produire des IgG spécifiques du VIH (IgG anti-Env et anti-Gag) en réalisant des co-cultures de cTfh / cellules B mémoires,

à partir de cellules triées *ex vivo*, puis évaluer par ELISA la production d'IgG anti-Env et anti-Gag dans les surnageants de culture.

A.3. MANUSCRIT :

High frequency of HIV-specific circulating follicular helper T cells associates with preserved memory B cell responses in HIV controllers

Claireaux M.^{1,2}, Nouël A.^{1,2}, Benati D.^{1,2,a}, Lambotte O.^{3,4,5,6}, Galperin M.^{1,2}, Mukhopadhyay M.^{1,2}, de Truchis P.⁷, Hendou S.⁸, Boufassa F.⁸, Delfraissy J.F.^{3,4,5}, and Chakrabarti L.A.^{1,2,b}

1 Pasteur Institute, Viral Pathogenesis Unit, Paris, France

2 INSERM U1108, Paris, France

3 INSERM U1184, Center for Immunology of Viral Infections and Autoimmune Diseases, France

4 AP-HP, Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, University Hospital Paris Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France

5 Université Paris Sud, UMR1184, France

6 CEA, DSV/iMETI, Division of Immuno-Viology, IDMIT, France

7 AP-HP, Infectious and Tropical Diseases Department, Raymond Poincaré Hospital, Garches, France

8 INSERM U1018, Center for Research in Epidemiology and Population Health (CESP), Le Kremlin-Bicêtre, France

a: Current address: Center for Regenerative Medicine “Stephano Ferrari”, Department of Life Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy

b Corresponding author

Correspondence: Lisa A. Chakrabarti, Unité de Pathogénie Virale, Inserm U1108, Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

E-mail: chakra@pasteur.fr

ABSTRACT

Follicular helper T cells (Tfh) play an essential role in the affinity maturation of the antibody response by providing help to B cells. To determine whether this CD4⁺ T cell subset may contribute to the spontaneous control of HIV infection, we analyzed the phenotype and function of circulating Tfh (cTfh) in patients from the ANRS CO21 CODEX cohort who naturally controlled HIV-1 replication to undetectable levels (HIC group), and compared them to treated patients with similarly low viral loads (ART group). HIV-specific cTfh (Tet⁺), detected by Gag MHC-II tetramer labeling in the CD45RA⁻CXCR5⁺ CD4⁺ T cell population, proved more frequent in the controller group (P=0.002). The frequency of PD-1 expression in Tet⁺ cTfh was increased in both groups (median >75%) compared to total cTfh (<30%), but the intensity of PD-1 expression per cell remained higher in the ART group (P=0.02), pointing to the persistence of abnormal immune activation in treated patients. The function of cTfh, analyzed by the capacity to promote IgG secretion in cocultures with autologous memory B cells, did not show major differences between groups in terms of total IgG production, but proved significantly more efficient in the controller group when measuring HIV-specific IgG production. The frequency of Tet⁺ cTfh correlated with HIV-specific IgG production (R=0.71 for Gag-specific and R=0.79 for Env-specific IgG, respectively). Taken together, our findings indicate that key cTfh/B cell interactions are preserved in controlled HIV infection, resulting in potent memory B cell responses that may play an underappreciated role in HIV control.

IMPORTANCE

The rare patients who spontaneously control HIV replication in the absence of therapy provide a unique model to identify determinants of an effective anti-HIV immune response. HIV controllers show signs of particularly efficient antiviral T cell responses, while their humoral response was until recently considered to play only a minor role in viral control. However, emerging evidence suggest that HIV controllers maintain a significant but "silent" antiviral memory B cell population that can be reactivated upon antigenic stimulation. We report that cTfh help likely contributes to the persistence of controller memory B cell responses, as the frequency of HIV-specific cTfh correlated with the induction of HIV-specific antibodies in functional assays. These findings suggest that T follicular help may contribute to HIV control, and highlight the need of inducing such help in HIV vaccine strategies that aim at eliciting persistent B cell responses.

INTRODUCTION

Follicular helper T cells (T_{fh}) were identified in 2000 as the key helper CD4⁺ T cell population responsible for providing help to B cells (1, 2). T_{fh} are required for the maturation of high affinity antibodies against T cell-dependent antigens and for the development of germinal centers (GC), both in mice and humans (for reviews, see (3-5)). T_{fh} form conjugates with B cells through cognate interactions dependent on TCR/peptide-MHC II antigen recognition and of costimulatory molecules. These interactions are needed to trigger immunoglobulin (Ig) class-switching and are at the core of the selection process that promotes the survival of high-affinity Ig producing B cells. T_{fh} can be identified by the expression of the CXCR5 chemokine receptor, which drives their localization to GC, and by a high expression of the regulatory marker PD-1, which may reflect ongoing activation through the TCR (1, 2). T_{fh} provide help to B cells through a series of costimulatory molecules (CD40L, ICOS, SLAM, CD28, OX40, and BTLA) and by secreting the cytokine IL-21 (3, 6). A defining transcription factor of the T_{fh} population is Bcl-6, which is required for high CXCR5 expression (7), though Bcl-6 needs to act in concert with a series of other transcription factors such as c-Maf, Ascl2, IRF4, BATF, and TCF-1 to confer full T_{fh} function (8-11). T_{fh} differentiation is finely regulated and not binary, as T_{fh} can show a degree of plasticity and share differentiation markers with other T helper types (12).

The circulating population of CXCR5⁺ CD4⁺ T cells, which represents about 10-15% of the blood CD4⁺ T cell pool in humans, was shown to share functional characteristics with T_{fh} that reside in lymphoid tissues. In particular, blood CXCR5⁺ CD4⁺ T cells have the capacity to provide help to B cells and promote IgG and IgA secretion in CD4/B cell coculture assays, thus demonstrating bona fide T_{fh} function (13, 14). These cells, termed circulating T_{fh}, or cT_{fh}, are phenotypically distinct from the T_{fh} found in GC, with a low expression of costimulatory markers such as ICOS and PD-1 and of the transcription factor Bcl-6. The cT_{fh} population is in a more resting state than GC T_{fh}, but there are indications that cT_{fh} reacquire typical T_{fh} makers such as Bcl-6, ICOS and PD-1 after in vitro activation (14) or in vivo re-activation following vaccination (15). Whether cT_{fh} represent short-lived effector T_{fh} recently released from lymphoid organs or long-lived recirculating memory T_{fh} is still debated (16). However, there is a clear link between the circulating and lymphoid T_{fh} populations as both are increased in human and murine models of autoimmunity (17, 18). In addition, activated cT_{fh} increase in frequency at peak response after flu vaccination and correlate in frequency with the titers of the specific antibody response (15, 19). Importantly, recent studies have reported an association between the proportion of PD-1⁺ cT_{fh} or PD-1⁺ CXCR3⁻ cT_{fh} and the induction of broadly neutralizing antibodies in HIV infected patients, pointing to the relevance of cT_{fh} studies for understanding the development of efficient antibody responses in the context of a chronic viral infection (20, 21).

Though T_{fh} help is thought to be essential to the maturation of antiviral humoral responses, T_{fh} also seem to contribute to HIV pathogenesis, through the promotion abnormal B cell activation and HIV replication. The frequency of T_{fh} cells is markedly increased in lymph nodes of patients with progressive HIV infection (22, 23), in a context where other CD4⁺ T cells subsets show exhaustion and depletion. A possible reason may be that T_{fh} preferentially differentiate in situations of high

antigenemia, when they receive strong and persisting signals through the TCR (24, 25). This notion is compatible with the observation that Tfh abundance generally increases in chronic, non-resolving viral and bacterial infections (3). Increases in IL-6 levels, which are a hallmark of abnormal immune activation, may also contribute to Tfh amplification (26). The predominance of Tfh helps explain the lymph node hyperplasia and the non-specific hyper-gammaglobulinemia that are characteristic of progressive HIV and SIV diseases. The frequency of HIV-specific cells among the Tfh population appears quite high, with median values of Gag-specific cells above 1% in viremic patients (22, 23), suggesting that HIV directly contributes to the amplification of Tfh responses. Importantly, Tfh also represent a major reservoir of HIV or SIV infected CD4+ T cells within lymphoid organs, with a higher viral DNA content than other CD4+ T cell subsets (23, 26-28). An intrinsically higher susceptibility of Tfh to HIV infection and the scarcity of cytotoxic CD8+ T cells that traffic to GC may both contribute to the high Tfh infection rate (23, 29). Studies in the SIV model suggest that GC constitute viral sanctuaries even in macaques that naturally control viral replication in the periphery (30). Tfh also remain the most prominent HIV reservoir in lymph nodes of treated patients after viremia suppression, which poses a major obstacle to viral eradication (31, 32).

Several lines of evidence suggest that Tfh function is suboptimal in progressive HIV and SIV infections. Multiple studies have shown that the development of antibody responses to vaccines or other pathogens is impaired in HIV-infected patients (33, 34). For instance, the proportion of non-responders to flu vaccination is higher among HIV-infected individuals, and cTfh capacity to promote the secretion of flu-specific antibodies by memory B cells appears impaired in the non-responders (15). Mechanistically, negative regulation via the PD1/PD-L1 axis has been proposed to play a role in Tfh dysfunction, as memory B cells from HIV infected patients showed overexpression of the PD-L1 ligand, which limited functional responses in cognate PD-1hi Tfh (35). Increased PD-L1 expression by DC-like cells has also been reported in the lymph nodes of macaques with progressive SIV infection, suggesting that abnormal PD-L1 expression may also perturb the priming of Tfh by antigen presenting cells (29). The fact that memory B cells show signs of abnormal activation and impaired differentiation in progressive HIV infection, and that HIV-specific memory B cell in particular appear depleted in patients with advanced infection are compatible with a loss of Tfh help (34, 36). In addition, the antibody response directed at HIV shows clear signs of impairment. A key observation is that antibodies able to efficiently neutralize autologous HIV strains take about two to three years to emerge in most patients (37, 38). These antibodies do not appear to bring much clinical benefit to patients, as HIV repeatedly and continuously escapes the antibody response through Env mutations (39). Antibodies able to neutralize a large spectrum of HIV variants, the so-called broadly-neutralizing antibodies (bNAbs), occur only rarely (38, 40). Importantly, sequencing of Ig variable regions showed that bNAbs are highly hypermutated and hence highly dependent on Tfh help (40, 41). This suggests that the consecutive cycles of B cell/ Tfh interactions required for extensive somatic hypermutation of anti-HIV antibodies are impaired or interrupted in most patients with progressive HIV disease.

HIV controllers, also called Elite controllers, are rare patients who spontaneously control HIV replication in the absence of antiretroviral therapy (42, 43). Fewer than 0.5% of HIV-1 seropositive individuals maintain a controller status, as defined by a viral load <50 copies HIV-1 RNA/mL over 5 years, but these individuals have a very low risk of progression to AIDS (44). HIV controllers provide a unique model to elucidate the determinants of an efficient immune response directed at HIV. Multiple studies have documented that HIV controllers have a particularly efficient cellular immunity directed against HIV, with highly cytotoxic CD8+ T cells able to suppress viral replication in CD4+ target cells (45, 46), and polyfunctional CD4+ T cell endowed with high proliferative capacity and high antigen sensitivity (43, 47-49). In contrast, the possible contribution of the humoral arm of the immune response to HIV control has not been emphasized, as controllers do not harbor high neutralizing antibody titers (42). Multiple studies have demonstrated that the emergence of bNabs requires relatively high viremia, high viral diversity, and multiple rounds of viral escape to emerge (37). While bNabs are extremely promising tools for HIV prevention and immunotherapy, they seem to provide only limited benefit to the patients who naturally develop them, due to continuous viral escape (37, 39). In the absence of autologous virus neutralization, high bNabs titers may thus reflect the persisting but failing efforts of the humoral response at containing HIV replication and diversification. There are indications that anti-HIV antibody levels parallel HIV viremia in patients with low viral loads (50), suggesting that low NAb titers in HIV controllers may actually reflect efficient viral containment. However, interest in the involvement of the humoral response in HIV control has been revived, with the recent realization that HIV-specific memory B cells responses are actually strong in HIV controllers, and are thus disconnected from circulating NAb titers. Analyses of memory B cells based on HIV-specific Ig production after restimulation in limiting dilution cultures or in B cell ELISPOT assays (36, 51-53), or on direct labeling with Env-derived protein probes (52) all revealed potent responses in HIV controllers, which surpassed those observed in treated patients or in viremic patients with advanced HIV infection. Thus, an emerging notion is that the preserved memory B cell population in HIV controllers has the capacity to transiently reactivate and produce NAb upon HIV replication episodes, which may contribute to the suppression of viremia.

Preserved Tfh function may help explain the persistence of a large HIV-specific memory B cell population in controlled HIV infection. To test this notion, we set to characterize the HIV-specific cTfh population of HIV controllers using the MHC II tetramer technology, which enabled a direct quantitation and phenotyping of this rare CD4+ T cell population without perturbations associated with *in vitro* culture. We compared HIV controllers with stringent viral control (<50 copies HIV-1 RNA/mL) for over 5 years to patients who had received efficient antiretroviral therapy for over 5 years, ensuring that functional differences between the two groups would not result primarily from differences in viral antigen loads. This approach revealed that the HIV-specific cTfh population was more abundant in controllers, and showed signs of chronic antigenic stimulation that remained lower than those seen in treated patients. Assays of Tfh function revealed an efficient induction of HIV-specific IgG in cTfh/memory B cell cocultures from controllers, while this response appeared defective for treated patients, and could not be restored by cytokine supplementation. The frequency of HIV-specific cTfh

correlated with IgG induction in the cocultures, supporting the notion of efficient cTfh/B cell interactions in controlled HIV infection.

RESULTS

The cTfh population displays a central memory phenotype with high PD-1 expression

In a first analysis, we characterized the frequency and phenotype of the total cTfh population from healthy donors (HD, n=8), HIV controllers (HIC group, n=10), and treated patients (ART group, n=13). The cTfh population was defined as the circulating CD3⁺ CD4⁺ CD45RA⁻ CXCR5⁺ T cell subset among live lymphocytes (Fig. 1A). The phenotype of cTfh was compared to that of memory CD4⁺ T cells that did not express the CXCR5 homing marker (MemX5⁻). Flow cytometry analysis showed that the cTfh population represented close to 10% of the circulating CD4⁺ T cell population, irrespective of the HIV infection status (Fig. 1B). No significant differences in cTfh frequencies were observed between the 3 groups, though a greater individual heterogeneity was noted in the ART group, with a few treated patients showing cTfh frequencies >25%. The cTfh population showed a predominantly central memory phenotype in the 3 groups, as indicated by a high percentage of CCR7 expression (medians: 44% to 54%, Fig. 1C), that was significantly higher than that observed in the MemX5⁻ population (medians: 26% to 33%). The cTfh population from healthy donors expressed higher levels of the PD-1 marker than the MemX5⁻ population (medians: 35% vs. 25%, P=0.007; Fig. 1D), compatible with the high PD-1 expression characteristic of tissue Tfh (54). Patient cTfh also showed a trend for higher PD-1 expression than in the MemX5⁻ population, which did not reach significance due to higher intragroup variability (Fig. 1D). Taken together, the cTfh population did not show signs of major perturbations in these patients with efficiently controlled viremia.

Increased population of HIV-specific cTfh in HIV controllers

To characterize HIV-specific cTfh unperturbed by *in vitro* culture, we labeled them with MHC II tetramers. The study focused on CD4⁺ T cells specific for the most immunoprevalent epitope in HIV-1 proteome, Gag293, located at positions 293-312 in HIV-1 capsid. Responses to this CD4 epitope are exceptionally prevalent, as they can be detected in close to 50% of treated patients and in >70% of HIV controllers (55-57). The Gag293 epitope shows broad HLA-DR cross-restriction (49), which enables the study of patients with varied HLA genotypes. Patients included in the present study expressed at least one of the 4 following HLA-DR alleles: DRB1*0101, DRB1*1101, DRB1*1502, or DRB5*010 (abbreviated to DR1, DR11, DR15, and DRB5, respectively). Labeling with the corresponding HLA-DR tetramers was performed on a minimum of 10⁷ PBMC per sample, to take into account the preferential depletion of HIV-specific CD4⁺ T cells in the course of progressive HIV infection (58).

Tetramer⁺ (Tet⁺) cells were readily detected in the cTfh population, and were highly enriched in the memory (94%) as compared to the naive CD4⁺ T cell population (6%), as expected (Fig. 2A). The frequency of Tet⁺ cTfh in CD4⁺ T cells was 4.4 times higher in the HIC than in the ART group (Medians: HIC 0.0049% vs ART 0.0011%, P=0.002; Fig. 2B), pointing to the preservation of Gag293-

specific cTfh in HIV controllers. Analysis of the absolute count of specific cTfh in the circulation supported this notion, with a median of 42 versus 4.9 cTfh/mL blood in the HIC and ART group, respectively ($P=0.0005$; not shown). To determine whether this difference was due to an enrichment of Gag293-specific cells in the cTfh subset, we compared the proportion of cTfh in the Tet⁺ and Tet⁻ CD45RA⁻ CD4⁺ T cell populations (Fig. 2C). This analysis did not reveal significant differences, with a proportion of cTfh that ranged in median between 23% and 29% of memory CD45RA⁻ CD4⁺ T cells, in the Tet⁺ and Tet⁻ populations of both groups. Rather, the frequency of Tet⁺ cells in the total CD4⁺ T cell population distinguished the HIC and ART groups, with a 3.8 fold increase of specific cells in HIV controllers (Medians: HIC 0.019% vs ART 0.0049%, $P=0.002$; Fig. 2D). Thus, the increased frequency of HIV-specific cTfh in controllers reflected an overall higher frequency of HIV-specific cells, rather than a preferential enrichment of specific cells in the cTfh subset.

Signs of antigenic activation in the HIV-specific cTfh population

The CCR7 marker remained highly expressed in HIV-specific cTfh, indicating a predominant central memory phenotype (Fig. 2E). However, a trend for decreased CCR7 expression was observed in the specific cTfh populations, reflecting a partial shift to an effector memory phenotype. CCR7 expression remained significantly higher in the Tet⁺ cTfh compared to the Tet⁺ MemX5⁻ population in the HIC group ($P=0.023$), but this difference was lost in the ART group, with a high intragroup variability in both groups. The trend for CCR7 decrease raised the possibility that HIV-specific cTfh underwent a degree of chronic antigenic stimulation.

A marked increase in PD-1 expression was noted in HIV-specific CD4⁺ T cells from controllers and treated patients, this increase being highly significant ($P<0.005$) in both the cTfh and the MemX5⁻ subsets (Fig. 3A). As PD-1 induction is thought to result from TCR signaling upon cognate antigen recognition, these findings suggested that specific CD4⁺ T cells were chronically stimulated by Gag antigens, in spite of the very low viremia characteristic of both the controller and the treated patient groups. HIV-specific cTfh expressed PD-1 at comparably high frequencies in both groups (medians: HIC: 76.2% vs ART: 77.5% PD-1⁺ in Tet⁺ cTfh), though individual variability in PD-1 induction remained high. In contrast, PD-1 induction was significantly higher in the specific MemX5⁻ subset of treated patients than in that of controllers (ART: 85.0% vs. HIC 42.2% PD-1⁺ in Tet⁺ MemX5⁻, $P=0.02$), reflecting a higher level of chronic immune activation and possibly exhaustion in the specific CD4⁺ T cell population of treated patients. Paired analysis of the specific cTfh and MemX5⁻ subsets in each patient showed that the frequency of PD-1 expression was in all cases higher in the specific cTfh subset for controllers ($P=0.002$; Fig. 3B). This was not the case for treated patients, as specific MemX5⁻ cells in this group could express PD-1 at very high levels (>80%), reinforcing the notion that abnormal immune activation persisted even after long-term antiretroviral therapy.

To further evaluate the extent of PD-1 induction, we monitored the mean fluorescent intensity (MFI) of the PD-1 labeling in the subpopulations of PD-1 positive cells (Fig. 3C). This analysis showed that the intensity of PD-1 expression per cell was higher in specific cells from treated patients than in those of

controllers, both in the MemX5⁻ (P=0.016) and in the cTfh subsets (P=0.02). Paired analysis confirmed that specific cTfh expressed PD1 at higher levels than specific MemX5⁻ cells in controllers, while the difference was blurred in treated patients, for whom both specific cTfh and non-cTfh expressed PD-1 at very high levels (Fig. 3D). Taken together, PD-1 expression was induced in all Gag293-specific CD4⁺ T cells both in controllers and treated patients, indicating that these cells were not quiescent, but rather engaged in an active antiviral immune response. In HIV controllers, PD-1 induction was more marked in the specific cTfh subset, which may reflect the activation of T follicular helper function. In treated patients, PD-1 induction was more generalized and reached higher levels, pointing to the persistence of immune exhaustion.

Of note, in the ART group, the frequency of PD-1⁺ induction in the specific cTfh population correlated inversely with the frequency of cTfh in the Tet⁺ population (R=-0.85 P=0.011, Fig. 3E). This correlation was not observed in the HIC group, as some controllers could have a significant PD-1 induction without a decrease in the proportion of specific cTfh. The inverse correlation observed for treated patients could reflect either a loss or a relocalization of specific cTfh upon increasing immune activation, further supporting the possibility of immune exhaustion.

The cTfh CD4⁺ T cell subset provides efficient help to B cells in vitro

To analyze cTfh function, we set up a coculture assay between sorted CD4⁺ T cell subsets and autologous memory B lymphocytes (BL). Sorted populations were >98% pure (see supplemental Fig. S1 for gating strategy). Sorted CD4⁺ T cell subsets included naive cells (CD45RA⁺ CCR7⁺), MemX5⁻ (CD45RA⁻ CXCR5⁻) and cTfh (CD45RA⁻ CXCR5⁺). Each sorted subset was cocultivated with autologous BL (CD3⁻ CD20⁺ CD27⁺) in the presence of superantigens, which induce polyclonal CD4⁺ T cell activation. CD4 helper function was analyzed by the induction of plasmablast differentiation, as measured by the number of CD38^{hi} B cells in the coculture, and by the amount of total immunoglobulins G (IgG) measured in coculture supernatants.

Functional analysis of healthy donor cells showed a clear hierarchy in the capacity of CD4⁺ T cell subsets to provide helper function to B cells, with cTfh proving more efficient than MemX5⁻ (P=0.03), which were themselves more efficient than naïve cells (P=0.03) at inducing plasmablast differentiation (Fig. 6A and B). A similar hierarchy was observed in the production of IgG measured in day 12 supernatants: cTfh induced IgG secretion to a median concentration of 3 µg/mL, MemX5⁻ induced IgG to 0.5 µg/mL, while naive CD4⁺ T cells failed to induce IgG secretion from autologous LB (Fig. 6C). The differentiation of plasmablast in the cocultures tightly correlated with the induction of IgG secretion (R=0.89, P=0.012, Fig. 4D), indicating that both parameters could be used to monitor cTfh function. Taken together, the data obtained with healthy donor cells confirmed that cTfh could provide bona fide help to BL after in vitro stimulation, confirming that cTfh provide a relevant model to study Tfh function (13).

Patient cTfh show a degree of functional impairment that can be reversed by IL-6 supplementation

The cTfh function showed signs of being perturbed in both the HIC and ART groups, as the hierarchy in helping capacity of the different CD4⁺ T cell subsets was not always conserved, with cTfh proving less efficient than MemX5⁻ cells at inducing IgG secretion for a few patients (Fig. 5A). As a consequence, IgG induction by the cTfh and MemX5⁻ subsets did not differ significantly, in the HIC as well as in the ART group. In addition, total IgG secreted in cTfh/BL cocultures showed a trend for decrease in the HIC and ART groups as compared to the HD group, though the difference did not reach significance (Fig. 5B). Analysis of CD38^{hi} plasmablasts in the cocultures led to similar conclusions, with in particular a trend for less efficient plasmablast differentiation in the ART group (Fig. 5C and D). Plasmablast induction still correlated with IgG secretion in patients cocultures, though the correlation was less tight than in healthy donor cocultures ($R=0.65$, $P=0.01$, Fig. 5E), supporting the notion of perturbed cTfh/BL interactions in both patient groups.

As production of the IL-6 cytokine by plasmablasts was recently shown to support Tfh function (59), we set to test the effect of IL-6 addition to the cTfh/BL cocultures. Interestingly, IL-6 supplementation restored cTfh function in the coculture of patient cells, as indicated by a significant increase IgG production in both the HIC and ART groups ($P=0.0078$ in both cases; Fig. 5F). IL-6 restored IgG production to levels higher than those seen in cocultures from healthy donors (Medians: HIC+IL-6: 3.6 $\mu\text{g/mL}$; ART+IL-6: 16.8 $\mu\text{g/mL}$; HD: 2.41 $\mu\text{g/mL}$). These findings suggested that the perturbation in patient cTfh function was not intrinsic, but rather resulted from limiting or dysregulated cytokine secretion.

High-level specific IgG production capacity in HIV controllers

To evaluate the extent to which cTfh could stimulate HIV-specific memory B cell responses, we measured the production of IgG specific for HIV-1 p24 Gag or gp140 Env in cTfh/BL coculture supernatants. Recombinant proteins derived from HIV-1 subtype B, p24 Gag III B and the trimeric Env gp140 MN-LAI (60), were used as capture antigens as this subtype was the most prevalent among studied patients.

The cTfh/BL cocultures of controller patients showed a trend for higher production of anti-Gag IgG compared to those of treated patients, with a median 7x difference between the two groups (Fig. 6A, left). Supplementation with IL-6 significantly increased Gag-specific IgG production in both groups, but dampened difference between the HIC and the ART groups (Fig. 6A, right). To take into account variations in total IgG production, we then computed the ratio of Gag-specific to total IgG (Fig. 6B). In this normalized analysis, Gag-specific IgG production was 3.5x higher in the HIC group in the absence of IL-6, and 4.8x higher in the HIC group in the presence of IL-6, with the difference reaching significance in the later case ($P=0.0499$). Interestingly, the frequency of Gag293-specific cTfh in the circulation correlated with Gag-specific IgG production in the cocultures ($R=0.71$, $P=0.041$; Fig. 6C),

supporting the notion that Tfh function contributed to the persistence of HIV-specific memory B cell responses.

Analysis of Env gp140-specific IgG production in the cTfh/BL cocultures revealed more pronounced differences between the HIC and the ART groups. Env-specific IgG were produced in median at 6.4x higher levels in the HIC than in the ART group ($P=0.012$; Fig. 6D). IL-6 supplementation did not abrogate, but rather amplified the difference, with 113x higher levels of Env-specific IgG in the HIC group ($P=0.0019$). After normalizing for total IgG production, the differences in Env-specific IgG production between the HIC and the ART groups were of 32x in the absence of IL-6 ($P=0.017$; Fig. 6E), and were increased to 51x in the presence of IL-6 ($P=0.0047$). It was striking that IL-6 supplementation had little effect on the synthesis of Env-specific IgG in the ART group, while total and Gag-specific IgG production responded to IL-6 supplementation for the same patients. This observation was confirmed by an analysis of the ratios of IgG produced in the presence and absence of IL-6, which showed significant differences in IL-6 effect depending on the antigenic specificity (Supplemental Fig. S2). Of note, the frequency of Gag293-specific cTfh in the circulation showed a strong correlation with Env-specific IgG production in the cocultures ($R=0.79$, $P=0.0093$; Fig. 6F), raising the possibility of intrastructural help provided by Gag-specific Tfh to Env-specific memory B cells. Taken together, these findings showed that treated patients, who had low frequencies of HIV-specific cTfh in the circulation, maintained defective memory B cell responses in spite of long-term therapy, with the defect being more marked for Env-specific than Gag-specific memory B cells. In contrast, key cTfh/B cell interactions were preserved in controlled HIV infection, resulting in potent memory B cell responses to both Gag and Env antigens.

DISCUSSION

This study provides evidence for the persistence of a highly functional HIV-specific cTfh population in controlled HIV infection. The use of MHC-II tetramer labeling enabled, for the first time to our knowledge, a direct quantitation and phenotypic characterization of HIV-specific cTfh in the circulation. This approach revealed significantly higher frequency and numbers of Gag-specific cTfh in HIV controllers compared to treated patients, even though both groups were characterized by long-term viral suppression and very low antigenic loads. These findings are in line with the notion of a potent CD4-mediated adaptive response in controlled HIV infection, and highlight by contrast the incomplete reconstitution of antiviral immunity in patients undergoing long-term antiretroviral therapy (43, 61). The high frequency of specific cTfh in the controller group suggests that successful HIV containment does not rely uniquely on Th1 responses, which are typically induced in the setting of chronic viral infections, but also involves Tfh help provided to the humoral arm of the immune response. This notion supported by the potent induction of HIV-specific IgG detected in cTfh/B cell cocultures from controllers, as well as by the high frequency of memory B cells recently reported in the setting of controlled HIV infection (36, 51-53).

Unexpectedly, HIV-specific cTfh from both groups of patients showed signs of ongoing activation, as indicated by a marked increase in PD-1 expression and a moderate decrease of CCR7 expression compared the total cTfh population. PD-1 induction is thought to reflect previous TCR engagement (62, 63), suggesting that cTfh encounter their cognate antigen, in this case Gag, even in situations of controlled viremia. Epigenetic studies indicate that PD-1 can in certain cases acquire constitutive expression in T cells after prolonged exposure to HIV (64), and we thus cannot rule out that high PD-1 expression in specific cTfh reflects a previous phase of viral replication, especially in the case of patients who had experienced high viral loads prior to treatment. However, the fact that PD-1 induction is also seen in cTfh of controllers, who did not experience massive HIV replication except possibly in acute infection, and the observation that CCR7 shows a trend to decrease, support the possibility of ongoing antigenic stimulation and partial shift toward an effector phenotype. Given that tissue Tfh have been recently identified as the major HIV/SIV reservoir in lymphoid organs, in treated patients (22, 23, 31), but also in a simian model of controlled SIV infection (30), a likely possibility is that cTfh encountered their cognate antigen while recirculating through these organs. Systemically, HIV controllers show moderate but detectable signs of immune activation that subside upon initiation of antiretroviral therapy (65), suggesting that residual viral replication in lymphoid tissues drives immune activation, while the virus remains efficiently contained in the periphery. Another reason for the activation of specific cTfh in controllers could lie in their expression of particularly sensitive TCRs, as we recently reported that controller CD4⁺ T cells expressed TCRs of significantly higher affinity for Gag293-MHC II complexes than those found in treated patients (57, 66). Thus, even minimal levels of viral antigens may trigger potent TCR signals in controller cTfh, which would promote their B cell helper function.

Of note, controller specific CD4⁺ T cells showed stronger PD-1 expression in the cTfh compartment than in MemX5⁻ memory compartment, suggesting that cTfh may be more frequently exposed to viral antigen than specific cells that do not traffic through GC. In contrast, treated patients showed high PD-1 expression ($\approx 75\%$ PD1⁺) in both cTfh and MemX5⁻ specific cells, which may point to the persistence of viral antigens in both GC and extrafollicular sites. Alternatively, high PD-1 expression may be a sequel of the massive immune activation and viral replication which patients experienced prior to treatment. It was also noteworthy that the intensity of PD-1 expression was significantly higher in the specific CD4⁺ T cell subsets of treated patients than of controllers, with the highest level of PD-1 expression per cell seen in the specific cTfh subset of treated patients. Given the negative regulatory function of the PD-1 receptor (62), these very high expression levels may impair cTfh function in treated patients. This notion is compatible with the report of a functional defect of Tfh function in HIV infected individuals, due to overexpression of the PDL-1 ligand in lymph node B cells (35). In this study, the PD-1/PD-L1 interaction was shown to limit Tfh proliferation and helper function, which may help explain the persistent defect of memory B cell responses in treated patients. Taken together, the phenotypic analysis of HIV-specific cTfh highlighted signs of generalized immune activation in treated patients, and of a more contained but nevertheless detectable activation in HIV controllers. The finding that HIV-specific cTfh are not quiescent in the latter group suggests that spontaneous HIV control

relies on chronic stimulation of T follicular helper function, which may be needed to sustain high level memory B cell responses.

Several studies have reported associations between the frequency of particular cTfh subsets and the breadth of circulating NABs directed at HIV (20, 21, 67). These findings point to the need of a generally preserved cTfh population for the development of NAB breadth, which relies on continuous cycles of B cell maturation. However, it is now apparent that HIV controllers can in certain cases develop potent memory B cell responses without high NAB titers (36, 51, 52), and that assessing the "silent" memory B cell compartment is needed to evaluate the status of the antiviral humoral response. The frequency of HIV-specific memory B cells still correlates with bNAb titers in a subset of HIV controllers who express the HLA-B57 allele (53), suggesting that in this particular group HIV-specific B cells have not returned to a quiescent memory state. Another study reported that the frequency of HIV-specific memory B cells decreased in HIV controllers who were given antiretroviral therapy, indicating that residual viral replication could still be a driver of memory B cell responses in the controller group (52). Our results suggest that another key determinant of the magnitude of memory B cell responses is the availability of T follicular help, as indicated by the positive correlation between HIV-specific cTfh frequency and HIV-specific IgG secretion by stimulated memory B cells. These findings are in line with a recent report where Tfh function defined functionally by IL-21 secretion in response to HIV peptides showed an association with Env-specific memory B cells (68). Genetic analysis of Env-specific IgG derived from controller memory B cells have been reported in a few cases, and have revealed an unexpectedly high level of somatic hypermutation, reinforcing the notion of a continuous involvement of T follicular help in maintaining the controller humoral response (69).

Intriguingly, measurement of total IgG production suggested a perturbation of cTfh/B cell interactions in both groups of HIV-infected patients as compared to healthy blood donors. The impairment was not generalized, but a subset of patients showed decreased IgG induction and plasmablast differentiation in cTfh/BL cocultures. The fact that these parameters could be restored by IL-6 supplementation suggested that cytokine imbalance could be involved. A possible explanation may lie in a shift in the Th1/Tfh balance, considering that these two CD4⁺ T cell populations depend on antagonist differentiation factors, and that chronic viral infections are thought to lead to a pronounced Th1 bias (9). The demonstration that IL-2-dependent signaling inhibits cTfh function in HIV infected patients is compatible with the notion that Th1-derived cytokines antagonize Tfh function (70). We previously documented the persistence of HIV-specific CD4⁺ T cells with advanced Th1 differentiation in HIV controllers, which could contribute to a general alteration of cTfh differentiation (71). The persistence of Th1 effectors was less prominent in the case of treated patients treated in the long-term, but other parameters may perturb Tfh differentiation, such as abnormal immune activation or residual induction of type I interferon (72). We tested the effect of the IL-6 cytokine on cTfh function as several studies suggest an important contribution of this cytokine to Tfh/BL interactions. In particular, IL-6 produced by human plasmablasts was shown to promote the differentiation of Tfh in vitro and to stimulate the secretion of IL-21 by these cells (59). As IL-21 is thought to be a major mediator of Tfh help to B cells,

this suggests a positive regulatory loop that promotes the differentiation of both cell types. The role of IL-6 on Tfh differentiation is supported by the decrease in cTfh observed in rheumatoid arthritis patients treated with an anti-IL-6R blocking antibody, by the role of IL-6 in driving Tfh amplification in murine models of chronic infection, and by the loss of the Tfh population in murine models deficient in BL (9, 59, 73). Our finding that IL-6 restores total IgG production in patient cTfh/BL cocultures suggests that the IL-6/IL-21 regulatory loop functions suboptimally in both controllers and treated patients, but that the defect is reversible rather than intrinsic.

In contrast, the analysis of Env-specific IgG production in the cTfh/BL coculture system revealed a defect in the treated patient group that could not be reversed by IL-6. Rather, the difference between groups persisted and was even amplified after IL-6 supplementation, with a >100x lower production of Env-specific IgG in treated patient cocultures compared to those of controllers. This loss of response may be explained by the irreversible exhaustion or loss of memory B cells, a notion supported by the low numbers of memory B cells able to bind Env-derived probes in treated patients (52). It was intriguing that Gag-specific IgG production did not show the same pattern, but rather showed a defect that could be partly restored by IL-6 supplementation, pointing to the persistence of responsive memory B cells. Why Env and Gag-specific memory B cell responses differ in severity of impairment remains to be elucidated, though one may speculate that Env, being a surface protein, is likely to be more frequently detected by B cell surface Ig receptors than the intracellular Gag protein, resulting in a more rapid exhaustion of Env-specific B cells. Also, it may be relevant that Env has the capacity to crosslink its receptor CD4, which was shown to impair TCR-dependent signaling and lead to CD4⁺ T cell anergy or apoptosis (74). This may perturb the development of T follicular help, and indirectly lead to B cell exhaustion. Indeed, vaccination with a gp140 Env engineered to occlude the CD4 binding site resulted in earlier T cell responses and superior antibody and ADCC responses compared to wild-type Env in a simian model (75). The inhibitory effect of wild type Env may contribute to the generally lower CD4 responses to Env than to Gag, and to the better prognostic value of Gag-specific T cell responses (56, 76). Of note, CD4 responses to Gag were more frequent in HIV-infected patients with detectable NAbs, while response to Env gp120 were not predictive, emphasizing the importance of Gag-specific CD4⁺ responses (77). The fact that Gag-specific responses predicted the induction of Env-specific Nabs raised the possibility of intrastructural help, based on the idea that an Env-specific B cell internalizing a whole HIV virion after Env binding may present both Gag and Env peptides on MHC-II and may thus receive help by a Gag-specific CD4⁺ T cell. Intrastructural help has received experimental validation in a mice model (78), and may account for the positive correlation we observed between Gag-specific cTfh and the induction of Env-specific IgG.

In conclusion, controlled HIV infection was characterized by a high frequency of cTfh that showed signs of antigenic stimulation, pointing to an ongoing maturation of the humoral response. Functional assays revealed preserved cTfh/ B cell interactions that sustained high level HIV-specific memory B cell responses. These findings suggest that humoral immunity plays an underappreciated role in HIV

control, and that immunotherapeutic approaches that aim at a functional HIV cure should elicit potent Tfh function

MATERIALS AND METHODS

Study design

HIV controllers (HIC group; n=13) were recruited through the CO21 CODEX cohort implemented by Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales (ANRS). HIV controllers were defined as HIV-1 infected patients who had been seropositive for >5 years, had received no antiretroviral treatment, and for whom >90% of plasma viral load measurements were undetectable by standard assays. All HIV controllers included in the study had current viral loads <50 copies/mL. The group of efficiently treated patients (ART group; n=16) had received antiretroviral therapy for a minimum of 5 years and showed long term HIV-1 suppression with viral loads <50 copies/mL. Treated patients were recruited at the Raymond Poincaré and Bicêtre hospitals (France). Patients were included in the TCR study if their genotype matched at least one of the following alleles: DRB1*0101 (DR1), DRB1*1101 (DR11), DRB1*1502 (DR15), or DRB5*0101 (DRB5). Healthy donors were anonymous volunteers who donated blood at Etablissement Français du Sang. The study was promoted by ANRS and approved by the Comité de Protection des Personnes IDF-VII under number 11-33. All participants gave written informed consent prior to inclusion in the study.

Antibodies

The following antibodies were used for cell surface staining: CD3-eFluor® 780-Allophycocyanin (eF780-APC, clone UCHT1), TCR-Allophycocyanin (APC, clone IP26) and IL-2-APC (clone MQ1-17H12) (all from eBioscience); CD4 BD Horizon™ R phycoerythrin-CF594 (PE-CF594, clone RPA-T4), CD27-PE-Cy™7 (Pe-Cy7-Clone M-T271), CXCR5 Alexa Fluor® 488 (AF488, Clone RF8B2), CCR7 Alexa Fluor® 647 (AF647, Clone 3D12) (all from BD Biosciences); CD14-Viogreen (clone TÜK4), and CD20-VioGreen (clone LT29) (from Miltenyi Biotec); CD38 Alexa Fluor® 700 (AF700, clone HIT2), PerCP/Cy5.5 CD20 (PerCP-Cy5-5, clone 2H7), CD8-Brilliant Violet 785™ (BV785, clone RPA-T8), CD45RA1, Brilliant Violet 421™ (BV421, clone HI100), CCR7-PE-Cy7 (clone G043H7), CD3-APC (clone SK7) (all from Biolegend). The fixable viability dye eFluor® 506 (eF506, eBioscience) was added to restrict the analysis to live cells.

Cell culture

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from heparinized blood via density gradient centrifugation on Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Life Sciences) and were either cryopreserved for future cell sorting or directly used for tetramer staining and cell surface phenotyping.

MHC class II tetramer labeling and cTfh phenotyping

Patients were genotyped for the HLA-DRB1 gene at a 4-digit resolution using the INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus kit (Fujirebio). Patients were included in the study if their genotype matched at least one of the following alleles: DR1, DR11, DR15, or DRB5. APC-labeled MHC II tetramers loaded with Gag293 peptide (FRDYVDRFYKTLRAEQASQE) for the DR1, DRB15, DRB5, alleles were obtained through the NIH Tetramer Core Facility at Emory University, USA. DR11 biotinylated monomers were obtained through the tetramer Core laboratory of the Benaroya Research Institute (Seattle, USA). Monomers were loaded with 0.2 mg/ml peptide by incubation at 37°C for 72 h in the presence of 2.5 mg/ml n-octyl-β-D-glucopyranoside and protease inhibitors. Peptide-loaded monomers were tetramerized using APC-conjugated streptavidin (eBioscience). For each tetramer loaded with the Gag293 peptide, a corresponding control tetramer was loaded with an irrelevant peptide (the CLIP peptide PVSKMRMATPLLMQA).

For the ex-vivo detection of Gag293-specific CD4⁺ T cells, patient PBMCs were labeled with MHC class II tetramers as follows: 10⁷ PBMC were incubated with 1 μg MHC II tetramer/10⁶ cells at a concentration ≥1 μg/mL in complete RPMI supplemented with 15% human AB serum for 90 min at 4°C. Antibodies for surface markers were added for the last 30 min of labeling, using the following combination: CD3-eF780-APC, CD20-Viogreen, CD14-Viogreen, CD8-BV785, CD4 PE-CF594, CD45RA-BV421, CCR7-PE-Cy7, CXCR5-AF488, PD-1-PE, and Viability-eF506. Cells were washed twice with PBA (PBS, 1%BSA, 0,09% azide) and fixed using 2% PFA in PBS. Fluorescence was collected on an LSR Fortessa flow cytometer (BD Biosciences). All flow cytometry experiments were analyzed with the Flowjo v8.8 software (Tree star Inc). Analysis was performed on singlet viable single cells, gated according to morphological criteria and viability dye expression.

For cTfh phenotyping, 1 × 10⁶ cells were stained in a total volume of 100 μL PBA (PBS, 1%BSA, 0,09% azide) with the same antibody panel as above for 30 minutes at 4°C. Cells were washed twice with PBA, fixed in 2% PFA and analyzed on an LSR Fortessa flow cytometer as described above.

Facs sorting

Following an overnight culture at a concentration of 5 × 10⁶ cells/ml, PBMCs were washed with PBS 1% FBS. Cells were then stained for 30 min at 4°C at 40 × 10⁶ cells/ml. The cell surface antibody panel consisted of the following antibodies: CD3-eF780-APC, CD20-Viogreen, CD8-BV785, CD4 PE-CF594, CD45RA-BV421, CCR7-AF647, CXCR5-AF488, and CD27-PE-Cy7. Stained samples were sorted using a FACSAria II cell sorter (BD Biosciences) installed in a microbiological safety cabinet. The collected cells were directly used for co-culture assays.

cTfh / BL co-culture assays

The cTfh cell population defined as (CD3⁺ CD20⁻ CD4⁺ CD45RA⁻ CXCR5⁺) or MemX5⁻ cells defined as (CD3⁺ CD20⁻ CD4⁺ CD45RA⁻ CXCR5⁻) or Naive CD4⁺ T cells (CD3⁺ CD20⁻ CD4⁺ CD45RA⁺ CCR7⁺) were sorted and plated in a 96-well plate in the presence of memory B cells (CD3⁺ CD20⁺ CD27⁺) at a 1:1 ratio (20 × 10³ cells each) in the presence of 1 μg/ml staphylococcal enterotoxin A

(SEA) and 1ug/ml staphylococcal enterotoxin (SEE) in complete RPMI 1640 medium, in the presence or absence of IL-6 at 10 ng/mL (Miltenyi Biotech). B Cells were analyzed for their phenotype at day 7 of co-culture using the following antibody combination: CD3-APC, CD4 PE-CF594, CD20-PerCP-Cy5-5, CD38-AF700, CD27-PE-Cy7, and Via-eF506. Fluorescence was collected on an LSR Fortessa flow cytometer (BD Biosciences). ELISA experiments were performed on supernatants collected at day 12 of co-culture for the detection of total and gp140-specific immunoglobulins.

ELISA assays

Analysis of total IgG production in cocultures supernatants was performed using the Human IgG kit (GenWay, San-Diego, USA) according to the manufacturer's instructions. To detect Env-specific IgG production, we used as antigen the trimeric glycoprotein gp140 MN-LAI, which consists of the gp120 subunit from HIV-1 clone MN fused to the extracellular domain of HIV-1 LAI gp41 (60). 96-well Immulon 2HB plates (Thermo Scientific) were coated overnight at 4°C with 2,5 µg/ml of gp140 MN/LAI in PBS. The following day, plates were washed four times with PBS + 0.05% Tween20 + 10mM EDTA (PBST) and blocked for 2 h with PBST+ 5% FBS at RT. Plates were subsequently washed and the culture supernatants added at decreasing dilutions for 2 h at RT. The plates were then washed and incubated with a secondary anti-human IgG-HRP at a concentration of 0.4ug/ml (Jackson ImmunoResearch; #109-035-098) for 1 h at RT. Plates were then thoroughly washed, and 100 µL of tetramethylbenzidine substrate (Sigma-Aldrich) was added until the appearance of color. The enzymatic reaction was stopped by the addition of 100 µL H2SO4 0.5M, and the OD was then measured at a 450nm wavelength. Env-specific IgG production was evaluated in equivalent (Eq) µg/mL, after normalization to a standard curve obtained with the human mAb 2G12.

To detect Gag-specific IgG, a recombinant p24 Gag protein produced in baculovirus (reagent #12028 from the NIH AIDS Reagent Program) was used as capture antigen. The p24 Gag protein was coated at 2 µg/mL in bicarbonate buffer (pH 9.6) on Maxisorp 96-well plates (Nunc) overnight at 4°C. The ELISA assay was then carried out as described above. gag-specific IgG production was evaluated in equivalent (Eq) µg/mL, after normalization to a standard curve obtained with an HIV controller plasma.

Statistical analyses

Comparisons between groups (HD, HIC, and ART) and between single cells were performed using a non-parametric two-tailed Mann-Whitney U test. For paired analyses, we used the non-parametric Wilcoxon matched-pairs signed rank tests or the two-tailed paired t test. All statistical analyses were made using the Prism v6.0 software (GraphPad). Differences $P < 0.05$ considered significant. Horizontal bars represent medians in all cases.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was carried out in the frame of the ANRS EP36 HIV controllers Study Group. We are grateful to patients who participated to the study. We thank the clinicians who recruited patients for this study: Huguette Berthé, David Zucman, Dominique Bornarel Olivier Bouchaud, Patricia Honoré, Philippe Genet, Juliette Gerbe, Olivier Patey, Laurent Richier, Katia Bourdic, Pierre-Marie Girard, Bénédicte Lefebvre, Michèle Pauchard, Jean-Michel Molina, Sylvie Parlier, Caroline Lascaux-Combe, Samuel Ferret, Valérie Garrait, and Isabelle DeLacroix-Szmania.

We thank the team of the Pasteur Center for Human Immunology for help with cell sorting. MHC class II tetramer reagents were provided by the NIH Tetramer Core facility at Emory University. The following reagent was obtained through the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: HIV-1 IIIB p24 Recombinant Protein from ImmunoDX, LLC.

L.C. is supported by grants from ANRS (EP36-10) and Sidaction (AI25-1-02343); M.C. was the recipient of a Ministère de la Recherche doctoral fellowship, followed by a Sidaction fellowship; M.G. was the recipient of an Agence Nationale de la Recherche (ANR) postdoctoral fellowship.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. Schaerli P, Willmann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, Moser B. 2000. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med* 192:1553-62.
2. Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, Forster R. 2000. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med* 192:1545-52.
3. Ma CS, Deenick EK, Batten M, Tangye SG. 2012. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J Exp Med* 209:1241-53.
4. Cannons JL, Lu KT, Schwartzberg PL. 2013. T follicular helper cell diversity and plasticity. *Trends Immunol* doi:10.1016/j.it.2013.01.001.
5. Vinuesa CG, Linterman MA, Goodnow CC, Randall KL. 2010. T cells and follicular dendritic cells in germinal center B-cell formation and selection. *Immunol Rev* 237:72-89.
6. Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L, Wang YH, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q, Dong C. 2008. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 29:138-49.
7. Nurieva RI, Chung Y, Martinez GJ, Yang XO, Tanaka S, Matskevitch TD, Wang YH, Dong C. 2009. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 325:1001-5.
8. Bauquet AT, Jin H, Paterson AM, Mitsdoerffer M, Ho IC, Sharpe AH, Kuchroo VK. 2009. The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat Immunol* 10:167-75.
9. Crotty S. 2014. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* 41:529-42.
10. Schmitt N, Liu Y, Bentebibel SE, Ueno H. 2016. Molecular Mechanisms Regulating T Helper 1 versus T Follicular Helper Cell Differentiation in Humans. *Cell Rep* 16:1082-95.
11. Donnarumma T, Young GR, Merckenschlager J, Eksmond U, Bongard N, Nutt SL, Boyer C, Dittmer U, Le-Trilling VT, Trilling M, Bayer W, Kassiotis G. 2016. Opposing Development of Cytotoxic and Follicular Helper CD4 T Cells Controlled by the TCF-1-Bcl6 Nexus. *Cell Rep* 17:1571-1583.
12. Lu KT, Kanno Y, Cannons JL, Handon R, Bible P, Elkahloun AG, Anderson SM, Wei L, Sun H, O'Shea JJ, Schwartzberg PL. 2011. Functional and epigenetic studies reveal multistep differentiation and plasticity of in vitro-generated and in vivo-derived follicular T helper cells. *Immunity* 35:622-32.
13. Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G, Foucat E, Dullaers M, Oh S, Sabzghabaei N, Lavecchio EM, Punaro M, Pascual V, Banchereau J, Ueno H. 2011. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* 34:108-21.

14. Chevalier N, Jarrossay D, Ho E, Avery DT, Ma CS, Yu D, Sallusto F, Tangye SG, Mackay CR. 2011. CXCR5 expressing human central memory CD4 T cells and their relevance for humoral immune responses. *J Immunol* 186:5556-68.
15. Pallikkuth S, Parmigiani A, Silva SY, George VK, Fischl M, Pahwa R, Pahwa S. 2012. Impaired peripheral blood T-follicular helper cell function in HIV-infected nonresponders to the 2009 H1N1/09 vaccine. *Blood* 120:985-93.
16. Ma CS, Phan TG. 2017. Here, there and everywhere: T follicular helper cells on the move. *Immunology* doi:10.1111/imm.12793.
17. Rao DA, Gurish MF, Marshall JL, Slowikowski K, Fonseka CY, Liu Y, Donlin LT, Henderson LA, Wei K, Mizoguchi F, Teslovich NC, Weinblatt ME, Massarotti EM, Coblyn JS, Helfgott SM, Lee YC, Todd DJ, Bykerk VP, Goodman SM, Pernis AB, Ivashkiv LB, Karlson EW, Nigrovic PA, Filer A, Buckley CD, Lederer JA, Raychaudhuri S, Brenner MB. 2017. Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis. *Nature* 542:110-114.
18. Linterman MA, Rigby RJ, Wong RK, Yu D, Brink R, Cannons JL, Schwartzberg PL, Cook MC, Walters GD, Vinuesa CG. 2009. Follicular helper T cells are required for systemic autoimmunity. *J Exp Med* 206:561-76.
19. Bentebibel SE, Lopez S, Obermoser G, Schmitt N, Mueller C, Harrod C, Flano E, Mejias A, Albrecht RA, Blankenship D, Xu H, Pascual V, Banchereau J, Garcia-Sastre A, Palucka AK, Ramilo O, Ueno H. 2013. Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH cells correlates with antibody responses to influenza vaccination. *Sci Transl Med* 5:176ra32.
20. Locci M, Havenar-Daughton C, Landais E, Wu J, Kroenke MA, Arlehamn CL, Su LF, Cubas R, Davis MM, Sette A, Haddad EK, International AVIPCPI, Pognard P, Crotty S. 2013. Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity* 39:758-69.
21. Cohen K, Altfeld M, Alter G, Stamatatos L. 2014. Early preservation of CXCR5+ PD-1+ helper T cells and B cell activation predict the breadth of neutralizing antibody responses in chronic HIV-1 infection. *J Virol* 88:13310-21.
22. Lindqvist M, van Lunzen J, Soghoian DZ, Kuhl BD, Ranasinghe S, Kranias G, Flanders MD, Cutler S, Yudanin N, Muller MI, Davis I, Farber D, Hartjen P, Haag F, Alter G, Wiesch JS, Streeck H. 2012. Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. *J Clin Invest* doi:10.1172/JCI64314.
23. Perreau M, Savoye AL, De Crignis E, Corpataux JM, Cubas R, Haddad EK, De Leval L, Graziosi C, Pantaleo G. 2012. Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *J Exp Med* doi:10.1084/jem.20121932.
24. Deenick EK, Chan A, Ma CS, Gatto D, Schwartzberg PL, Brink R, Tangye SG. 2010. Follicular helper T cell differentiation requires continuous antigen presentation that is independent of unique B cell signaling. *Immunity* 33:241-53.

25. Fahey LM, Wilson EB, Elsaesser H, Fistonich CD, McGavern DB, Brooks DG. 2011. Viral persistence redirects CD4 T cell differentiation toward T follicular helper cells. *J Exp Med* 208:987-99.
26. Petrovas C, Yamamoto T, Gerner MY, Boswell KL, Wloka K, Smith EC, Ambrozak DR, Sandler NG, Timmer KJ, Sun X, Pan L, Poholek A, Rao SS, Brenchley JM, Alam SM, Tomaras GD, Roederer M, Douek DC, Seder RA, Germain RN, Haddad EK, Koup RA. 2012. CD4 T follicular helper cell dynamics during SIV infection. *J Clin Invest* doi:10.1172/JCI63039.
27. Klatt NR, Vinton CL, Lynch RM, Canary LA, Ho J, Darrah PA, Estes JD, Seder RA, Moir SL, Brenchley JM. 2011. SIV infection of rhesus macaques results in dysfunctional T- and B-cell responses to neo and recall Leishmania major vaccination. *Blood* 118:5803-12.
28. Xu Y, Weatherall C, Bailey M, Alcantara S, De Rose R, Estaquier J, Wilson K, Suzuki K, Corbeil J, Cooper DA, Kent SJ, Kelleher AD, Zaunders J. 2013. SIV Infects Follicular Helper CD4 T cells in Lymphoid Tissues During Pathogenic Infection of Pigtail Macaques. *J Virol* doi:10.1128/JVI.02497-12.
29. Hong JJ, Amancha PK, Rogers K, Ansari AA, Villinger F. 2012. Spatial alterations between CD4(+) T follicular helper, B, and CD8(+) T cells during simian immunodeficiency virus infection: T/B cell homeostasis, activation, and potential mechanism for viral escape. *J Immunol* 188:3247-56.
30. Fukazawa Y, Lum R, Okoye AA, Park H, Matsuda K, Bae JY, Hagen SI, Shoemaker R, Deleage C, Lucero C, Morcock D, Swanson T, Legasse AW, Axthelm MK, Hesselgesser J, Geleziunas R, Hirsch VM, Edlefsen PT, Piatak M, Jr., Estes JD, Lifson JD, Picker LJ. 2015. B cell follicle sanctuary permits persistent productive simian immunodeficiency virus infection in elite controllers. *Nat Med* 21:132-9.
31. Pallikkuth S, Sharkey M, Babic DZ, Gupta S, Stone GW, Fischl MA, Stevenson M, Pahwa S. 2015. Peripheral T Follicular Helper Cells Are the Major HIV Reservoir within Central Memory CD4 T Cells in Peripheral Blood from Chronically HIV-Infected Individuals on Combination Antiretroviral Therapy. *J Virol* 90:2718-28.
32. Banga R, Procopio FA, Noto A, Pollakis G, Cavassini M, Ohmiti K, Corpataux JM, de Leval L, Pantaleo G, Perreau M. 2016. PD-1(+) and follicular helper T cells are responsible for persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals. *Nat Med* 22:754-61.
33. Fogelman I, Davey V, Ochs HD, Elashoff M, Feinberg MB, Mican J, Siegel JP, Sneller M, Lane HC. 2000. Evaluation of CD4+ T cell function In vivo in HIV-infected patients as measured by bacteriophage phiX174 immunization. *J Infect Dis* 182:435-41.
34. Moir S, Fauci AS. 2009. B cells in HIV infection and disease. *Nat Rev Immunol* 9:235-45.
35. Cubas RA, Mudd JC, Savoye AL, Perreau M, van Grevenynghe J, Metcalf T, Connick E, Meditz A, Freeman GJ, Abesada-Terk G, Jr., Jacobson JM, Brooks AD, Crotty S, Estes JD, Pantaleo G, Lederman MM, Haddad EK. 2013. Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nat Med* 19:494-9.

36. Bussmann BM, Reiche S, Bieniek B, Krznicaric I, Ackermann F, Jassoy C. 2010. Loss of HIV-specific memory B-cells as a potential mechanism for the dysfunction of the humoral immune response against HIV. *Virology* 397:7-13.
37. van Gils MJ, Sanders RW. 2013. Broadly neutralizing antibodies against HIV-1: templates for a vaccine. *Virology* 435:46-56.
38. Stamatatos L, Morris L, Burton DR, Mascola JR. 2009. Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? *Nat Med* 15:866-70.
39. Richman DD, Wrin T, Little SJ, Petropoulos CJ. 2003. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4144-9.
40. Haynes BF, Kelsoe G, Harrison SC, Kepler TB. 2012. B-cell-lineage immunogen design in vaccine development with HIV-1 as a case study. *Nat Biotechnol* 30:423-33.
41. Wu X, Zhou T, Zhu J, Zhang B, Georgiev I, Wang C, Chen X, Longo NS, Louder M, McKee K, O'Dell S, Perfetto S, Schmidt SD, Shi W, Wu L, Yang Y, Yang ZY, Yang Z, Zhang Z, Bonsignori M, Crump JA, Kapiga SH, Sam NE, Haynes BF, Simek M, Burton DR, Koff WC, Doria-Rose NA, Connors M, Program NCS, Mullikin JC, Nabel GJ, Roederer M, Shapiro L, Kwong PD, Mascola JR. 2011. Focused evolution of HIV-1 neutralizing antibodies revealed by structures and deep sequencing. *Science* 333:1593-602.
42. Walker BD, Yu XG. 2013. Unravelling the mechanisms of durable control of HIV-1. *Nat Rev Immunol* 13:487-98.
43. Chakrabarti LA, Simon V. 2010. Immune mechanisms of HIV control. *Curr Opin Immunol* 22:488-96.
44. Grabar S, Selinger-Leneman H, Abgrall S, Pialoux G, Weiss L, Costagliola D. 2009. Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV. *AIDS* 23:1163-9.
45. Saez-Cirion A, Lacabaratz C, Lambotte O, Vermisse P, Urrutia A, Boufassa F, Barre-Sinoussi F, Delfraissy J, Sinet M, Pancino G, Venet A, ANRS EP36 HIV CONTROLLERS study group. 2007. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar CTL activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:6776-6781.
46. Almeida JR, Sauce D, Price DA, Papagno L, Shin SY, Moris A, Larsen M, Pancino G, Douek DC, Autran B, Saez-Cirion A, Appay V. 2009. Antigen sensitivity is a major determinant of CD8+ T-cell polyfunctionality and HIV-suppressive activity. *Blood* 113:6351-60.
47. Younes SA, Yassine-Diab B, Dumont AR, Boulassel MR, Grossman Z, Routy JP, Sekaly RP. 2003. HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity. *J Exp Med* 198:1909-22.
48. Kaufmann DE, Kavanagh DG, Pereyra F, Zaunders JJ, Mackey EW, Miura T, Palmer S, Brockman M, Rathod A, Piechocka-Trocha A, Baker B, Zhu B, Le Gall S, Waring MT, Ahern R, Moss K,

- Kelleher AD, Coffin JM, Freeman GJ, Rosenberg ES, Walker BD. 2007. Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat Immunol* 8:1246-54.
49. Benati D, Galperin M, Lambotte O, Gras S, Lim A, Mukhopadhyay M, Nouel A, Campbell KA, Lemercier B, Claireaux M, Hendou S, Lechat P, de Truchis P, Boufassa F, Rossjohn J, Delfraissy JF, Arenzana-Seisdedos F, Chakrabarti LA. 2016. Public T cell receptors confer high-avidity CD4 responses to HIV controllers. *J Clin Invest* 126:2093-108.
50. Pereyra F, Palmer S, Miura T, Block BL, Wiegand A, Rothchild AC, Baker B, Rosenberg R, Cutrell E, Seaman MS, Coffin JM, Walker BD. 2009. Persistent low-level viremia in HIV-1 elite controllers and relationship to immunologic parameters. *J Infect Dis* 200:984-90.
51. Guan Y, Sajadi MM, Kamin-Lewis R, Fouts TR, Dimitrov A, Zhang Z, Redfield RR, DeVico AL, Gallo RC, Lewis GK. 2009. Discordant memory B cell and circulating anti-Env antibody responses in HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:3952-7.
52. Buckner CM, Kardava L, Zhang X, Gittens K, Justement JS, Kovacs C, McDermott AB, Li Y, Sajadi MM, Chun TW, Fauci AS, Moir S. 2016. Maintenance of HIV-Specific Memory B-Cell Responses in Elite Controllers Despite Low Viral Burdens. *J Infect Dis* 214:390-8.
53. Rouers A, Klingler J, Su B, Samri A, Laumond G, Even S, Avettand-Fenoel V, Richetta C, Paul N, Boufassa F, Hocqueloux L, Mouquet H, Rouzioux C, Lambotte O, Autran B, Graff-Dubois S, Moog C, Moris A, Cohort AC. 2017. HIV-Specific B Cell Frequency Correlates with Neutralization Breadth in Patients Naturally Controlling HIV-Infection. *EBioMedicine* doi:10.1016/j.ebiom.2017.05.029.
54. Ma CS, Deenick EK. 2014. Human T follicular helper (Tfh) cells and disease. *Immunol Cell Biol* 92:64-71.
55. Kaufmann DE, Bailey PM, Sidney J, Wagner B, Norris PJ, Johnston MN, Cosimi LA, Addo MM, Lichterfeld M, Altfeld M, Frahm N, Brander C, Sette A, Walker BD, Rosenberg ES. 2004. Comprehensive analysis of human immunodeficiency virus type 1-specific CD4 responses reveals marked immunodominance of gag and nef and the presence of broadly recognized peptides. *J Virol* 78:4463-77.
56. Ransinghe S, Flanders M, Cutler S, Soghoian DZ, Ghebremichael M, Davis I, Lindqvist M, Pereyra F, Walker BD, Heckerman D, Streeck H. 2012. HIV-Specific CD4 T Cell Responses to Different Viral Proteins Have Discordant Associations with Viral Load and Clinical Outcome. *J Virol* 86:277-283.
57. Vingert B, Perez-Patrigeon S, Jeannin P, Lambotte O, Boufassa F, Lemaitre F, Kwok WW, Theodorou I, Delfraissy JF, Theze J, Chakrabarti LA, Group AEHCS. 2010. HIV controller CD4+ T cells respond to minimal amounts of Gag antigen due to high TCR avidity. *PLoS Pathog* 6:e1000780.

58. Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, Casazza JP, Kuruppu J, Kunstman K, Wolinsky S, Grossman Z, Dybul M, Oxenius A, Price DA, Connors M, Koup RA. 2002. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature* 417:95-8.
59. Chavele KM, Merry E, Ehrenstein MR. 2015. Cutting edge: circulating plasmablasts induce the differentiation of human T follicular helper cells via IL-6 production. *J Immunol* 194:2482-5.
60. Aubertin AM, Le Grand R, Wang Y, Beyer C, Tao L, Neildez O, Barre-Sinoussi F, Hurtrel B, Moog C, Lehner T, Girard M. 2000. Generation of CD8+ T cell-generated suppressor factor and beta-chemokines by targeted iliac lymph node immunization in rhesus monkeys challenged with SHIV-89.6P by the rectal route. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:381-92.
61. Porichis F, Kaufmann DE. 2011. HIV-specific CD4 T cells and immune control of viral replication. *Curr Opin HIV AIDS* 6:174-80.
62. Okazaki T, Chikuma S, Iwai Y, Fagarasan S, Honjo T. 2013. A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat Immunol* 14:1212-8.
63. Sauce D, Almeida JR, Larsen M, Haro L, Autran B, Freeman GJ, Appay V. 2007. PD-1 expression on human CD8 T cells depends on both state of differentiation and activation status. *Aids* 21:2005-13.
64. Youngblood B, Noto A, Porichis F, Akondy RS, Ndhlovu ZM, Austin JW, Bordi R, Procopio FA, Miura T, Allen TM, Sidney J, Sette A, Walker BD, Ahmed R, Boss JM, Sekaly RP, Kaufmann DE. 2013. Cutting edge: Prolonged exposure to HIV reinforces a poised epigenetic program for PD-1 expression in virus-specific CD8 T cells. *J Immunol* 191:540-4.
65. Hatano H, Yukl SA, Ferre AL, Graf EH, Somsouk M, Sinclair E, Abdel-Mohsen M, Liegler T, Harvill K, Hoh R, Palmer S, Bacchetti P, Hunt PW, Martin JN, McCune JM, Tracy RP, Busch MP, O'Doherty U, Shacklett BL, Wong JK, Deeks SG. 2013. Prospective antiretroviral treatment of asymptomatic, HIV-1 infected controllers. *PLoS Pathog* 9:e1003691.
66. Benati D, Galperin M, Lambotte O, Gras S, Lim A, Mukhopadhyay M, Nouël A, Campbell KA, Lemercier B, Claireaux M, Hendou S, Lechat P, De Truchis P, Boufassa F, Rossjohn J, Delfraissy JF, Arenzana-Seisdedos F, Chakrabarti LA. in press. Public TCRs confer high-avidity responses to HIV Controllers. *Journal of Clinical Investigation*.
67. Martin-Gayo E, Cronin J, Hickman T, Ouyang Z, Lindqvist M, Kolb KE, Schulze Zur Wiesch J, Cubas R, Porichis F, Shalek AK, van Lunzen J, Haddad EK, Walker BD, Kaufmann DE, Lichterfeld M, Yu XG. 2017. Circulating CXCR5+CXCR3+PD-1^{lo} Tfh-like cells in HIV-1 controllers with neutralizing antibody breadth. *JCI Insight* 2:e89574.
68. Buranapraditkun S, Pissani F, Teigler JE, Schultz BT, Alter G, Marovich M, Robb ML, Eller MA, Martin J, Deeks S, Michael NL, Streeck H. 2017. Preservation of Peripheral T Follicular Helper Cell Function in HIV Controllers. *J Virol* 91.
69. Scheid JF, Mouquet H, Feldhahn N, Seaman MS, Velinzon K, Pietzsch J, Ott RG, Anthony RM, Zebroski H, Hurley A, Phogat A, Chakrabarti B, Li Y, Connors M, Pereyra F, Walker BD,

- Wardemann H, Ho D, Wyatt RT, Mascola JR, Ravetch JV, Nussenzweig MC. 2009. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature* 458:636-40.
70. Cubas R, van Grevenynghe J, Wills S, Kardava L, Santich BH, Buckner CM, Muir R, Tardif V, Nichols C, Procopio F, He Z, Metcalf T, Ghneim K, Locci M, Ancuta P, Routy JP, Trautmann L, Li Y, McDermott AB, Koup RA, Petrovas C, Migueles SA, Connors M, Tomaras GD, Moir S, Crotty S, Haddad EK. 2015. Reversible Reprogramming of Circulating Memory T Follicular Helper Cell Function during Chronic HIV Infection. *J Immunol* 195:5625-36.
71. Vingert B, Benati D, Lambotte O, de Truchis P, Slama L, Jeannin P, Galperin M, Perez-Patrigeon S, Boufassa F, Kwok WW, Lemaitre F, Delfraissy JF, Theze J, Chakrabarti LA. 2012. HIV controllers maintain a population of highly efficient Th1 effector cells in contrast to patients treated in the long term. *J Virol* 86:10661-74.
72. Fernandez S, Tanaskovic S, Helbig K, Rajasuriar R, Kramski M, Murray JM, Beard M, Purcell D, Lewin SR, Price P, French MA. 2011. CD4+ T-cell deficiency in HIV patients responding to antiretroviral therapy is associated with increased expression of interferon-stimulated genes in CD4+ T cells. *J Infect Dis* 204:1927-35.
73. Harker JA, Lewis GM, Mack L, Zuniga EI. 2011. Late interleukin-6 escalates T follicular helper cell responses and controls a chronic viral infection. *Science* 334:825-9.
74. Jabado N, Pallier A, Le Deist F, Bernard F, Fischer A, Hivroz C. 1997. CD4 ligands inhibit the formation of multifunctional transduction complexes involved in T cell activation. *J Immunol* 158:94-103.
75. Bogers W, Barnett SW, Oostermeijer H, Nieuwenhuis IG, Beenhakker N, Mortier D, Mooij P, Koopman G, Remarque E, Martin G, Pei-Jen Lai R, Dey AK, Sun Y, Burke B, Ferrari G, Montefiori D, Martin L, Davis D, Srivastava I, Heeney JL. 2017. Increased, durable B-cell and ADCC Responses Associated with T-helper Responses to HIV-1 Envelope in Macaques Vaccinated with gp140 Occluded at the CD4 Receptor Binding Site. *J Virol* doi:10.1128/JVI.00811-17.
76. Kiepiela P, Ngumbela K, Thobakgale C, Ramduth D, Honeyborne I, Moodley E, Reddy S, de Pierres C, Mncube Z, Mkhwanazi N, Bishop K, van der Stok M, Nair K, Khan N, Crawford H, Payne R, Leslie A, Prado J, Prendergast A, Frater J, McCarthy N, Brander C, Learn GH, Nickle D, Rousseau C, Coovadia H, Mullins JI, Heckerman D, Walker BD, Goulder P. 2007. CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat Med* 13:46-53.
77. Ranasinghe S, Soghoian DZ, Lindqvist M, Ghebremichael M, Donaghey F, Carrington M, Seaman MS, Kaufmann DE, Walker BD, Porichis F. 2015. HIV-1 Antibody Neutralization Breadth Is Associated with Enhanced HIV-Specific CD4+ T Cell Responses. *J Virol* 90:2208-20.
78. Storcksdieck genannt Bonsmann M, Niezold T, Temchura V, Pissani F, Ehrhardt K, Brown EP, Osei-Owusu NY, Hannaman D, Hengel H, Ackerman ME, Streeck H, Nabi G, Tenbusch M, Uberla

K. 2015. Enhancing the Quality of Antibodies to HIV-1 Envelope by GagPol-Specific Th Cells. *J Immunol* 195:4861-72.

LEGENDS TO THE FIGURES

Figure 1: Phenotyping of the total cTfh population

Flow cytometry analysis of CD4+ T cells derived from healthy donors (HD, n=8), HIV Controllers (HIC, n=10), and treated patients (ART, n=14).

(A) Representative plots depicting the gating of analyzed subsets in the CD4+ T cell population. Left: Viable CD4+ T cells were initially gated as viable CD3+ CD20- CD14- CD8- CD4+ cells, and were then analyzed for the following subsets: MemX5- (CD45RA- CXCR5-; purple square) and cTfh (CD45RA- CXCR5+; orange square). Right: the MemX5- and cTfh subsets were then analyzed in function of CCR7 and PD-1 expression.

(B) Comparison of the frequency of cTfh in CD4+ T cells between healthy donor, HIV Controller and treated patient groups.

(C-D) Comparison of the frequency of CCR7+ (C) and PD-1+ (D) cells within the MemX5- and cTfh subsets between healthy donor, HIV Controller, and treated patient groups.

Bars represent medians. Significant differences ($P < 0.05$) obtained with the Mann-Whitney U test are reported.

Figure 2 : Phenotyping of HIV-specific cTfh cells.

Phenotyping of CD4+ T cells derived from HIV Controllers (HIC, n=10) and treated patients (ART, n=8) with MHC II tetramers.

(A) Gating strategy used to analyze HIV-specific CD4+ T cells. Left: representative plot depicting the detection of Gag293-specific CD4+ T cells by MHC-II tetramer labeling. Middle: Gates used to select Mem X5- (CD45RA- CXCR5-; purple) and cTfh (CD45RA- CXCR5+; orange) in Gag293-specific (bottom) or non-specific (top) CD4+ T cells populations.

(B) Frequency of Gag293-specific cTfh cells in the HIC and ART groups.

(C) Comparison of the frequency of cTfh cells in the memory CD45RA- CD4+ T cells populations that are Gag293-specific (Tet+) or non-specific (Tet-) in the HIC and ART groups.

(D) Frequency of total Gag293-specific cells in CD4+ T cells of controllers and treated patients.

(E) Frequency of CCR7+ cells in the cTfh or MemX5- cell populations : Comparison between Gag293-specific (Tet+) or non-specific (Tet-) CD4+ T cells in the HIC and ART groups.

Bars represent medians. Significant differences ($P < 0.05$) obtained with the Mann-Whitney U test are reported.

Figure 3. Analysis of PD-1 expression in HIV-specific cTfh cells.

Phenotyping Gag293-specific and non-specific CD4+ T cells derived from HIV Controllers (HIC, n=10) and treated patients (ART, n=8). The gating strategy used is identical to one described in Figure 2A.

(A) Frequency of PD-1+ cells in the cTfh and MemX5- cell populations: comparison between the Gag293-specific (Tet+) and non-specific (Tet-) CD4+ T cell populations in HIC and ART groups.

(B) Comparison of the frequency of PD-1+ cells in paired cTfh and MemX5- Gag293-specific populations from the HIC and ART groups.

(C) Mean fluorescence intensity (MFI) of PD-1 expression in the PD-1+ subset of cTfh and MemX5- cell populations: comparison between Gag293-specific (Tet+) and non-specific (Tet-) CD4+ T cell populations in the HIC and ART groups.

(D) Comparison of the MFI of PD-1+ cells in paired cTfh and MemX5- Gag293-specific populations from the HIC and ART groups.

(E-F) Correlation between the frequency of PD-1+ cells in the Gag293-specific cTfh population and the frequency of cTfh within the Gag293-specific population in the HIC (left) and ART (right) groups.

Bars represent medians. Significant differences ($P < 0.05$) obtained by the Mann-Whitney U test (A and C), the Wilcoxon matched pairs statistical test (B and D), and the Spearman's rank correlation coefficient test (E) are reported.

Figure 4: cTfh induction of B cell maturation and IgG production

Thawed PBMCs from healthy donors were sorted into 3 CD4+ T cell subsets: cTfh (CD3+ CD20- CD4+ CD45RA- CXCR5+; orange), MemX5- (CD3+ CD20- CD4+ CD45RA- CXCR5-; purple), and Nv or naive CD4+ T cells (CD3+ CD20- CD4+ CD45RA+ CCR7+; green). The gating strategy is provided in Supplementary Figure S1. Each of these 3 subsets was then cocultured with autologous memory B cells (CD3- CD20+ CD27+) in the presence of superantigens. Cells or supernatants were harvested at day 7 and 12 respectively.

(A) Representative flow cytometry plots depicting B cell maturation following 7 days of coculture. Top panels: B cell gate (CD3- CD4-); bottom panels: analysis of plasmablasts (CD38hi) in the B cell population.

(B) Absolute number of CD38hi expressing B cells at day 7 of coculture with the 3 distinct CD4+ T cell subsets Nv (green), MemX5- (purple), and cTfh (orange).

(C) Total IgG secretion measured by ELISA in the supernatants of the cocultures at day 12.

(D) Correlation between the number of CD38hi plasmablasts and total IgG production in the cocultures.

Bars represent medians. Significant differences ($P < 0.05$) obtained by the Wilcoxon matched pairs statistical test are reported.

Figure 5: Analysis of patient cTfh-mediated help to autologous memory B cells

PBMCs from healthy donors (HD), HIV Controllers (HIC) and treated patients (ART) were sorted into 3 CD4+ T cells subsets and cocultured with memory B cells as described in Figure 4.

(A) Total IgG secretion was measured by ELISA in coculture supernatants at day 12. (A) IgG secretion was compared in cocultures of memory B cells with naive CD4+ T cells (Nv), memory CXCR5- CD4+ T cells (MemX5-), and cTfh in the HIC (n=6, left) and ART (n=5, right) groups.

(B) Comparison of total IgG secretion in memory B cells/cTfh cocultures for the HD (n=9), HIC (n=13), and ART (n=8) groups.

(C) The B cell phenotype was analyzed at day 7 days of coculture. The absolute number of plasmablasts (CD3- CD4- CD38hi) present in the different cocultures systems (Nv, MemX5-, and cTfh) was compared in HIC (n=3, left) and ART (n=4, right) patients.

(D) Comparison of the absolute number of plasmablasts in memory B cells/cTfh co-cultures in the HD (n=7), HIC (n=9) and ART (n=6) groups.

(E) Correlation between the amount of secreted IgG and the absolute number of plasmablasts in memory B cells/cTfh cocultures from HIC (red squares) and HAART (blue triangles) patients.

(F) Effects of IL-6 addition on total IgG secretion in memory B cells/cTfh cocultures from HIC (left panel) and ART (right panel) patients.

Bars represents medians. Significant differences ($P < 0.05$) obtained by the Wilcoxon matched pairs statistical test (A, C, and F), the Mann-Whitney U test (B and D), and the Spearman's rank correlation coefficient test (E) are reported.

Figure 6: Analysis of HIV-specific IgG production stimulated by cTh help

cTfh cells (CD3⁺ CD20⁻ CD4⁺ CD45RA⁻ CXCR5⁺) and memory B cells (CD3⁻ CD20⁺ CD27⁺) were sorted from patient PBMC samples and cocultured with superantigens in the presence or absence of IL-6. Supernatant were harvest at day 12.

(A) Levels of Gag p24-specific IgG production in presence or absence of IL-6, as measured by ELISA in cocultures from HIC (n=8) and ART patients (n=8).

(B) Ratio of p24-specific IgG to total IgG production in presence or absence of IL-6 in HIC (n=8) and ART (n=8) patient cocultures.

(C) Correlation between the level of p24-specific IgG production and the frequency of Gag293-specific cTfh in CD4⁺ T cells in HIC (red squares) and ART (blue triangles) patients.

(D) Level of Env gp140-specific IgG production in presence or absence of IL-6, as measured by ELISA in cocultures from HIC (n=9) and ART (n=8) patients.

(E) Ratio of gp140-specific IgG to total IgG production in presence or absence of IL-6 in HIC (n=8) and ART (n=8) patient cocultures.

(F) Correlation between the level of gp140-specific IgG production and the frequency of Gag293-specific cTfh in CD4⁺ T cells in HIC (red squares) and ART (blue triangles) patients.

Significant differences ($P < 0.05$) obtained by the Mann-Whitney U test (A, B, D, E) and the Spearman's rank correlation coefficient test (C, F) are reported.

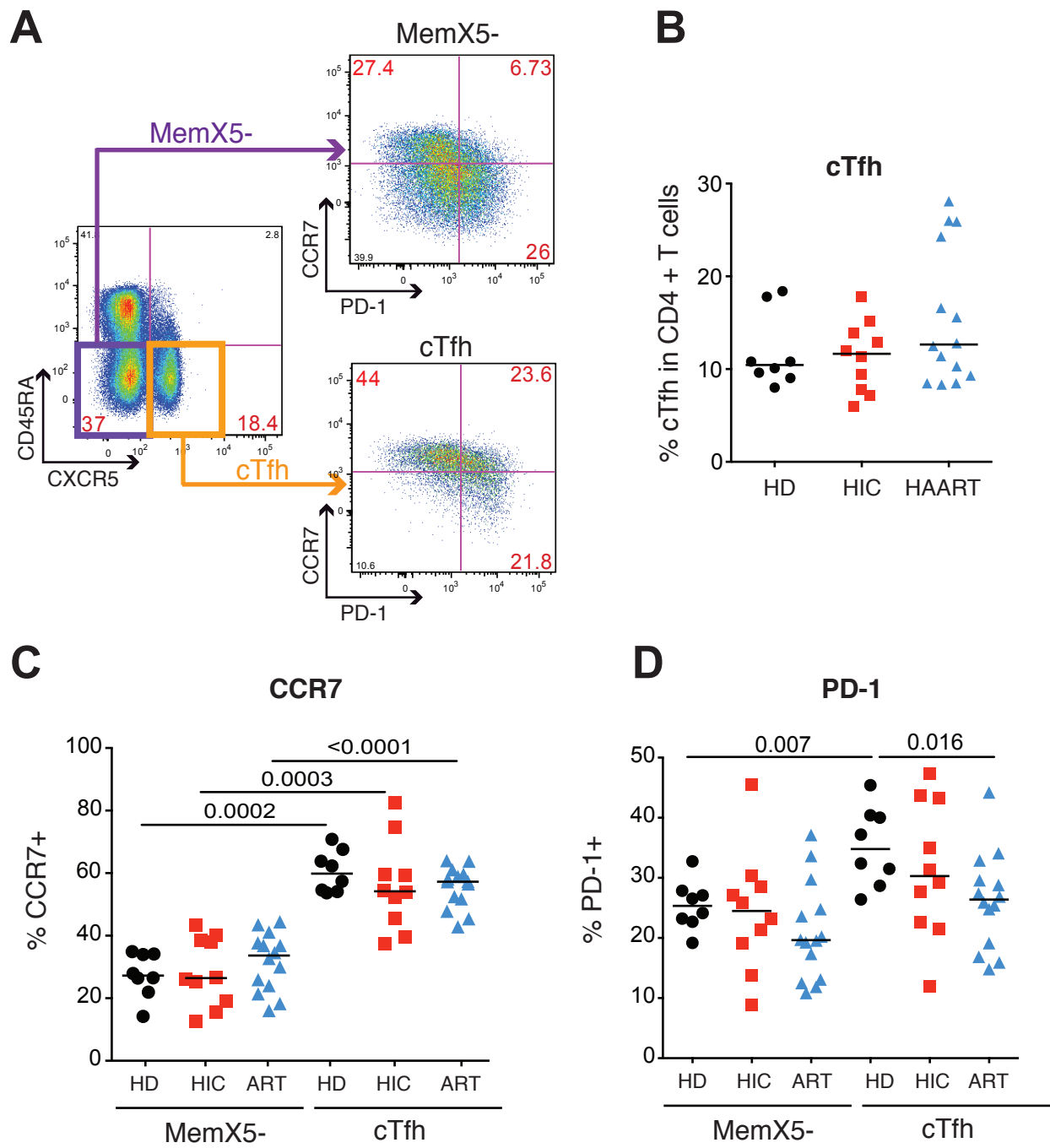


Figure 1: Phenotyping of the total cTfh population

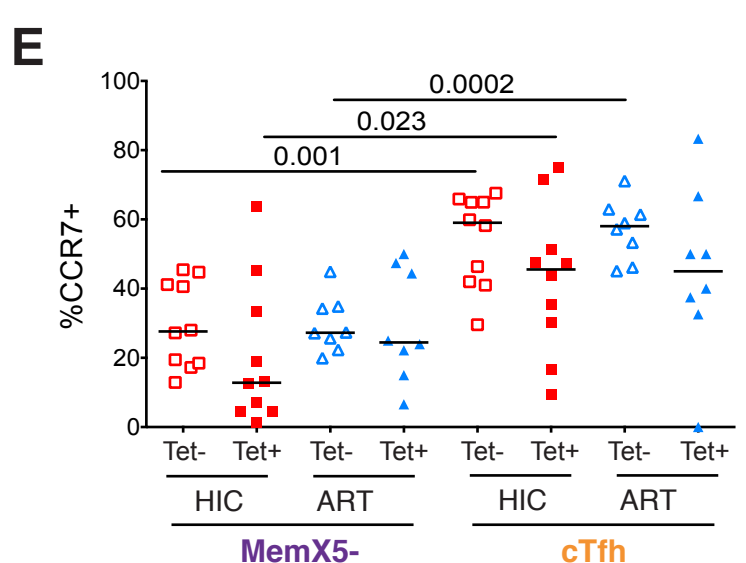
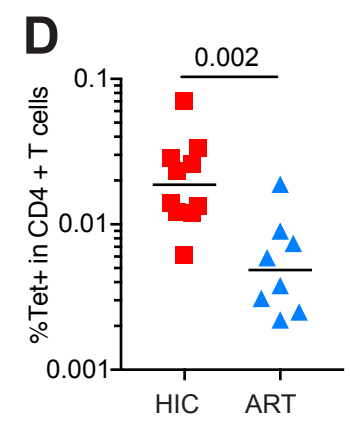
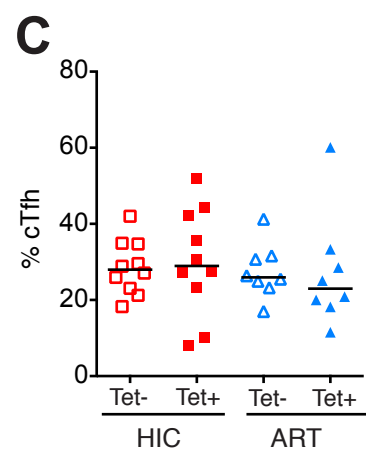
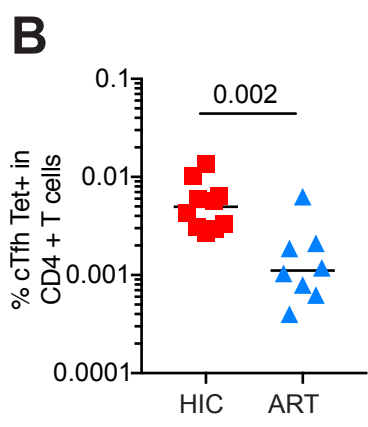
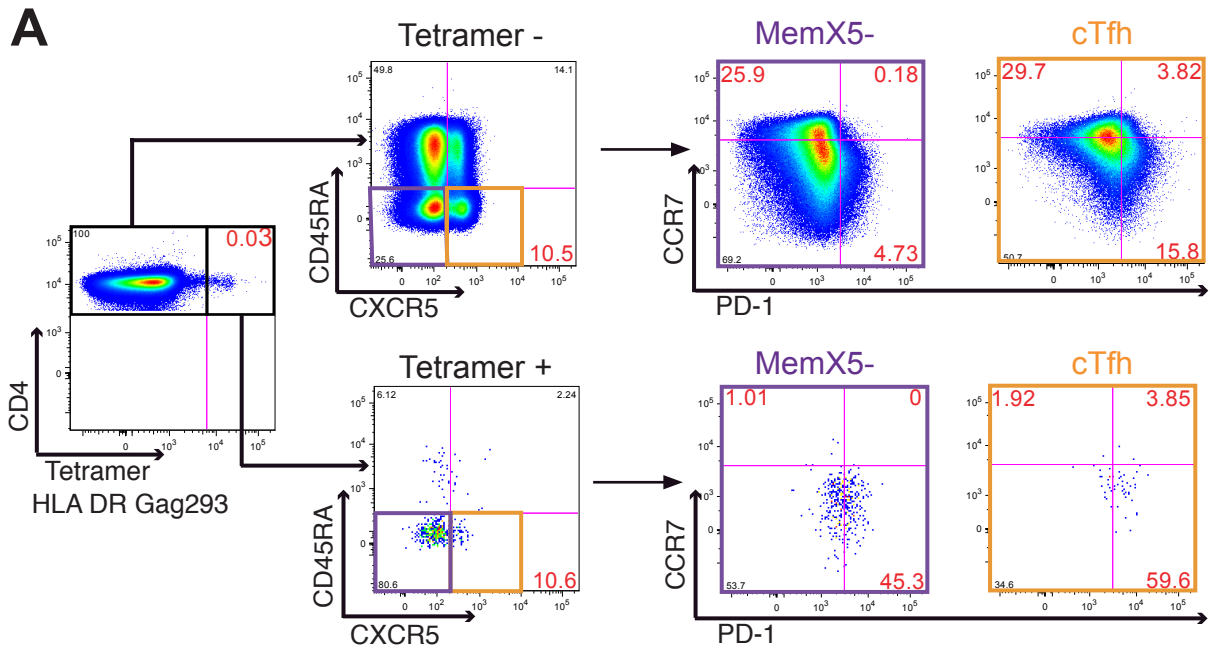


Figure 2 : Phenotyping of HIV-specific cTfh cells

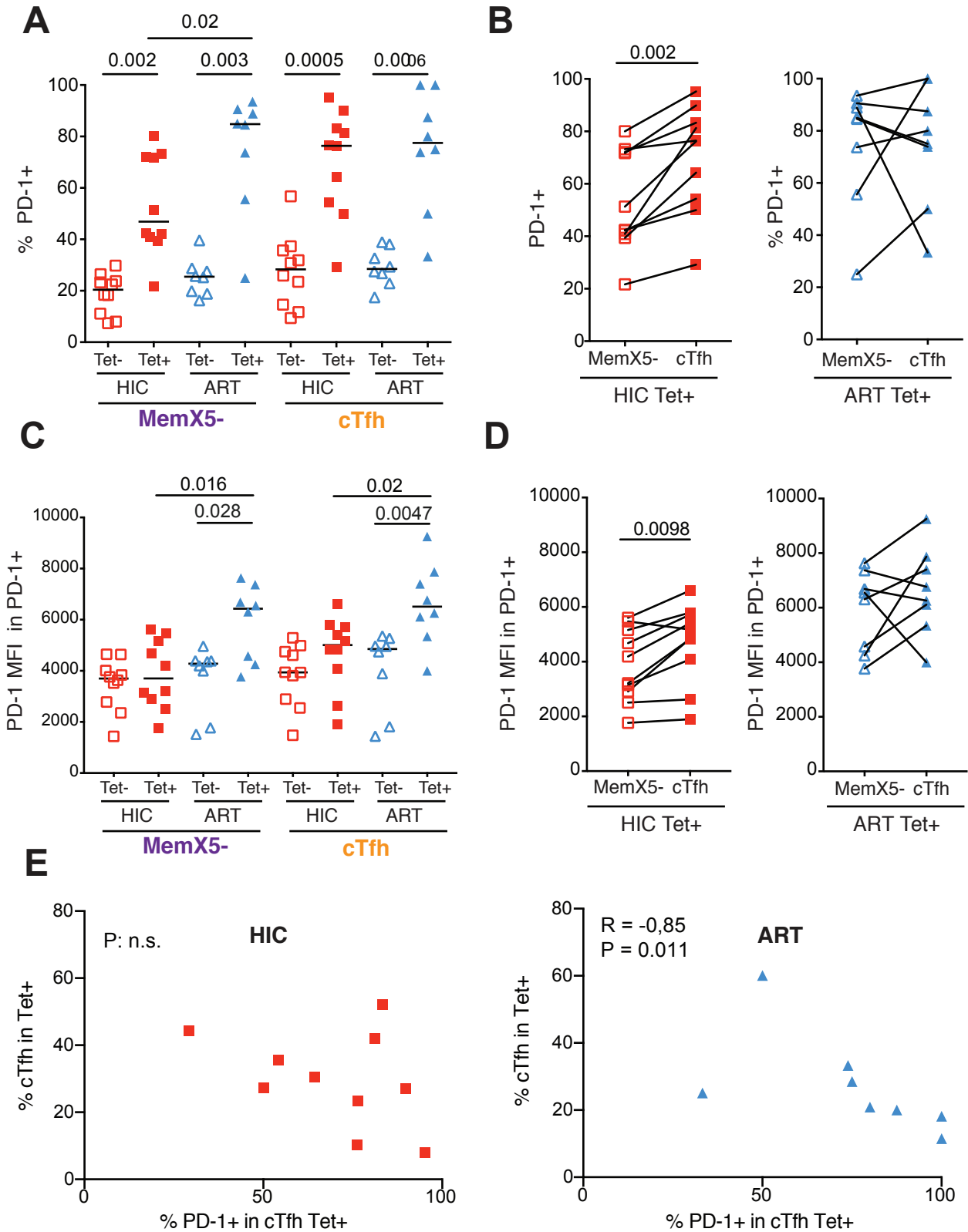


Figure 3. Analysis of PD-1 expression in HIV-specific cTfh cells

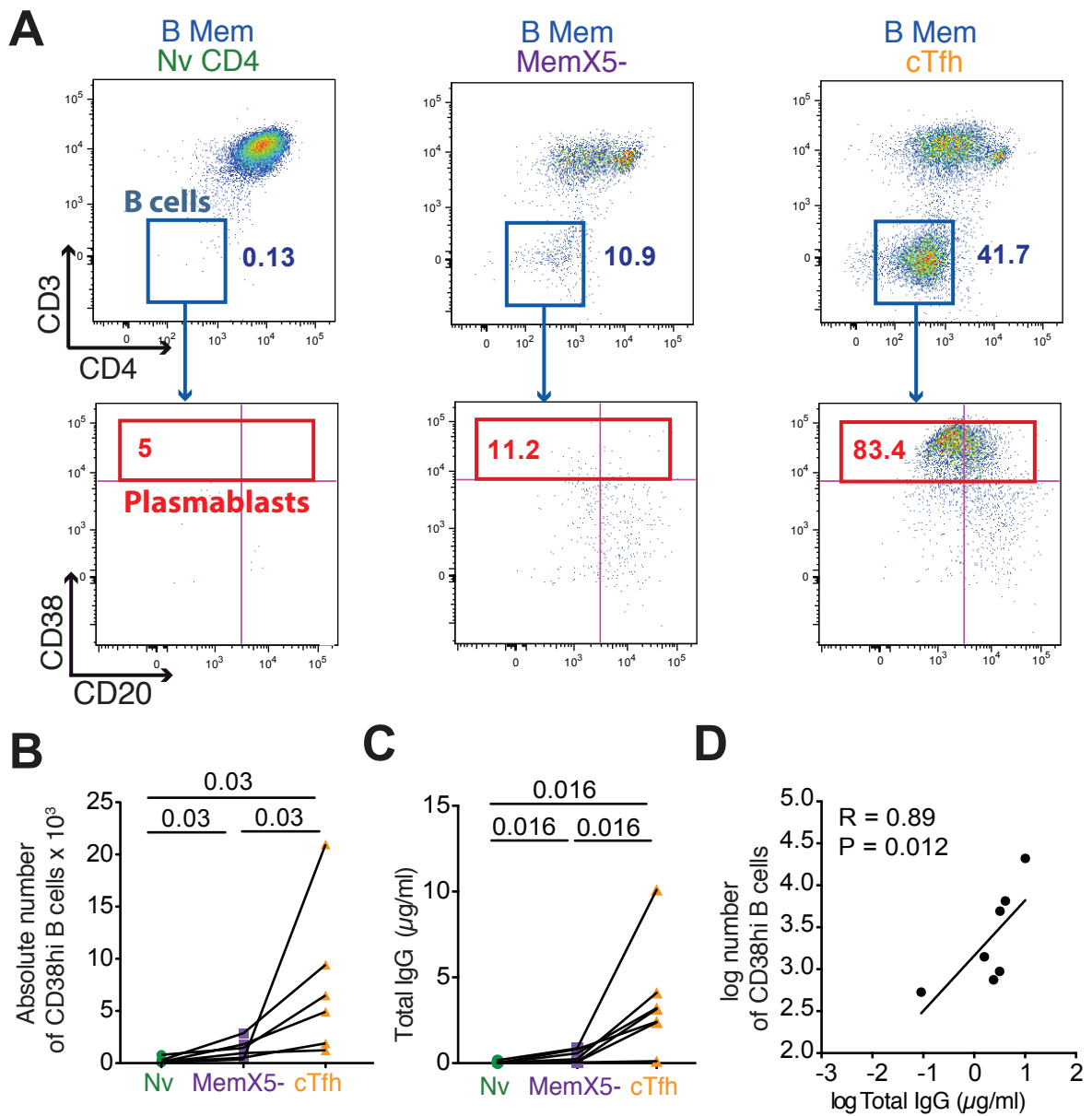


Figure 4: cTfh induction of B cell maturation and IgG production

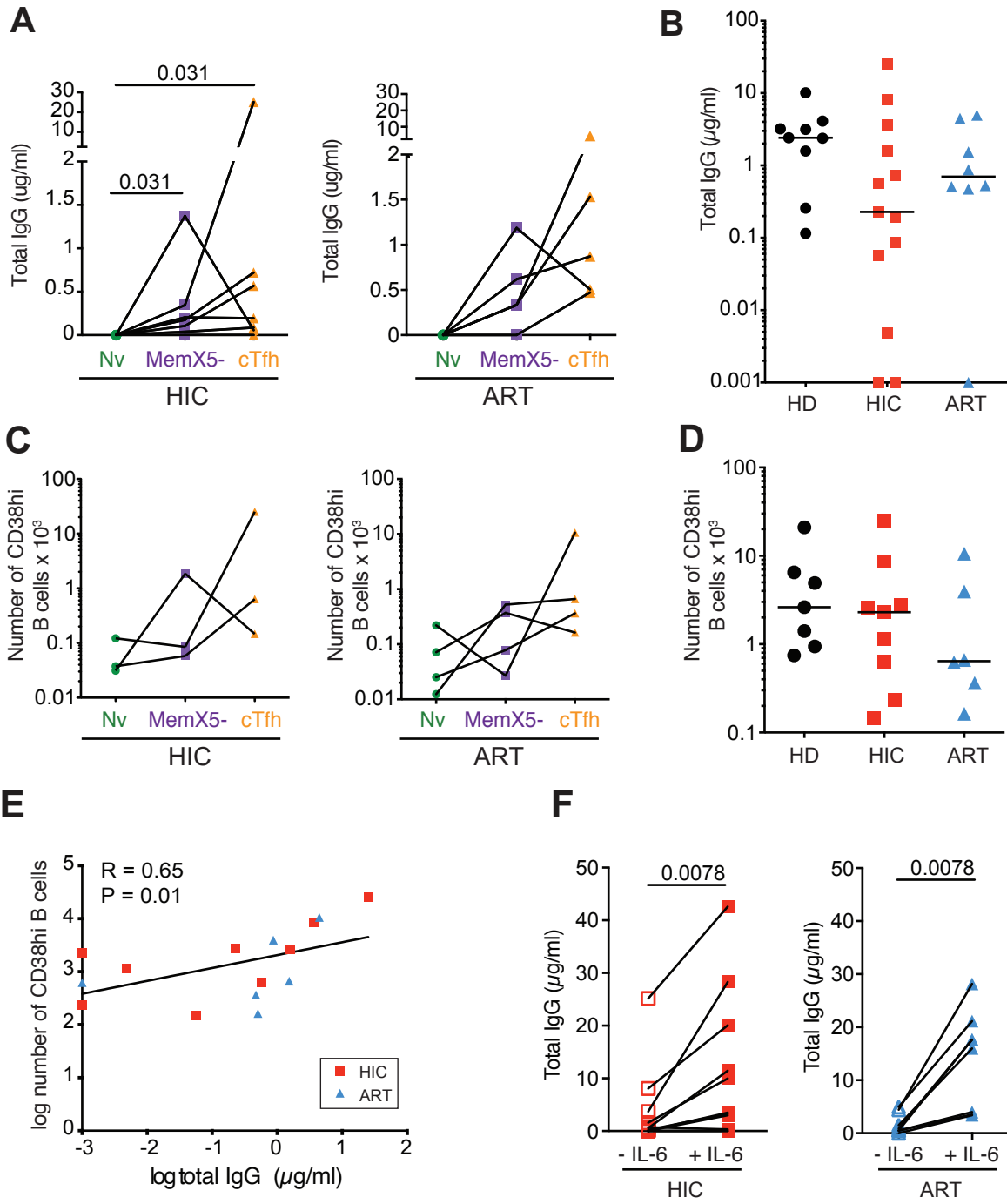


Figure 5: Analysis of patient cTfh-mediated help to autologous memory B cells

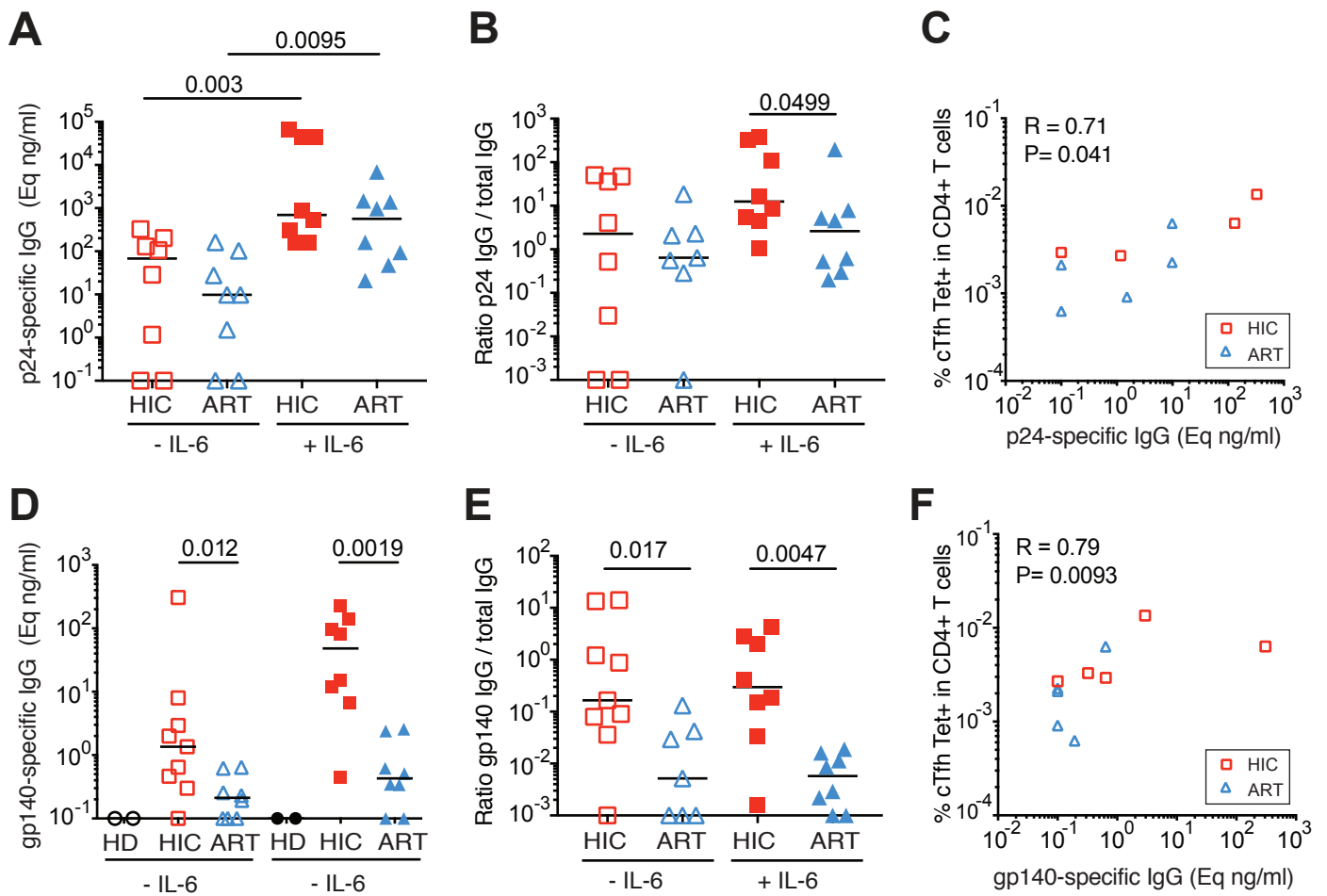
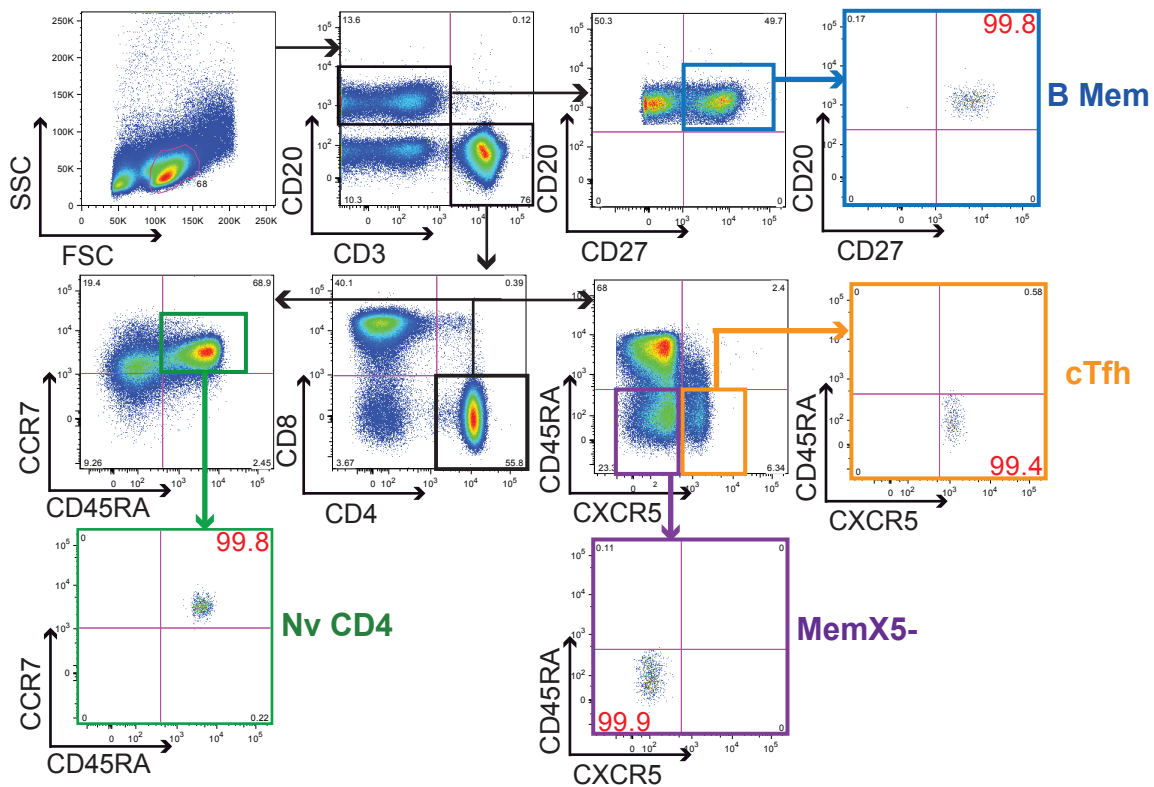
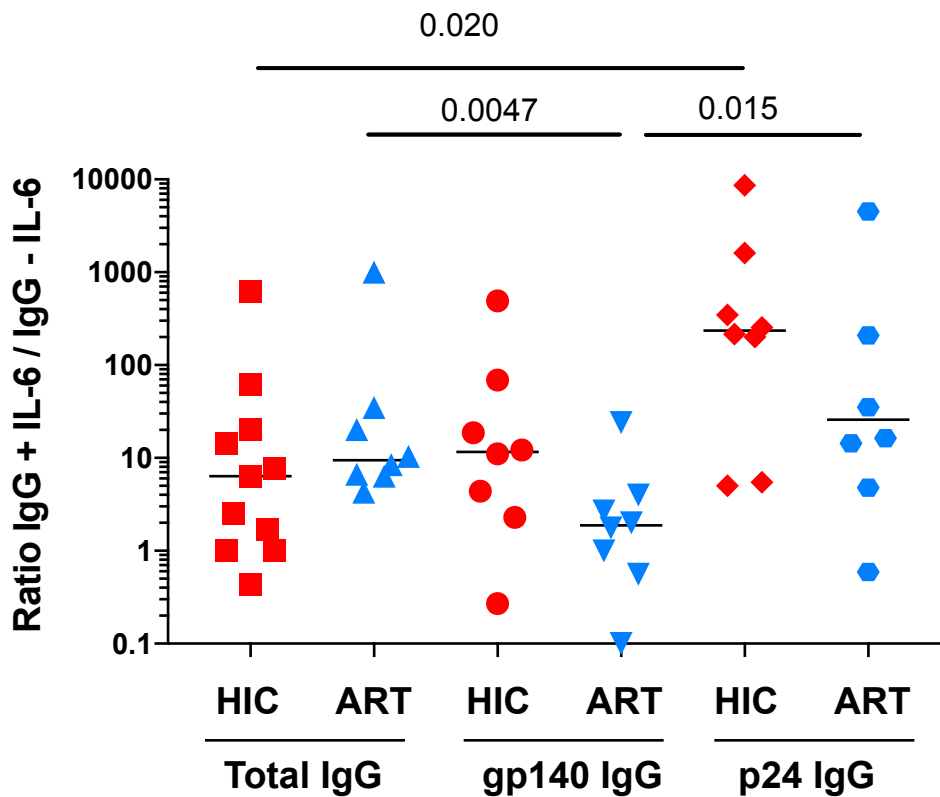


Figure 6: Analysis of HIV-specific IgG production stimulated by cTh help



Supplemental figure S1: Gating strategy used for sorting CD4+ T cell and B cell subsets.

Flow cytometry plots showing the gating strategy used for sorting cTfh cells (CD3+ CD20- CD4+ CD45RA- CXCR5+; orange), MemX5-(CD3+ CD20- CD4+ CD45RA- CXCR5-; purple), naive CD4+ T cells (CD3+ CD20- CD4+ CD45RA+ CCR7+; green), and memory B cells (CD3- CD20+ CD27+; blue) among live singlets PBMC. A representative example from a healthy donor sample pre- and post-sort is shown. Post-sort samples plot are outlined with the color corresponding to the different sub-populations.



Supplemental Figure S2: Effect of IL-6 on IgG secretion in cTfh/B cell cocultures

cTfh cells and memory B cells were cocultivated in the presence of superantigens SEA + SEE for 12 days. Supernatants were assessed for the presence of total IgG, IgG specific for HIV Env gp140, and IgG specific for HIV capsid protein Gag p24. The ratio of IgG obtained with IL-6 supplementation to IgG obtained without IL-6 is reported for cocultures of cells from HIV controllers (HIC) and treated patients (ART). Significant differences ($P < 0.05$) obtained with the Mann-Whitney U test are reported.

B. AXE 2 : Analyse en cellule unique des cellules T CD4+ spécifiques du VIH : différenciation Th1 avancée et expression réduite de CCR5 chez les Contrôleurs

B.1. Contexte

B.1.1 *L'infection à VIH*

Les phases précoces de l'infection à VIH sont caractérisées par une déplétion massive des cellules T CD4+ qui cible particulièrement les cellules T CD4+ EM exprimant à un fort niveau le corécepteur d'entrée à l'infection VIH, CCR5. L'une des caractéristiques les plus admises de la phase chronique de l'infection VIH est l'activation immunitaire généralisée, qui est induite par la production aberrante de cytokines, la translocation microbienne, mais surtout par la stimulation antigénique chronique principalement due à la réplication du VIH. Cette dernière induit une activation préférentielle des cellules spécifiques du VIH. Cette activation immunitaire chronique a pour conséquence une différenciation biaisée des cellules mémoires de longue durée de vie, telles que les CM, en cellules EM et effectrices activées, provoquant à terme une perte du potentiel de régénération, qui est la clef du maintien d'un système immunitaire compétent. De plus, les cellules T CD4+ EM et effectrices qui expriment fortement CCR5, vont alimenter le pool de cellules cibles du VIH. Enfin, une sur-activation induit l'épuisement immunitaire, via la perte de fonctions effectrices et de la capacité proliférative des cellules T CD4+ mémoires. Ces cellules deviennent fonctionnellement insensibles à une stimulation supplémentaire par l'Ag, et sont caractérisées phénotypiquement par une augmentation de l'expression de multiples récepteurs inhibiteurs tels que PD-1 ou CTLA-4. En plus d'être préférentiellement déplétées, les cellules T CD4+ spécifiques du VIH sont également épuisées.

Aujourd'hui, CCR5 est l'un des seuls marqueurs génétiques de protection avéré dans l'infection VIH. En effet, les individus homozygotes pour la mutation $\Delta 32$ sur CCR5, ne progressent pas dans la maladie, et les individus hétérozygotes WT/ $\Delta 32$ progressent lentement. De plus, dans le modèle singe, la non progression des sooty mangabeys dans l'infection à SIV est associée à une fréquence réduite des cellules T CD4+ exprimant CCR5 (279). Chez les patients progresseurs, une forte expression de CCR5 durant la phase aiguë corrèle avec la progression vers le SIDA (280), et la densité de CCR5 corrèle directement avec la charge virale du VIH (281, 282).

B.1.2 Les Contrôleurs du VIH

Les Contrôleurs du VIH sont de rares patients, qui représentent moins de 0,5 % des individus séropositifs, capables de contrôler spontanément l'infection à VIH en l'absence de traitement. Dans nos études ces patients ont une charge virale <50 copies ARN/ mL depuis plus de 10 ans. Ces patients présentent un risque très faible de progression vers le SIDA. La majorité des Contrôleurs du VIH est infectée par un virus compétent, signifiant que ce sont les facteurs de l'hôte, génétiques et / ou immuno-médiés, qui régissent le contrôle de la virémie.

B.1.3 Les cellules T CD4+ chez les Contrôleurs du VIH

La réponse T CD8+ chez les Contrôleurs du VIH a largement été étudiée, et il a clairement été montré que les cellules T CD8+ des Contrôleurs du VIH sont dotées d'un ensemble de fonctions immunitaires antivirales participant à l'inhibition de la réplication virale.

Nous nous sommes intéressés à l'étude des cellules T CD4+, car ces cellules jouent un rôle central dans la fonction du système immunitaire notamment dans la réponse antivirale: elles aident les cellules B à produire des anticorps, à améliorer et à maintenir les réponses des cellules T CD8+, à réguler la fonction des macrophages, et peuvent aussi directement tuer les cellules infectées. De plus, les cellules T CD4+ sont la cible préférentielle du VIH, et jouent donc un rôle prépondérant dans l'évolution de l'infection.

La susceptibilité à l'infection des cellules T CD4+ des Contrôleurs du VIH

La susceptibilité à l'infection des cellules T CD4+ chez les Contrôleurs du VIH est encore débattue. Une récente étude de Noel et al. montre que les Contrôleurs du VIH ont une fréquence très faible de cellules infectées (654). De plus, deux groupes ont montré que les cellules T CD4+ de Contrôleurs activées par anti-CD3 sont moins propices à l'infection par le VIH que les cellules de donneurs sains, et que le blocage du cycle du VIH s'effectuait au stade de la transcription inverse (650) (651). Plusieurs études suggèrent un contrôle de l'infection dû à un blocage au niveau de l'entrée virale, les Contrôleurs présentant une proportion de cellules T CD4+ CCR5+ plus basse que chez les patients progressifs (653). De plus, certains Contrôleurs présentent une susceptibilité réduite à l'infection de souches R5 qui pourrait être liée à une surexpression de R5-CHK, pouvant rentrer en compétition avec le virus pour l'entrée (652).

En revanche, des études menées par le groupe de Blankson et al. suggèrent que la stimulation des cellules T CD4+ *in vitro*, induit un biais dans la compréhension du mécanisme

d'infection. Ils ont montré une susceptibilité accrue à la fusion ainsi qu'à l'infection par un virus de souche R5 des cellules T CD4+ non-stimulées de Contrôleurs en comparaison à des patients progressifs. Ces différences n'étaient attribuables ni aux niveaux d'expression différentielle de CCR5, ni à l'état d'activation des lymphocytes T CD4+ (655, 656).

La contradiction entre ces études pourrait donc être attribuée aux différences dans les méthodologies utilisées afin de quantifier l'infection. Ainsi, ce conflit reste à résoudre pleinement en utilisant des études supplémentaires afin d'éclairer les facteurs intrinsèques cellulaires qui pourraient contribuer au contrôle du VIH.

Alors qu'il est clair que les cellules T CD4+ spécifiques du VIH sont une cible préférentielle du VIH, une étude de Hunt et al. s'est intéressée à la susceptibilité des cellules T CD4+ spécifiques du VIH chez les patients Contrôleurs. Ils montrent une corrélation positive entre la fréquence des cellules spécifiques de Gag et le niveau de cellules T CD4+ associé à de l'ADN ou de l'ARN viral, et suggèrent que les cellules spécifiques du VIH contribuent à la persistance virale chez les patients Contrôleurs (615).

La réponse T CD4+ dirigée contre le VIH chez les patients Contrôleurs

Les Contrôleurs du VIH montrent une proportion élevée de cellules T CD4+ spécifiques de Gag *ex vivo* par rapport aux patients traités, et cette fréquence chez les patients Contrôleurs corrèle inversement avec la charge virale, soulignant leur importance dans le contrôle viral (623, 625). En plus d'être plus nombreuses, les réponses T CD4+ anti-Gag chez les Contrôleurs sont d'une plus grande amplitude et reconnaissent une plus large diversité d'épitopes en comparaison aux patients traités. Ces réponses T CD4+ sont fortement associées à des niveaux inférieurs de virémie (617). L'infection à VIH se caractérise par l'épuisement cellulaire, c'est à dire une perte précoce du nombre et de la fonction des cellules T CD4+ spécifiques du VIH et plus particulièrement celles des cellules spécifiques de Gag qui participent au contrôle de l'infection (406, 618, 619). Mais contrairement aux patients progressifs, les cellules T CD4+ spécifiques de Gag chez les patients Contrôleurs présentent des capacités prolifératives élevées (Emu et al., 2005; Potter et al. 2007; Dyer et al., 2008; Rosenberg et al., 1997; Younes Et al., 2003) et sont particulièrement efficaces, plus polyfonctionnelles que celles des patients traités et ont plus grande capacité à produire simultanément des cytokines Th1 comme IL-2, IFN γ , TNF α , CCL4 (573, 625-627).

Les patients Contrôleurs semblent donc mieux protégés contre l'épuisement de leurs cellules T CD4+ spécifiques, qui maintiennent une fonction proliférative élevée et une réponse cytokinique polyfonctionnelle. Ces caractéristiques sont associées à une expression diminuée des récepteurs inhibiteurs PD-1 et CTLA-4 en comparaison aux patients traités. L'expression de ces récepteurs inhibiteurs corrèle directement avec le stade de l'infection et la charge virale (Kaufmann et al., 2007; Porichis et al. . 2011) (504).

Les Contrôleurs du VIH abritent une population de cellules T CD4+ portant des TCR de forte avidité, qui sont capables de répondre à une quantité minimale de peptides Gag293 immunodominants (623). Dans une étude récente à laquelle j'ai participé (cf **Annexe 1**), nous avons recherché les déterminants moléculaires qui sous-tendent à cette réponse de haute avidité chez les cellules T CD4+ de patients Contrôleurs, et caractérisé le répertoire TCR des cellules T CD4+ spécifiques pour l'épitope immunodominant Gag293. Les Contrôleurs du VIH ont montré un répertoire TCR hautement biaisé, caractérisé par une expression préférentielle des chaînes TCR Va24 et Vb2, la présence de motifs conservés au sein des régions CDR3 de ces deux chaînes, et une prévalence élevée de clonotypes publics (n=18 pour chaque chaîne de TCR), *i.e* des séquences TCR des régions CDR3, permettant la reconnaissance de Gag293, partagées entre plusieurs patients. Les clonotypes publics les plus représentés ont été capables de générer des TCR fonctionnels ayant des affinités de l'ordre du micromolaire pour le complexe peptide / CMH-II, ce qui est remarquablement élevé pour les TCR restreints par le CMH-II. Nous avons montré que les TCR de haute affinité spécifiques pour Gag293 sont capables de reconnaître jusqu'à 5 allèles différents de HLA-DR. De plus, après transduction à l'aide de lentivecteurs, ces TCR ont conféré une réponse spécifique à Gag293 très sensible et polyfonctionnelle aux cellules T CD4+ primaires (658).

Ensemble, les propriétés des cellules T CD4+ décrites ci-dessus suggèrent que les cellules T CD4+ de Contrôleurs du VIH échappent à l'épuisement et conservent des fonctions Th1, notamment liées à la nature intrinsèque de leurs TCR de haute affinité, pour soutenir la réponse antivirale et contribuer au contrôle viral.

B.2. Approches et objectifs

Etant donné la faible proportion de cellules spécifiques de Gag parmi les T CD4⁺ circulantes du sang chez les patients, les études phénotypiques et fonctionnelles pré-citées (cf partie « contexte ») sur les cellules T CD4⁺ spécifiques de Gag ont principalement été réalisées sur des lignées primaires stimulées avec des peptides à partir de PBMC, ou *ex vivo* suite à une stimulation peptidique des PBMC.

Nous avons décidé d'étudier phénotypiquement les cellules T CD4⁺ spécifiques de Gag en isolant ces cellules via un marquage tétramère de classe II *ex vivo* sans stimulation, afin d'être dans des conditions plus physiologiques. Les tétramères de classe II utilisés ont été chargés avec le peptide Gag293, qui est le peptide le plus immunodominant de la capsid virale, plus de 50% des patients montent une réponse contre ce peptide, nous permettant de mettre à profit un large spectre d'échantillons. Nous voulons comparer le phénotype des cellules T CD4⁺ spécifiques de Gag293 chez des patients Contrôleurs et des patients traités, ces deux groupes de patients ayant une charge virale contrôlée <50 copies d'ARN/mL, afin de prévenir les différences liées à la réplication virale.

La fréquence de cellules T CD4⁺ spécifiques de Gag293 détectées par marquage tétramère est relativement faible, particulièrement chez les patients traités. Nous avons donc opté pour un phénotypage sur « cellule unique » en combinant un marquage en cytométrie en flux contre 6 protéines membranaires (pendant le tri cellulaire), et une quantification de l'ARNm via une analyse en PCR quantitative (qPCR) multiplexée sur cellules uniques après tri. L'analyse des qPCR multiplexées sur cellules uniques, nous a permis d'obtenir l'expression de 44 gènes par cellule.

Nous avons réalisé cette analyse sur 9 patients Contrôleurs et 9 patients traités, et nous avons comparé 371 cellules tétramères positives (HIC Tet⁺: 191 ; HAART Tet⁺:180) et 360 cellules tétramères négatives (HIC Tet⁻: 171 ; HAART Tet⁻:189).

L'objectif étant d'étudier *ex vivo* les programmes de différenciation T « helper » dans lesquels les cellules T CD4⁺ spécifiques sont engagées, ainsi que l'état d'activation de ces cellules dans un contexte physiologique, de comprendre si les cellules T CD4⁺ spécifiques sont similaires ou différentes entre les patients Contrôleurs et traités, et enfin de trouver des indices nous permettant d'expliquer la perte de cellules T CD4⁺ spécifiques de Gag chez les patients traités, comme des marqueurs de l'apoptose ou de l'épuisement, ou encore des facteurs de l'hôte facilitant ou empêchant l'infection.

L'un des principaux résultats obtenu par cette analyse est une expression diminuée de CCR5 parmi les cellules spécifiques de Gag293 chez les Contrôleurs par rapport aux patients traités. Nous avons approfondi cette piste et réalisé une analyse extensive de l'expression de CCR5 membranaire, puis nous avons testé la susceptibilité à la fusion virale des cellules T CD4+ totales et spécifiques de Gag293, chez les patients Contrôleurs et traités.

B.3. Résultats

B.3.1 *Les Contrôleurs du VIH présentent une forte proportion de cellules T CD4+ spécifiques de Gag293*

Nous avons déjà montré par le passé que les cellules T CD4+ spécifiques du peptide immunodominant Gag293 étaient préférentiellement amplifiées chez les Contrôleurs du VIH par rapport aux patients HAART. Nous validons ici ces résultats en utilisant des tétramères de classe II chargés avec le peptide Gag293 afin de détecter les cellules T CD4+ (CD20- CD14- Marqueur de viabilité- CD3+ CD4+ CD8-) spécifiques de ce peptide à partir de PBMC (**Figure 1A**). Comme attendu dans une infection chronique, les cellules spécifiques (Tet+, orange) sont particulièrement enrichies dans les compartiments mémoires (CD45RA-) comparées aux cellules non-spécifiques pour ce peptides (Tet-, vert), aux dépens des cellules naïves (Nv : CD45RA- CCR7+). Dans cet exemple représentatif réalisé chez un patient Contrôleur, 98,3% des cellules Tet+ ont un phénotype mémoire comparées à 52,2% dans la population Tet- (**Figure 1B**). Lorsque l'on compare la proportion de Tet+ au sein de la population T CD4+, les patients Contrôleurs montrent une médiane plus de quatre fois plus élevée que celle des patients traités, suggérant un maintien de cette population T CD4+ spécifique de Gag293 chez les patients contrôlant spontanément l'infection à VIH (HIC : 0,3 ; HAART : 0,068) (**Figure 1C**).

B.3.2 *Les cellules T CD4+ spécifiques de Gag sont activées et engagées dans une différenciation Th1 à profil cytotoxique*

Afin d'analyser phénotypiquement les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293, nous avons trié en cellule unique les cellules tétramères positives mémoires (Tet+ CD45RA-) pour le peptide Gag293 ainsi que les cellules tétramères négatives mémoires (Tet- CD45RA-) chez 9 patients Contrôleurs du VIH et 9 patients traités (**Figure 1A**). En utilisant un panel de gènes présélectionnés impliqués dans les fonctions effectrices des cellules T, nous avons évalué par qPCR multiplexée l'expression de 44 gènes rapportés à l'expression de la GAPDH via la technologie Biomark. L'analyse a été réalisée sur 371 cellules Tet+ (HIC Tet+: 191 ; HAART Tet+ :180) et 360 cellules Tet- (HIC Tet-: 171 ; HAART Tet- : 189) triées. De plus via

« index sorting », nous avons été capable d'accéder aux paramètres de cytométrie en flux de chaque cellule triée, et nous avons évalué 6 expressions protéiques via la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI). La liste complète des gènes et protéines étudiés est à consulter dans la section Matériels et Méthodes.

Afin d'obtenir une vision globale de nos données, nous avons effectué une analyse linéaire discriminante (LDA) (689). Il s'agit d'une technique de réduction de dimension supervisée, qui permet de séparer nos quatre sous-groupes d'intérêt (HIC Tet-, HAART Tet-, HIC Tet+, HAART Tet+) décrits par le statut « Groupe de patients » et le statut « Tet ». La LDA recherche des combinaisons linéaires de fonctionnalité qui expliquent le mieux l'information contenue dans les données suivantes : l'expression génique rapportée à l'expression de la GAPDH et l'expression protéique membranaire issue de données de cytométrie en flux, la MFI). La LDA vise explicitement à différencier les 4 classes d'intérêt en maximisant la variabilité intergroupes et en minimisant la variabilité intragroupes. La **figure 2A** présente le diagramme de dispersion des cellules sur la carte générée par les deux premières directions linéaires calculées par LDA. Ce diagramme montre la première direction discriminante linéaire (LD1) distinguant les cellules selon leur statut Tet. La deuxième direction de discrimination linéaire (LD2) distingue les cellules selon le type de patient.

Nous pouvons observer une claire discrimination des populations Tet- (HIC : rouge ; HAART : vert) vs Tet+ (HIC : bleu ; HAART : violet) le long de l'axe LD1 en fonction du statut Tet. De manière intéressante, on observe que la discrimination le long de l'axe LD2 en fonction du statut patient s'effectue essentiellement entre les cellules Tet+ (Tet+ HIC vs Tet+ HAART), alors que les cellules Tet- (Tet- HIC vs Tet- HAART) se confondent. Ces résultats suggèrent que la discrimination selon l'axe LD2 entre le statut patient est commandée majoritairement par les différences entre les cellules Tet+.

Par la suite nous avons regardé les variables (gènes et MFI) qui présentent des corrélations avec LD1 et expliquent donc les discriminations entre les cellules de statut « Tet » différent : Tet- (HIC ; HAART) vs Tet+ (HIC ; HAART). Dans ce graphique nous avons gardé seulement les gènes ayant des corrélations avec une p-value < 0,0001. Les barres pleines correspondent aux corrélations positives, indiquant que l'expression des gènes et les MFI sont augmentées dans la population Tet+. Les barres rayées correspondent aux corrélations négatives, indiquant que l'expression des gènes et les MFI sont diminuées dans la population Tet+ (**Figure 2B**). Nous avons classé les gènes et les MFI en fonction de leur appartenance à

un programme de différenciation en sous-type T CD4+ « helper » ou bien à des marqueurs d'activation ou médiateurs inflammatoires.

Premièrement, nous validons le biais dans l'usage des chaînes de TCR AV24 et BV2 préférentiellement exprimées chez les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293, que nous avons décrit dans l'article de Benati et al. (658). Ensuite, de nombreux gènes et MFI du programme de différenciation Th1 (*TBX21*, *CXCR3* (gènes et MFI) ; *CCR5* (MFI), *IFNG*, *CCL5*) (27, 659), d'autres avec un potentiel cytotoxique (*EOMES*, *GZMB*, *FASLG*) (55) sont corrélés positivement avec la discrimination suivant l'axe LD1 suggérant une expression préférentielle de ces programmes dans les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293. Certains gènes décrits chez les Tfh sont aussi corrélés positivement avec LD1 tel que *IL21*, *ICOS*, *IL21R*. Par contre, certains gènes d'autres sous-types « helpers » tels que Th2 (*GATA3*) (660) ou Treg (*FOXP3* et *IL2RA*) (661, 662) sont corrélés négativement suggérant une expression préférentielle de ces gènes dans les cellules T CD4+ Tet-. L'approche en cellule unique nous a permis de détecter les communautés de gènes qui sont corrélées positivement ou négativement dans des groupes de cellules définies. Nous avons donc réalisé des diagrammes de réseaux de cellules dans la population HIC Tet+ (**Figure S1A**) et HAART Tet+ (**Figure S1B**). Nous observons dans les deux groupes de patients un grand réseau associé à l'ARNm des chimiorécepteurs, *FASLG2* et l'*IFNA*. Et de manière intéressante alors que les gènes liés à la cytotoxicité (en orange) (*EOMES*, *GZMB*, *PRF1*) sont associés ensemble chez les Contrôleurs, dans les cellules spécifiques des patients traités, ces trois gènes sont dissociés, et ne forment pas de réseau.

Enfin, il y a un grand nombre de marqueurs d'activation impliqués dans la discrimination Tet+ vs Tet- tels que PD-1 (MFI), *IL2RB*, *HLADR*, qui corrèlent positivement avec la LD1 et sont donc préférentiellement exprimés dans les Tet+, ou bien *IL7R* qui corrèle négativement et qui est perdu dans les Tet+ reflétant une différenciation vers un état plus effecteur (**Figure 2B**).

Les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 ont tendance à être activées et présentent un profil Th1 avec un potentiel cytotoxique, qui semble plus prononcé chez les patients Contrôleurs du VIH.

B.3.3 Les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 chez les Contrôleurs montrent un profil Th1 plus prononcé mais sont moins activées

Comme nous l'avons souligné précédemment, la discrimination le long de l'axe LD2 en fonction du statut « patient » s'effectue essentiellement entre les cellules Tet+ (Tet+ HIC (bleu) vs Tet+ HAART (violet)) (**Figure 2A**). Les gènes corrélant avec la LD2 sont donc les gènes impliqués dans la discrimination entre ces deux groupes (**Figure 2C**).

Nous avons validé le biais dans l'usage de la chaîne de TCR BV2 préférentiellement exprimée chez les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 de patients contrôleurs, par contre AV24 est préférentiellement amplifiée chez les patients traités. De nombreux gènes et MFI du programme de différenciation Th1 (*TBX21*, *CXCR3* (gènes et MFI), *IFNG*, *CCL5*), sont corrélés positivement avec la discrimination suivant l'axe LD2 suggérant une expression préférentielle de ce programme dans les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 de patients Contrôleurs. De manière intéressante *CCR5* décrit comme faisant partie du programme Th1 corrèle négativement avec la LD2 suggérant une expression préférentielle dans les cellules de patients traités. *CCR5* a aussi été décrit pour être un marqueur d'activation (297, 302) ce qui s'accorde bien avec une expression augmentée de PD-1 et une perte de l'IL7-R dans les cellules de patients traités.

Les cellules T CD4+ de patients Contrôleurs, particulièrement les cellules spécifiques de Gag293 montrent un profil Th1 plus prononcé et un état d'activation limité en comparaison des cellules des patients traités.

Afin de valider ces observations, nous avons comparé l'expression des gènes normalisée à l'expression de la GAPDH (43 gènes) ou bien l'expression protéique membranaire (MFI) obtenue par cytométrie en flux, entre les quatre sous-groupes de cellules définis en fonction du statut « patient » et du statut « Tet » (HIC Tet+: 191 cellules ; HAART Tet+ : 180 cellules ; HIC Tet-: 171 cellules ; HAART Tet- : 189 cellules). L'ensemble des distributions des niveaux relatifs des ARNm et des protéines a été représenté en « violin plots » (**Figures S2A-C**), montrant la courbe de densité de probabilité des différentes valeurs.

Les p-values ont été ajustées en utilisant la procédure Benjamini et Hochberg qui permet de prendre en compte les comparaisons multiples (686), elles sont représentées sous forme de graphiques pour les gènes (**Figure 3A** : Tet+ HIC vs Tet+ HAART ; **Figure S3** : Tet- HIC vs Tet+ HIC, Tet- HAART vs Tet+ HAART, Tet- HIC vs Tet- HAART) et pour les MFI (**Figure 3D** : Tet+ HIC vs Tet+ HAART ; **Figure S4** : Tet- HIC vs Tet+ HIC, Tet- HAART vs Tet+

HAART, Tet- HIC vs Tet- HAART). La comparaison des gènes entre les groupes Tet+ HIC vs Tet+ HAART révèle, après correction pour comparaisons multiples, une expression significativement plus élevée de *BV2* ($p < 0,0001$) et de *CCL5* ($p = 0,0008$) dans les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 des patients Contrôleurs (**Figures 3A-C**). Quant à la comparaison des MFI, cette dernière révèle une expression significativement plus élevée de *CXCR3* ($p = 0,013$), et de *CCR5* ($p < 0,0001$) alors que *PD-1* ($p < 0,0001$) est diminué dans les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 chez les patients Contrôleurs (**Figures 3D-G**). Les différences observées avec une forte p-value, entre la population HIC et HAART, dans l'analyse LDA (**Figure 2C**) sont donc confirmées par une méthode plus rigoureuse. Cette méthode valide que ces différences observées dans l'analyse LDA entre les groupes de patients sont bien commandées par les différences dans la population Tet+. De plus, cette méthode montre que nous avons des différences robustes qui résistent aux corrections pour les comparaisons multiples entre les groupes Tet+ HIC vs Tet+ HAART.

Nous validons encore le biais dans l'usage de la chaîne du TCR BV2 préférentiellement exprimée chez les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 de patients Contrôleurs. L'expression augmentée de *CXCR3* typique de la population Th1 pourrait suggérer, avec les autres observations, une différenciation plus avancée vers le phénotype Th1 des cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 chez les Contrôleurs du VIH. Validant de précédentes observations (505), nous montrons une hausse de *PD-1* dans les cellules T CD4+ spécifiques de patients traités. D'après la littérature, cette forte expression de *PD-1* chez les patients traités pourrait refléter un état d'épuisement de leurs cellules spécifiques.

CCR5 est à la fois un marqueur de la population Th1, un marqueur d'activation, mais aussi le corécepteur d'entrée du VIH. Sa MFI est significativement augmentée dans les populations spécifiques des patients Contrôleurs ($p < 0,0001$) et des patients traités ($p < 0,0001$) en comparaison aux populations Tet- respectives (**Figures 3G et S4**). De manière intéressante, son expression est limitée dans les cellules spécifiques de patients Contrôleurs en comparaison aux patients traités.

Il est donc intéressant de constater que l'expression du gène *CCL5* (le ligand de *CCR5*), qui est significativement augmentée dans les populations spécifiques en comparaison aux populations Tet- (HIC: $p < 0,0001$; HAART: $p < 0,003$) (**Figures 3C et S3**), est surexprimée dans les cellules spécifiques de patients Contrôleurs en comparaison aux patients traités. La

liaison de CCL5 à CCR5 provoque l'internalisation et diminue la disponibilité de CCR5, et il est également rapporté que des niveaux élevés de R5-CHK dans le sérum sont associés à une progression plus lente de la maladie (291).

Ces observations nous ont poussés à étudier plus attentivement CCR5 chez les patients Contrôleurs afin de comprendre l'incidence d'une expression limitée de CCR5 chez ces individus.

B.3.4 Les cellules T CD4+ de patients Contrôleurs ont une expression de CCR5 limitée

Nous avons donc réalisé une analyse extensive de l'expression membranaire de CCR5 sur les cellules T CD4+ totales, par cytométrie en flux, de PBMC de patients Contrôleurs et traités. Nous avons regardé l'expression de CCR5 sur les cellules T CD4+ totales viables (CD20- CD14- Marqueur de viabilité- CD3+ CD4+ CD8-) et dans les sous-populations mémoires (Nv : CD45RA+ CCR7+ ; CM : CD45RA- CCR7+ ; EM : CD45RA- CCR7- ; Eff (Effectrices) : CD45RA+ CCR7-) (**Figure 4A**). Comme il a été précédemment décrit dans la littérature (663), on observe une hiérarchie claire de l'expression de CCR5, détecté par sa MFI, en fonction du sous-type cellulaire : Nv < CM < Eff < EM (**Figure 4B**), que cela soit chez les Contrôleurs du VIH (**Figure 4C**) ou chez les patients traités (**Figure S5A**). La comparaison des deux groupes de patients a mis en avant l'expression limitée de CCR5 dans la population totale T CD4+ chez les patients Contrôleurs en comparaison aux patients traités (**Figure 4D**), qui s'explique par une expression augmentée de CCR5 chez les patients traités dans tous les sous-types cellulaires. (**Figure 4E**).

Par la suite, nous avons étudié l'expression de CCR5 dans les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293. Afin de pouvoir comparer l'expression de CCR5 dans les cellules Tet- et cellules Tet+, ces dernières étant largement enrichies en population mémoire (Tet- CD45RA- : 33,9% ; Tet+ CD45RA- : 88,3%), nous avons regardé l'expression de CCR5 dans les cellules mémoires CD45RA- pour les deux populations (**Figures 5A-B**). L'expression de CCR5 parmi les cellules T CD4+ mémoires Tet+ est significativement augmentée en comparaison aux cellules T CD4+ mémoires Tet-, que ce soit chez les patients Contrôleurs ou chez les patients traités (**Figures 5B-C**), validant les données obtenues en cellule unique (**Figures 2B, 3G, S4**). Cette différence s'explique à la fois par une tendance à un enrichissement de la population EM chez les cellules spécifiques de certains patients (**Figure S5B**), mais surtout par une expression intrinsèquement plus forte dans les populations CM (HIC : p =0,004 ; HAART p =

0,014) et EM (HIC : $p = 0,006$; HAART $p = 0,019$) (**Comparaison Figure 4E et 5D**). Comme nous pouvions l'anticiper au vu des précédents résultats (**Figure 4E**), il y a une expression significativement plus faible de CCR5 dans la population mémoire Tet- des Contrôleurs en comparaison à celle des patients traités.

Alors que les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 expriment fortement CCR5, cette population chez les patients traités présente un niveau de CCR5 encore plus élevé par rapport aux patients Contrôleurs (**Figure 5C**), validant aussi les données obtenues en cellule unique (**Figures 2C, 3D et 3G**). Il y a donc une hiérarchie de l'expression de CCR5 dans la population T CD4+ mémoire, dépendant des statuts « Tet » et « groupe de patient », avec une expression de CCR5 qui culmine dans les cellules spécifiques des patients traités. De manière intéressante, la différence d'expression de CCR5 dans les cellules T CD4+ mémoires spécifiques est nettement plus marquée dans la population CM que dans celle des EM (**Figure 5D**).

Enfin, nous avons remarqué une corrélation significativement négative entre l'expression de CCR5 et la proportion de cellules Tet+, suggérant un lien direct entre l'expression de CCR5 et la perte des cellules spécifiques de Gag293 chez les patients traités (**Figure 5E**).

Ces variations d'expression de CCR5 nous ont amené à nous questionner sur la susceptibilité des cellules T CD4+ à l'entrée virale, en fonction du groupe de patients et de leur spécificité pour Gag293.

B.3.5 *La fusion du VIH dans les cellules T CD4+ non-stimulées corrèle directement avec l'expression de CCR5*

Afin d'évaluer la susceptibilité à la fusion des cellules T CD4+ chez les deux groupes de patients, nous avons réalisé des expériences de fusion avec le provirus NL4-3, exprimant l'enveloppe JRFL (gp160) de tropisme R5, ayant incorporé la protéine de fusion β -lactamase (BlaM)-Vpr sur des PBMC non-stimulées. Après 3h de fusion, nous avons chargé les cellules avec le substrat fluorescent de la BlaM, le CCF2/AM. Nous avons par la suite réalisé un marquage anticorps nous permettant de discriminer par cytométrie en flux les cellules T CD4+ viables (CD20- CD14- Marqueur de viabilité- CD3+ CD4+ CD8-) ainsi que les sous-populations mémoires des cellules T CD4+. Dans ces expériences, la fusion se traduit par un clivage de la molécule de CCF2 par la BlaM, ce qui conduit à un changement du spectre d'émission de fluorescence du substrat du vert (520 nm) vers le bleu (447 nm) que l'on analyse par cytométrie en flux ((664)) (et cf. « Matériel et Méthodes »). Les résultats sont

exprimés en pourcentage de cellules T CD4⁺ cibles dans lesquelles la molécule de CCF2 est clivée (**Figure 6A**). Les cellules T CD4⁺ de patients Contrôleurs montrent une susceptibilité à la fusion limitée qui est reflétée par une proportion de cellules fusionnées significativement diminuée par rapport aux patients traités (**Figure 6B**, panneau de gauche). De plus dans la population T CD4⁺, la proportion de fusion corrèle directement avec la MFI de CCR5 (**Figure 6B**, panneau de droite), suggérant que la faible expression de CCR5 chez les patients Contrôleurs préserve leurs cellules T CD4⁺ de la fusion virale.

Par la suite nous avons évalué la fusion dans les sous-populations mémoires des cellules T (**Figure 6C**) et montré une hiérarchie claire de la susceptibilité à la fusion en fonction du sous-type cellulaire : Nv < CM < Eff < EM, que cela soit chez les Contrôleurs du VIH (**Figure 6D**) ou chez les patients traités (**Figure S5C**). Ces résultats coïncident parfaitement avec l'expression de CCR5 dans les sous-populations mémoires (**Figure 4C**), soulignant le lien manifeste entre l'expression de CCR5 et la fusion. Dans les sous-populations T CD4⁺, nous observons une proportion de cellules fusionnées significativement plus faibles dans les cellules Nv et Eff de patients Contrôleurs en comparaison aux patients traités, mais aussi une tendance à la baisse dans les populations CM et EM (**Figure 6E**). Ces résultats confirment la tendance générale d'une fusion virale restreinte dans les cellules T CD4⁺ de patients Contrôleurs liée à une expression moindre de CCR5.

B.3.6 *Les cellules T CD4⁺ centrales mémoires spécifiques de Gag293 chez les Contrôleurs du VIH sont peu sensibles à l'entrée virale*

Afin d'évaluer la susceptibilité à la fusion virale des cellules T CD4⁺ spécifiques de Gag, nous avons mis en présence le provirus BlaM-Vpr-JRFL avec 20.10⁶ PBMC pendant 3h, puis nous avons chargé ces cellules avec le substrat de la BLAM, ensuite réalisé un marquage tétramère afin de pouvoir discriminer les cellules T CD4⁺ spécifiques pour Gag293 et enfin réalisé un marquage anticorps afin de pouvoir discriminer les cellules T CD4⁺ ainsi que leurs sous-populations mémoires. Dans le but d'éviter un biais dans la comparaison entre les cellules Tet⁻ et Tet⁺, nous avons comparé la fusion au sein de la population mémoire (CD45RA⁻) (**Figure 7A**).

Comme nous l'avons précédemment observé (**Figure 6E**), il y a une tendance à une fusion virale plus restreinte dans la population mémoire Tet⁻ des patients Contrôleurs en comparaison aux patients traités (**Figure 7B**). Alors que les cellules Tet⁺ chez les patients

traités montrent une proportion de cellules fusionnées significativement plus élevée en comparaison aux cellules Tet-, nous observons une tendance moindre chez les patients Contrôleurs. Il y a notamment un des patients Contrôleurs qui présente 0% de cellules fusionnées dans les compartiments Tet- et Tet+, et qui est donc complètement hermétique au mécanisme de fusion par ce virus. Enfin, parmi les cellules Tet+, les patients traités présentent un niveau de fusion significativement plus élevé que les patients Contrôleurs (**Figure 7B**). De manière générale, nous observons une hiérarchie similaire de la susceptibilité à la fusion à celle observée dans l'expression de CCR5 (**Figure 5D**), dépendant des statuts « Tet » et « groupe de patient », avec un niveau de fusion particulièrement élevé dans la population CD4+ spécifique de Gag293 des patients traités, et une susceptibilité restreinte dans celles des patients Contrôleurs.

Nous observons une très forte corrélation entre la MFI de CCR5 et la proportion de cellules fusionnées dans le compartiment mémoire des cellules Tet+ et Tet- (**Figure 7C**), confirmant ce lien manifeste entre l'expression de CCR5 et la susceptibilité à la fusion, et suggérant que la faible expression de CCR5 dans les cellules T CD4+ de Contrôleurs les rendraient moins susceptibles à l'infection. Ces différences ne s'expliquent pas par une différence dans la proportion de CM et EM dans la population mémoire des spécifiques (**Figure S5B**). Par contre, la proportion de cellules fusionnées dans la population CM Tet+ est significativement plus importante chez les patients traités par rapport aux patients Contrôleurs, alors qu'on retrouve un niveau de fusion similaire dans la population EM (**Figure 7D**). De plus, on observe une forte corrélation entre la proportion de cellules fusionnées dans le compartiment CM Tet+ et la MFI de CCR5 (**Figure 7E**), ce qui n'est pas le cas dans le compartiment EM Tet+ (**Figure S5D**).

Il semble donc que la fusion dans les cellules EM spécifiques ne soit pas complètement dépendante de l'expression de CCR5, alors que la susceptibilité limitée à la fusion des cellules CM spécifiques de Gag293 chez les patients Contrôleurs est due à une expression restreinte de CCR5.

B.4. Discussion

B.4.1 *Les Contrôleurs du VIH maintiennent une fréquence élevée de cellules T CD4+ spécifiques de Gag293*

Par le passé plusieurs travaux, ainsi que notre groupe, ont montré que les patients Contrôleurs du VIH préservent une fréquence plus élevée de cellules T CD4+ spécifiques pour le peptide immunodominant de la capsidie Gag293 en comparaison avec les patients traités. Plusieurs études ont corrélé le maintien de cette population avec le contrôle de l'infection (623, 625) (617). Nous voulions comprendre dans quel programme de différenciation cette population amplifiée chez les patients Contrôleurs était engagée, et pourquoi ces cellules étaient perdues chez les patients traités.

B.4.2 *Les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 chez les Contrôleurs sont activées et présentent un programme de différenciation Th1 avec un potentiel cytotoxique*

Etant donnée la fréquence faible de cellules T CD4+ spécifiques pour Gag293, détectées par marquage tétramère *ex vivo*, nous avons opté pour un phénotypage sur cellule unique où nous avons regardé le niveau d'expression génique (44 gènes) et protéique (6 MFI). L'analyse en LDA nous a révélé que les cellules spécifiques de Gag293 chez les deux groupes de patient, en comparaison avec les cellules non spécifiques, présentaient un profil de différenciation Th1 (*TBX21*, *IFNG*, *CXCR3*, *CCR5*) avec un potentiel cytotoxique (*EOMES*, *FASL*, *GZMB*) aux dépens d'autres sous-types « helper » tels que Th2 et Treg. Ces résultats sont en accord avec la littérature montrant que la réponse anti-Gag est préférentiellement Th1 (617), et récemment, que les cellules spécifiques de Gag293 montrent un phénotype de type cytotoxique après stimulation *in vitro*. De plus, ces cellules spécifiques montrent un état d'activation important reflété par la régulation à la hausse de PD-1, *IL2RB*, *HLADR* et la perte de l'*IL7R*, suggérant qu'elles sont entrain de répondre à l'Ag, ou tout du moins qu'elles l'ont déjà rencontré.

Les différences phénotypiques entre les cellules T CD4+ de patients Contrôleurs et traités s'expliquent essentiellement par une hétérogénéité dans leurs compartiments spécifiques. On note un programme de différenciation vers un profil Th1 plus marqué chez les patients Contrôleurs (*TBX21*, *IFNG*, *CXCR3*) en accord avec la littérature (573, 625-627) ainsi qu'un

programme de différenciation cytotoxique plus complet se traduisant par une expression corrélée des gènes marqueurs de la cytotoxicité (665).

Ensemble ces résultats indiquent que les patients Contrôleurs du VIH maintiennent une forte fréquence de cellules spécifiques engagées dans une réponse de type Th1 avec un potentiel cytotoxique.

B.4.3 Les cellules T CD4+ spécifiques de patients traités sont épuisées

L'une des caractéristiques les plus admises de la phase chronique de l'infection VIH est l'activation immunitaire généralisée, médiée notamment par la stimulation antigénique chronique. La sur-activation induit l'épuisement immunitaire qui est caractérisé phénotypiquement par une augmentation de l'expression de multiples récepteurs inhibiteurs tel que PD-1 ou CTLA-4. Dans un premier temps, les cellules épuisées perdent leurs fonctions effectrices et leurs capacités prolifératives, puis dans un second temps ces cellules meurent par apoptose. On note que les cellules spécifiques de patients traités sont fortement activées en comparaison avec celles des patients Contrôleurs, et présentent une perte de l'*IL7R* ainsi qu'une hausse de l'expression d'*HLADR* et de l'expression CCR5, qui en plus d'être un marqueur Th1 est un marqueur d'activation.

De plus, alors que l'expression de PD-1 est augmentée dans les cellules T CD4+ spécifiques des deux groupes de patients, celle-ci est encore plus importante dans les cellules T CD4+ spécifiques des patients traités par rapport à celles des patients Contrôleurs, suggérant un épuisement avancé des cellules spécifiques Gag293 des patients traités, comme il l'a déjà été décrit précédemment (505).

L'épuisement cellulaire pourrait être l'une des raisons pour expliquer la différenciation moins aboutie en Th1 et le programme de différenciation cytotoxique moins corrélé des cellules spécifiques de patients traités par rapport à celui chez les patients Contrôleurs. De plus, l'épuisement pourrait aussi expliquer la faible fréquence de cellules T CD4+ spécifiques chez les patients traités due à la perte de prolifération et l'induction d'apoptose.

B.4.4 Les cellules T CD4+ spécifiques du VIH de Contrôleurs présentent une susceptibilité à la fusion limitée due à une expression de CCR5 membranaire limitée

Alors que l'expression de l'ARNm de CCR5 est inchangée, nous montrons que l'expression de CCR5 membranaire est augmentée dans le compartiment de T CD4+ spécifiques des deux groupes de patients, mais celle-ci est particulièrement limitée dans les cellules T CD4+ spécifiques des Contrôleurs du VIH en comparaison avec celles chez les patients traités. Cette observation d'expression moindre de CCR5 est étonnante, alors que les cellules spécifiques de Contrôleurs sont engagées dans une différenciation Th1 plus marquée.

La régulation à la hausse du CCR5 membranaire pourrait alors refléter une activation plus importante des cellules spécifiques chez les patients traités, plutôt qu'un marqueur de la voie de différenciation Th1. Il a notamment été décrit que certaines populations exprimant fortement PD-1 exprimaient conjointement CCR5 (666). Une seconde hypothèse est que les cellules T CD4+ des Contrôleurs du VIH exprimeraient intrinsèquement moins de CCR5 due à une régulation post-transcriptionnelle. CCR5 étant le corécepteur d'entrée du VIH, nous avons évalué la susceptibilité des cellules T CD4+ de patients à l'entrée virale via un test de fusion par un provirus de tropisme R5. Dans la population T CD4+ totale, nous avons obtenu une forte corrélation entre l'expression de CCR5 et la proportion de cellules fusionnées, mais nous avons aussi validé le fait que l'expression différentielle de CCR5 dans les sous-populations mémoires (Nv < CM < Eff < EM) conduit à un profil de fusion du même ordre.

En utilisant un marquage tétramère contre le peptide Gag293, suite à la fusion de plus de 20 millions de cellules, nous avons été capables de déterminer de façon directe la susceptibilité à la fusion de ces cellules spécifiques très rares. Nous avons montré que les cellules spécifiques des deux groupes de patients étaient plus susceptibles à la fusion que les cellules mémoires non-spécifiques, ce qui était directement lié avec l'expression différentielle de CCR5.

Cette différence s'explique à la fois par une tendance à un enrichissement de la population EM dans la population spécifique chez certains patients mais surtout par l'expression intrinsèquement plus forte de CCR5 dans les populations CM et EM. Il a été montré que les cellules spécifiques étaient préférentiellement infectées (517), et nous montrons ici qu'une des raisons pouvant expliquer cela est une expression particulièrement élevée de CCR5.

La comparaison des groupes de patients, nous a révélé que les cellules T CD4+ Gag293 de patients Contrôleurs présentaient une susceptibilité à la fusion limitée par rapport aux patient traités, et que ces différences étaient corrélées directement avec l'expression de CCR5. De plus l'expression de CCR5 est associée dans les cellules spécifiques des Contrôleurs à une

forte expression de CCL5. CCL5 est un des ligands de CCR5 capable d'induire son internalisation. Plusieurs études ont montré le lien existant entre un fort niveau de CCL5 dans le sérum et une progression plus lente dans la maladie (287, 291), chez les Contrôleurs (652) mais aussi chez les individus hautement exposés mais séronégatifs (288-290). Certains virus néanmoins sont capables d'échapper à l'inhibition par les cytokines en ciblant des conformations de CCR5 qui sont de faible affinité pour le ligand naturel (249).

La sécrétion autologue de CCL5 pourrait être à l'origine, de l'expression limitée de CCR5 dans les cellules T CD4⁺ spécifiques de Contrôleurs, limitant le phénomène de fusion virale. Une étude portée sur les cellules T CD4⁺ spécifiques de CMV, a révélé un phénomène similaire. Comparées aux cellules T CD4⁺ spécifiques de Gag chez des patients progresseurs, les cellules spécifiques de CMV étaient protégées de l'infection à VIH via une production autocrine de CCL3 et CCL4 (667). Afin de comprendre l'implication de CCL5 dans le niveau d'expression limité de CCR5 chez les Contrôleurs, nous pourrions bloquer ou bien ajouter CCL5 en excès, puis vérifier si nous nivellons l'expression de CCR5 et la susceptibilité à la fusion entre les deux groupes.

Une perméabilité à l'infection par le VIH limitée des cellules spécifiques chez les Contrôleurs due à une expression de CCR5 restreinte pourrait aussi expliquer le maintien des cellules T CD4⁺ spécifiques chez les Contrôleurs du VIH. Nous observons d'ailleurs une corrélation négative directe entre l'expression membranaire de CCR5 et la proportion de cellules T CD4⁺ spécifiques de Gag293.

B.4.5 Les cellules T CD4⁺ spécifiques du VIH de Contrôleurs présentent une susceptibilité à la fusion limitée de leurs cellules Centrales mémoires

La fusion limitée dans les cellules spécifiques de Contrôleurs par rapport à celles de patients traités, ne s'explique pas par une différence dans la fréquence des populations CM et EM, mais par une fusion particulièrement importante dans le compartiment CM des patients traités, qui corrèle avec une expression de CCR5 élevée. De manière intéressante la fusion dans la population EM est très élevée dans les deux groupes de patients et ne corrèle pas avec l'expression de CCR5, suggérant que d'autres mécanismes indépendants de l'expression de CCR5 sont à l'origine de l'augmentation de l'entrée virale dans cette population. Les cellules T CD4⁺ CM sont responsables de la mémoire à long terme et sont progénitrices des autres populations mémoires et effectrices. Ces cellules sont peu infectables en raison de leur expression réduite de CCR5, mais ont un potentiel de réplication virale élevé dû à leur

capacité proliférative élevée (655, 656, 668). Les cellules EM représentent le compartiment T CD4+ le plus infectable, reflétant une dépendance importante à l'expression de CCR5 (669). En effet, en dessous de 10000 récepteurs CCR5 par cellule, il y a une forte diminution de l'infectabilité du VIH (191). Alors que le compartiment CM est normalement peu susceptible, nous montrons ici que le niveau élevé de CCR5 dans la population CM des cellules T CD4+ spécifiques chez les patients traités corrèle avec un niveau important de fusion (même niveau que EM). La permissivité accrue à l'entrée virale des cellules CM spécifiques de Gag293 chez les patients traités, pourrait engendrer la perte de ce compartiment progéniteur et donc expliquer la perte des cellules spécifiques de Gag293. La susceptibilité à l'infection des cellules CM est un facteur primordial dans le contrôle de l'infection SIV chez les sooty mangabeys et dans la progression vers le SIDA (670, 671). De plus, étant des cellules de longue durée de vie, ces cellules CM résiduelles pourraient participer au réservoir viral chez les patients traités (202).

B.4.6 Les cellules T CD4+ totales expriment aussi moins de CCR5 et ont une susceptibilité à la fusion limitée

De manière intéressante, alors que l'analyse sur cellules uniques ne nous avait pas montré de différences dans l'expression de CCR5 dans le compartiment non-spécifique entre les patients Contrôleurs et traités, l'étude de l'expression de CCR5 sur un grand nombre de cellules nous a révélé une expression préférentielle de CCR5 chez les patients traités dans la population T CD4+ totale. Cela était expliquée par une augmentation de l'expression de CCR5 dans tous les compartiments (Nv, CM, EM, et Eff). Nous avons observé une fusion préférentielle des cellules T CD4+ de patients traités qui est corrélée à l'expression de CCR5. L'augmentation de fusion dans le compartiment CD4+ chez les patients traités ne s'explique pas par une différence de fréquence dans leurs sous-populations mémoires, mais par une fusion significativement plus forte dans le compartiment naïf et effecteur, ainsi qu'une forte tendance dans le compartiment mémoire (CD45RA- : p-value = 0,06). Il semble donc que ce phénomène observé dans la population spécifique est aussi présent, bien que moins marqué, dans la population totale, suggérant une expression intrinsèquement faible de ce récepteur dans les cellules de patients Contrôleurs. L'expression de CCR5 est critique dans l'infection VIH, la protection liée à la mutation $\Delta 32$ en étant l'exemple typique {Huang, 1996 #5085, de plus de nombreuses études montrent un lien entre une expression de CCR5 faible et la progression dans la maladie (280) (281, 282), Une expression réduite de CCR5 sur les cellules

T CD4+ des Contrôleur pourrait donc être une des explications du contrôle de l'infection chez ces rares individus.

B.4.7 Susceptibilité à l'infection et à la fusion des cellules T CD4+ de Contrôleur dans les autres études

La susceptibilité à l'infection des cellules T CD4+ chez les Contrôleurs du VIH est débattue, Une récente étude de Noel et al. montre que les Contrôleurs du VIH ont une fréquence très faible de cellules infectées (654). De plus, deux groupes ont montré que les cellules T CD4+ de Contrôleur activées *in vitro* sont moins propices à l'infection par le VIH que les cellules de donneurs sains, notamment par des phénomènes post-entrée (650) (651).

En revanche, le groupe de Blankson et al. suggère que la stimulation des cellules T CD4+ *in vitro*, induit un biais dans la compréhension du mécanisme d'infection, notamment dans l'expression des chimiorécepteurs. Ils étudient donc les cellules T CD4+ non-stimulées et montrent, en contradiction avec les autres études, une susceptibilité accrue à la fusion ainsi qu'à l'infection, par un virus de souche R5, des cellules de Contrôleurs en comparaison avec celles des patients progresseurs. Ils montrent que ce différentiel est dû à une distribution différente des sous-populations mémoires entre les Contrôleurs et les patients progresseurs, notamment provoquée par l'activation chronique, due à la réplication virale chez les patients progresseurs, qui induit une forte différenciation vers le stade effecteur, qui est peu infectable (655, 656).

Le choix de comparer les patients Contrôleurs avec des patients progresseurs crée donc un biais dans la compréhension de la susceptibilité intrinsèque des cellules T CD4+ chez ces individus, car la physiopathologie du VIH modifie les populations T CD4+ et leurs degrés d'infectabilité. C'est pourquoi nous avons étudié la susceptibilité à l'entrée virale des Contrôleurs du VIH en utilisant des cellules T CD4+ non stimulées, en les comparant à des patients traités montrant un contrôle de la charge virale similaire, afin de prévenir les différences liées à la réplication virale. Par ailleurs, nous avons montré que la fréquence des sous-populations mémoires était similaire dans les deux groupes de patients. Néanmoins, nous avons aussi montré que les cellules T CD4+ de patients traités, notamment les cellules spécifiques de Gag293, montrent certains signes d'activation. Il sera donc nécessaire de comparer la susceptibilité à l'entrée virale chez les Contrôleurs avec des donneurs sains. Enfin, nous planifions d'effectuer des expériences d'infection du fait que la fusion et l'infection sont parfois déconnectées dans certaines sous-populations T CD4+ comme les

cellules effectrices exprimant fortement CCR5 mais étant peu infectables par les virus R5 (358).

B.4.8 *Détection de CCR5 dans la population T CD4+*

De nombreux phénomènes pourraient être à l'origine de la variabilité d'expression du CCR5 membranaire. Nous n'avons pas observé de différences d'expression de l'ARNm de CCR5 que ce soit dans les populations spécifiques ou dans les populations totales, suggérant que cette régulation est post-transcriptionnelle. On peut penser à des régulations au niveau de l'export, ou de l'internalisation du récepteur (potentiellement par les chimiokines). Comme nous l'avons observé dans la population spécifique, le différentiel d'expression de CCR5 dans la population T CD4+ totale pourrait aussi refléter un état d'activation chez les patients traités, même si nous n'avons pas vu de différences dans l'expression des marqueurs d'activation entre les deux groupes de patients dans cette population. Bien que cela ne soit pas encore complètement caractérisé, il est envisageable que suite à leur activation, les cellules T CD4+ pourraient remobiliser des pools intracellulaires de CCR5, afin d'induire une régulation rapide de son expression membranaire (672). Afin de comprendre, si l'état d'activation résiduel des cellules T CD4+ chez les patients traités joue un rôle dans le niveau de CCR5 membranaire, nous caractériserons en parallèle l'expression de ce récepteur, chez des donneurs sains (non affectés par la réplication virale) « au repos », des patients Contrôleurs et des patient traités.

CCR5 est présent à la surface des cellules sous différentes conformations détectables par la liaison d'anticorps monoclonaux dirigés contre différents épitopes de CCR5. Il a été montré que les proportions relatives de ces différentes populations (conformations) détectées varient d'une population cellulaire à l'autre et que celles-ci sont différenciellement utilisées par différentes souches de VIH-1 (250, 252). De plus, il a été montré que certains clones d'anticorps étaient capables de reconnaître spécifiquement des modifications post-traductionnelles, telles que les glycosylations ou des sulfatations à la surface de CCR5, qui peuvent être requises pour l'interaction avec l'enveloppe du virus. Nous pouvons donc détecter avec des anticorps, différentes populations de CCR5 en fonction de leurs conformations et de leurs modifications post-traductionnelles. Nous pouvons penser que les contrôleurs du VIH et patients traités présentent sur leur cellules T CD4+ des conformation différentes de CCR5. Il serait donc intéressant de marquer les cellules de ces patients avec différents anticorps monoclonaux.

Enfin, il y a aussi de nombreux mutants de la partie codante de CCR5 qui affectent la structure de la protéine CCR5, ce qui peut affecter la production, le transport, la liaison aux chimiokines, la signalisation et l'expression du récepteur CCR5. La plus célèbre est la mutation $\Delta 32$, abolissant toute expression de CCR5 à la membrane. De manière générale, les patients Contrôleurs ne sont pas surreprésentés parmi les individus portant la mutation $\Delta 32$ (673). Nous séquencerons le transcrite de CCR5 chez les patients, et vérifierons les mutations répertoriées de CCR5 (674). Nous sommes notamment intéressés par l'étude d'un patient Contrôleur, qui montre peu d'expression de CCR5 et de susceptibilité à l'entrée virale, que ce soit dans les populations totales ou spécifiques de Gag293.

B.4.9 Conclusion

De nombreuses études suggèrent que les cellules T CD4+ spécifiques de Gag pourraient participer au contrôle spontané de l'infection VIH. Nous avons effectivement observé qu'elles sont préférentiellement maintenues chez les patients Contrôleurs du VIH, et qu'elles sont engagées dans une réponse antivirale de type Th1 avec un potentiel cytotoxique. Ces cellules pourraient donc être essentielles dans l'aide aux cellules T CD8+, mais aussi être capable d'éliminer directement des cellules infectées.

Dans ce projet nous avons étudié les caractéristiques nécessaires au maintien de cette population chez les Contrôleurs. Nous avons montré que les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 chez ces individus montrent un état d'épuisement limité, et une susceptibilité à l'infection restreinte de leurs cellules CM progénitrices, due à une expression limitée de CCR5. Le faible niveau de CCR5 pourrait s'expliquer par une production autocrine de CCL5 induisant l'internalisation du récepteur. Ce phénomène rappelle le contrôle de l'infection observé chez les sooty mangabeys, qui montrent une expression limitée de CCR5 dans le compartiment CM.

De plus chez les Contrôleurs, les cellules T CD4+ totales semblent aussi être moins susceptibles à l'entrée virale, suggérant une expression de CCR5 intrinsèquement faible chez ces patients. De nombreuses études montrent un lien clair entre CCR5 et protection ou une progression lente de la maladie. CCR5 pourrait donc être un élément clef dans le contrôle de l'infection chez ces rares patients.

B.5. Matériels et Méthodes

B.5.1 Matériels

Patients

Les Contrôleurs du VIH (groupe HIC; n = 15) ont été recrutés dans le cadre de la cohorte CO21 CODEX mise en œuvre par l'Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS). Les contrôleurs du VIH ont été définis comme des patients infectés par le VIH-1 qui étaient séropositifs pendant plus de 5 ans, n'avaient reçu aucun traitement antirétroviral, et pour lesquels plus de 90% des mesures de la charge virale plasmatique étaient indétectables par des tests standards. Tous les contrôleurs du VIH inclus dans la présente étude ont des charges virales actuelles <50 copies d'ARN du VIH / mL. Le groupe de patients traités de manière efficace (groupe HAART; n = 15) a reçu un traitement antirétroviral pendant au moins 5 ans et a montré une suppression virale à long terme avec des charges virales <50 copies / mL. Les patients traités ont été recrutés à l'hôpital Raymond Poincaré (Garches, France) et à l'hôpital Bicêtre (Le Kremlin-Bicêtre, France). Le groupe donneur sain (groupe HD, n = 8) était composé d'individus anonymes sains qui ont fait un don de sang à l'Etablissement Français du Sang (EFS, Paris, France). L'étude a été promue par l'ANRS sous le numéro EP36-8 et EP36-10. Tous les participants ont donné leur consentement écrit préalable avant l'échantillonnage du sang.

Anticorps

Les anticorps suivants ont été utilisés pour des marquages membranaires :

Analyse d'expression sur cellule unique

Mêmes anticorps que dans l'étude Tfh additionnés de: anti-CCR5-PerCP/Cy5.5 (clone HEK/1/85a), anti-CXCR3-BV605 (clone 1C6/CXCR3) et anti-CCR7-PE-Cy7 (clone G043H7),

Analyse des cellules T CD4+ primaires fusionnées

anti-CD3-BUV395 (clone UCHT1), anti-CD4-BD Horizon™ R-phycoerythrin-CF594 (PE-CF594) (clone RPA-T4), anti-CD45RA-BUV737 (clone HI100), anti-CCR5-AF700 (clone HEK/1/85a), anti-TCR-Allophycocyanin (APC) (clone IP26) et le marqueur de viabilité eFluor® 780 (eF780) (eBioscience) a été ajouté pour analyser les cellules vivantes.

B.5.2 Méthodes

Culture cellulaire

PBMC

Les PBMC ont été isolées par un gradient de centrifugation Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Life Sciences) à partir de sang humain de donneurs anonymes obtenu auprès de l'Etablissement Français du Sang (EFS) (Paris, France) ou de patients Contrôleurs et traités. Les cellules purifiées ont été utilisées pour les expériences ou cryo-préservées dans de l'azote liquide.

Les lignées cellulaires HEK 293T

Les cellules humaines embryonnaires de rein (HEK 293T) utilisées dans cette étude ont été cultivées dans du milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 100 unités / mL de pénicilline et 100 µg / mL de streptomycine.

Marquage des tétramères

Les patients ont été génotypés pour le gène HLA-DRB1 avec une résolution de 4 digits en utilisant le kit INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus (Fujirebio). Seuls les patients ayant un génotype présentant au moins un des allèles suivants ont été inclus dans l'étude : DRB1*0101 (DR1), DRB1*1101 (DR11), DRB1*1501/1502 (DR15) ou DRB5*0101 (DRB5). Les tétramères de CMH-II couplés au fluorochrome APC correspondants aux allèles suivantes : DR1, DRB15 et DRB5 ont été obtenus auprès du NIH Tetramer Core Facility (Emory University, USA). Les monomères biotinylés DR11 ont été obtenus respectivement auprès du Dr Fabrice Lemaître (Institut Pasteur, Paris) et du Tetramer Core Laboratory of the Benaroya Research Institute (Seattle, USA).

Les monomères ont été incubés avec 0,2 mg/mL de peptide Gag293 ou de peptide associé à la chaîne invariante (CLIP) « PVS_KM_RM_AT_PL_LM_QA », un peptide contrôle. L'incubation s'est faite à 37°C durant 72h en présence de 2,5 mg/mL de n-octyl-b-D-glucopyranoside et un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Les monomères chargés avec les peptides Gag293 ou CLIP ont été tétramérisés avec de la streptavidine marquée avec APC (eBioscience). Le protocole de marquage des tétramères CMH-II a été adapté de (618)

Les PBMC fraîchement isolées de patients (ou récupérées après cryo-préservation ou après fusion) ont été incubées à raison de 1 µg de tétramère CMH-II pour 1.10⁶ de cellules dans du

milieu complet RPMI supplémenté avec 15% de sérum humain AB pendant 90 min à 4°C. Les marquages ont été réalisés sur 5.10^6 PBMC / tubes dans 100 μ L final, avec 1 tube pour le contrôle CLIP et au moins 2 tubes pour le marquage tétramère Gag293. Les combinaisons d'anticorps ciblant des marqueurs de surface ont été ajoutées durant les 30 dernières minutes de l'incubation. Après lavage, les cellules ayant subi les mêmes conditions de marquage ont été groupées, à un minimum de 1.10^6 de PBMC pour la condition avec le tétramère Gag293 (Pour plus de détails cf **Annexe 2**).

Analyse sur cellule unique

Tri de cellules uniques

A partir des PBMC marquées avec des tétramères et des anticorps, les cellules T CD4+ sont sélectionnées par cytométrie en flux dans les populations suivantes : CD3+, CD4+, CD14-, CD20-, Marqueur de viabilité-, CD8- et CD4+.

Les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 (Tet+) sont alors triées sur la base du marquage tétramère, dont la fenêtre a été fixée à partir du contrôle CLIP. Les cellules non-spécifiques qui ne montrent pas de marquage tétramère (Tet-) sont triées sur leur phénotype mémoire (CD45RA-). Nous réalisons alors un tri en cellule unique à l'aide du trieur cellulaire FACSaria II cell sorter (BD Biosciences) présent sous une hotte de sécurité microbiologique. Chaque cellule est triée dans un puits d'une plaque PCR 96 puits, contenant du NP40 à 0,5% pour lyser les cellules, une RNase (Superase-in) et un tampon commercial (5x Vilo) pour la transcription inverse. Pour chaque patient, 25 cellules Tet+ et 25 Tet- ont été triées, en utilisant le mode « single cell purity » permettant d'éviter les contaminants. Durant le tri nous avons utilisé la technologie « index sorting » permettant d'enregistrer les paramètres MFI des cellules triées. En plus de la combinaison utilisée pour la sélection des cellules, nous avons aussi enregistré 4 paramètres (CCR7, CCR5, CXCR3, et PD-1). Nous avons aussi enregistré au moins 5.10^6 évènements pendant la durée du tri permettant de faire le phénotypage de l'ensemble des cellules. Les cellules triées et lysées ont été ensuite stockées à -80°C.

Transcription inverse et amplification des gènes d'intérêt par PCR

Après décongélation, les échantillons ont été dénaturés pendant 90s à 60°C, puis ont subi la transcription inverse avec le mix enzymatique « SuperScript® Enzyme Mix », contenant la RT SuperScript III et la RNase (Thermo fisher). Nous avons amplifié les 48 gènes d'intérêt à partir des ADNc néo-synthétisés, pour cela nous avons réalisé une PCR en présence de nos 48 paires d'amorces (testées préalablement en qPCR classique) à 0,2X chacune et du MIX « TaqMan® PreAmp Master » contenant la polymérase ADN « AmpliTaq Gold® DNA Polymerase » (Thermo fisher). S'en suivent 20 cycles d'amplification et d'exonucléase pour enlever les amorces résiduelles. L'ADNc amplifié et nettoyé de ses amorces est alors dilué au 1/5^{ème} dans du tampon TE, puis conservé à -20°C.

qPCR multiplexée en micro-fluidique

Les échantillons et amorces ont été préparés pour une plaque 48.48 « Fluidigm Dynamic arrays » (Fluidigm, San Fransisco, CA, USA) selon les recommandations indiquées par le fournisseur. Brièvement, chaque paire d'amorces, à 10 µM, a été mélangée au mix « 2x assay loading reagent » et les échantillons à l'evagreen et au « 20X Fluidigm sample reagent ».

Les échantillons et amorces sont alors chargés dans la plaque 48.48 « Fluidigm Dynamic arrays » où la puce a été apprêtée, puis la PCR en temps réel a été exécutée sur le système biomark pour l'analyse génétique suivant les instructions du fournisseur. Les données ont été collectées en utilisant le logiciel Fluidigm « real-time PCR Analysis ».

Normalisation et nettoyage des données

Les cellules montrant des expressions trop basses pour leur gène de ménage (GAPDH) ont été retirées. Les cellules présentant des expressions faibles dues à des dimères d'amorces, détectables par la courbe de fusion, ont également été retirées. Chaque expression génique a été normalisée à la GAPDH de la cellule correspondante. Après compensation à partir des cellules monomarquées et normalisation des expression géniques, les expressions protéiques (6 MFI) et géniques (44 gènes) ont été rassemblées dans un tableau regroupant toutes les cellules des 9 patients Contrôleurs et des 9 patient traités. Sur la population totale que nous avons acquise durant le tri, nous avons été capable de fixer des fenêtres de sélection pour chaque paramètre de cytométrie (FACS). Les coordonnées de ces fenêtres nous ont permis de

discriminer pour chaque paramètre MFI si la cellule était positive ou négative pour ce paramètre donné, nous permettant par la suite de discriminer les cellules CXCR5+ des cellules CXCR5- par exemple. La partie d'analyse des données se trouve dans la section statistiques.

Gènes et MFI étudiés

Gènes

APOBEC3G, AV24, BATF, BCL6, BST2, BV2, CCL3 ISO, CCL4 ISO, CCL5, CCR4, CCR5, CCR6, CD274, CD40, CD40LG, CTLA4, CXCL8, CXCR3, CXCR5, EOMES, FAS, FASLG 2, FOXP3, GAPDH, GATA3, GZMB, HLADRB1, ICOS, IFNA, IFNG, IL10, IL12RB2, IL15RA, IL21, IL21R, IL2RA, IL2RB, IL7R, LAG3, MAF, MX2, PRDM1, PRF1, RORC, SERINC5, TBX21, TRIM5A, ZBTB7B.

MFI

CXCR5 -AF488, CXCR3-AF700, CD8-BV785, PD-1-PE, CCR7-PE-Cy7, CCR5-PerCP-Cy5-5.

Analyse des cellules T CD4+ fusionnées

Production de virus Blam-Vpr

La séquence codant pour la gp160 de la souche R5 JRFL a été intégrée dans le plasmide pNL4.3-Ren, ADN proviral, qui contient la séquence de la souche de VIH-1 de tropisme X4 NL4.3, en lieu et place du gène de l'enveloppe. La séquence de ce plasmide contient un gène rapporteur (la luciférase de Renilla Reniformis) en lieu et place du gène *nef*.

Les virus JRFL-Blam-Vpr ont été produits en co-transfectant dans des cellules HEK 293T, par la méthode de précipitation au phosphate de calcium, l'ADN proviral exprimant la glycoprotéine d'intérêt, le plasmide pCMV4-Blam-Vpr et le plasmide pAdvantage permettant d'optimiser la production de virus. La transfection a été faite dans des flasques T162 cm², contenant 10 millions de cellules, avec 43 µg d'ADN proviral, 6 µg de plasmide pCMV4-Blam-Vpr et 7 µg du plasmide pAdvantage. Dix huit heures après transfection, le milieu de culture a été remplacé par du milieu frais et 48 h post-transfection les surnageants de culture ont été récoltés, centrifugés à 800 g pendant 5 min puis concentrés 50 fois dans du milieu DMEM contenant 10% de SVF après ultracentrifugation à 83000 g pendant 90 min. Les virus ainsi produits ont été quantifiés à l'aide d'un kit ELISA de dosage de la protéine Gag p24 (Perkin Elmer).

Fusion

Cette technique mesure la fusion de virus ayant incorporé la protéine de fusion β -lactamase (BLAM)-Vpr à des cellules cibles qui seront chargées par le substrat (CCF2) de la BLAM, (664). Suite à la fusion, le CCF2-AM (Life Technologies) sera clivé par la BLAM qui aura été libérée dans les cellules où le virus a fusionné, ce qui se traduira par un changement dans le spectre d'émission de fluorescence de cette molécule passant du vert (520 nm) au bleu (447 nm). Ce changement d'émission de fluorescence dans les cellules ayant fusionnées avec le virus, souvent quantifié en pourcentage de cellules « bleues », sera mesuré par cytométrie en flux.

Les expériences de fusion ont été réalisées en tubes Eppendorf dans un volume final de 500 μ L de milieu de culture contenant 5.10^6 PBMC préalablement décongelées et ayant subies 30 à 60 min de culture à 37°C. Ces PBMC sont alors mélangées avec 150 ng de p24 de virus JRFL-Blam-Vpr. Plusieurs tubes sont préparés : 1 tube pour le contrôle sans virus, 1 tube pour le marquage tétramère contrôle avec CLIP (sans substrat), 1 tube pour le marquage tétramère Gag293 (sans substrat), et au moins deux tubes qui seront groupés à la fin de l'expérience pour l'évaluation de la fusion dans les cellules tétramères positives (avec virus et substrat).

Les mélanges virus / cellules ont été soumis en premier lieu à une spinoculation (2000 g, 1 h, 4°C). Les cellules ont ensuite été resuspendues puis incubées pendant 3 heures à 37°C. A l'issue de l'expérience, les cellules ont ensuite été centrifugées, puis resuspendues dans une solution de CCF2-AM préparée préalablement selon les instructions du fournisseur (Life Technologies) diluée dans du milieu CO₂ indépendant, ou seulement avec du milieu CO₂ indépendant pour les contrôles sans substrat.

Les cellules sont alors maintenues dans l'obscurité à température ambiante pendant 2 h. A la fin de la période d'incubation, les cellules sont lavées deux fois avec du RPMI 15% de sérum humain AB puis nous réalisons le marquage tétramère (cf section marquage tétramère). Les cellules sont ensuite marquées avec des anticorps, qui nous permettront de discriminer les cellules T CD4⁺ ainsi que les sous-populations mémoires (cf panel anticorps dans section anticorps). Les cellules sont par la suite lavées deux fois avec du PBA (PBS 1% BSA 0,09% azide de sodium) et fixées avec une solution PBS 2% paraformaldéhyde. Le pourcentage de cellules ayant fusionnées a été mesuré par cytométrie en flux avec un FACS Symphony (BD Biosciences). L'analyse des populations cellulaires infectées a été faite avec le logiciel FlowJo10.

Statistiques

Analyse statistique sur cellule unique

Comparaison de l'expression génique et protéique sur cellule unique, avec correction pour comparaisons multiples

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant MAST (v1.0.5) progiciel (1) issu du logiciel R (v3.3.3). Ce « package » est basé sur un modèle linéaire généralisé en deux parties : le modèle de hurdle adapté au bimodal et/ou aux données d'expression génique en cellule unique à inflation de zéro. Après un contrôle qualité des données, 25 cellules ayant des valeurs aberrantes ont été écartées de l'analyse. L'expression des gènes a été normalisée par rapport au contrôle GAPDH. L'analyse de l'expression des gènes et des MFI a été réalisée indépendamment. Pour chaque groupe de patient, le modèle hurdle a été utilisé pour détecter les différences d'expression entre les cellules Tet+ et Tet- (MFI ou gènes). Nous avons défini un modèle incluant le nombre de patients, le statut « tétramère » (Tet-, Tet+) et le statut « groupe de patient » (HIC, HAART), les interactions entre les deux dernières variables et les interactions entre le nombre de patients et le groupe de patients. Cette dernière interaction a été utile pour déterminer l'appariement entre les cellules provenant d'un même patient. Afin d'évaluer la différence d'expression pour chaque gène, nous avons défini des « vectors of contrasts » et appliqué un test de Wald. Les p-values obtenues ont été ajustées en utilisant les procédures Benjamini et Hochberg (686).

Réseaux de co-expression de gènes entre les cellules uniques

Les réseaux de co-expression ont été inférés grâce au progiciel huge (687) (v1.2.7) de R basés sur des corrélations de spearman et des regroupements de nœuds en utilisant des mélanges de graphiques aléatoires Erdos-Renyi (688) proposé par le progiciel (v1.8). Cette approche permet de détecter les groupes de gènes qui sont positivement ou négativement corrélés.

Analyse Discriminante Linéaire

Une analyse “Analyse Discriminante Linéaire” (LDA) a été réalisée sur les expressions géniques et MFI en utilisant le progiciel MASS (v7.3-47) de R (689). La LDA est une technique de réduction de la dimensionnalité qui permet de chercher une combinaison linéaire

de variables (expression génique ou MFI) qui caractérise et sépare les 4 sous-groupes d'intérêt décrits en fonction du statut « groupe de patients » et « Tet » (Tet+ ou Tet-). De la même manière que l'analyse en composantes principales (PCA), la LDA recherche des combinaisons linéaires de fonctionnalités qui expliquent le mieux les informations contenues dans les données, à l'exception que la LDA vise explicitement à modéliser la différence entre les 4 classes d'intérêt en maximisant la variabilité entre les groupes, et en minimisant la variabilité au sein des groupes.

Autres analyses statistiques

Les analyses ont été effectuées avec le logiciel GraphPad Prism 6.0. Les différences de variables entre les groupes ont été analysées avec le test U de Mann-Whitney. Les corrélations ont été analysées avec le coefficient R. de Spearman. Toutes les différences significatives entre les groupes ($P < 0,05$) ont été rapportées sur les graphiques de données.

B.6. Légende des figures

Figure 1: Les Contrôleurs du VIH présentent une forte proportion de cellules T CD4+ spécifiques de Gag293.

Analyse FACS des cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 provenant de PBMC congelées de Contrôleurs du VIH (HIC, n=9) et de patients traités (HAART, n=9). (A) Graphique FACS en nuage de points représentatifs décrivant la stratégie de sélection des cellules T CD4+. Les cellules T CD4+ viables ont été sélectionnées de la manière suivante : CD20- CD14- Marqueur de viabilité- CD3+ CD4+ CD8-. (B) Graphique FACS en nuage de points représentatifs décrivant la stratégie de sélection utilisée pour réaliser une analyse des cellules T CD4+ mémoires spécifiques de Gag293. Panneau haut: Graphique FACS en nuage de points décrivant un marquage tétramère de HLA-DR chargé, soit avec un peptide contrôle CLIP (panneau gauche), soit avec le peptide immunodominant de la réponse VIH Gag293 (panneau droite). En vert, sélection des cellules négatives pour le marquage tétramère Gag293 (Tet-), et en orange, sélection des cellules positives pour le marquage tétramère Gag293 (Tet+). Panneau bas: Sélection des cellules mémoires (CD45RA-) pour la population Tet- (panneau gauche) et Tet+ (panneau droite). (C) Comparaison de la fréquence de cellules positives pour le tétramère Gag293 entre les Contrôleurs du VIH et les patients traités. Les barres représentent les médianes. Les différences significatives ($P < 0,05$) obtenues par le test statistique Mann-Whitney sont reportées.

Figure 2: Les cellules T CD4+ spécifiques de Gag sont activées et engagées dans une différenciation Th1 à profil cytotoxique

Analyse phénotypique sur cellule unique, de 371 cellules T CD4+ mémoires spécifiques du VIH et 360 cellules non spécifiques provenant de PBMC congelées de Contrôleurs du VIH (HIC, n=9) et de patients traités (HAART, n=9). Nous avons divisé ces cellules en quatre groupes, les cellules triées par marquage tétramère de HLA-DR chargé avec le peptide Gag293 (HIC CD45RA- Tet+: 191 ; HAART CD45RA- Tet+: 180) et les cellules non spécifiques (HIC CD45RA- Tet-: 171 ; HAART CD45RA- Tet- : 189) (cf stratégie de tri présentée en **Figure 1**). L'expression ARNm de 44 gènes a été rapportée à l'expression ARNm de la GAPDH (post tri) et l'expression de 6 protéines à la membrane est représentée par leurs MFI détectées par cytométrie en flux (pendant le tri) (cf liste dans la section matériels et méthodes) par cellule. (A) Diagramme de dispersion des cellules dérivant de

l'analyse linéaire discriminante (LDA) permettant la séparation de nos quatre sous-groupes d'intérêts (HIC Tet- : rouge ; HAART Tet- : vert ; HIC Tet+ : bleu ; HAART Tet+ : violet) décrits par le statut « Groupe de patients » selon l'axe LD1 et le statut « Tet » selon l'axe LD2 en fonction de l'information contenue dans les données (expression ARNm et MFI). **(B-C)** Les graphiques en barres présentent les variables (MFI ou expression ARNm) qui montrent les corrélations les plus significatives (p -value < 0,0001, représentée par la barre en pointillées) avec l'axe LD1 (statut « patient ») **(B)** ou LD2 (statut « Tet ») **(C)**. Les corrélations positives sont représentées en barres pleines et les négatives en barres rayées. Les variables sont regroupées par couleur en fonction de leur appartenance à un programme de différenciation (Th1 : bleu ; cytotoxique : orange ; Tfh : violet ; Autres : gris) ou à des marqueurs d'activation (rouge) ou des médiateurs inflammatoires (marron) ou des chaînes variables de TCR (vert).

Figure 3 : Les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 chez les Contrôleurs montrent un profil Th1 plus prononcé mais sont moins activées

Analyse phénotypique sur cellule unique, de 371 cellules T CD4+ mémoires spécifiques du VIH et 360 cellules non spécifiques provenant de PBMC congelées de Contrôleurs du VIH (HIC, n=9) et de patients traités (HAART, n=9). Nous avons divisé ces cellules en quatre groupes, les cellules triées par marquage tétramère de HLA-DR chargé avec le peptide Gag293 (HIC CD45RA- Tet+ : 191 ; HAART CD45RA- Tet+ : 180) et les cellules non spécifiques (HIC CD45RA- Tet- : 171 ; HAART CD45RA- Tet- : 189) (cf stratégie de tri présentée en **Figure 1**). L'expression ARNm de 44 gènes a été rapportée à l'expression ARNm de la GAPDH (post tri) et l'expression de 6 protéines à la membrane est représentée par leurs MFI détectées par cytométrie en flux (pendant le tri) (cf liste dans la section matériels et méthodes) par cellule. **(A)** Graphique en barres comparant les p-values discriminant l'expression des gènes entre les groupes de cellules HIC Tet+ et HAART Tet+. **(B-C)** Distribution des cellules en « violin plot » par groupe respectif (HIC Tet- : rouge ; HAART Tet- : vert ; HIC Tet+ : bleu ; HAART Tet+ : violet) pour les gènes significativement différents entre les groupes de cellules HIC Tet+ et HAART Tet+, TRBV2 **(B)** et CCL5 **(C)**. **(D)** Graphique en barres comparant les p-values discriminant les MFI entre les groupes de cellules HIC Tet+ et HAART Tet+. **(E-G)** Distribution des cellules en « violin plot » par groupe respectif (HIC Tet- : rouge ; HAART Tet- : vert ; HIC Tet+ : bleu ; HAART Tet+ : violet) pour les MFI significativement différentes entre les groupes de cellules HIC Tet+ et HAART Tet+, CXCR3 **(E)**, PD-1 **(F)** et CCR5 **(G)**.

Les barres représentent les médianes. L'analyse des p-values a été réalisée en utilisant le modèle hurdle. Les différences significatives ($P < 0,05$), ajustées par la procédure corrigeant les p-values pour comparaisons multiples de Benjamini and Hochberg, sont reportées. Les barres en pointillées représentent une p-value = 0,05.

Figure 4: Les cellules T CD4+ totales de patients Contrôleurs ont une expression de CCR5 limitée

Analyse FACS de l'expression de CCR5 dans les populations mémoires des cellules T CD4+ provenant de PBMC congelées de Contrôleurs du VIH (HIC, n=9) et de patients traités (HAART, n=9). (A) Graphique FACS en nuage de points représentatifs décrivant la stratégie de sélection des différentes populations mémoires des cellules T CD4+. Les cellules T CD4+ viables ont été sélectionnées de la manière suivante : CD20- CD14- Marqueur de viabilité- CD3+ CD8- CD4+. Les sous-populations mémoires ont été sélectionnées en fonction de l'expression de CD45RA et CCR7 : cellules T CD4+ Naïves (Nv : CD45RA+ CCR7+), Centrales mémoires (CM : CD45RA- CCR7+), Effectrices mémoires (EM : CD45RA- CCR7-) et Effectrices (Eff : CD45RA+ CCR7-). (B-C) Expression de CCR5 mesurée par sa MFI dans les différentes sous-populations mémoires. Histogramme représentatif de la MFI de CCR5 (B) et comparaison de la MFI de CCR5 dans les sous-populations mémoires chez les patients Contrôleurs du VIH (C). (D) Comparaison de la MFI de CCR5 dans les cellules T CD4+ chez les patients Contrôleurs du VIH et les patients traités. (E) Comparaison de la MFI de CCR5 dans les sous-populations mémoires des cellules T CD4+ (de gauche à droite: Nv, CM, EM, Eff) entre les patients Contrôleurs du VIH et les patients traités

Les barres représentent les médianes. Les différences significatives ($P < 0,05$) obtenues par le test statistique Mann-Whitney sont reportées.

Figure 5: Les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 de patients Contrôleurs ont une expression de CCR5 limitée

Analyse FACS de l'expression de CCR5 dans les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 provenant de PBMC congelées de Contrôleurs du VIH (HIC, n=9) et de patients traités (HAART, n=9). (A) Graphique FACS en nuage de points représentatifs, décrivant la stratégie de sélection utilisée pour réaliser une analyse des cellules T CD4+ mémoires spécifiques de Gag293. Panneau haut: Graphique FACS en nuage de points décrivant un marquage tétramère de HLA-DR chargé soit avec un peptide contrôle CLIP (panneau de gauche), soit avec le peptide immunodominant de la réponse VIH Gag293 (panneau de droite) à partir de cellules T

CD4+ viables. En vert, sélection des cellules négatives pour le marquage tétramère Gag293 (Tet-) en orange, sélection des cellules positives pour le marquage tétramère Gag293 (Tet+). Panneau bas : Marquage représentatif de CCR5 et sélection des cellules mémoires (CD45RA-) pour la population Tet- (panneau de gauche) et Tet+ (panneau de droite). **(B-C)** Comparaison de la MFI de CCR5 parmi le compartiment T CD4+ mémoire (CD45RA-) entre le population Tet- et Tet+. Histogramme représentatif chez un patient Contrôleur du VIH **(B)**, et comparaison entre patients Contrôleurs du VIH et patients traités **(C)**. **(D)** Comparaison de l'expression de CCR5 mesurée par sa MFI dans le compartiment Tet+ parmi les sous-populations CM (panneau de gauche : CD45RA- CCR7+) et EM (panneau de droite : CD45RA- CCR7-) entre les patients Contrôleurs du VIH et les patients traités. **(E)** Corrélation entre la MFI de CCR5 dans la population Tet+ et la fréquence de cellules Tet+ dans la population T CD4+ chez les patients Contrôleurs du VIH (carrés rouges) et les patients traités (triangles bleus).

Les barres représentent les médianes et les différences significatives ($P < 0,05$) obtenues par le test statistique Mann-Whitney **(C et D)** et de corrélation de Spearman **(E)** sont reportées.

Figure 6: La fusion du VIH dans les cellules T CD4+ non-stimulées corrèle avec l'expression de CCR5

Analyse FACS de la fusion du provirus R5 BlaM-Vpr-JRFL dans les populations mémoires des cellules T CD4+ provenant de PBMC congelées de Contrôleurs du VIH (HIC, n=9) et de patients traités (HAART, n=9). **(A)** Graphique FACS en nuage de points représentatifs décrivant la stratégie de sélection des cellules fusionnées parmi les cellules T CD4+ viables. **(B) Panneau de gauche** : Comparaison de la fréquence de cellules fusionnées par BlaM-Vpr-JRFL dans la population T CD4+ viables entre les Contrôleurs du VIH et les patients traités. Panneau de droite : Corrélation entre la fréquence de cellules fusionnées par BlaM-Vpr-JRFL dans la population de T CD4+ viables et la MFI de CCR5 dans la population de T CD4+ viables chez les patients Contrôleurs du VIH (carrés rouges) et les patients traités (triangles bleus). **(C)** Graphique FACS en nuage de points représentatifs, décrivant la stratégie de sélection des cellules fusionnées par le provirus BlaM-Vpr-JRFL dans les sous-populations mémoires : cellules T CD4+ Naïves (Nv : CD45RA+ CCR7+), Centrales mémoires (CM : CD45RA- CCR7+), Effectrices mémoires (EM : CD45RA- CCR7-) et Effectrices (Eff : CD45RA+ CCR7-). **(D)** Comparaison de la fréquence de cellules fusionnées dans les sous-populations mémoires chez les patients Contrôleurs du VIH. **(E)** Comparaison de la fréquence

de cellules fusionnées dans les sous-populations mémoires des cellules T CD4+ (de gauche à droite: Nv, CM, EM, Eff) entre les patients Contrôleurs du VIH et les patients traités. Les barres représentent les médianes et les différences significatives ($P < 0,05$) obtenues par le test statistique Mann-Whitney (**B**, **D** et **E**) et de corrélation de Spearman (**B**) sont reportées.

Figure 7 : Les cellules T CD4+ centrales mémoires spécifiques de Gag293 chez les Contrôleurs du VIH sont peu sensibles à l'entrée virale

Analyse FACS de la fusion par le provirus R5 BlaM-Vpr-JRFL dans les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 provenant de PBMC congelées de Contrôleurs du VIH (HIC, n=9) et de patients traités (HAART, n=9). (A) Graphique FACS en nuage de points représentatifs, décrivant la stratégie de sélection des cellules fusionnées par le provirus BlaM-Vpr-JRFL parmi les cellules T CD4+ mémoires (CD45RA-) spécifiques du VIH, suite à un marquage tétramère de HLA-DR chargés avec le peptide immunodominant Gag293 (panel de droite: CD45RA- Tet+), ou non spécifiques (panel de gauche: CD45RA- Tet-) à partir de cellules T CD4+ viables. (B) Comparaison de la fréquence de cellules fusionnées par le provirus BlaM-Vpr-JRFL dans le compartiment T CD4+ mémoire (CD45RA-), soit dans la population Tet-, soit dans la population Tet+ entre les patients Contrôleurs du VIH et les patients traités. (C) Corrélation entre la fréquence de cellules fusionnées par le provirus BlaM-Vpr-JRFL dans le compartiment T CD4+ mémoire (CD45RA-) des populations Tet- et Tet+ et de la MFI de CCR5 parmi le compartiment T CD4+ mémoire (CD45RA-) des populations Tet- et Tet+ chez les Contrôleurs du VIH (HIC Tet- CD45RA- : carrés rouges vides ; HIC Tet+ CD45RA- : carrés rouges pleins) et les patients traités (HAART Tet- CD45RA- : triangles bleus vides; HIC Tet+ CD45RA- : triangles bleus pleins). (D) Comparaison de la fréquence de cellules fusionnées par le provirus BlaM-Vpr-JRFL dans le compartiment Tet+ parmi les sous-populations CM (panneau de gauche : CD45RA- CCR7+) et EM (panneau de droite : CD45RA- CCR7-) entre les patients Contrôleurs du VIH et les patients traités. (E) Corrélation entre la fréquence de cellules fusionnées par le provirus BlaM-Vpr-JRFL dans le compartiment Tet+ parmi la sous-population CM et la MFI de CCR5 dans le compartiment Tet+ parmi la sous-population CM chez les patients Contrôleurs (carrés rouges) et les patients traités (triangles bleus).

Les barres représentent les médianes et les différences significatives ($P < 0,05$) obtenues par le test statistique Mann-Whitney (**B** et **D**) et de corrélation de Spearman (**C** et **E**) sont reportées.

Figure supplémentaire 1 : L'expression du programme cytotoxique est corrélée dans les cellules spécifiques de Gag, chez les Contrôleurs du VIH

Analyse phénotypique sur cellule unique, de 371 cellules T CD4⁺ mémoires spécifiques du VIH et 360 cellules non spécifiques provenant de PBMC congelées de Contrôleurs du VIH (HIC, n=9) et de patients traités (HAART, n=9). Nous avons divisé ces cellules en quatre groupes, les cellules triées par marquage tétramère de HLA-DR chargé avec le peptide Gag293 (HIC CD45RA⁻ Tet⁺: 191 ; HAART CD45RA⁻ Tet⁺:180) et les cellules non spécifiques (HIC CD45RA⁻Tet⁻: 171 ; HAART CD45RA⁻ Tet⁻ : 189) (cf stratégie de tri présentée en **Figure 1**). L'expression ARNm de 44 gènes a été rapportée à l'expression ARNm de la GAPDH (post tri) (cf liste dans la section matériels et méthodes) par cellule. (**A-B**) Détection des communautés de gènes qui sont corrélées positivement ou négativement ensemble dans la population HIC Tet⁺ (**A**) et HAART Tet⁺ (**B**). Les gènes absents d'un réseau ont été enlevés, à l'exception de *PRFI* dans le panneau B. Les barres noires représentent les corrélations positives et les barres rouges les corrélations négatives. Les réseaux se ressemblant entre les deux groupes sont colorés similairement. Les points en orange correspondent aux gènes décrits dans le programme cytotoxique.

Figure supplémentaire 2 : « Violin plots »

Analyse phénotypique sur cellule unique, de 371 cellules T CD4⁺ mémoires spécifiques du VIH et 360 cellules non spécifiques, provenant de PBMC congelées de Contrôleurs du VIH (HIC, n=9) et de patients traités (HAART, n=9). Nous avons divisé ces cellules en quatre groupes, les cellules triées par marquage tétramère de HLA-DR chargé avec le peptide Gag293 (HIC CD45RA⁻ Tet⁺: 191 ; HAART CD45RA⁻ Tet⁺:180) et les cellules non spécifiques (HIC CD45RA⁻ Tet⁻: 171 ; HAART CD45RA⁻ Tet⁻ : 189) (cf stratégie de tri présentée en **Figure 1**). L'expression ARNm de 44 gènes a été rapportée à l'expression ARNm de la GAPDH (post tri) et l'expression de 6 protéines à la membrane est représentée par leurs MFI détectées par cytométrie en flux (pendant le tri) (cf liste dans la section matériels et méthodes) par cellule. (**A-C**). Distribution des cellules en « violin plot » par groupe respectif (HIC Tet⁻: rouge ; HAART Tet⁻: vert ; HIC Tet⁺: bleu ; HAART Tet⁺ : violet) pour les 44 gènes et les 6 MFI par ordre alphabétique.

Figures supplémentaires 3 et 4 : P-values pour les comparaisons d'expression ARNm et protéique avec correction pour comparaisons multiples

Analyse phénotypique sur cellule unique, de 371 cellules T CD4⁺ mémoires spécifiques du VIH et 360 cellules non spécifiques provenant de PBMC congelées de Contrôleurs du VIH (HIC, n=9) et de patients traités (HAART, n=9). Nous avons divisé ces cellules en quatre groupes, les cellules triées par marquage tétramère de HLA-DR chargé avec le peptide Gag293 (HIC CD45RA⁻ Tet⁺: 191 ; HAART CD45RA⁻ Tet⁺:180) et les cellules non spécifiques (HIC CD45RA⁻Tet⁻: 171 ; HAART CD45RA⁻ Tet⁻ : 189) (cf stratégie de tri présentée en **Figure 1**). L'expression ARNm de 44 gènes a été rapportée à l'expression ARNm de la GAPDH (post tri) et l'expression de 6 protéines à la membrane est représentée par leurs MFI détectées par cytométrie en flux (pendant le tri) (cf liste dans la section matériels et méthodes) par cellule. (**Figure S3**) Graphique en barres comparant les p-values discriminant l'expression des 44 gènes entre les groupes de cellules suivant : (du bas vers le haut) HIC Tet⁻ vs HIC Tet⁺ ; HAART Tet⁻ vs HAART Tet⁺ ; HIC Tet⁻ vs HAART Tet⁻. (**Figure S4**) Graphique en barres comparant les p-values discriminant l'expression des 6 MFI entre les groupes de cellules suivant : (de la gauche vers la droite) HIC Tet⁻ vs HIC Tet⁺ ; HAART Tet⁻ vs HAART Tet⁺ ; HIC Tet⁻ vs HAART Tet⁻.

Les barres représentent les médianes. L'analyse des p-values a été réalisée en utilisant le modèle hurdle. Les différences significatives ($P < 0,05$), ajustées par la procédure corrigeant les p-values pour comparaisons multiples de Benjamini and Hochberg, sont reportées. Les barres en pointillées représentent une p-value = 0,05.

Figure supplémentaire 5 : Complément

Analyse FACS des sous-populations mémoires parmi les cellules T CD4⁺ spécifiques (Tet⁺) et non spécifiques (Tet⁻) de Gag293 provenant de PBMC congelées de Contrôleurs du VIH (HIC, n=9) et de patients traités (HAART, n=9). Les sous-populations mémoires ont été sélectionnées en fonction de l'expression de CD45RA et CCR7 : cellules T CD4⁺ Naïves (Nv : CD45RA⁺ CCR7⁺), Centrales mémoires (CM : CD45RA⁻ CCR7⁺), Effectrices mémoires (EM : CD45RA⁻ CCR7⁻) et Effectrices (Eff : CD45RA⁺ CCR7⁻).

(A et C) Comparaisons de la MFI de CCR5 (A) ou de la fréquence de cellules fusionnées par le provirus BlaM-Vpr-JRFL (C) dans les sous-populations mémoires chez les patients traités. (B) Comparaison de la fréquence des CM dans la population T CD4⁺ mémoire spécifique de Gag293 (CD45RA⁻ Tet⁺) ou non spécifique (CD45RA⁻ Tet⁻) chez les patients Contrôleurs ou

traités. **(D)** Corrélation entre la fréquence de cellules fusionnées par le provirus BlaM-Vpr-JRFL dans le compartiment Tet⁺ parmi la sous-population EM, et la MFI de CCR5 dans le compartiment Tet⁺ parmi la sous-population EM chez les patients Contrôleurs (carrés rouges) et patients traités (triangles bleus).

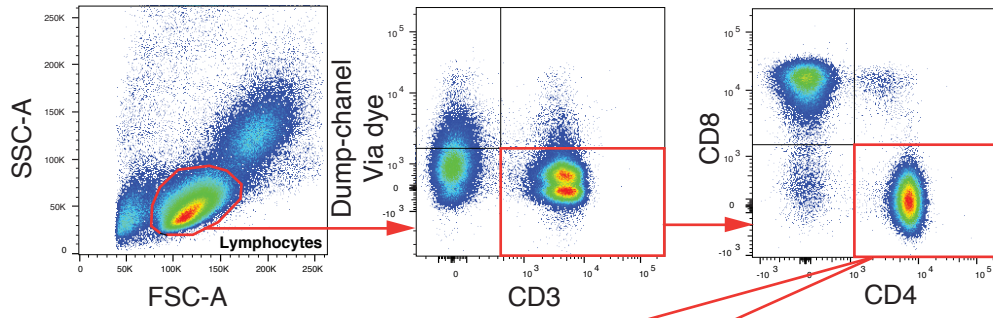
Les barres représentent les médianes. Les différences significatives ($P < 0,05$) obtenues par le test statistique Mann-Whitney (**A**, **B** et **C**) et de corrélation de Spearman (**D**) sont reportées.

B.7. Résultats

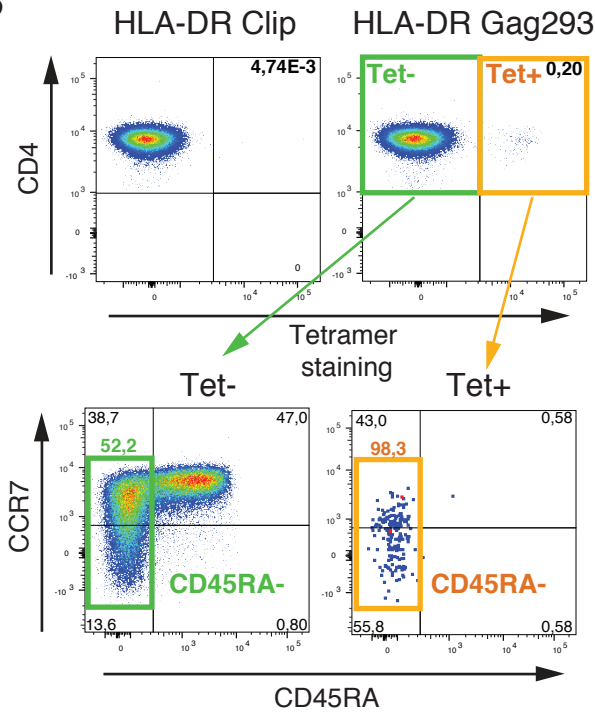
Figure 1:

Les Contrôleurs du VIH présentent une forte proportion de cellules T CD4+ spécifiques de Gag293

A



B



C

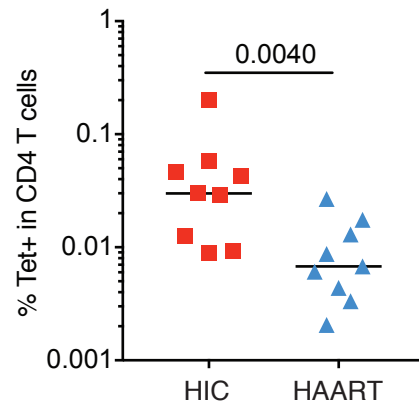


Figure 2:

Les cellules T CD4+ spécifiques de Gag sont activées et engagées dans une différenciation Th1 à profil cytotoxique

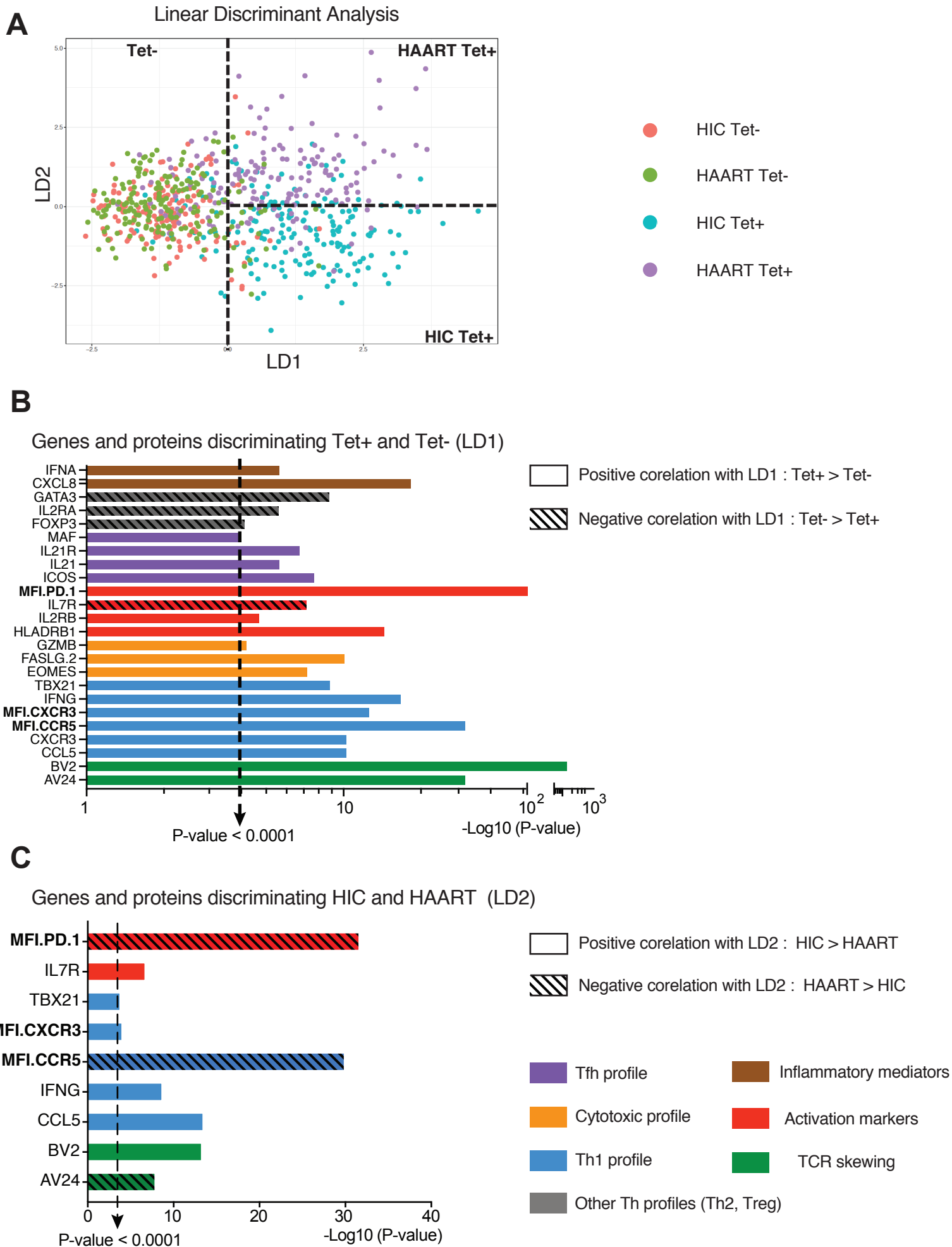


Figure 3: Les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 chez les Contrôleurs montrent un profil Th1 plus prononcé mais sont moins activées

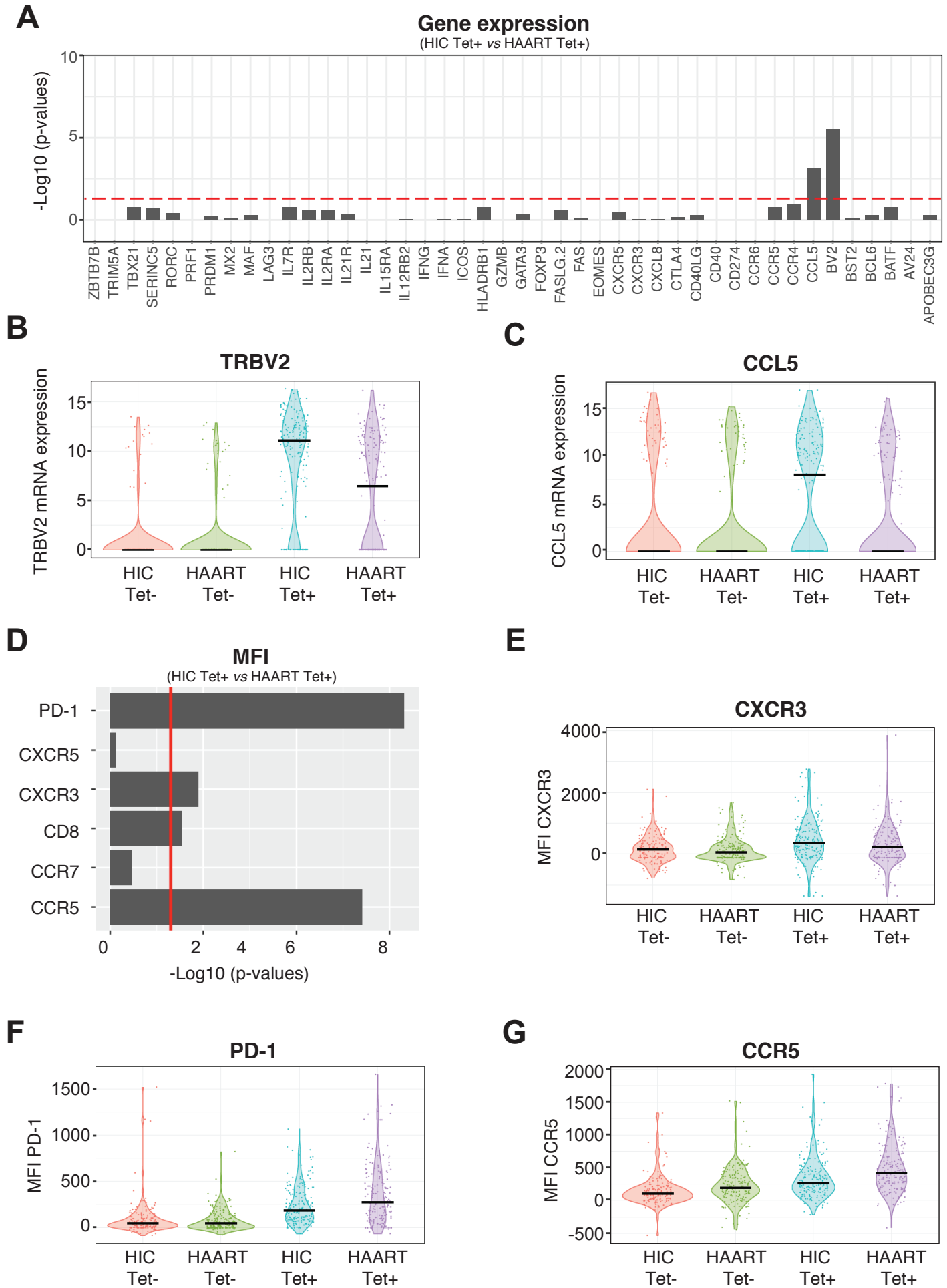
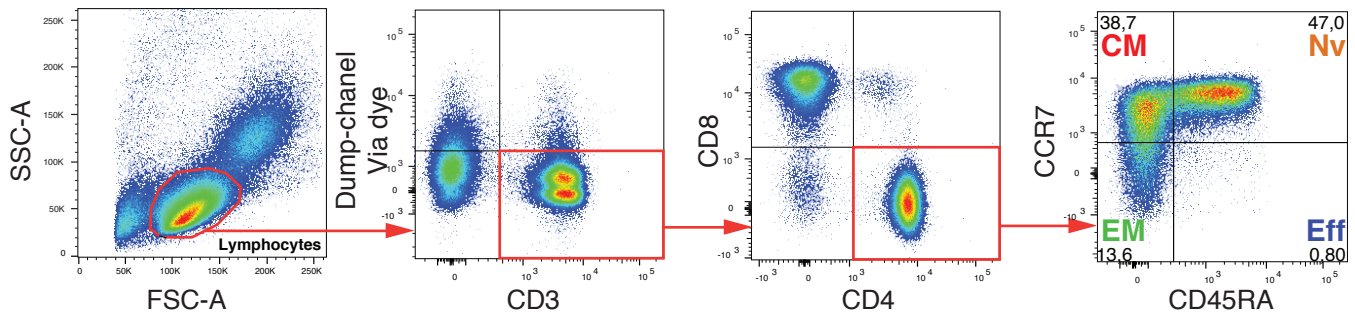


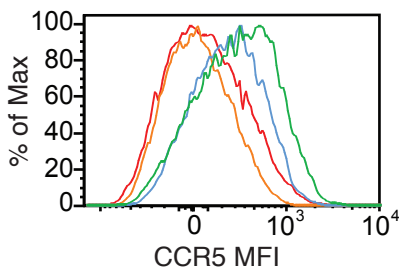
Figure 4:

Les cellules T CD4+ totales de patients Contrôleurs ont une expression de CCR5 limitée

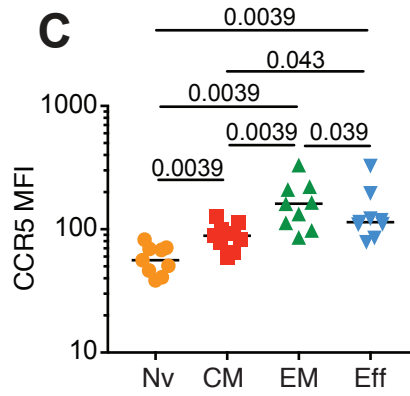
A



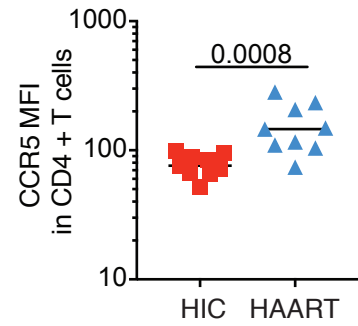
B



C



D



E

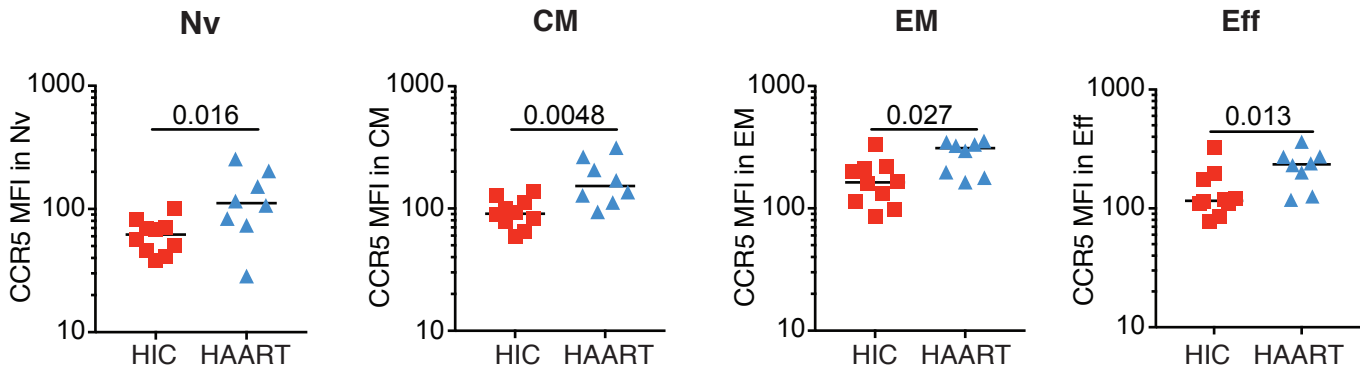


Figure 5:

*Les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 de patients
Contrôleurs ont une expression de CCR5 limitée*

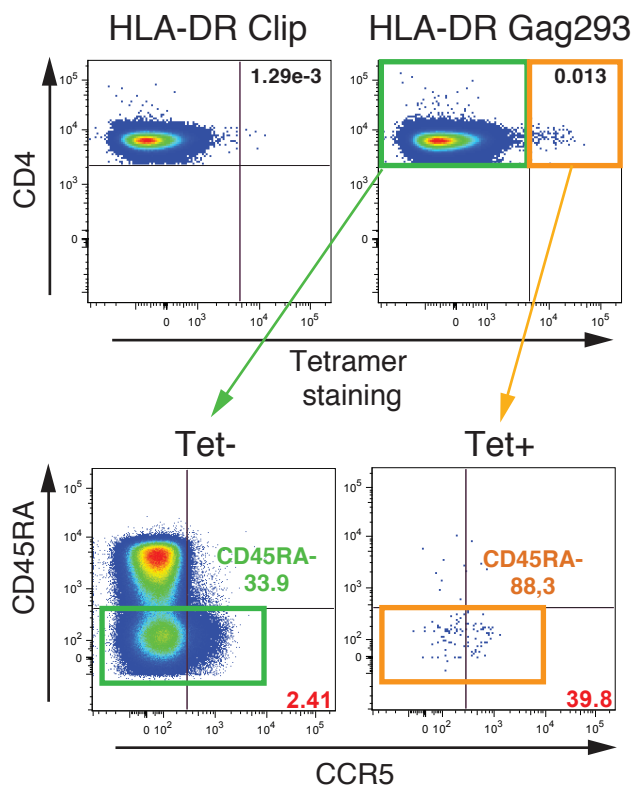
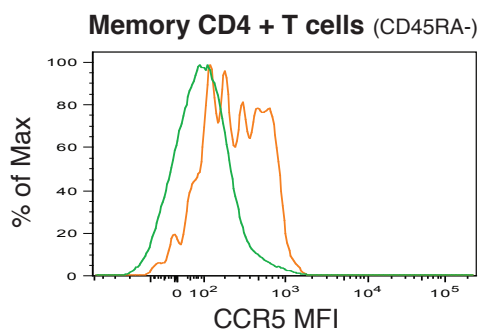
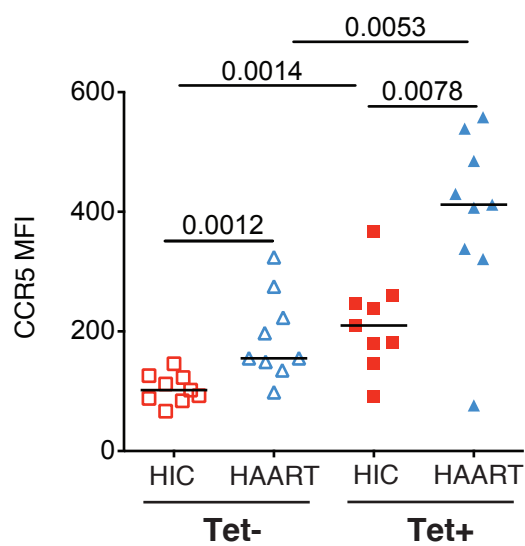
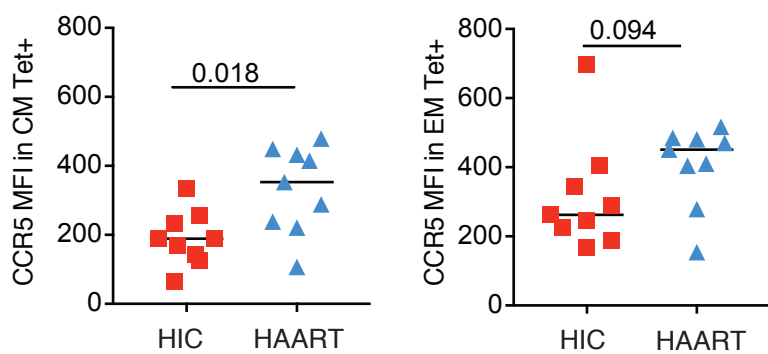
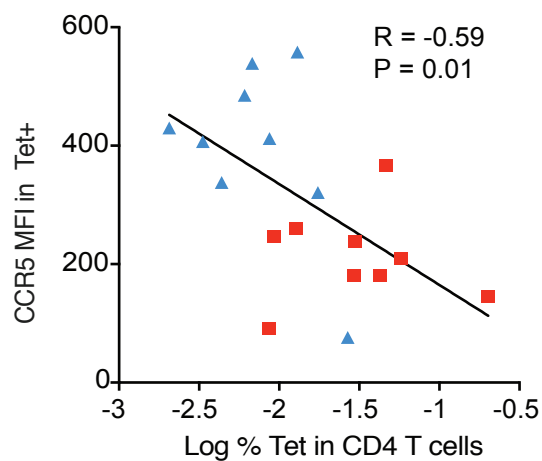
A**B****C****D****E**

Figure 6:

*La fusion du VIH dans les cellules T CD4+ non-stimulées
corrèle avec l'expression de CCR5*

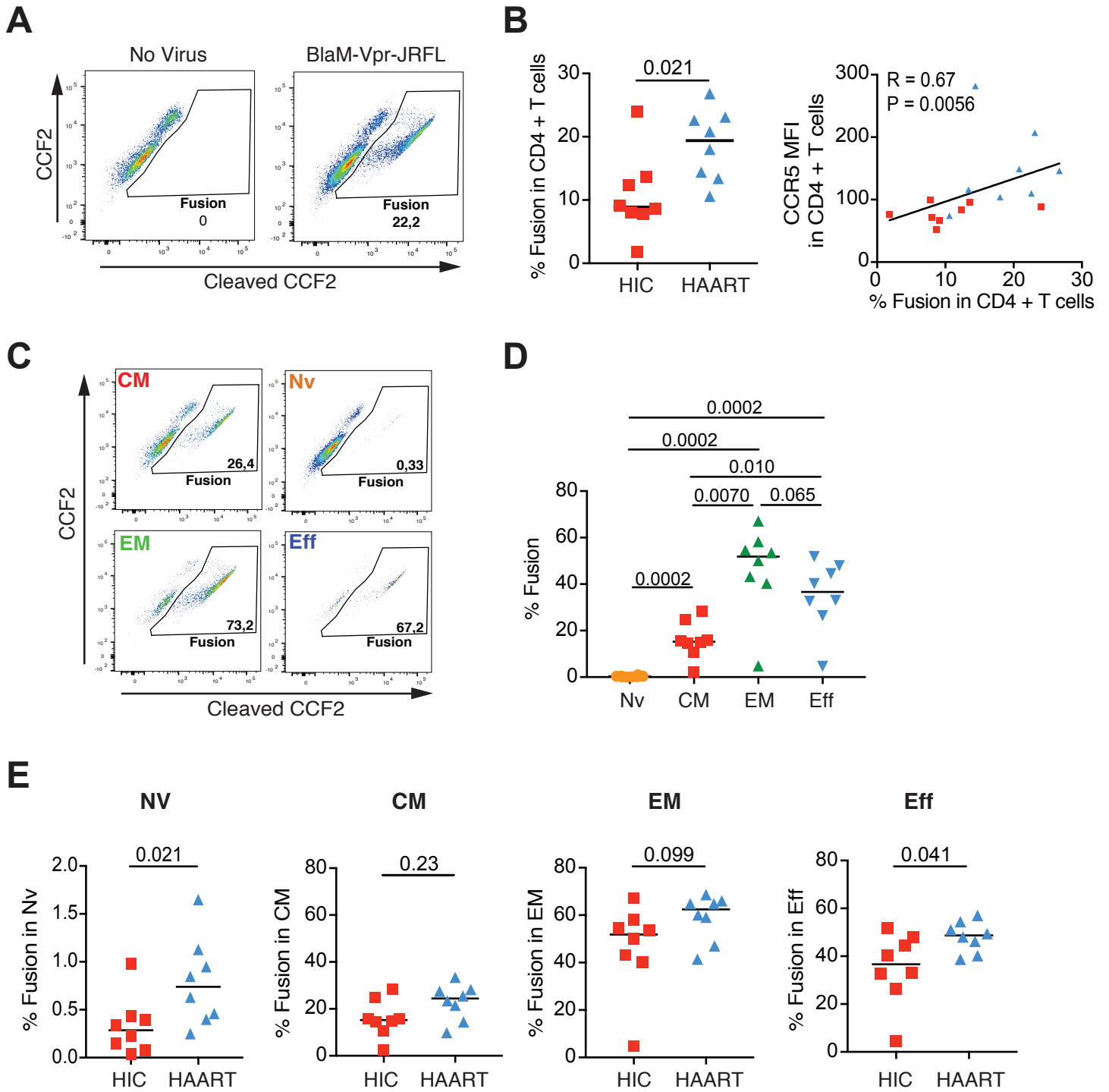
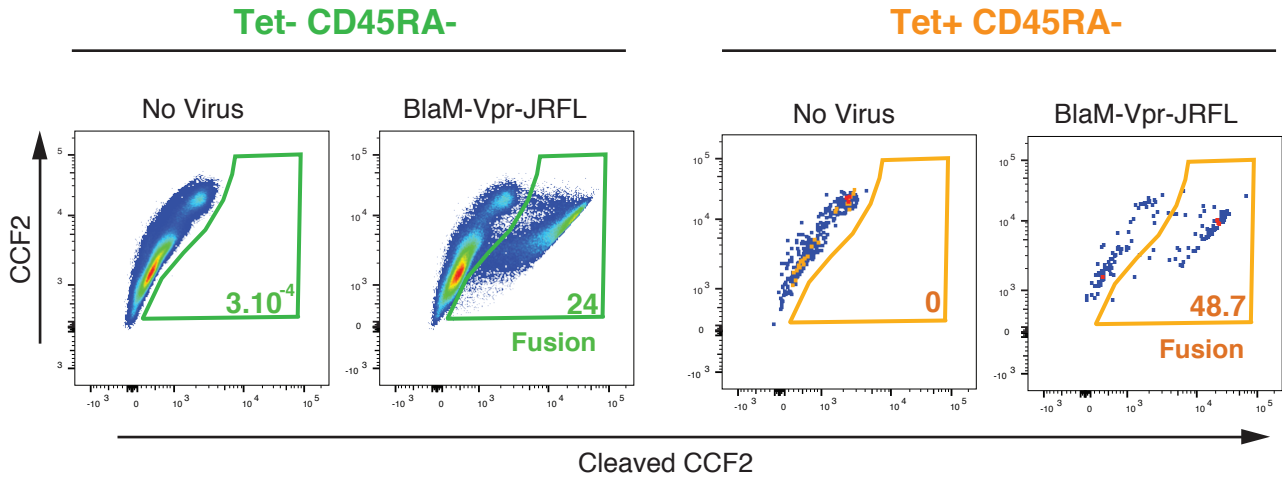
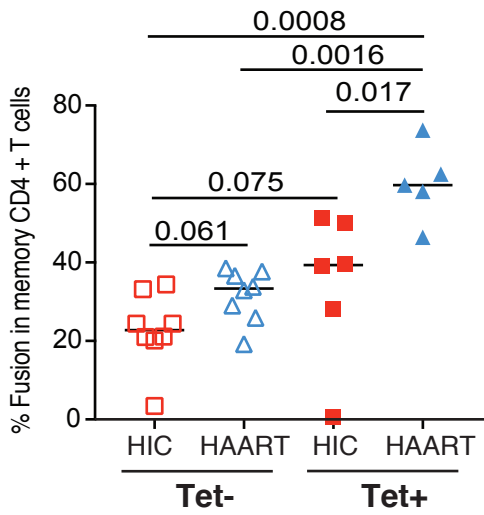
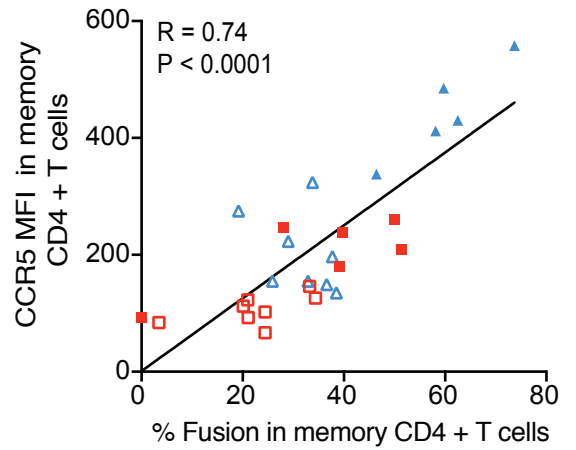
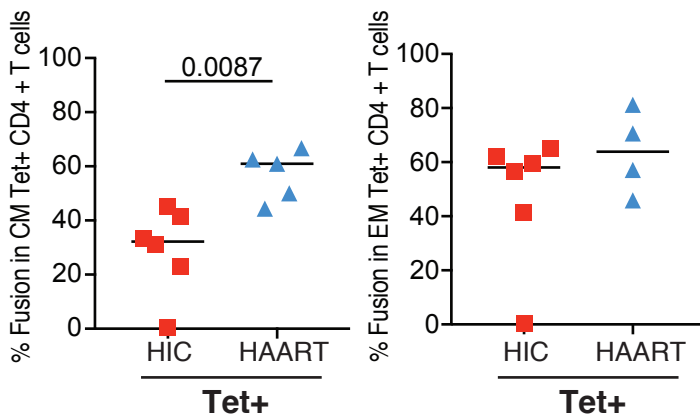
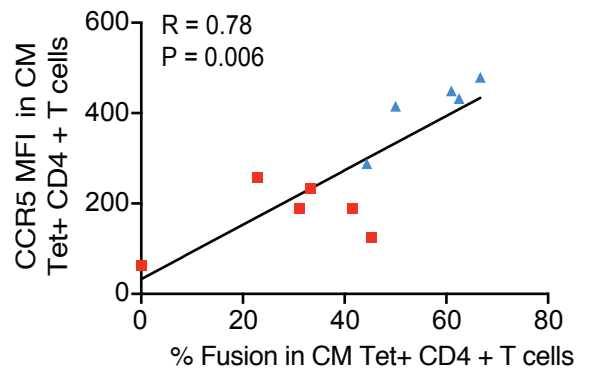


Figure 7:

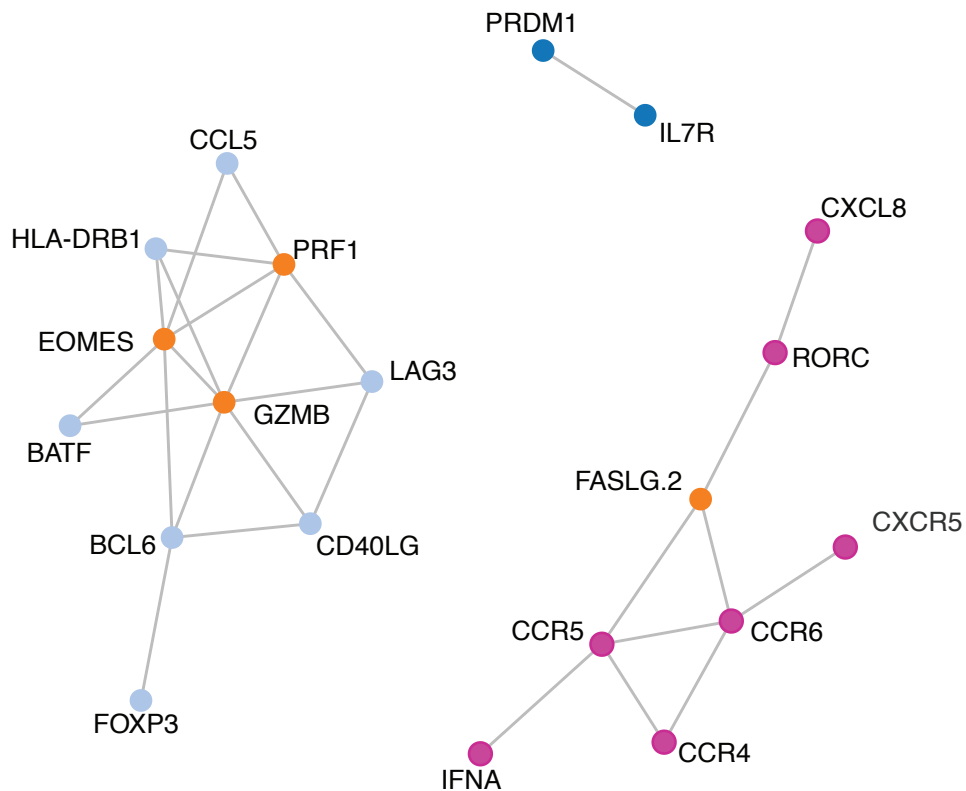
Les cellules T CD4+ centrales mémoires spécifiques de Gag293 chez les Contrôleurs du VIH sont peu sensibles à l'entrée virale

A**B****C****D****E**

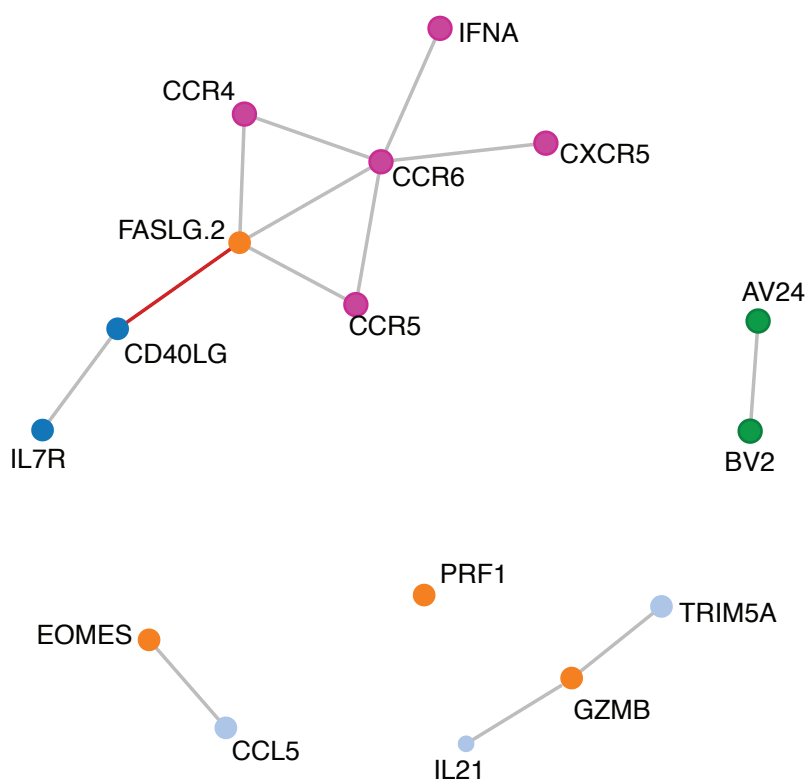
Supplementary data 1:

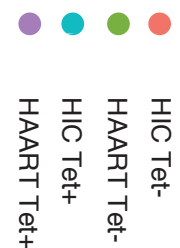
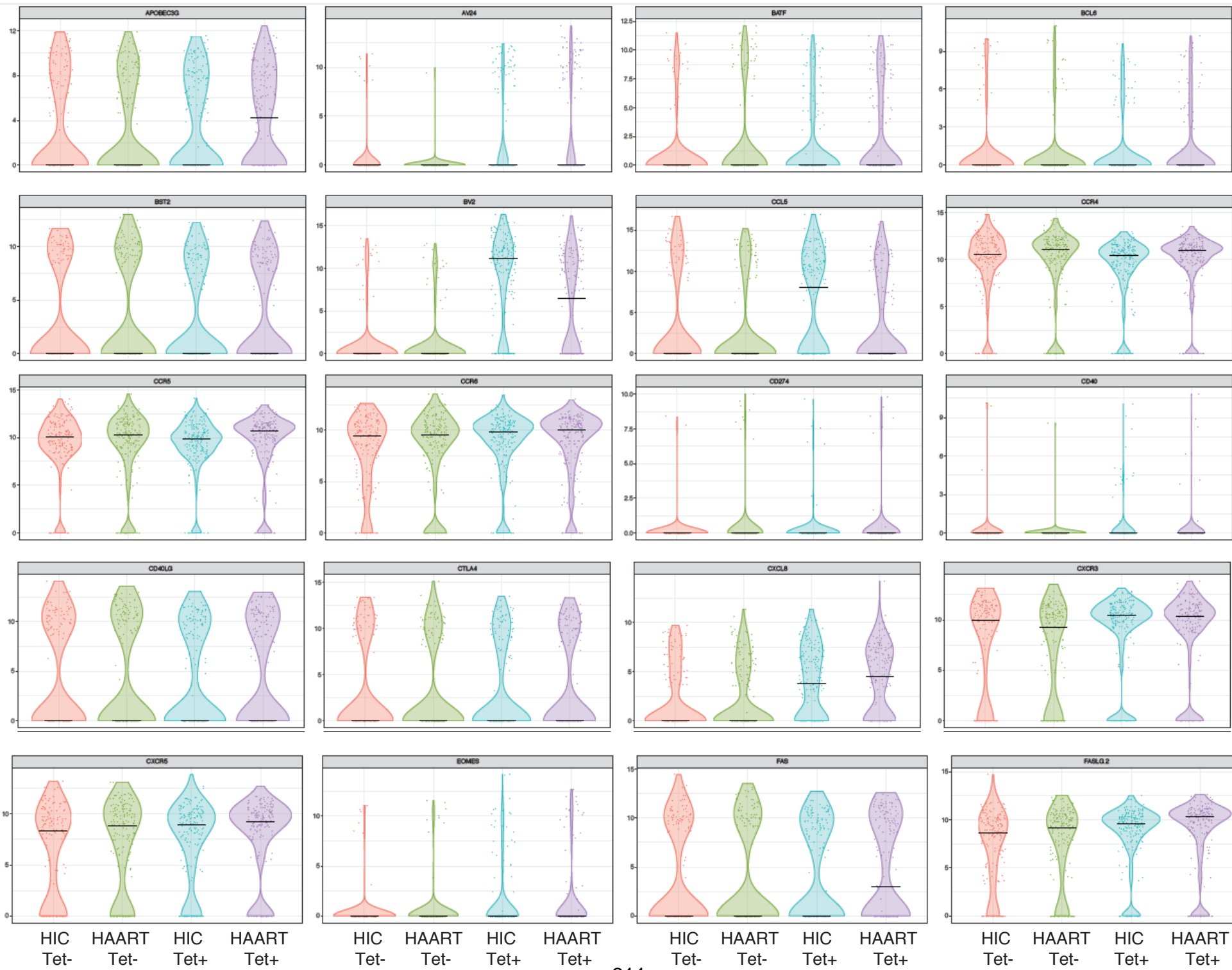
L'expression du programme cytotoxique est corrélée dans les cellules spécifiques de Gag, chez les Contrôleurs du VIH

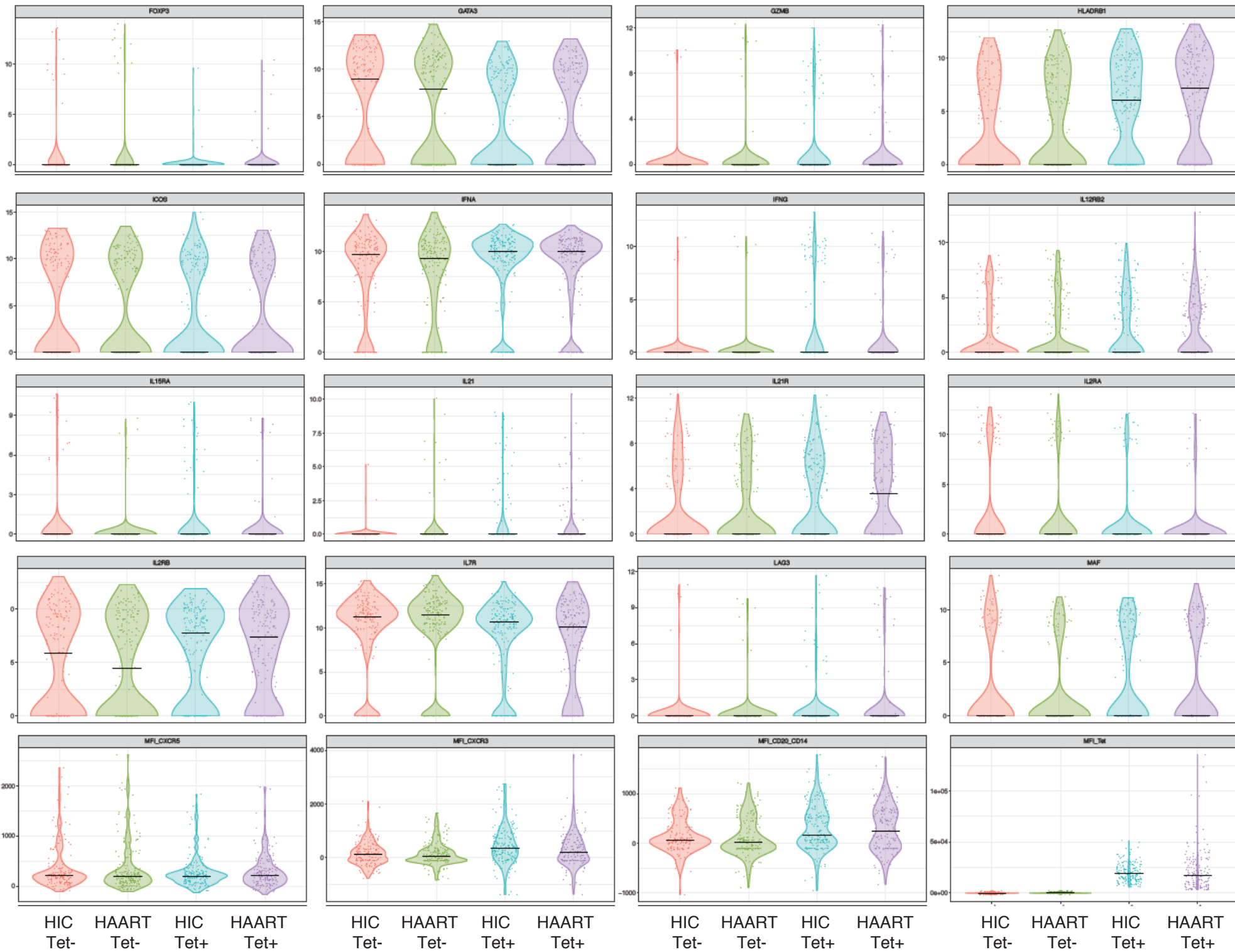
A HIV Controllers Gag293-specific CD4+ T cells



B HAART patients Gag293-specific CD4+ T cells







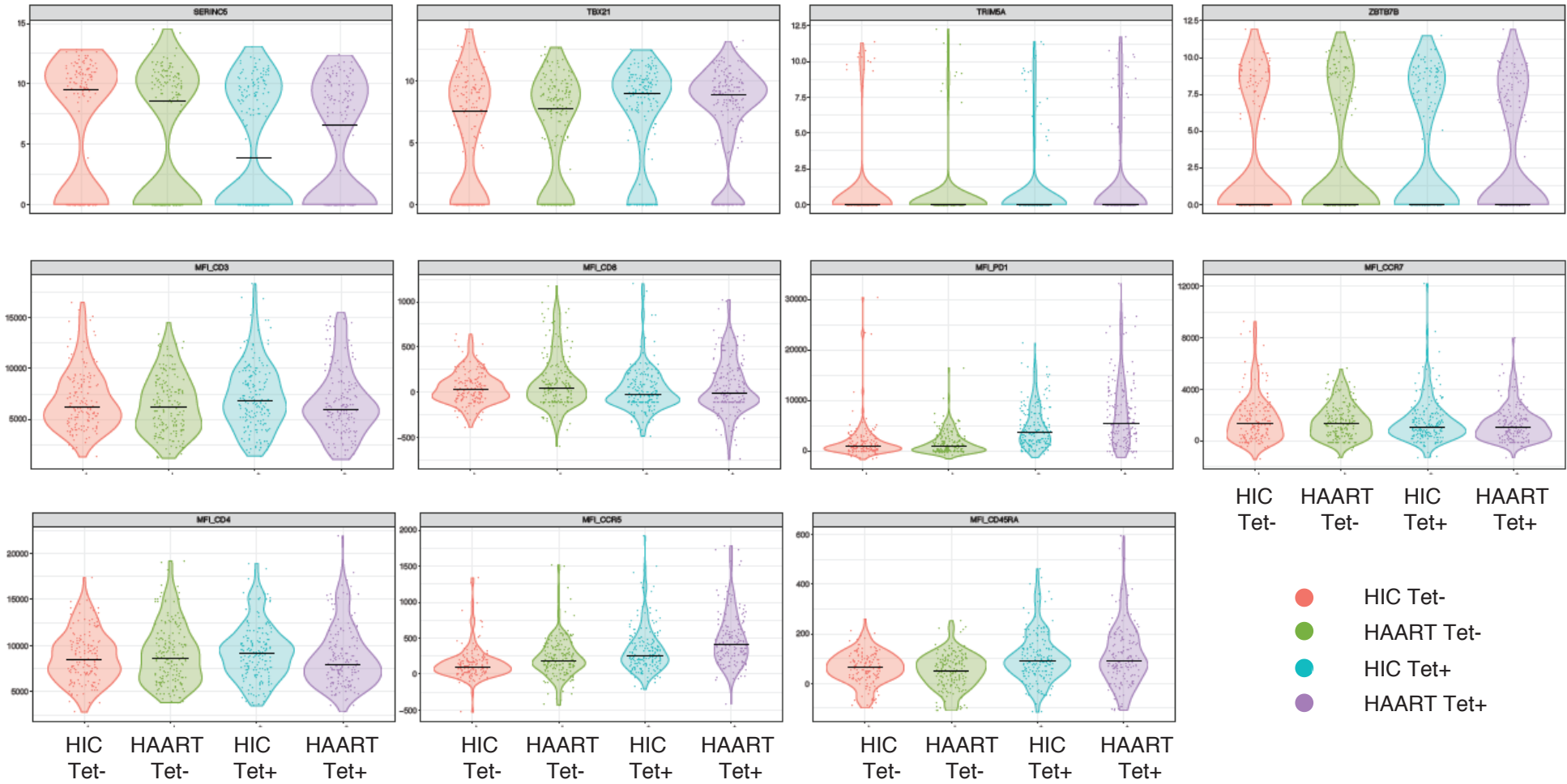
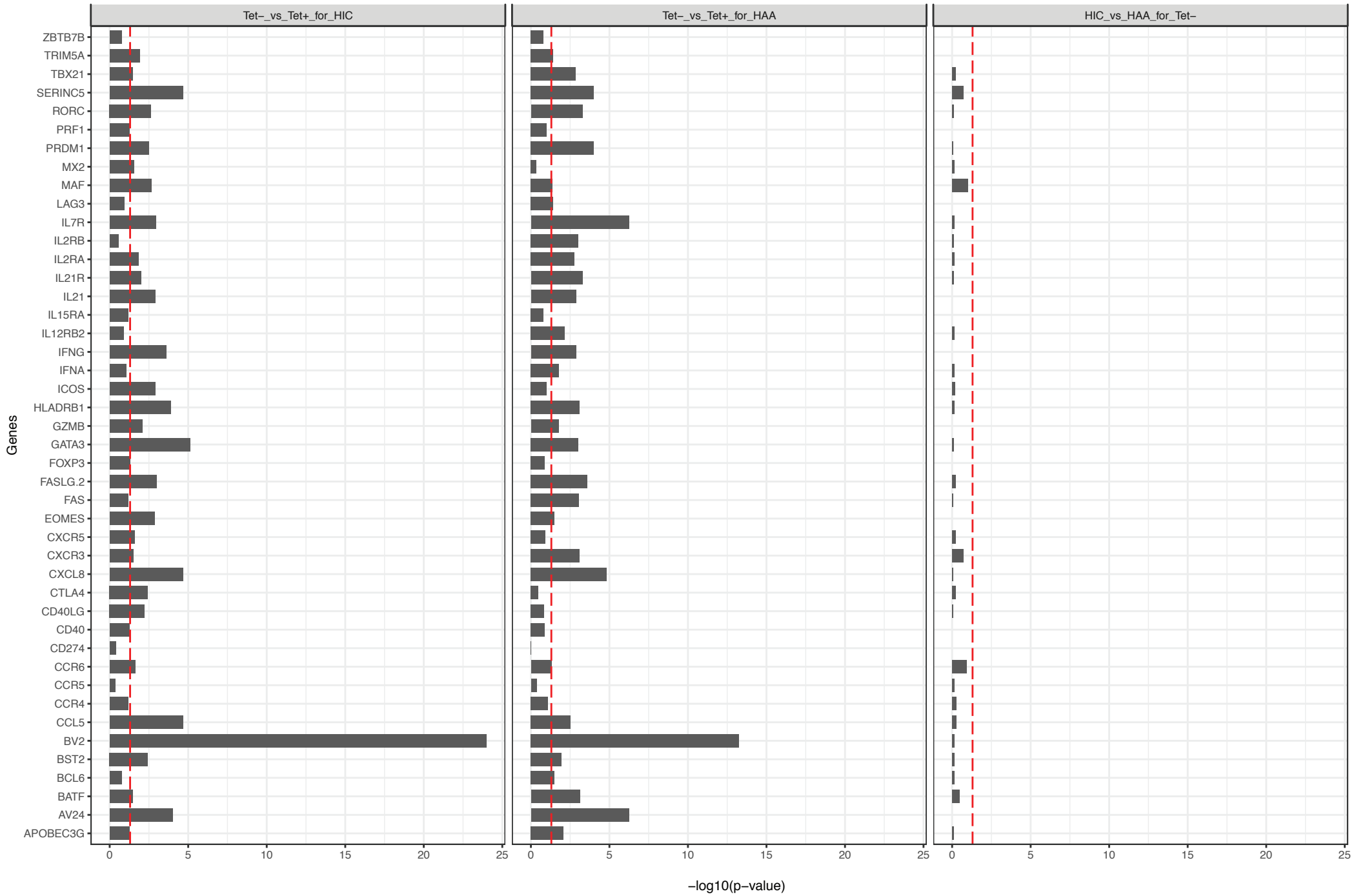


Figure supplementary data 3 : *P*-values pour les comparaisons d'expression ARNm avec correction pour comparaisons multiples



$-\log_{10}(\text{p-value})$

Figure supplementary Data 4

P-values pour les comparaisons d'expression protéique avec correction pour comparaisons multiples

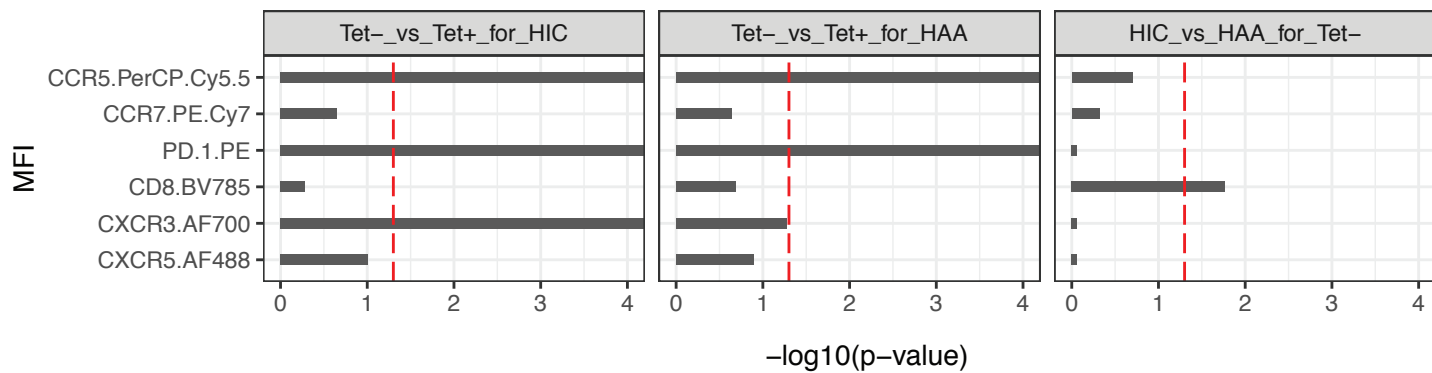
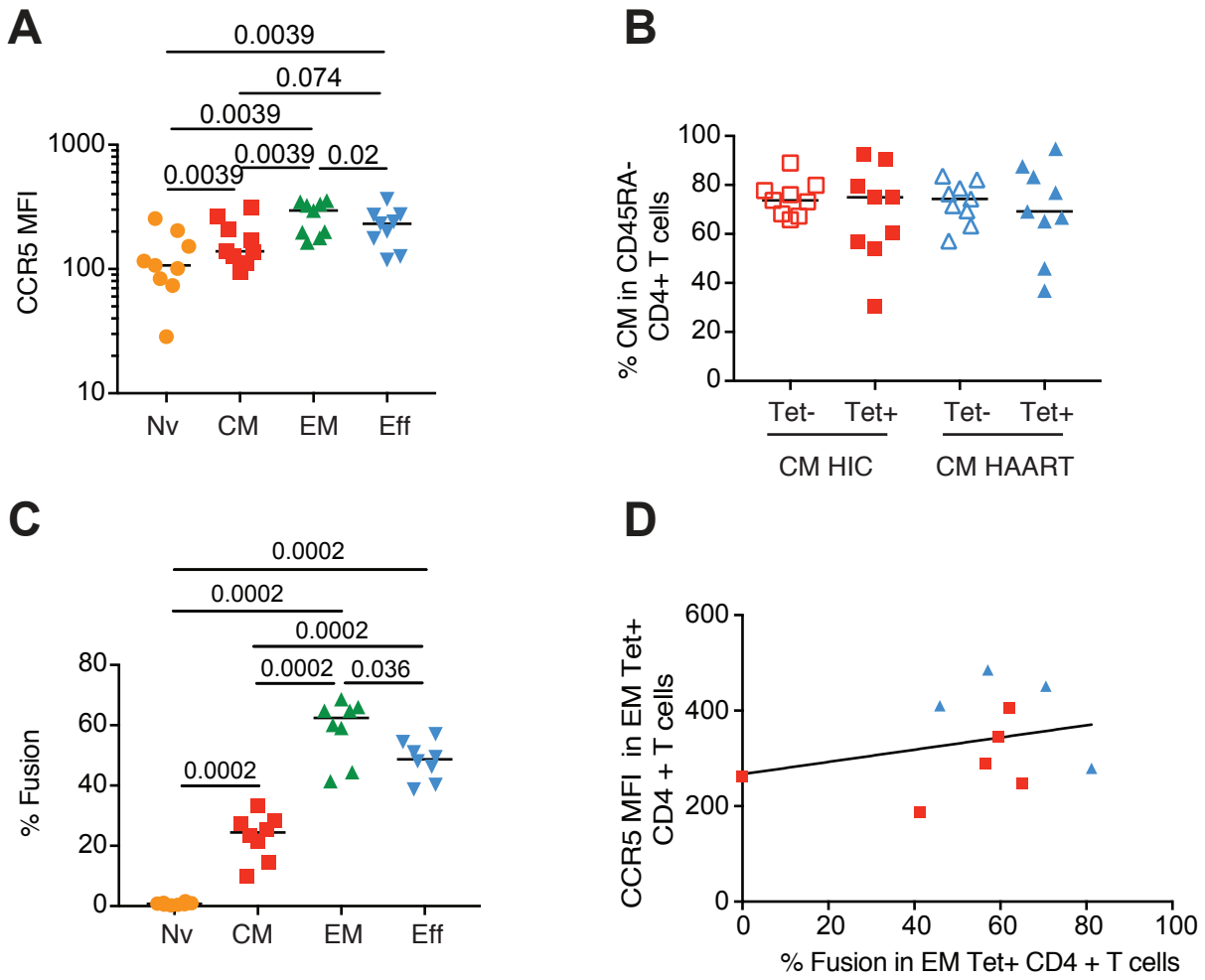


Figure supplementary data 5: *Complément*



DISCUSSION

III. DISCUSSION GENERALE

A. Maintien de la fréquence et fonction des cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 Th1 et Tfh dans l'infection à VIH naturellement contrôlée

Dans nos deux études, les Contrôleurs du VIH montrent une proportion élevée de cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 par rapport aux patients traités, alors que ces deux groupes de patients sont caractérisés par une très faible charge virale à long terme. Le maintien de cette population chez les Contrôleurs suggère que la réponse adaptative CD4 est active dans l'infection contrôlée à VIH, par contraste avec la reconstitution incomplète de l'immunité antivirale chez les patients sous thérapie antirétrovirale (675, 676). De plus, il a été montré que globalement la fréquence des cellules T CD4+ spécifiques de Gag corrèle inversement avec la charge virale, soulignant l'importance de cette population dans le contrôle de l'infection. L'étude sur cellule unique révèle que la population spécifique de Gag293, maintenue chez les Contrôleurs, montre un programme de différenciation Th1 avec un profil cytotoxique (625). Ceci est en accord avec des données de la littérature décrivant une réponse Th1 anti-Gag abondante ainsi qu'une expression de molécules cytolitiques dans les cellules T CD4+ des Contrôleurs du VIH (573, 624-627). Enfin, une prédominance de la réponse anti-Gag par rapport à la réponse anti-Env est également associée à des niveaux inférieurs de virémie (617). Malgré une quantité d'antigènes viraux très limitée dans les deux groupes de patients, la population spécifique de Gag293 semble être engagée dans une réponse antivirale active, ce qui se reflète par l'expression des marqueurs d'activation tels que *HLADR*, *IL2RB*, *PD-1*, et par la perte de l'*IL7R*.

Nous observons aussi qu'une fraction de la population spécifique de Gag293, maintenue chez les Contrôleurs, montre un programme de différenciation Tfh, avec l'expression des gènes *IL21*, *IL21R*, *ICOS*, et *MAF*. L'étude de cette population cTfh nous a permis d'identifier pour la première fois des cTfh spécifiques de Gag293 par marquage tétramère, et de montrer que le nombre de cTfh spécifiques est plus élevé dans le compartiment T CD4+ des Contrôleurs que dans celui des patients traités. La forte fréquence de cTfh spécifiques chez les Contrôleurs suggère que l'endiguement du VIH ne dépend pas uniquement de la réponse Th1, comme il l'a été suggéré précédemment, mais aussi de l'aide des Tfh, les acteurs principaux de la réponse humorale. Cette notion est supportée par une importante induction d'IgG spécifiques

dirigées contre le VIH, qui ont été détectées dans les co-cultures de cTfh / cellules B de Contrôleurs. Les IgG anti-gp140 étaient préférentiellement amplifiées, avec une fréquence au sein des IgG totales 30 fois supérieure à celle des patients traités. Il a aussi récemment été rapporté la présence d'une forte fréquence de cellules B mémoires spécifiques dans l'infection VIH contrôlée (609, 612, 677, 678), suggérant une aide efficace des Tfh chez ces individus.

Plusieurs études ont rapporté l'association entre la fréquence de sous-types cTfh particuliers et la présence de bNAbs dirigés contre le VIH (68, 533, 649), ce qui suggère le besoin d'un compartiment cTfh préservé pour induire le développement de ces anticorps hautement maturés. Il est maintenant clair que les Contrôleurs du VIH peuvent dans certains cas développer une réponse B mémoire importante, qui corrèle chez certains patients (HLA-B57) avec la capacité à neutraliser une large diversité de souches VIH (678). Nos résultats suggèrent que la disponibilité de l'aide Tfh est l'une des composantes clés de l'amplitude de la réponse B mémoire, comme indiquée par la corrélation positive entre les cTfh spécifiques du VIH et la sécrétion d'IgG spécifiques par les cellules B mémoires stimulées. Ces résultats sont en lien avec une récente étude montrant une corrélation entre la fréquence de Tfh spécifiques produisant de l'IL-21 et la fréquence de cellules B mémoires spécifiques de Env (611).

De manière surprenante, nous montrons que la fréquence de cTfh spécifiques de Gag293 corrèle à la fois avec la production d'IgG anti-Gag mais aussi avec la production d'IgG anti-Env. Ces résultats sont en accord avec une récente étude montrant que la réponse T CD4+ contre Gag est plus fréquente chez les patients montrant des bNAbs détectables alors que la réponse contre l'enveloppe n'est pas prédictive de la neutralisation à large spectre, soulignant l'importance de la réponse T CD4+ spécifique de Gag dans l'induction de bNAbs (679). Le fait que la réponse T CD4+ spécifique de Gag prédise l'induction de bNAbs spécifiques de Env soulève la possibilité d'une aide intrastucturale (680).

En résumé, nous confirmons donc que les cellules T CD4+ spécifiques de Gag, particulièrement amplifiées chez les patients Contrôleurs, sont engagées dans une réponse de Type Th1 et montrent un potentiel cytotoxique. De plus, nous montrons qu'une population cTfh spécifique de Gag293 est également maintenue parmi les T CD4+ des Contrôleurs du VIH, et que cette population semble être impliquée dans la forte production d'IgG anti-Env. Les deux bras de la réponse antivirale T CD4+ sont donc bien représentés dans cette

population T CD4+ spécifique de Gag, suggérant qu'ils contribuent tous les deux au contrôle spontané du VIH.

B. Epuisement limité des cellules T CD4+ spécifiques du VIH chez les Contrôleurs

L'infection à VIH se caractérise par l'épuisement lymphocytaire impliquant une perte précoce du nombre et de la fonction des cellules T CD4+ spécifiques du VIH sensées contribuer au contrôle de l'infection (406, 618, 619). Les Contrôleurs, de leur côté, montrent un état d'épuisement limité (504, 505, 629), permettant un maintien de la capacité proliférative des T CD4+ et de la fonction Th1 (573, 625-627) (624).

Nous avons validé ces notions par une étude des T CD4+ obtenues *ex vivo*, dans un système physiologique ne nécessitant pas de stimulation *in vitro*, et montré qu'en plus d'être maintenues, les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 chez les patients Contrôleurs montraient des signes d'épuisement limités en comparaison avec les patients traités. Cela se reflète tout d'abord par un état d'activation modéré (maintien de l'expression de l'*IL7R*, expression d'*HLADR* limitée), ainsi qu'une expression limitée du corécepteur inhibiteur PD-1. De plus, nos données révèlent une différenciation plus prononcée vers le programme Th1, ainsi qu'une expression des marqueurs cytotoxiques plus corrélée chez les Contrôleurs du VIH.

La population cTfh spécifique semble également être protégée de l'épuisement chez les patients Contrôleurs. Alors que les Tfh des CG expriment fortement PD-1, les cTfh montrent en général une expression plus modérée de ce marqueur. Nous montrons dans notre étude que la fréquence d'expression de PD-1 dans les cTfh spécifiques est nettement plus importante dans les deux groupes de patients, suggérant une persistance virale stimulant chroniquement ces cellules. Cependant l'intensité d'expression de PD-1 est significativement plus importante dans les cellules cTfh spécifiques de patients traités par comparaison avec les Contrôleurs. Ce très haut niveau d'expression chez les patients traités pourrait perturber la fonction cTfh. Il a en effet été montré que les Tfh montrent un défaut fonctionnel dans l'infection progressive à VIH, dû à une surexpression de PDL-1 par les cellules B des CG anormalement activés (67). Dans cette étude, l'interaction PD-1 / PD-L1 limite la prolifération et la fonction d'aide des

Tfh, ce qui pourrait expliquer le défaut de réponse des cellules B mémoires chez les patients traités observé dans nos travaux.

Cependant, la forte perte de production d'IgG anti gp140 chez les patients traités ne semble pas seulement imputable aux cTfh. En effet, l'ajout de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 dans nos co-cultures, cytokine qui est normalement sécrétée par les plasmablastes et permet d'induire la sécrétion d'IL-21 par les Tfh (681), induit une production accrue d'IgG totales par les cellules B mémoires. Par contre, cette cytokine n'a que peu d'effet sur la production d'IgG spécifiques anti-Env chez les patients traités, ce qui suggère un épuisement irréversible ou une perte des cellules B mémoires spécifiques de Env. Cette notion est en accord avec une récente étude montrant une faible fréquence de cellules B mémoires spécifiques détectées par la fixation d'une enveloppe gp120 marquée (609). La phase terminale de l'épuisement induit la mort cellulaire par apoptose, et il est donc possible que les cTfh et les B mémoires épuisées disparaissent chez les patients traités. Nous pensons que l'expression limitée de PD-1 dans les cellules spécifiques de Gag293 chez les Contrôleurs limite leur susceptibilité à l'épuisement et contribue à expliquer le maintien des cellules Th1 et Tfh spécifiques chez ces patients.

C. Expression limitée de CCR5 dans le compartiment spécifique de Gag293 chez les Contrôleurs du VIH

Nous avons observé une susceptibilité restreinte à l'entrée virale des cellules spécifiques de Gag293 chez les Contrôleurs du VIH, due à une expression limitée de CCR5. Cette diminution de CCR5 était particulièrement nette dans les cellules T CD4⁺ CM qui sont responsables de la mémoire à long terme et sont progénitrices des autres populations mémoires et effectrices. La susceptibilité réduite à l'infection des CM est un facteur primordial dans le caractère non pathogène de l'infection à SIV chez les sooty mangabeys, qui sont des hôtes naturels du virus (670, 671). On peut donc établir un parallèle entre le contrôle de l'infection à VIH et les infections SIV non pathogènes, même si les niveaux de charge virale sont très différents dans ces deux modèles.

La sécrétion autologue de CCL5, importante chez les Contrôleurs, pourrait être à l'origine de l'expression limitée de CCR5 dans les cellules T CD4⁺ spécifiques des Contrôleurs, limitant le phénomène de fusion virale. Nous avons en effet observé que les transcrits de CCR5 sont moins abondants dans les cellules T CD4⁺ spécifiques des Contrôleurs comparées à celles des

patients traités. Cette hypothèse sera à confirmer par une analyse du mécanisme possible menant à l'internalisation ou à la dégradation de CCR5.

La population cTfh semble aussi être concernée par l'expression réduite de CCR5, même si ces résultats doivent être confirmés du fait du faible nombre de cellules CXCR5+ dans l'analyse en cellule unique. La population cTfh montre en effet une tendance à la même hiérarchie d'expression de CCR5 dépendante des statuts « Tet » et « groupes de patients » (Cf **Annexe 3A**). Les cTfh sont préférentiellement enrichies dans la population CM, population où l'expression de CCR5 corrèle très bien avec la susceptibilité à la fusion. Ainsi, nous pouvons nous attendre à observer la même hiérarchie de susceptibilité à la fusion virale.

Nous savons que les Tfh des CG sont l'un des réservoirs viraux majeurs dans l'infection à VIH (430, 431, 519, 524), notamment car les CG sont des sanctuaires, peu accessibles aux cellules T CD8+ (409) (530). Une récente étude a montré que les cellules Tfh des CG n'expriment pas CCR5. L'analyse génétique des génomes viraux intégrés dans les Tfh a pourtant montré que les virus par lesquels ces cellules ont été infectées ne montrent pas de mutations particulières, et sont capables d'utiliser le corécepteur CCR5 pour infecter les cellules T CD4+. Les auteurs suggèrent que le SIV et le VIH infectent les précurseurs des Tfh qui expriment CCR5, puis qui se différencient lors de la migration dans les CG et perdent alors l'expression de CCR5 (519). On peut supposer que les cTfh spécifiques, exprimant fortement CCR5, pourraient être une source de ces cellules hautement infectables capables de migrer dans les CG chez les patients traités. Cela pourrait également être le cas chez les Contrôleurs, car les RhM Contrôleurs du SIV montrent des réservoirs viraux dans le compartiment Tfh, indiquant que l'infection est imparfaitement contrôlée dans les organes lymphoïdes (522).

Chez les Contrôleurs, la faible expression de CCR5 dans les cellules CM et la tendance à la baisse de ce récepteur dans les cTfh spécifiques de Gag293 pourrait donc expliquer la susceptibilité limitée à l'infection de ces cellules, et par conséquent le maintien de ces T CD4+ essentielles pour stimuler l'immunité antivirale à médiation cellulaire et humorale.

D. Expression limitée de CCR5 dans l'ensemble de la population T CD4+ des Contrôleurs

Chez les Contrôleurs, les cellules T CD4+ totales sont aussi moins susceptibles à l'entrée virale, du fait d'une expression de CCR5 intrinsèquement faible chez ces patients. Nous observons aussi une expression faible de CCR5 dans la population cTfh totale chez les Contrôleurs, suggérant aussi une susceptibilité à l'infection limitée de cette population. De nombreuses études montrent un lien clair entre CCR5 et la protection ou une progression lente de la maladie. CCR5 pourrait donc être un élément clef dans le contrôle spontané de l'infection à VIH. La faible expression intrinsèque de CCR5 dans la population T CD4+ totale pourrait donc aussi expliquer le différentiel important de CCR5 observé dans les cellules spécifiques entre les deux groupes de patients. Les différences seraient de plus amplifiées dans le compartiment spécifique du fait de son état d'activation.

Il est très intéressant de voir qu'un des patients Contrôleurs étudiés, qui est inclus dans les deux études, montre un niveau très faible de CCR5, une fusion quasi-nulle dans les populations T CD4+ totale ou spécifique, une proportion de cellules T CD4+ spécifiques pour Gag293 faible (0,006%) par rapport aux autres Contrôleurs (médiane = 0,02%), ainsi qu'une production d'anticorps anti-gp120 nulle. Ces observations suggèrent un très faible apport de la réponse immunitaire T CD4+ dans le contrôle de l'infection chez ce patient, mais plutôt un contrôle médié par une résistance des T CD4+ cibles à l'infection. Il sera donc intéressant d'étudier le récepteur CCR5 de ce patient au niveau génétique, pour savoir si celui-ci présente une ou des mutations conférant un défaut fonctionnel et/ou d'expression.

E. Les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 de Contrôleurs de VIH expriment des TCR de forte affinité.

Notre laboratoire a montré que les Contrôleurs du VIH portent une population de cellules T CD4+ de forte avidité, c'est à dire capables de répondre à une quantité minimale de peptides Gag293 (623). Dans une étude récente à laquelle j'ai participé (cf **Annexe 1 : Public T cell receptors confer high-avidity CD4 responses to HIV controllers**, 1^{ers} auteurs: Daniela Benati, Moran Galperin), nous avons recherché les déterminants moléculaires qui sous-tendent cette réponse, en caractérisant le répertoire TCR des cellules T CD4+ spécifiques pour l'épitope immunodominant Gag293. Les Contrôleurs du VIH possèdent un répertoire TCR

hautement biaisé, caractérisé par une expression préférentielle des chaînes TCR Va24 et Vb2, la présence de motifs conservés au sein des régions CDR3 de ces deux chaînes, et une prévalence élevée de clonotypes publics (n=18 pour chaque chaîne de TCR), *i.e.* des séquences TCRA ou TCRb identiques partagées entre plusieurs patients. Les clonotypes publics les plus représentés chez les Contrôleurs ont été capables de générer des TCR fonctionnels ayant des affinités de l'ordre du micromolaire pour le complexe peptide / CMH-II, ce qui est dans la gamme, la plus haute des affinités publiées pour les TCR restreints par le CMH-II. Ces TCR confèrent une réponse spécifique à Gag293 très sensible et polyfonctionnelle aux cellules T CD4+ primaires (658). La polyfonctionnalité, typique des cellules T CD4+ des Contrôleurs, serait donc due à la fois à un état d'épuisement limité et à l'expression de TCR de forte affinité.

Nous avons récemment étudié les répertoires des TCR spécifiques de Gag293 chez des individus vaccinés avec un candidat vaccin ADN (données non montrées). Nous avons montré que certains des clonotypes publics AV24 et BV2 préférentiellement exprimés chez les Contrôleurs étaient retrouvés dans la population des individus vaccinés, certes à des taux inférieurs par rapport aux patients Contrôleurs, mais à des taux plus importants que chez les patients traités. Par analyse des répertoires TCR de donneurs sains disponibles dans la littérature (682), nous avons aussi pu montrer que les clonotypes publics associés à la chaîne AV24 ont une fréquence de précurseurs élevée, ce qui pourrait expliquer leur amplification fréquente chez les Contrôleurs. L'ensemble de ces résultats suggère que les clonotypes publics enrichis chez les Contrôleurs ne sont pas uniques à ce groupe, mais qu'ils peuvent aussi être induits dans une certaine mesure chez des donneurs sains recevant un vaccin. Par contre, leur fréquence diminuée chez les patients traités suggère que ces clonotypes public ont été perdus, ou n'ont jamais été induits au cours de l'infection.

Alors que l'on retrouve les clonotypes publics spécifiques de Gag293 dans la population générale, le taux faible de ces clonotypes chez les patients traités pourrait être le reflet d'une perte préférentielle de ces derniers au cours de l'infection. Nous avons montré que les clonotypes publics les plus prévalents chez les Contrôleurs confèrent une réponse spécifique à Gag293 très sensible et polyfonctionnelle, ces caractéristiques étant dépendantes de l'affinité du TCR. Il est possible que ces clonotypes de forte affinité soient plus susceptibles à l'épuisement dans des conditions de forte antigénémie et/ou de forte inflammation. En effet, la forte affinité pour le complexe CMH-II / peptide mène à une forte stimulation par le TCR,

ce qui, dans un contexte chronique, favorise l'expression de PD-1 (683) et augmente donc la susceptibilité à l'épuisement et à l'apoptose.

De plus, les cellules T CD4+ de forte affinité pourraient être préférentiellement détruites par le VIH. Une cellule T CD4+ naïve spécifique qui rencontre un Ag du VIH interagit avec une DC ayant capturé le virus, et donc ayant un risque élevé d'être elle-même infectée. La cellule T CD4+ a alors un fort risque de s'infecter à son tour via la synapse immunologique formée avec la DC. Une fois la cellule T CD4+ spécifique activée par les signaux dépendants du TCR, le VIH pourra se répliquer à un niveau élevé et rapidement détruire cette cellule (517). Une forte affinité du TCR pour le complexe peptide / CMH-II va potentialiser la formation de synapses (684) entre les cellules T CD4+ portant ces clonotypes et les DC infectées, ce qui pourrait induire une infection et une déplétion préférentielle de ces cellules durant la phase de primo-infection. Nous avons montré que les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293 chez les patients traités expriment plus fortement CCR5 par comparaison aux patients Contrôleurs, et il est possible que les cellules ayant une affinité du TCR plus importante montrent une activation plus élevée et donc expriment le corécepteur CCR5 à des niveaux encore plus importants. Ce mécanisme pourrait accélérer la déplétion des cellules T CD4+ spécifiques de forte affinité chez les patients exprimant fortement CCR5.

Il est donc possible que les cellules T CD4+ portant les clonotypes de forte affinité soient rapidement perdues dans les cas d'infection progressive, ce qui expliquerait les différences fonctionnelles telles que la perte de la polyfonctionnalité et des réponses prolifératives rapportées dans la littérature.

F. Maintien de cellules cytotoxiques de haute affinité chez les Contrôleurs

Nous avons poursuivi l'étude des fonctions des TCR de forte affinité provenant de Contrôleurs. Récemment, nous avons montré qu'en plus de conférer une haute sensibilité à l'Ag et une polyfonctionnalité de type Th1, ces TCR conféraient également un fort pouvoir cytotoxique permettant l'élimination de DC infectées (Manuscrit en préparation, 1^{er} auteur : Moran Galperin). Ces données sont compatibles avec nos observations sur les cellules T CD4+ spécifiques de Contrôleurs analysées *ex vivo*, démontrant l'expression coordonnée d'un groupe de gènes associés au phénotype cytotoxique. Il est donc probable que les cellules T

CD4+ de haute affinité montrent *in vivo* une cytotoxicité accrue permettant l'élimination des APC infectées. Il reste à déterminer si le signal fort médié par ces TCR de haute affinité est suffisant pour induire une différenciation en cellules T CD4+ cytotoxiques.

G. Les Tfh spécifiques de Gag293 produisant de l'IL-21 expriment des chaînes TCR particulières

L'analyse des populations cTfh spécifiques de Gag293 en cellule unique sur la base de l'expression de CXCR5 n'a pas montré de fortes différences entre les patients Contrôleurs et les patients traités, une limitation possible étant le nombre de cellules restreint de cellules cTfh analysées. Cependant, il a récemment été proposé que les cellules T CD4+ produisant de l'IL-21 pourraient représenter une population fonctionnellement proche des Tfh. De manière intéressante, chez les patients Contrôleurs, les cellules spécifiques de Gag293 exprimant de l'IL-21 montrent un répertoire TCR particulier, presque toutes ces cellules exprimant BV2 mais pas AV24 (Cf **Annexe 3B**). La population spécifique IL-21+ se distingue donc des autres cellules T CD4+ spécifiques de Gag293, qui co-expriment fréquemment AV24 et BV2. Nous avons montré que l'appariement d'AV24 et BV2 produit des affinités remarquablement fortes, alors que l'appariement avec d'autres chaînes induisait des TCR moins affins et moins fonctionnels (données non montrées). On peut donc penser que l'appariement, de la chaîne beta BV2 avec une autre chaîne alpha, dans les cellules Tfh spécifiques de Gag293, va promouvoir des TCR d'affinité restreinte ou tout du moins d'affinité différente pour ce peptide. Il est intéressant de noter qu'il existe un débat sur le rôle de l'affinité du TCR dans la différenciation helper des T CD4+, certains auteurs proposant que les Th1 nécessitent une affinité plus élevée que les Tfh (685) (82). Il sera donc intéressant d'étudier en détail l'affinité du TCR des cellules spécifiques produisant de l'IL-21.

H. Perspectives

Pour l'étude de CCR5, comme mentionné plus haut, nous voulons réaliser des infections pour valider les résultats obtenus avec les analyses d'entrée virale. Nous voulons également confirmer les observations obtenues sur les cellules T CD4+ totales en augmentant le nombre de patients étudiés, et en intégrant un groupe de donneurs sains qui n'ont pas subi l'activation chronique due à l'infection par le VIH. Nous utiliserons une série d'anticorps anti-CCR5 pour déterminer si les cellules des contrôleurs et des patients traités expriment différentes conformations du récepteur CCR5. Enfin nous projetons d'étudier extensivement les cellules

T CD4+ du Contrôleur du VIH présentant une fusion virale quasiment nulle et une réponse T CD4+ spécifique faible.

Afin de répondre aux interrogations concernant le lien entre le phénotype et les clonotypes exprimés par les cellules T CD4+ spécifiques de Gag293, nous avons commencé à analyser le transcriptome de cellules uniques, ceci par séquençage à haut débit. Les premières expériences ont permis, par une reconstruction bioinformatique des chaînes variables des TCR, d'obtenir chez un patient Contrôleur l'appariement physiologique d'une série de chaînes TCR α et β issues de cellules uniques. Nous avons notamment retrouvé les clonotypes publics les plus prévalents, ce qui a validé l'approche proposée (données non montrées). Nous projetons d'évaluer en parallèle l'expression quantitative de tous les autres gènes. L'objectif sera de lier le clonotype des cellules spécifiques pour Gag293 à leur profil d'expression génique. Grâce à cette approche, nous devrions pouvoir répondre à de multiples questions :

Est-ce que les rares cellules T CD4+ portant des clonotypes publics chez les patients traités montrent un état plus particulièrement épuisé ? Est-ce que ces cellules sont préférentiellement infectées ? Dans quel programme de différenciation sont engagées les cellules portant les clonotypes publics chez les Contrôleurs? Quel est le répertoire TCR des cellules spécifiques de Contrôleurs exprimant l'*IL21* ? Nous chercherons ensuite à cloner et exprimer les TCR d'intérêt pour évaluer leur affinité. Nous pourrons alors déterminer si les cellules spécifiques exprimant l'*IL21* expriment des TCR d'affinité différente, et plus généralement évaluer l'impact de l'affinité du TCR dans la différenciation en cellules helpers Th1 ou Tfh.

Enfin, nous chercherons à étudier la fonction des TCR clonés dans un contexte de cellule Tfh. Nous avons pour cela entrepris de différencier des Tfh *in vitro* en utilisant les conditions développées par N. Schmitt et al. (90) (données non montrées) Nous chercherons ensuite à transduire des Tfh différenciées *in vitro* avec différents TCR, et à tester fonctionnellement l'aide apportée aux cellules B. Nous pourrons ainsi évaluer la fonction d'aide aux cellules B conférée par des TCR provenant de cellules IL-21+, et corrélérer cette fonction avec le niveau d'affinité du TCR. Enfin, nous chercherons à comprendre le principe de l'aide intrastructurale, c'est à dire la capacité des cTfh exprimant un TCR spécifique de Gag à aider des cellules B mémoires spécifiques de Env. L'ensemble de ces approches permettra une étude mécanistique des déterminants de la fonction Tfh.

REFERENCES

IV. REFERENCES

1. **Zhu J, Yamane H, Paul WE.** 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* **28**:445-489.
2. **Roche PA, Furuta K.** 2015. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol* **15**:203-216.
3. **Turner SJ, Doherty PC, McCluskey J, Rossjohn J.** 2006. Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity. *Nat Rev Immunol* **6**:883-894.
4. **Lefranc MP, Giudicelli V, Ginestoux C, Bodmer J, Muller W, Bontrop R, Lemaître M, Malik A, Barbie V, Chaume D.** 1999. IMGT, the international ImmunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res* **27**:209-212.
5. **Shimazaki N, Lieber MR.** 2014. Histone methylation and V(D)J recombination. *Int J Hematol* **100**:230-237.
6. **Bassing CH, Swat W, Alt FW.** 2002. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* **109 Suppl**:S45-55.
7. **Lieber MR.** 2010. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem* **79**:181-211.
8. **Cabaniols JP, Fazilleau N, Casrouge A, Kourilsky P, Kanellopoulos JM.** 2001. Most alpha/beta T cell receptor diversity is due to terminal deoxynucleotidyl transferase. *J Exp Med* **194**:1385-1390.
9. **Rock EP, Sibbald PR, Davis MM, Chien YH.** 1994. CDR3 length in antigen-specific immune receptors. *J Exp Med* **179**:323-328.
10. **Davis MM, Bjorkman PJ.** 1988. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* **334**:395-402.
11. **Garcia KC, Degano M, Stanfield RL, Brunmark A, Jackson MR, Peterson PA, Teyton L, Wilson IA.** 1996. An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* **274**:209-219.
12. **Carpenter AC, Bosselut R.** 2010. Decision checkpoints in the thymus. *Nat Immunol* **11**:666-673.
13. **Clambey ET, Davenport B, Kappler JW, Marrack P, Homann D.** 2014. Molecules in medicine mini review: the alphabeta T cell receptor. *J Mol Med (Berl)* **92**:735-741.
14. **Hale JS, Fink PJ.** 2010. T-cell receptor revision: friend or foe? *Immunology* **129**:467-473.
15. **Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA.** 2003. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* **21**:139-176.
16. **Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, Wolf E, Lipp M.** 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* **99**:23-33.
17. **Jenkins MK, Khoruts A, Ingulli E, Mueller DL, McSorley SJ, Reinhardt RL, Itano A, Pape KA.** 2001. In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu Rev Immunol* **19**:23-45.
18. **Gasper DJ, Tejera MM, Suresh M.** 2014. CD4 T-cell memory generation and maintenance. *Crit Rev Immunol* **34**:121-146.
19. **Swain SL, McKinstry KK, Strutt TM.** 2012. Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol* **12**:136-148.
20. **Surh CD, Sprent J.** 2008. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* **29**:848-862.

21. **Rivino L, Messi M, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F, Geginat J.** 2004. Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells. *J Exp Med* **200**:725-735.
22. **Potter SJ, Lacabaratz C, Lambotte O, Perez-Patrigeon S, Vingert B, Sinet M, Colle JH, Urrutia A, Scott-Algara D, Boufassa F, Delfraissy JF, Theze J, Venet A, Chakrabarti LA.** 2007. Preserved central memory and activated effector memory CD4+ T-cell subsets in human immunodeficiency virus controllers: an ANRS EP36 study. *J Virol* **81**:13904-13915.
23. **Abdel-Hakeem MS, Boisvert M, Bruneau J, Soudeyans H, Shoukry NH.** 2017. Selective expansion of high functional avidity memory CD8 T cell clonotypes during hepatitis C virus reinfection and clearance. *PLoS Pathog* **13**:e1006191.
24. **Tanel A, Fonseca SG, Yassine-Diab B, Bordi R, Zeidan J, Shi Y, Benne C, Sekaly RP.** 2009. Cellular and molecular mechanisms of memory T-cell survival. *Expert Rev Vaccines* **8**:299-312.
25. **Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, Almeida JR, Gostick E, Yu Z, Carpenito C, Wang E, Douek DC, Price DA, June CH, Marincola FM, Roederer M, Restifo NP.** 2011. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med* **17**:1290-1297.
26. **Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA.** 2003. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* **19**:641-644.
27. **Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B.** 2012. CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol* **2012**:925135.
28. **Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP.** 2001. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol* **19**:565-594.
29. **Masteller EL, Chuang E, Mullen AC, Reiner SL, Thompson CB.** 2000. Structural analysis of CTLA-4 function in vivo. *J Immunol* **164**:5319-5327.
30. **Buchbinder EI, Desai A.** 2016. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol* **39**:98-106.
31. **Krummel MF, Allison JP.** 1996. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med* **183**:2533-2540.
32. **Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S.** 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* **192**:303-310.
33. **Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH.** 2008. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* **26**:677-704.
34. **Deenick EK, Ma CS.** 2011. The regulation and role of T follicular helper cells in immunity. *Immunology* **134**:361-367.
35. **Fife BT, Bluestone JA.** 2008. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev* **224**:166-182.
36. **Chen L.** 2004. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol* **4**:336-347.
37. **Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, Okazaki T, Tokura Y.** 2010. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer* **116**:1757-1766.

38. **Baitsch L, Legat A, Barba L, Fuertes Marraco SA, Rivals JP, Baumgaertner P, Christiansen-Jucht C, Bouzourene H, Rimoldi D, Pircher H, Rufer N, Matter M, Michielin O, Speiser DE.** 2012. Extended co-expression of inhibitory receptors by human CD8 T-cells depending on differentiation, antigen-specificity and anatomical localization. *PLoS One* **7**:e30852.
39. **Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, Murphy TL, Murphy KM.** 2002. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nat Immunol* **3**:549-557.
40. **Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC.** 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* **15**:749-795.
41. **Melzer T, Duffy A, Weiss LM, Halonen SK.** 2008. The gamma interferon (IFN-gamma)-inducible GTP-binding protein IGTP is necessary for toxoplasma vacuolar disruption and induces parasite egression in IFN-gamma-stimulated astrocytes. *Infect Immun* **76**:4883-4894.
42. **Boyman O, Sprent J.** 2012. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol* **12**:180-190.
43. **Groom JR, Luster AD.** 2011. CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res* **317**:620-631.
44. **Belz GT, Wodarz D, Diaz G, Nowak MA, Doherty PC.** 2002. Compromised influenza virus-specific CD8(+)-T-cell memory in CD4(+)-T-cell-deficient mice. *J Virol* **76**:12388-12393.
45. **Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, Schoenberger SP.** 2003. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* **421**:852-856.
46. **Shedlock DJ, Shen H.** 2003. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* **300**:337-339.
47. **Sun JC, Bevan MJ.** 2003. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* **300**:339-342.
48. **Sun JC, Williams MA, Bevan MJ.** 2004. CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection. *Nat Immunol* **5**:927-933.
49. **Snell LM, Osokine I, Yamada DH, De la Fuente JR, Elsaesser HJ, Brooks DG.** 2016. Overcoming CD4 Th1 Cell Fate Restrictions to Sustain Antiviral CD8 T Cells and Control Persistent Virus Infection. *Cell Rep* **16**:3286-3296.
50. **Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Kramer PH, Peter ME.** 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* **14**:5579-5588.
51. **Masson D, Tschopp J.** 1985. Isolation of a lytic, pore-forming protein (perforin) from cytolytic T-lymphocytes. *J Biol Chem* **260**:9069-9072.
52. **Smyth MJ, Kelly JM, Sutton VR, Davis JE, Browne KA, Sayers TJ, Trapani JA.** 2001. Unlocking the secrets of cytotoxic granule proteins. *J Leukoc Biol* **70**:18-29.
53. **Brown DM, Kamperschroer C, Dilzer AM, Roberts DM, Swain SL.** 2009. IL-2 and antigen dose differentially regulate perforin- and FasL-mediated cytolytic activity in antigen specific CD4+ T cells. *Cell Immunol* **257**:69-79.
54. **Workman AM, Jacobs AK, Vogel AJ, Condon S, Brown DM.** 2014. Inflammation enhances IL-2 driven differentiation of cytolytic CD4 T cells. *PLoS One* **9**:e89010.
55. **Juno JA, van Bockel D, Kent SJ, Kelleher AD, Zaunders JJ, Munier CM.** 2017. Cytotoxic CD4 T Cells-Friend or Foe during Viral Infection? *Front Immunol* **8**:19.

56. **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.
57. **Hua L, Yao S, Pham D, Jiang L, Wright J, Sawant D, Dent AL, Braciale TJ, Kaplan MH, Sun J.** 2013. Cytokine-dependent induction of CD4+ T cells with cytotoxic potential during influenza virus infection. *J Virol* **87**:11884-11893.
58. **Eshima K, Chiba S, Suzuki H, Kokubo K, Kobayashi H, Iizuka M, Iwabuchi K, Shinohara N.** 2012. Ectopic expression of a T-box transcription factor, eomesodermin, renders CD4(+) Th cells cytotoxic by activating both perforin- and FasL-pathways. *Immunol Lett* **144**:7-15.
59. **Takeuchi A, Badr Mel S, Miyauchi K, Ishihara C, Onishi R, Guo Z, Sasaki Y, Ike H, Takumi A, Tsuji NM, Murakami Y, Katakai T, Kubo M, Saito T.** 2016. CRTAM determines the CD4+ cytotoxic T lymphocyte lineage. *J Exp Med* **213**:123-138.
60. **Simpson N, Gatenby PA, Wilson A, Malik S, Fulcher DA, Tangye SG, Manku H, Vyse TJ, Roncador G, Huttley GA, Goodnow CC, Vinuesa CG, Cook MC.** 2010. Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **62**:234-244.
61. **He J, Tsai LM, Leong YA, Hu X, Ma CS, Chevalier N, Sun X, Vandenberg K, Rockman S, Ding Y, Zhu L, Wei W, Wang C, Karnowski A, Belz GT, Ghali JR, Cook MC, Riminton DS, Veillette A, Schwartzberg PL, Mackay F, Brink R, Tangye SG, Vinuesa CG, Mackay CR, Li Z, Yu D.** 2013. Circulating precursor CCR7(lo)PD-1(hi) CXCR5(+) CD4(+) T cells indicate Tfh cell activity and promote antibody responses upon antigen reexposure. *Immunity* **39**:770-781.
62. **Ma CS, Uzel G, Tangye SG.** 2014. Human T follicular helper cells in primary immunodeficiencies. *Curr Opin Pediatr* **26**:720-726.
63. **Ma CS, Wong N, Rao G, Avery DT, Torpy J, Hambridge T, Bustamante J, Okada S, Stoddard JL, Deenick EK, Pelham SJ, Payne K, Boisson-Dupuis S, Puel A, Kobayashi M, Arkwright PD, Kilic SS, El Baghdadi J, Nonoyama S, Minegishi Y, Mahdavian SA, Mansouri D, Bousfiha A, Blincoe AK, French MA, Hsu P, Campbell DE, Stormon MO, Wong M, Adelstein S, Smart JM, Fulcher DA, Cook MC, Phan TG, Stepensky P, Boztug K, Kansu A, Ikinciogullari A, Baumann U, Beier R, Roscioli T, Ziegler JB, Gray P, Picard C, Grimbacher B, Warnatz K, Holland SM, Casanova JL, Uzel G, Tangye SG.** 2015. Monogenic mutations differentially affect the quantity and quality of T follicular helper cells in patients with human primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* **136**:993-1006 e1001.
64. **Tan J, Jin X, Zhao R, Wei X, Liu Y, Kong X.** 2015. Beneficial effect of T follicular helper cells on antibody class switching of B cells in prostate cancer. *Oncol Rep* **33**:1512-1518.
65. **Lindqvist M, van Lunzen J, Soghoian DZ, Kuhl BD, Ranasinghe S, Kranias G, Flanders MD, Cutler S, Yudanin N, Muller MI, Davis I, Farber D, Hartjen P, Haag F, Alter G, Wiesch JS, Streeck H.** 2012. Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. *J Clin Invest* doi:10.1172/JCI64314.
66. **Pallikkuth S, Parmigiani A, Silva SY, George VK, Fischl M, Pahwa R, Pahwa S.** 2012. Impaired peripheral blood T-follicular helper cell function in HIV-infected nonresponders to the 2009 H1N1/09 vaccine. *Blood* **120**:985-993.

67. **Cubas RA, Mudd JC, Savoye AL, Perreau M, van Grevenynghe J, Metcalf T, Connick E, Meditz A, Freeman GJ, Abesada-Terk G, Jr., Jacobson JM, Brooks AD, Crotty S, Estes JD, Pantaleo G, Lederman MM, Haddad EK.** 2013. Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nat Med* **19**:494-499.
68. **Locci M, Havenar-Daughton C, Landais E, Wu J, Kroenke MA, Arlehamn CL, Su LF, Cubas R, Davis MM, Sette A, Haddad EK, International AVIPCPI, Poignard P, Crotty S.** 2013. Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity* **39**:758-769.
69. **Perreau M, Savoye AL, De Crignis E, Corpataux JM, Cubas R, Haddad EK, De Leval L, Graziosi C, Pantaleo G.** 2013. Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *J Exp Med* **210**:143-156.
70. **Boswell KL, Paris R, Boritz E, Ambrozak D, Yamamoto T, Darko S, Wloka K, Wheatley A, Narpala S, McDermott A, Roederer M, Haubrich R, Connors M, Ake J, Douek DC, Kim J, Petrovas C, Koup RA.** 2014. Loss of circulating CD4 T cells with B cell helper function during chronic HIV infection. *PLoS Pathog* **10**:e1003853.
71. **Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, Barnett B, Dent AL, Craft J, Crotty S.** 2009. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* **325**:1006-1010.
72. **Nurieva RI, Chung Y, Martinez GJ, Yang XO, Tanaka S, Matskevitch TD, Wang YH, Dong C.** 2009. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* **325**:1001-1005.
73. **Yu D, Rao S, Tsai LM, Lee SK, He Y, Sutcliffe EL, Srivastava M, Linterman M, Zheng L, Simpson N, Ellyard JI, Parish IA, Ma CS, Li QJ, Parish CR, Mackay CR, Vinuesa CG.** 2009. The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity* **31**:457-468.
74. **Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, Sato TA, Clifford KN, Macduff BM, Anderson DM, Gimpel SD, Davis-Smith T, Maliszewski CR, et al.** 1992. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* **357**:80-82.
75. **Ozaki K, Spolski R, Ettinger R, Kim HP, Wang G, Qi CF, Hwu P, Shaffer DJ, Akilesh S, Roopenian DC, Morse HC, 3rd, Lipsky PE, Leonard WJ.** 2004. Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J Immunol* **173**:5361-5371.
76. **Ettinger R, Sims GP, Fairhurst AM, Robbins R, da Silva YS, Spolski R, Leonard WJ, Lipsky PE.** 2005. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *J Immunol* **175**:7867-7879.
77. **Bryant VL, Ma CS, Avery DT, Li Y, Good KL, Corcoran LM, de Waal Malefyt R, Tangye SG.** 2007. Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5+ T follicular helper cells. *J Immunol* **179**:8180-8190.
78. **Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L, Wang YH, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q, Dong C.** 2008. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* **29**:138-149.

79. **King C.** 2009. New insights into the differentiation and function of T follicular helper cells. *Nat Rev Immunol* **9**:757-766.
80. **Choi YS, Kageyama R, Eto D, Escobar TC, Johnston RJ, Monticelli L, Lao C, Crotty S.** 2011. ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity* **34**:932-946.
81. **Weber JP, Fuhrmann F, Feist RK, Lahmann A, Al Baz MS, Gentz LJ, Vu Van D, Mages HW, Haftmann C, Riedel R, Grun JR, Schuh W, Kroczek RA, Radbruch A, Mashreghi MF, Hutloff A.** 2015. ICOS maintains the T follicular helper cell phenotype by down-regulating Kruppel-like factor 2. *J Exp Med* **212**:217-233.
82. **Fazilleau N, McHeyzer-Williams LJ, Rosen H, McHeyzer-Williams MG.** 2009. The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. *Nat Immunol* **10**:375-384.
83. **Crotty S.** 2014. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* **41**:529-542.
84. **Batten M, Ramamoorthi N, Kljavin NM, Ma CS, Cox JH, Dengler HS, Danilenko DM, Caplazi P, Wong M, Fulcher DA, Cook MC, King C, Tangye SG, de Sauvage FJ, Ghilardi N.** 2010. IL-27 supports germinal center function by enhancing IL-21 production and the function of T follicular helper cells. *J Exp Med* **207**:2895-2906.
85. **Ma CS, Avery DT, Chan A, Batten M, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Arkwright PD, Kreins AY, Averbuch D, Engelhard D, Magdorf K, Kilic SS, Minegishi Y, Nonoyama S, French MA, Choo S, Smart JM, Peake J, Wong M, Gray P, Cook MC, Fulcher DA, Casanova JL, Deenick EK, Tangye SG.** 2012. Functional STAT3 deficiency compromises the generation of human T follicular helper cells. *Blood* **119**:3997-4008.
86. **Ma CS, Suryani S, Avery DT, Chan A, Nanan R, Santner-Nanan B, Deenick EK, Tangye SG.** 2009. Early commitment of naive human CD4(+) T cells to the T follicular helper (T(FH)) cell lineage is induced by IL-12. *Immunol Cell Biol* **87**:590-600.
87. **Schmitt N, Morita R, Bourdery L, Bentebibel SE, Zurawski SM, Banchereau J, Ueno H.** 2009. Human dendritic cells induce the differentiation of interleukin-21-producing T follicular helper-like cells through interleukin-12. *Immunity* **31**:158-169.
88. **Eto D, Lao C, DiToro D, Barnett B, Escobar TC, Kageyama R, Yusuf I, Crotty S.** 2011. IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (Tfh) differentiation. *PLoS One* **6**:e17739.
89. **Karnowski A, Chevrier S, Belz GT, Mount A, Emslie D, D'Costa K, Tarlinton DM, Kallies A, Corcoran LM.** 2012. B and T cells collaborate in antiviral responses via IL-6, IL-21, and transcriptional activator and coactivator, Oct2 and OBF-1. *J Exp Med* **209**:2049-2064.
90. **Schmitt N, Liu Y, Bentebibel SE, Munagala I, Bourdery L, Venuprasad K, Banchereau J, Ueno H.** 2014. The cytokine TGF-beta co-opts signaling via STAT3-STAT4 to promote the differentiation of human TFH cells. *Nat Immunol* **15**:856-865.
91. **Kroenke MA, Eto D, Locci M, Cho M, Davidson T, Haddad EK, Crotty S.** 2012. Bcl6 and Maf cooperate to instruct human follicular helper CD4 T cell differentiation. *J Immunol* **188**:3734-3744.

92. **Crotty S, Johnston RJ, Schoenberger SP.** 2010. Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation. *Nat Immunol* **11**:114-120.
93. **Ellyard JI, Vinuesa CG.** 2011. A BATF-ling connection between B cells and follicular helper T cells. *Nat Immunol* **12**:519-520.
94. **Sahoo A, Alekseev A, Tanaka K, Obertas L, Lerman B, Haymaker C, Clise-Dwyer K, McMurray JS, Nurieva R.** 2015. Batf is important for IL-4 expression in T follicular helper cells. *Nat Commun* **6**:7997.
95. **Ise W, Kohyama M, Schraml BU, Zhang T, Schwer B, Basu U, Alt FW, Tang J, Oltz EM, Murphy TL, Murphy KM.** 2011. The transcription factor BATF controls the global regulators of class-switch recombination in both B cells and T cells. *Nat Immunol* **12**:536-543.
96. **Bauquet AT, Jin H, Paterson AM, Mitsdoerffer M, Ho IC, Sharpe AH, Kuchroo VK.** 2009. The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat Immunol* **10**:167-175.
97. **Pratama A, Vinuesa CG.** 2014. Control of TFH cell numbers: why and how? *Immunol Cell Biol* **92**:40-48.
98. **Tangye SG, Ma CS, Brink R, Deenick EK.** 2013. The good, the bad and the ugly - TFH cells in human health and disease. *Nat Rev Immunol* **13**:412-426.
99. **Pereira JP, Kelly LM, Xu Y, Cyster JG.** 2009. EB12 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle. *Nature* **460**:1122-1126.
100. **Qi H, Chen X, Chu C, Lu P, Xu H, Yan J.** 2014. Follicular T-helper cells: controlled localization and cellular interactions. *Immunol Cell Biol* **92**:28-33.
101. **Batista FD, Harwood NE.** 2009. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol* **9**:15-27.
102. **MacLennan IC, Toellner KM, Cunningham AF, Serre K, Sze DM, Zuniga E, Cook MC, Vinuesa CG.** 2003. Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev* **194**:8-18.
103. **Samitas K, Lotvall J, Bossios A.** 2010. B cells: from early development to regulating allergic diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **58**:209-225.
104. **de Vinuesa CG, Cook MC, Ball J, Drew M, Sunners Y, Cascalho M, Wabl M, Klaus GG, MacLennan IC.** 2000. Germinal centers without T cells. *J Exp Med* **191**:485-494.
105. **Allen CD, Okada T, Cyster JG.** 2007. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* **27**:190-202.
106. **Paus D, Phan TG, Chan TD, Gardam S, Basten A, Brink R.** 2006. Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J Exp Med* **203**:1081-1091.
107. **Lee SK, Rigby RJ, Zotos D, Tsai LM, Kawamoto S, Marshall JL, Ramiscal RR, Chan TD, Gatto D, Brink R, Yu D, Fagarasan S, Tarlinton DM, Cunningham AF, Vinuesa CG.** 2011. B cell priming for extrafollicular antibody responses requires Bcl-6 expression by T cells. *J Exp Med* **208**:1377-1388.
108. **Shapiro-Shelef M, Lin KI, McHeyzer-Williams LJ, Liao J, McHeyzer-Williams MG, Calame K.** 2003. Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity* **19**:607-620.
109. **Poholek AC, Hansen K, Hernandez SG, Eto D, Chandele A, Weinstein JS, Dong X, Odegard JM, Kaech SM, Dent AL, Crotty S, Craft J.** 2010. In vivo regulation of Bcl6 and T follicular helper cell development. *J Immunol* **185**:313-326.

110. **Odegard JM, Marks BR, DiPlacido LD, Poholek AC, Kono DH, Dong C, Flavell RA, Craft J.** 2008. ICOS-dependent extrafollicular helper T cells elicit IgG production via IL-21 in systemic autoimmunity. *J Exp Med* **205**:2873-2886.
111. **Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, Forster R.** 2000. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med* **192**:1545-1552.
112. **Schaerli P, Willimann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, Moser B.** 2000. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med* **192**:1553-1562.
113. **Kim CH, Rott LS, Clark-Lewis I, Campbell DJ, Wu L, Butcher EC.** 2001. Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J Exp Med* **193**:1373-1381.
114. **Chtanova T, Tangye SG, Newton R, Frank N, Hodge MR, Rolph MS, Mackay CR.** 2004. T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J Immunol* **173**:68-78.
115. **Fazilleau N, Mark L, McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG.** 2009. Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity* **30**:324-335.
116. **Kim JR, Lim HW, Kang SG, Hillsamer P, Kim CH.** 2005. Human CD57+ germinal center-T cells are the major helpers for GC-B cells and induce class switch recombination. *BMC Immunol* **6**:3.
117. **Gatto D, Brink R.** 2010. The germinal center reaction. *J Allergy Clin Immunol* **126**:898-907; quiz 908-899.
118. **De Silva NS, Klein U.** 2015. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol* **15**:137-148.
119. **MacLennan IC.** 1994. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* **12**:117-139.
120. **Zhang Y, Garcia-Ibanez L, Toellner KM.** 2016. Regulation of germinal center B-cell differentiation. *Immunol Rev* **270**:8-19.
121. **Odegard VH, Schatz DG.** 2006. Targeting of somatic hypermutation. *Nat Rev Immunol* **6**:573-583.
122. **Linterman MA, Beaton L, Yu D, Ramiscal RR, Srivastava M, Hogan JJ, Verma NK, Smyth MJ, Rigby RJ, Vinuesa CG.** 2010. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J Exp Med* **207**:353-363.
123. **Tangye SG, Tarlinton DM.** 2009. Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. *Eur J Immunol* **39**:2065-2075.
124. **Kurosaki T, Kometani K, Ise W.** 2015. Memory B cells. *Nat Rev Immunol* **15**:149-159.
125. **Eibel H, Kraus H, Sic H, Kienzler AK, Rizzi M.** 2014. B cell biology: an overview. *Curr Allergy Asthma Rep* **14**:434.
126. **Tangye SG, Avery DT, Deenick EK, Hodgkin PD.** 2003. Intrinsic differences in the proliferation of naive and memory human B cells as a mechanism for enhanced secondary immune responses. *J Immunol* **170**:686-694.
127. **Tangye SG, Liu YJ, Aversa G, Phillips JH, de Vries JE.** 1998. Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. *J Exp Med* **188**:1691-1703.
128. **Weller S, Braun MC, Tan BK, Rosenwald A, Cordier C, Conley ME, Plebani A, Kumararatne DS, Bonnet D, Tournilhac O, Tchernia G, Steiniger B, Staudt LM, Casanova JL, Reynaud CA, Weill JC.** 2004. Human blood IgM "memory" B

- cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* **104**:3647-3654.
129. **Berkowska MA, Driessen GJ, Bikos V, Grosserichter-Wagener C, Stamatopoulos K, Cerutti A, He B, Biermann K, Lange JF, van der Burg M, van Dongen JJ, van Zelm MC.** 2011. Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *Blood* **118**:2150-2158.
 130. **McHeyzer-Williams MG, Ahmed R.** 1999. B cell memory and the long-lived plasma cell. *Curr Opin Immunol* **11**:172-179.
 131. **Sanz I, Wei C, Lee FE, Anolik J.** 2008. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Semin Immunol* **20**:67-82.
 132. **Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM.** 2015. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol* **15**:160-171.
 133. **Shapiro-Shelef M, Lin KI, Savitsky D, Liao J, Calame K.** 2005. Blimp-1 is required for maintenance of long-lived plasma cells in the bone marrow. *J Exp Med* **202**:1471-1476.
 134. **Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G, Foucat E, Dullaers M, Oh S, Sabzghabaei N, Lavecchio EM, Punaro M, Pascual V, Banchereau J, Ueno H.** 2011. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* **34**:108-121.
 135. **Chevalier N, Jarrossay D, Ho E, Avery DT, Ma CS, Yu D, Sallusto F, Tangye SG, Mackay CR.** 2011. CXCR5 expressing human central memory CD4 T cells and their relevance for humoral immune responses. *J Immunol* **186**:5556-5568.
 136. **Pallikkuth S, Pilakka Kanthikeel S, Silva SY, Fischl M, Pahwa R, Pahwa S.** 2011. Upregulation of IL-21 receptor on B cells and IL-21 secretion distinguishes novel 2009 H1N1 vaccine responders from nonresponders among HIV-infected persons on combination antiretroviral therapy. *J Immunol* **186**:6173-6181.
 137. **Schultz BT, Teigler JE, Pissani F, Oster AF, Kranias G, Alter G, Marovich M, Eller MA, Dittmer U, Robb ML, Kim JH, Michael NL, Bolton D, Streeck H.** 2016. Circulating HIV-Specific Interleukin-21(+)CD4(+) T Cells Represent Peripheral Tfh Cells with Antigen-Dependent Helper Functions. *Immunity* **44**:167-178.
 138. **Ma CS, Phan TG.** 2017. Here, there and everywhere: T follicular helper cells on the move. *Immunology* doi:10.1111/imm.12793.
 139. **Linterman MA, Rigby RJ, Wong RK, Yu D, Brink R, Cannons JL, Schwartzberg PL, Cook MC, Walters GD, Vinuesa CG.** 2009. Follicular helper T cells are required for systemic autoimmunity. *J Exp Med* **206**:561-576.
 140. **Rao DA, Gurish MF, Marshall JL, Slowikowski K, Fonseka CY, Liu Y, Donlin LT, Henderson LA, Wei K, Mizoguchi F, Teslovich NC, Weinblatt ME, Massarotti EM, Coblyn JS, Helfgott SM, Lee YC, Todd DJ, Bykerk VP, Goodman SM, Pernis AB, Ivashkiv LB, Karlson EW, Nigrovic PA, Filer A, Buckley CD, Lederer JA, Raychaudhuri S, Brenner MB.** 2017. Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis. *Nature* **542**:110-114.
 141. **Bentebibel SE, Lopez S, Obermoser G, Schmitt N, Mueller C, Harrod C, Flano E, Mejias A, Albrecht RA, Blankenship D, Xu H, Pascual V, Banchereau J, Garcia-Sastre A, Palucka AK, Ramilo O, Ueno H.** 2013. Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH cells correlates with antibody responses to influenza vaccination. *Sci Transl Med* **5**:176ra132.

142. **Haynes BF, Gilbert PB, McElrath MJ, Zolla-Pazner S, Tomaras GD, Alam SM, Evans DT, Montefiori DC, Karnasuta C, Sutthent R, Liao HX, DeVico AL, Lewis GK, Williams C, Pinter A, Fong Y, Janes H, DeCamp A, Huang Y, Rao M, Billings E, Karasavvas N, Robb ML, Ngauy V, de Souza MS, Paris R, Ferrari G, Bailer RT, Soderberg KA, Andrews C, Berman PW, Frahm N, De Rosa SC, Alpert MD, Yates NL, Shen X, Koup RA, Pitisuttithum P, Kaewkungwal J, Nitayaphan S, Rerks-Ngarm S, Michael NL, Kim JH.** 2012. Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *N Engl J Med* **366**:1275-1286.
143. **Boritz EA, Darko S, Swazek L, Wolf G, Wells D, Wu X, Henry AR, Laboune F, Hu J, Ambrozak D, Hughes MS, Hoh R, Casazza JP, Vostal A, Bunis D, Nganou-Makamdop K, Lee JS, Migueles SA, Koup RA, Connors M, Moir S, Schacker T, Maldarelli F, Hughes SH, Deeks SG, Douek DC.** 2016. Multiple Origins of Virus Persistence during Natural Control of HIV Infection. *Cell* **166**:1004-1015.
144. **Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-871.
145. **Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A.** 1981. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* **305**:1425-1431.
146. **Voronin Y, Mofenson LM, Cunningham CK, Fowler MG, Kaleebu P, McFarland EJ, Safrit JT, Graham BS, Snow W.** 2014. HIV monoclonal antibodies: a new opportunity to further reduce mother-to-child HIV transmission. *PLoS Med* **11**:e1001616.
147. **Mehta SD, Moses S, Agot K, Odoyo-June E, Li H, Maclean I, Hedeker D, Bailey RC.** 2013. The long-term efficacy of medical male circumcision against HIV acquisition. *AIDS* **27**:2899-2907.
148. **Gendelman HE, Narayan O, Kennedy-Stoskopf S, Clements JE, Pezeshkpour GH.** 1984. Slow virus-macrophage interactions. Characterization of a transformed cell line of sheep alveolar macrophages that express a marker for susceptibility to ovine-caprine lentivirus infections. *Lab Invest* **51**:547-555.
149. **Vandergeeten C, Fromentin R, DaFonseca S, Lawani MB, Sereti I, Lederman MM, Ramgopal M, Routy JP, Sekaly RP, Chomont N.** 2013. Interleukin-7 promotes HIV persistence during antiretroviral therapy. *Blood* **121**:4321-4329.
150. **Watts JM, Dang KK, Gorelick RJ, Leonard CW, Bess JW, Jr., Swanstrom R, Burch CL, Weeks KM.** 2009. Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature* **460**:711-716.
151. **Maartens G, Celum C, Lewin SR.** 2014. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet* **384**:258-271.
152. **Loemba H, Brenner B, Parniak MA, Ma'ayan S, Spira B, Moisi D, Oliveira M, Detorio M, Wainberg MA.** 2002. Genetic divergence of human immunodeficiency virus type 1 Ethiopian clade C reverse transcriptase (RT) and rapid development of resistance against nonnucleoside inhibitors of RT. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:2087-2094.
153. **Gao F, Vidal N, Li Y, Trask SA, Chen Y, Kostrikis LG, Ho DD, Kim J, Oh MD, Choe K, Salminen M, Robertson DL, Shaw GM, Hahn BH, Peeters M.** 2001. Evidence of two distinct subsubtypes within the HIV-1 subtype A radiation. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**:675-688.

154. **Triques K, Bourgeois A, Vidal N, Mpoudi-Ngole E, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, Torimiro N, Saman E, Delaporte E, Peeters M.** 2000. Near-full-length genome sequencing of divergent African HIV type 1 subtype F viruses leads to the identification of a new HIV type 1 subtype designated K. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**:139-151.
155. **Buonaguro L, Tornesello ML, Buonaguro FM.** 2007. Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *J Virol* **81**:10209-10219.
156. **McCutchan FE.** 2006. Global epidemiology of HIV. *J Med Virol* **78 Suppl 1**:S7-S12.
157. **Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S, Isolation W-UNfH, Characterisation.** 2011. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS* **25**:679-689.
158. **Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S.** 2006. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS* **20**:W13-23.
159. **Montavon C, Toure-Kane C, Liegeois F, Mpoudi E, Bourgeois A, Vergne L, Perret JL, Boumah A, Saman E, Mboup S, Delaporte E, Peeters M.** 2000. Most env and gag subtype A HIV-1 viruses circulating in West and West Central Africa are similar to the prototype AG recombinant virus IBNG. *J Acquir Immune Defic Syndr* **23**:363-374.
160. **Osmanov S, Pattou C, Walker N, Schwardlander B, Esparza J, Isolation W-UNfH, Characterization.** 2002. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *J Acquir Immune Defic Syndr* **29**:184-190.
161. **Piyasirisilp S, McCutchan FE, Carr JK, Sanders-Buell E, Liu W, Chen J, Wagner R, Wolf H, Shao Y, Lai S, Beyrer C, Yu XF.** 2000. A recent outbreak of human immunodeficiency virus type 1 infection in southern China was initiated by two highly homogeneous, geographically separated strains, circulating recombinant form AE and a novel BC recombinant. *J Virol* **74**:11286-11295.
162. **Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA.** 1988. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* **242**:1171-1173.
163. **Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M.** 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**:123-126.
164. **Michael NL.** 1999. Host genetic influences on HIV-1 pathogenesis. *Curr Opin Immunol* **11**:466-474.
165. **Vidal N, Peeters M, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, Robertson D, Ilunga W, Sema H, Tshimanga K, Bongo B, Delaporte E.** 2000. Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. *J Virol* **74**:10498-10507.
166. **Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A, Hahn BH, Wolinsky S, Bhattacharya T.** 2000. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* **288**:1789-1796.
167. **Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, Santiago ML, Bibollet-Ruche F, Chen Y, Wain LV, Liegeois F, Loul S, Ngole EM, Bienvenue Y, Delaporte E, Brookfield JF, Sharp PM, Shaw GM, Peeters M, Hahn BH.** 2006.

- Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* **313**:523-526.
168. **Clewley JP.** 2004. Enigmas and paradoxes: the genetic diversity and prevalence of the primate lentiviruses. *Curr HIV Res* **2**:113-125.
 169. **Ayouba A, Souquieres S, Njinku B, Martin PM, Muller-Trutwin MC, Roques P, Barre-Sinoussi F, Maucelere P, Simon F, Nerrienet E.** 2000. HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon. *AIDS* **14**:2623-2625.
 170. **Peeters M, Gueye A, Mboup S, Bibollet-Ruche F, Ekaza E, Mulanga C, Ouedrago R, Gandji R, Mpele P, Dibanga G, Koumare B, Saidou M, Esu-Williams E, Lombart JP, Badombena W, Luo N, Vanden Haesevelde M, Delaporte E.** 1997. Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. *AIDS* **11**:493-498.
 171. **Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH.** 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* **397**:436-441.
 172. **Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM.** 2000. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* **287**:607-614.
 173. **Sharp PM, Hahn BH.** 2010. The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**:2487-2494.
 174. **Bailes E, Gao F, Bibollet-Ruche F, Courgnaud V, Peeters M, Marx PA, Hahn BH, Sharp PM.** 2003. Hybrid origin of SIV in chimpanzees. *Science* **300**:1713.
 175. **Chitnis A, Rawls D, Moore J.** 2000. Origin of HIV type 1 in colonial French Equatorial Africa? *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**:5-8.
 176. **Pepin J, Labbe AC.** 2008. Noble goals, unforeseen consequences: control of tropical diseases in colonial Central Africa and the iatrogenic transmission of blood-borne viruses. *Trop Med Int Health* **13**:744-753.
 177. **Worobey M, Gemmel M, Teuwen DE, Haselkorn T, Kunstman K, Bunce M, Muyembe JJ, Kabongo JM, Kalengayi RM, Van Marck E, Gilbert MT, Wolinsky SM.** 2008. Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature* **455**:661-664.
 178. **de Silva TI, Cotten M, Rowland-Jones SL.** 2008. HIV-2: the forgotten AIDS virus. *Trends Microbiol* **16**:588-595.
 179. **Campbell-Yesufu OT, Gandhi RT.** 2011. Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection. *Clin Infect Dis* **52**:780-787.
 180. **Damond F, Worobey M, Campa P, Farfara I, Colin G, Matheron S, Brun-Vezinet F, Robertson DL, Simon F.** 2004. Identification of a highly divergent HIV type 2 and proposal for a change in HIV type 2 classification. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**:666-672.
 181. **MacNeil A, Sarr AD, Sankale JL, Meloni ST, Mboup S, Kanki P.** 2007. Direct evidence of lower viral replication rates in vivo in human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infection than in HIV-1 infection. *J Virol* **81**:5325-5330.
 182. **Marlink R, Kanki P, Thior I, Travers K, Eisen G, Siby T, Traore I, Hsieh CC, Dia MC, Gueye EH, et al.** 1994. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* **265**:1587-1590.
 183. **Lemey P, Pybus OG, Wang B, Saksena NK, Salemi M, Vandamme AM.** 2003. Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:6588-6592.
 184. **Sundquist WI, Krausslich HG.** 2012. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**:a006924.

185. **Greene WC.** 1990. Regulation of HIV-1 gene expression. *Annu Rev Immunol* **8**:453-475.
186. **Meng X, Zhao G, Yufenyuy E, Ke D, Ning J, Delucia M, Ahn J, Gronenborn AM, Aiken C, Zhang P.** 2012. Protease cleavage leads to formation of mature trimer interface in HIV-1 capsid. *PLoS Pathog* **8**:e1002886.
187. **Engelman A, Cherepanov P.** 2012. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol* **10**:279-290.
188. **Sinangil F, Loyter A, Volsky DJ.** 1988. Quantitative measurement of fusion between human immunodeficiency virus and cultured cells using membrane fluorescence dequenching. *FEBS Lett* **239**:88-92.
189. **Frey S, Marsh M, Gunther S, Pelchen-Matthews A, Stephens P, Ortlepp S, Stegmann T.** 1995. Temperature dependence of cell-cell fusion induced by the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **69**:1462-1472.
190. **Kuhmann SE, Platt EJ, Kozak SL, Kabat D.** 2000. Cooperation of multiple CCR5 coreceptors is required for infections by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **74**:7005-7015.
191. **Platt EJ, Wehrly K, Kuhmann SE, Chesebro B, Kabat D.** 1998. Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **72**:2855-2864.
192. **Pugach P, Ray N, Klasse PJ, Ketas TJ, Michael E, Doms RW, Lee B, Moore JP.** 2009. Inefficient entry of vicriviroc-resistant HIV-1 via the inhibitor-CCR5 complex at low cell surface CCR5 densities. *Virology* **387**:296-302.
193. **Gallo SA, Finnegan CM, Viard M, Raviv Y, Dimitrov A, Rawat SS, Puri A, Durell S, Blumenthal R.** 2003. The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim Biophys Acta* **1614**:36-50.
194. **Brandenberg OF, Magnus C, Rusert P, Regoes RR, Trkola A.** 2015. Different Infectivity of HIV-1 Strains Is Linked to Number of Envelope Trimers Required for Entry. *PLoS Pathog* **11**:e1004595.
195. **Wilén CB, Tilton JC, Doms RW.** 2012. HIV: cell binding and entry. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**.
196. **Sarafianos SG, Marchand B, Das K, Himmel DM, Parniak MA, Hughes SH, Arnold E.** 2009. Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition. *J Mol Biol* **385**:693-713.
197. **Chabria SB, Gupta S, Kozal MJ.** 2014. Deep sequencing of HIV: clinical and research applications. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **15**:295-325.
198. **Coffin JM.** 1995. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* **267**:483-489.
199. **Simon V, Bloch N, Landau NR.** 2015. Intrinsic host restrictions to HIV-1 and mechanisms of viral escape. *Nat Immunol* **16**:546-553.
200. **Endsley MA, Somasunderam AD, Li G, Oezguen N, Thiviyanathan V, Murray JL, Rubin DH, Hodge TW, O'Brien WA, Lewis B, Ferguson MR.** 2014. Nuclear trafficking of the HIV-1 pre-integration complex depends on the ADAM10 intracellular domain. *Virology* **454-455**:60-66.
201. **Suzuki Y, Craigie R.** 2007. The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. *Nat Rev Microbiol* **5**:187-196.
202. **Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, Boucher G, Boulassel MR, Ghattas G, Brenchley JM, Schacker TW, Hill BJ, Douek DC, Routy JP, Haddad EK, Sekaly RP.** 2009. HIV reservoir size and

- persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med* **15**:893-900.
203. **Das AT, Harwig A, Berkhout B.** 2011. The HIV-1 Tat protein has a versatile role in activating viral transcription. *J Virol* **85**:9506-9516.
 204. **Taniguchi I, Mabuchi N, Ohno M.** 2014. HIV-1 Rev protein specifies the viral RNA export pathway by suppressing TAP/NXF1 recruitment. *Nucleic Acids Res* **42**:6645-6658.
 205. **Ono A, Waheed AA, Freed EO.** 2007. Depletion of cellular cholesterol inhibits membrane binding and higher-order multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag. *Virology* **360**:27-35.
 206. **Kutluay SB, Bieniasz PD.** 2010. Analysis of the initiating events in HIV-1 particle assembly and genome packaging. *PLoS Pathog* **6**:e1001200.
 207. **Datta SA, Heinrich F, Raghunandan S, Krueger S, Curtis JE, Rein A, Nanda H.** 2011. HIV-1 Gag extension: conformational changes require simultaneous interaction with membrane and nucleic acid. *J Mol Biol* **406**:205-214.
 208. **Saad JS, Miller J, Tai J, Kim A, Ghanam RH, Summers MF.** 2006. Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:11364-11369.
 209. **Brandano L, Stevenson M.** 2012. A highly conserved residue in the C-terminal helix of HIV-1 matrix is required for envelope incorporation into virus particles. *J Virol* **86**:2347-2359.
 210. **Jang SI, Kim YH, Paik SY, You JC.** 2007. Development of a cell-based assay probing the specific interaction between the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid and psi RNA in vivo. *J Virol* **81**:6151-6155.
 211. **Bleck M, Itano MS, Johnson DS, Thomas VK, North AJ, Bieniasz PD, Simon SM.** 2014. Temporal and spatial organization of ESCRT protein recruitment during HIV-1 budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:12211-12216.
 212. **Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA.** 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**:1955-1958.
 213. **Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA.** 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**:872-877.
 214. **Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B.** 1996. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* **382**:833-835.
 215. **Gray L, Sterjovski J, Churchill M, Ellery P, Nasr N, Lewin SR, Crowe SM, Wesselingh SL, Cunningham AL, Gorry PR.** 2005. Uncoupling coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) from macrophage tropism reveals biological properties of CCR5-restricted HIV-1 isolates from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Virology* **337**:384-398.
 216. **Peters PJ, Duenas-Decamp MJ, Sullivan WM, Clapham PR.** 2007. Variation of macrophage tropism among HIV-1 R5 envelopes in brain and other tissues. *J Neuroimmune Pharmacol* **2**:32-41.
 217. **Peters PJ, Duenas-Decamp MJ, Sullivan WM, Brown R, Ankghuambom C, Luzuriaga K, Robinson J, Burton DR, Bell J, Simmonds P, Ball J, Clapham PR.** 2008. Variation in HIV-1 R5 macrophage-tropism correlates with sensitivity to

- reagents that block envelope: CD4 interactions but not with sensitivity to other entry inhibitors. *Retrovirology* **5**:5.
218. **Turville SG, Arthos J, Donald KM, Lynch G, Naif H, Clark G, Hart D, Cunningham AL.** 2001. HIV gp120 receptors on human dendritic cells. *Blood* **98**:2482-2488.
 219. **Lee B, Sharron M, Montaner LJ, Weissman D, Doms RW.** 1999. Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:5215-5220.
 220. **Burleigh L, Lozach PY, Schiffer C, Staropoli I, Pezo V, Porrot F, Canque B, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Amara A.** 2006. Infection of dendritic cells (DCs), not DC-SIGN-mediated internalization of human immunodeficiency virus, is required for long-term transfer of virus to T cells. *J Virol* **80**:2949-2957.
 221. **Izquierdo-Useros N, Lorizate M, Puertas MC, Rodriguez-Plata MT, Zangger N, Erikson E, Pino M, Erkizia I, Glass B, Clotet B, Keppler OT, Telenti A, Krausslich HG, Martinez-Picado J.** 2012. Siglec-1 is a novel dendritic cell receptor that mediates HIV-1 trans-infection through recognition of viral membrane gangliosides. *PLoS Biol* **10**:e1001448.
 222. **Tuttle DL, Harrison JK, Anders C, Sleasman JW, Goodenow MM.** 1998. Expression of CCR5 increases during monocyte differentiation and directly mediates macrophage susceptibility to infection by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **72**:4962-4969.
 223. **Lahouassa H, Daddacha W, Hofmann H, Ayinde D, Logue EC, Dragin L, Bloch N, Maudet C, Bertrand M, Gramberg T, Pancino G, Priet S, Canard B, Laguette N, Benkirane M, Transy C, Landau NR, Kim B, Margottin-Goguet F.** 2012. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat Immunol* **13**:223-228.
 224. **Maddon PJ, Littman DR, Godfrey M, Maddon DE, Chess L, Axel R.** 1985. The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family. *Cell* **42**:93-104.
 225. **Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruet J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC, Montagnier L.** 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**:767-768.
 226. **Wang J, Crawford K, Yuan M, Wang H, Gorry PR, Gabuzda D.** 2002. Regulation of CC chemokine receptor 5 and CD4 expression and human immunodeficiency virus type 1 replication in human macrophages and microglia by T helper type 2 cytokines. *J Infect Dis* **185**:885-897.
 227. **Lynch GW, Slaytor EK, Elliott FD, Saurajen A, Turville SG, Sloane AJ, Cameron PU, Cunningham AL, Halliday GM.** 2003. CD4 is expressed by epidermal Langerhans' cells predominantly as covalent dimers. *Exp Dermatol* **12**:700-711.
 228. **Muench MO, Roncarolo MG, Namikawa R.** 1997. Phenotypic and functional evidence for the expression of CD4 by hematopoietic stem cells isolated from human fetal liver. *Blood* **89**:1364-1375.
 229. **Moebius U, Clayton LK, Abraham S, Diener A, Yunis JJ, Harrison SC, Reinherz EL.** 1992. Human immunodeficiency virus gp120 binding C'C" ridge of CD4 domain 1 is also involved in interaction with class II major histocompatibility complex molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:12008-12012.

230. **Moebius U, Clayton LK, Abraham S, Harrison SC, Reinherz EL.** 1992. The human immunodeficiency virus gp120 binding site on CD4: delineation by quantitative equilibrium and kinetic binding studies of mutants in conjunction with a high-resolution CD4 atomic structure. *J Exp Med* **176**:507-517.
231. **Peterson A, Seed B.** 1988. Genetic analysis of monoclonal antibody and HIV binding sites on the human lymphocyte antigen CD4. *Cell* **54**:65-72.
232. **Bachelierie F, Ben-Baruch A, Burkhardt AM, Combadiere C, Farber JM, Graham GJ, Horuk R, Sparre-Ulrich AH, Locati M, Luster AD, Mantovani A, Matsushima K, Murphy PM, Nibbs R, Nomiya H, Power CA, Proudfoot AE, Rosenkilde MM, Rot A, Sozzani S, Thelen M, Yoshie O, Zlotnik A.** 2014. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacol Rev* **66**:1-79.
233. **Tan Q, Zhu Y, Li J, Chen Z, Han GW, Kufareva I, Li T, Ma L, Fenalti G, Li J, Zhang W, Xie X, Yang H, Jiang H, Cherezov V, Liu H, Stevens RC, Zhao Q, Wu B.** 2013. Structure of the CCR5 chemokine receptor-HIV entry inhibitor maraviroc complex. *Science* **341**:1387-1390.
234. **Percherancier Y, Planchenault T, Valenzuela-Fernandez A, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Bachelierie F.** 2001. Palmitoylation-dependent control of degradation, life span, and membrane expression of the CCR5 receptor. *J Biol Chem* **276**:31936-31944.
235. **Blanpain C, Wittamer V, Vanderwinden JM, Boom A, Renneboog B, Lee B, Le Poul E, El Asmar L, Govaerts C, Vassart G, Doms RW, Parmentier M.** 2001. Palmitoylation of CCR5 is critical for receptor trafficking and efficient activation of intracellular signaling pathways. *J Biol Chem* **276**:23795-23804.
236. **Liao HX, Lynch R, Zhou T, Gao F, Alam SM, Boyd SD, Fire AZ, Roskin KM, Schramm CA, Zhang Z, Zhu J, Shapiro L, Program NCS, Mullikin JC, Gnanakaran S, Hraber P, Wiehe K, Kelsoe G, Yang G, Xia SM, Montefiori DC, Parks R, Lloyd KE, Scarce RM, Soderberg KA, Cohen M, Kamanga G, Louder MK, Tran LM, Chen Y, Cai F, Chen S, Moquin S, Du X, Joyce MG, Srivatsan S, Zhang B, Zheng A, Shaw GM, Hahn BH, Kepler TB, Korber BT, Kwong PD, Mascola JR, Haynes BF.** 2013. Co-evolution of a broadly neutralizing HIV-1 antibody and founder virus. *Nature* **496**:469-476.
237. **Dragic T, Trkola A, Lin SW, Nagashima KA, Kajumo F, Zhao L, Olson WC, Wu L, Mackay CR, Allaway GP, Sakmar TP, Moore JP, Maddon PJ.** 1998. Amino-terminal substitutions in the CCR5 coreceptor impair gp120 binding and human immunodeficiency virus type 1 entry. *J Virol* **72**:279-285.
238. **Farzan M, Choe H, Vaca L, Martin K, Sun Y, Desjardins E, Ruffing N, Wu L, Wyatt R, Gerard N, Gerard C, Sodroski J.** 1998. A tyrosine-rich region in the N terminus of CCR5 is important for human immunodeficiency virus type 1 entry and mediates an association between gp120 and CCR5. *J Virol* **72**:1160-1164.
239. **Blanpain C, Doranz BJ, Vakili J, Rucker J, Govaerts C, Baik SS, Lorthioir O, Migeotte I, Libert F, Baleux F, Vassart G, Doms RW, Parmentier M.** 1999. Multiple charged and aromatic residues in CCR5 amino-terminal domain are involved in high affinity binding of both chemokines and HIV-1 Env protein. *J Biol Chem* **274**:34719-34727.
240. **Lee B, Sharron M, Blanpain C, Doranz BJ, Vakili J, Setoh P, Berg E, Liu G, Guy HR, Durell SR, Parmentier M, Chang CN, Price K, Tsang M, Doms RW.** 1999. Epitope mapping of CCR5 reveals multiple conformational states and distinct but

- overlapping structures involved in chemokine and coreceptor function. *J Biol Chem* **274**:9617-9626.
241. **Dragic T, Trkola A, Thompson DA, Cormier EG, Kajumo FA, Maxwell E, Lin SW, Ying W, Smith SO, Sakmar TP, Moore JP.** 2000. A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:5639-5644.
242. **Garcia-Perez J, Rueda P, Alcami J, Rognan D, Arenzana-Seisdedos F, Lagane B, Kellenberger E.** 2011. Allosteric model of maraviroc binding to CC chemokine receptor 5 (CCR5). *J Biol Chem* **286**:33409-33421.
243. **Schnur E, Kessler N, Zherdev Y, Noah E, Scherf T, Ding FX, Rabinovich S, Arshava B, Kurbatska V, Leonciks A, Tsimanis A, Rosen O, Naider F, Anglister J.** 2013. NMR mapping of RANTES surfaces interacting with CCR5 using linked extracellular domains. *FEBS J* **280**:2068-2084.
244. **Cormier EG, Persuh M, Thompson DA, Lin SW, Sakmar TP, Olson WC, Dragic T.** 2000. Specific interaction of CCR5 amino-terminal domain peptides containing sulfotyrosines with HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:5762-5767.
245. **Farzan M, Chung S, Li W, Vasilieva N, Wright PL, Schnitzler CE, Marchione RJ, Gerard C, Gerard NP, Sodroski J, Choe H.** 2002. Tyrosine-sulfated peptides functionally reconstitute a CCR5 variant lacking a critical amino-terminal region. *J Biol Chem* **277**:40397-40402.
246. **Chen G, Way J, Armour S, Watson C, Queen K, Jayawickreme CK, Chen WJ, Kenakin T.** 2000. Use of constitutive G protein-coupled receptor activity for drug discovery. *Mol Pharmacol* **57**:125-134.
247. **Lagane B, Ballet S, Planchenault T, Balabanian K, Le Poul E, Blanpain C, Percherancier Y, Staropoli I, Vassart G, Oppermann M, Parmentier M, Bachelier F.** 2005. Mutation of the DRY motif reveals different structural requirements for the CC chemokine receptor 5-mediated signaling and receptor endocytosis. *Mol Pharmacol* **67**:1966-1976.
248. **Garcia-Perez J, Rueda P, Staropoli I, Kellenberger E, Alcami J, Arenzana-Seisdedos F, Lagane B.** 2011. New insights into the mechanisms whereby low molecular weight CCR5 ligands inhibit HIV-1 infection. *J Biol Chem* **286**:4978-4990.
249. **Colin P, Benureau Y, Staropoli I, Wang Y, Gonzalez N, Alcami J, Hartley O, BreLOT A, Arenzana-Seisdedos F, Lagane B.** 2013. HIV-1 exploits CCR5 conformational heterogeneity to escape inhibition by chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:9475-9480.
250. **Berro R, Klasse PJ, Lascano D, Flegler A, Nagashima KA, Sanders RW, Sakmar TP, Hope TJ, Moore JP.** 2011. Multiple CCR5 conformations on the cell surface are used differentially by human immunodeficiency viruses resistant or sensitive to CCR5 inhibitors. *J Virol* **85**:8227-8240.
251. **Flegler AJ, Cianci GC, Hope TJ.** 2014. CCR5 conformations are dynamic and modulated by localization, trafficking and G protein association. *PLoS One* **9**:e89056.
252. **Berro R, Yasmeeen A, Abrol R, Trzaskowski B, Abi-Habib S, Grunbeck A, Lascano D, Goddard WA, 3rd, Klasse PJ, Sakmar TP, Moore JP.** 2013. Use of G-protein-coupled and -uncoupled CCR5 receptors by CCR5 inhibitor-resistant and -sensitive human immunodeficiency virus type 1 variants. *J Virol* **87**:6569-6581.

253. **Jin J, Colin P, Staropoli I, Lima-Fernandes E, Ferret C, Demir A, Rogee S, Hartley O, Randriamampita C, Scott MG, Marullo S, Sauvonnnet N, Arenzana-Seisdedos F, Lagane B, Brelot A.** 2014. Targeting spare CC chemokine receptor 5 (CCR5) as a principle to inhibit HIV-1 entry. *J Biol Chem* **289**:19042-19052.
254. **Nguyen DH, Taub D.** 2002. Cholesterol is essential for macrophage inflammatory protein 1 beta binding and conformational integrity of CC chemokine receptor 5. *Blood* **99**:4298-4306.
255. **Cardaba CM, Kerr JS, Mueller A.** 2008. CCR5 internalisation and signalling have different dependence on membrane lipid raft integrity. *Cell Signal* **20**:1687-1694.
256. **Blanpain C, Migeotte I, Lee B, Vakili J, Doranz BJ, Govaerts C, Vassart G, Doms RW, Parmentier M.** 1999. CCR5 binds multiple CC-chemokines: MCP-3 acts as a natural antagonist. *Blood* **94**:1899-1905.
257. **Bayram H, Sapsford RJ, Abdelaziz MM, Khair OA.** 2001. Effect of ozone and nitrogen dioxide on the release of proinflammatory mediators from bronchial epithelial cells of nonatopic nonasthmatic subjects and atopic asthmatic patients in vitro. *J Allergy Clin Immunol* **107**:287-294.
258. **Oppermann M.** 2004. Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cell Signal* **16**:1201-1210.
259. **Barmania F, Pepper MS.** 2013. C-C chemokine receptor type five (CCR5): An emerging target for the control of HIV infection. *Appl Transl Genom* **2**:3-16.
260. **Samson M, LaRosa G, Libert F, Painedavoine P, Detheux M, Vassart G, Parmentier M.** 1997. The second extracellular loop of CCR5 is the major determinant of ligand specificity. *J Biol Chem* **272**:24934-24941.
261. **Starcich BR, Hahn BH, Shaw GM, McNeely PD, Modrow S, Wolf H, Parks ES, Parks WP, Josephs SF, Gallo RC, et al.** 1986. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* **45**:637-648.
262. **Willey RL, Rutledge RA, Dias S, Folks T, Theodore T, Buckler CE, Martin MA.** 1986. Identification of conserved and divergent domains within the envelope gene of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:5038-5042.
263. **Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA.** 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**:648-659.
264. **Chen B, Vogan EM, Gong H, Skehel JJ, Wiley DC, Harrison SC.** 2005. Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature* **433**:834-841.
265. **Harris A, Borgnia MJ, Shi D, Bartesaghi A, He H, Pejchal R, Kang YK, Depetris R, Marozsan AJ, Sanders RW, Klasse PJ, Milne JL, Wilson IA, Olson WC, Moore JP, Subramaniam S.** 2011. Trimeric HIV-1 glycoprotein gp140 immunogens and native HIV-1 envelope glycoproteins display the same closed and open quaternary molecular architectures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:11440-11445.
266. **Liu J, Bartesaghi A, Borgnia MJ, Sapiro G, Subramaniam S.** 2008. Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. *Nature* **455**:109-113.
267. **Huang CC, Lam SN, Acharya P, Tang M, Xiang SH, Hussan SS, Stanfield RL, Robinson J, Sodroski J, Wilson IA, Wyatt R, Bewley CA, Kwong PD.** 2007. Structures of the CCR5 N terminus and of a tyrosine-sulfated antibody with HIV-1 gp120 and CD4. *Science* **317**:1930-1934.

268. **Huang CC, Tang M, Zhang MY, Majeed S, Montabana E, Stanfield RL, Dimitrov DS, Korber B, Sodroski J, Wilson IA, Wyatt R, Kwong PD.** 2005. Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science* **310**:1025-1028.
269. **Cormier EG, Dragic T.** 2002. The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor. *J Virol* **76**:8953-8957.
270. **Tamamis P, Floudas CA.** 2014. Molecular recognition of CCR5 by an HIV-1 gp120 V3 loop. *PLoS One* **9**:e95767.
271. **Farzan M, Mirzabekov T, Kolchinsky P, Wyatt R, Cayabyab M, Gerard NP, Gerard C, Sodroski J, Choe H.** 1999. Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry. *Cell* **96**:667-676.
272. **Lederman MM, Penn-Nicholson A, Cho M, Mosier D.** 2006. Biology of CCR5 and its role in HIV infection and treatment. *JAMA* **296**:815-826.
273. **Proudfoot AE, Handel TM, Johnson Z, Lau EK, LiWang P, Clark-Lewis I, Borlat F, Wells TN, Kosco-Vilbois MH.** 2003. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:1885-1890.
274. **Ottaviani C, Nasorri F, Bedini C, de Pita O, Girolomoni G, Cavani A.** 2006. CD56brightCD16(-) NK cells accumulate in psoriatic skin in response to CXCL10 and CCL5 and exacerbate skin inflammation. *Eur J Immunol* **36**:118-128.
275. **Menu E, Braet F, Timmers M, Van Riet I, Van Camp B, Vanderkerken K.** 2002. The F-actin content of multiple myeloma cells as a measure of their migration. *Ann N Y Acad Sci* **973**:124-136.
276. **Udi J, Schuler J, Wider D, Ihorst G, Catusse J, Waldschmidt J, Schnerch D, Follo M, Wasch R, Engelhardt M.** 2013. Potent in vitro and in vivo activity of sorafenib in multiple myeloma: induction of cell death, CD138-downregulation and inhibition of migration through actin depolymerization. *Br J Haematol* **161**:104-116.
277. **Poncelet P, Poinas G, Corbeau P, Devaux C, Tubiana N, Muloko N, Tamalet C, Chermann JC, Kourilsky F, Sampol J.** 1991. Surface CD4 density remains constant on lymphocytes of HIV-infected patients in the progression of disease. *Res Immunol* **142**:291-298.
278. **Moore JP.** 1997. Coreceptors: implications for HIV pathogenesis and therapy. *Science* **276**:51-52.
279. **Paiardini M, Cervasi B, Reyes-Aviles E, Micci L, Ortiz AM, Chahroudi A, Vinton C, Gordon SN, Bosinger SE, Francella N, Hallberg PL, Cramer E, Schlub T, Chan ML, Riddick NE, Collman RG, Apetrei C, Pandrea I, Else J, Munch J, Kirchhoff F, Davenport MP, Brenchley JM, Silvestri G.** 2011. Low levels of SIV infection in sooty mangabey central memory CD(4)(+) T cells are associated with limited CCR5 expression. *Nat Med* **17**:830-836.
280. **Yang X, Jiao YM, Wang R, Ji YX, Zhang HW, Zhang YH, Chen DX, Zhang T, Wu H.** 2012. High CCR5 density on central memory CD4+ T cells in acute HIV-1 infection is mostly associated with rapid disease progression. *PLoS One* **7**:e49526.
281. **Reynes J, Portales P, Segondy M, Baillat V, Andre P, Reant B, Avinens O, Couderc G, Benkirane M, Clot J, Eliaou JF, Corbeau P.** 2000. CD4+ T cell surface CCR5 density as a determining factor of virus load in persons infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* **181**:927-932.

282. **Marmor M, Krowka J, Goldberg JD.** 2000. CD4+ T cell surface CCR5 density and virus load in persons infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* **182**:1284-1286.
283. **Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ.** 1996. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CCR5 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.
284. **Blanpain C, Lee B, Tackoen M, Puffer B, Boom A, Libert F, Sharron M, Wittamer V, Vassart G, Doms RW, Parmentier M.** 2000. Multiple nonfunctional alleles of CCR5 are frequent in various human populations. *Blood* **96**:1638-1645.
285. **Benkirane M, Jin DY, Chun RF, Koup RA, Jeang KT.** 1997. Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32. *J Biol Chem* **272**:30603-30606.
286. **Agrawal L, Jin Q, Altenburg J, Meyer L, Tubiana R, Theodorou I, Alkhatib G.** 2007. CCR5Delta32 protein expression and stability are critical for resistance to human immunodeficiency virus type 1 in vivo. *J Virol* **81**:8041-8049.
287. **Garzino-Demo A, Moss RB, Margolick JB, Cleghorn F, Sill A, Blattner WA, Cocchi F, Carlo DJ, DeVico AL, Gallo RC.** 1999. Spontaneous and antigen-induced production of HIV-inhibitory beta-chemokines are associated with AIDS-free status. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:11986-11991.
288. **Furci L, Scarlatti G, Burastero S, Tambussi G, Colognesi C, Quillent C, Longhi R, Loverro P, Borgonovo B, Gaffi D, Carrow E, Malnati M, Lusso P, Siccardi AG, Lazzarin A, Beretta A.** 1997. Antigen-driven C-C chemokine-mediated HIV-1 suppression by CD4(+) T cells from exposed uninfected individuals expressing the wild-type CCR-5 allele. *J Exp Med* **186**:455-460.
289. **Shieh B, Yan YP, Ko NY, Liao YE, Liu YC, Lin HH, Chen PP, Li C.** 2001. Detection of elevated serum beta-chemokine levels in seronegative Chinese individuals exposed to human immunodeficiency virus type 1. *Clin Infect Dis* **33**:273-279.
290. **Paxton WA, Liu R, Kang S, Wu L, Gingeras TR, Landau NR, Mackay CR, Koup RA.** 1998. Reduced HIV-1 infectability of CD4+ lymphocytes from exposed-uninfected individuals: association with low expression of CCR5 and high production of beta-chemokines. *Virology* **244**:66-73.
291. **Ullum H, Cozzi Lepri A, Victor J, Aladdin H, Phillips AN, Gerstoft J, Skinhoj P, Pedersen BK.** 1998. Production of beta-chemokines in human immunodeficiency virus (HIV) infection: evidence that high levels of macrophage inflammatory protein-1beta are associated with a decreased risk of HIV disease progression. *J Infect Dis* **177**:331-336.
292. **Cocchi F, DeVico AL, Yarchoan R, Redfield R, Cleghorn F, Blattner WA, Garzino-Demo A, Colombini-Hatch S, Margolis D, Gallo RC.** 2000. Higher macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta levels from CD8+ T cells are associated with asymptomatic HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:13812-13817.
293. **Fowke KR, Dong T, Rowland-Jones SL, Oyugi J, Rutherford WJ, Kimani J, Krausa P, Bwayo J, Simonsen JN, Shearer GM, Plummer FA.** 1998. HIV type 1 resistance in Kenyan sex workers is not associated with altered cellular

- susceptibility to HIV type 1 infection or enhanced beta-chemokine production. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14**:1521-1530.
294. **Butera ST, Pisell TL, Limpakarnjanarat K, Young NL, Hodge TW, Mastro TD, Folks TM.** 2001. Production of a novel viral suppressive activity associated with resistance to infection among female sex workers exposed to HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**:735-744.
 295. **Schmidtmayerova H, Nottet HS, Nuovo G, Raabe T, Flanagan CR, Dubrovsky L, Gendelman HE, Cerami A, Bukrinsky M, Sherry B.** 1996. Human immunodeficiency virus type 1 infection alters chemokine beta peptide expression in human monocytes: implications for recruitment of leukocytes into brain and lymph nodes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:700-704.
 296. **Canque B, Rosenzweig M, Gey A, Tartour E, Fridman WH, Gluckman JC.** 1996. Macrophage inflammatory protein-1alpha is induced by human immunodeficiency virus infection of monocyte-derived macrophages. *Blood* **87**:2011-2019.
 297. **Ostrowski MA, Justement SJ, Catanzaro A, Hallahan CA, Ehler LA, Mizell SB, Kumar PN, Mican JA, Chun TW, Fauci AS.** 1998. Expression of chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in HIV-1-infected and uninfected individuals. *J Immunol* **161**:3195-3201.
 298. **Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A.** 2004. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* **22**:745-763.
 299. **Cayota A, Vuillier F, Scott-Algara D, Dighiero G.** 1990. Preferential replication of HIV-1 in memory CD4+ subpopulation. *Lancet* **336**:941.
 300. **Spina CA, Prince HE, Richman DD.** 1997. Preferential replication of HIV-1 in the CD45RO memory cell subset of primary CD4 lymphocytes in vitro. *J Clin Invest* **99**:1774-1785.
 301. **Ebert LM, McColl SR.** 2002. Up-regulation of CCR5 and CCR6 on distinct subpopulations of antigen-activated CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* **168**:65-72.
 302. **Meditz AL, Haas MK, Folkvord JM, Melander K, Young R, McCarter M, Mawhinney S, Campbell TB, Lie Y, Coakley E, Levy DN, Connick E.** 2011. HLA-DR+ CD38+ CD4+ T lymphocytes have elevated CCR5 expression and produce the majority of R5-tropic HIV-1 RNA in vivo. *J Virol* **85**:10189-10200.
 303. **Mo H, Monard S, Pollack H, Ip J, Rochford G, Wu L, Hoxie J, Borkowsky W, Ho DD, Moore JP.** 1998. Expression patterns of the HIV type 1 coreceptors CCR5 and CXCR4 on CD4+ T cells and monocytes from cord and adult blood. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14**:607-617.
 304. **Kestens L, Vanham G, Vereecken C, Vandenbruaene M, Vercauteren G, Colebunders RL, Gigase PL.** 1994. Selective increase of activation antigens HLA-DR and CD38 on CD4+ CD45RO+ T lymphocytes during HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol* **95**:436-441.
 305. **Okoye AA, Picker LJ.** 2013. CD4(+) T-cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure. *Immunol Rev* **254**:54-64.
 306. **Loetscher P, Ugucioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C, Dayer JM.** 1998. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* **391**:344-345.
 307. **Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA.** 1996. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* **382**:829-833.

308. **Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR.** 1998. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* **393**:595-599.
309. **Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M, Bachelier F.** 2005. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* **280**:35760-35766.
310. **Zhou Y, Kurihara T, Ryseck RP, Yang Y, Ryan C, Loy J, Warr G, Bravo R.** 1998. Impaired macrophage function and enhanced T cell-dependent immune response in mice lacking CCR5, the mouse homologue of the major HIV-1 coreceptor. *J Immunol* **160**:4018-4025.
311. **Ng-Cashin J, Kuhns JJ, Burkett SE, Powderly JD, Craven RR, van Deventer HW, Kirby SL, Serody JS.** 2003. Host absence of CCR5 potentiates dendritic cell vaccination. *J Immunol* **170**:4201-4208.
312. **Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, Nagasawa T.** 1998. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* **393**:591-594.
313. **Sierro F, Biben C, Martinez-Munoz L, Mellado M, Ransohoff RM, Li M, Woehl B, Leung H, Groom J, Batten M, Harvey RP, Martinez AC, Mackay CR, Mackay F.** 2007. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:14759-14764.
314. **Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T.** 1996. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* **382**:635-638.
315. **Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA.** 1998. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:9448-9453.
316. **Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, Choi BI, Nagasawa T.** 2004. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* **20**:707-718.
317. **Calderon L, Boehm T.** 2011. Three chemokine receptors cooperatively regulate homing of hematopoietic progenitors to the embryonic mouse thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:7517-7522.
318. **Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR.** 1997. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:1925-1930.
319. **Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A.** 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**:708-712.
320. **Nicholson JK, Browning SW, Hengel RL, Lew E, Gallagher LE, Rimland D, McDougal JS.** 2001. CCR5 and CXCR4 expression on memory and naive T cells in HIV-1 infection and response to highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* **27**:105-115.
321. **Doyle T, Goujon C, Malim MH.** 2015. HIV-1 and interferons: who's interfering with whom? *Nat Rev Microbiol* **13**:403-413.

322. **Jarmuz A, Chester A, Bayliss J, Gisbourne J, Dunham I, Scott J, Navaratnam N.** 2002. An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics* **79**:285-296.
323. **Refsland EW, Stenglein MD, Shindo K, Albin JS, Brown WL, Harris RS.** 2010. Quantitative profiling of the full APOBEC3 mRNA repertoire in lymphocytes and tissues: implications for HIV-1 restriction. *Nucleic Acids Res* **38**:4274-4284.
324. **Malim MH, Bieniasz PD.** 2012. HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**:a006940.
325. **Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L, Trono D.** 2003. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* **424**:99-103.
326. **Nair S, Sanchez-Martinez S, Ji X, Rein A.** 2014. Biochemical and biological studies of mouse APOBEC3. *J Virol* **88**:3850-3860.
327. **Bishop KN, Holmes RK, Sheehy AM, Davidson NO, Cho SJ, Malim MH.** 2004. Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. *Curr Biol* **14**:1392-1396.
328. **Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, Mao P, Yu XF.** 2003. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* **302**:1056-1060.
329. **Bailey CC, Zhong G, Huang IC, Farzan M.** 2014. IFITM-Family Proteins: The Cell's First Line of Antiviral Defense. *Annu Rev Virol* **1**:261-283.
330. **Compton AA, Bruel T, Porrot F, Mallet A, Sachse M, Euvrard M, Liang C, Casartelli N, Schwartz O.** 2014. IFITM proteins incorporated into HIV-1 virions impair viral fusion and spread. *Cell Host Microbe* **16**:736-747.
331. **Brandariz-Nunez A, Valle-Casuso JC, White TE, Laguette N, Benkirane M, Brojatsch J, Diaz-Griffero F.** 2012. Role of SAMHD1 nuclear localization in restriction of HIV-1 and SIVmac. *Retrovirology* **9**:49.
332. **Ayinde D, Bruel T, Cardinaud S, Porrot F, Prado JG, Moris A, Schwartz O.** 2015. SAMHD1 limits HIV-1 antigen presentation by monocyte-derived dendritic cells. *J Virol* doi:10.1128/JVI.00069-15.
333. **Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, Ringeard M, Chable-Bessia C, Segeral E, Yatim A, Emiliani S, Schwartz O, Benkirane M.** 2011. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* **474**:654-657.
334. **Rosa A, Chande A, Ziglio S, De Sanctis V, Bertorelli R, Goh SL, McCauley SM, Nowosielska A, Antonarakis SE, Luban J, Santoni FA, Pizzato M.** 2015. HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation. *Nature* **526**:212-217.
335. **Sood C, Marin M, Chande A, Pizzato M, Melikyan GB.** 2017. SERINC5 protein inhibits HIV-1 fusion pore formation by promoting functional inactivation of envelope glycoproteins. *J Biol Chem* **292**:6014-6026.
336. **Doyle T, Goujon C, Malim MH.** 2015. HIV-1 and interferons: who's interfering with whom? *Nat Rev Microbiol* doi:10.1038/nrmicro3449.
337. **Strebel K, Klimkait T, Maldarelli F, Martin MA.** 1989. Molecular and biochemical analyses of human immunodeficiency virus type 1 vpu protein. *J Virol* **63**:3784-3791.
338. **Neil SJ.** 2013. The antiviral activities of tetherin. *Curr Top Microbiol Immunol* **371**:67-104.

339. **Galao RP, Le Tortorec A, Pickering S, Kueck T, Neil SJ.** 2012. Innate sensing of HIV-1 assembly by Tetherin induces NFkappaB-dependent proinflammatory responses. *Cell Host Microbe* **12**:633-644.
340. **Sauter D, Hotter D, Van Driessche B, Sturzel CM, Kluge SF, Wildum S, Yu H, Baumann B, Wirth T, Plantier JC, Leoz M, Hahn BH, Van Lint C, Kirchhoff F.** 2015. Differential regulation of NF-kappaB-mediated proviral and antiviral host gene expression by primate lentiviral Nef and Vpu proteins. *Cell Rep* **10**:586-599.
341. **Campbell E.** 2014. Are we done monkeying around with TRIM5alpha? *Mol Ther* **22**:1072-1073.
342. **Luban J.** 2012. TRIM5 and the Regulation of HIV-1 Infectivity. *Mol Biol Int* **2012**:426840.
343. **Battivelli E, Migraine J, Lecossier D, Yeni P, Clavel F, Hance AJ.** 2011. Gag cytotoxic T lymphocyte escape mutations can increase sensitivity of HIV-1 to human TRIM5alpha, linking intrinsic and acquired immunity. *J Virol* **85**:11846-11854.
344. **Granier C, Battivelli E, Lecuroux C, Venet A, Lambotte O, Schmitt-Boulanger M, Delaugerre C, Molina JM, Chakrabarti LA, Clavel F, Hance AJ.** 2013. Pressure from TRIM5alpha contributes to control of HIV-1 replication by individuals expressing protective HLA-B alleles. *J Virol* doi:JV.01313-13 [pii] 10.1128/JVI.01313-13 [doi].
345. **Stevenson M, Stanwick TL, Dempsey MP, Lamonica CA.** 1990. HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *EMBO J* **9**:1551-1560.
346. **Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR, Go AS, Haislip A, Chen IS.** 1990. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* **61**:213-222.
347. **Zack JA, Haislip AM, Krogstad P, Chen IS.** 1992. Incompletely reverse-transcribed human immunodeficiency virus type 1 genomes in quiescent cells can function as intermediates in the retroviral life cycle. *J Virol* **66**:1717-1725.
348. **Gowda SD, Stein BS, Mohagheghpour N, Benike CJ, Engleman EG.** 1989. Evidence that T cell activation is required for HIV-1 entry in CD4+ lymphocytes. *J Immunol* **142**:773-780.
349. **McDougal JS, Mawle A, Cort SP, Nicholson JK, Cross GD, Scheppler-Campbell JA, Hicks D, Sligh J.** 1985. Cellular tropism of the human retrovirus HTLV-III/LAV. I. Role of T cell activation and expression of the T4 antigen. *J Immunol* **135**:3151-3162.
350. **Veazey RS, Mansfield KG, Tham IC, Carville AC, Shvetz DE, Forand AE, Lackner AA.** 2000. Dynamics of CCR5 expression by CD4(+) T cells in lymphoid tissues during simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* **74**:11001-11007.
351. **Descours B, Avettand-Fenoel V, Blanc C, Samri A, Melard A, Supervie V, Theodorou I, Carcelain G, Rouzioux C, Autran B, Group AACS.** 2012. Immune responses driven by protective human leukocyte antigen alleles from long-term nonprogressors are associated with low HIV reservoir in central memory CD4 T cells. *Clin Infect Dis* **54**:1495-1503.
352. **Baldauf HM, Pan X, Erikson E, Schmidt S, Daddacha W, Burggraf M, Schenkova K, Ambiel I, Wabnitz G, Gramberg T, Panitz S, Flory E, Landau NR, Sertel S, Rutsch F, Lasitschka F, Kim B, Konig R, Fackler OT, Keppler OT.** 2012. SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4(+) T cells. *Nat Med* **18**:1682-1687.

353. **Maggi E, Mazzetti M, Ravina A, Annunziato F, de Carli M, Piccinni MP, Manetti R, Carbonari M, Pesce AM, del Prete G, et al.** 1994. Ability of HIV to promote a TH1 to TH0 shift and to replicate preferentially in TH2 and TH0 cells. *Science* **265**:244-248.
354. **Tanaka Y, Koyanagi Y, Tanaka R, Kumazawa Y, Nishimura T, Yamamoto N.** 1997. Productive and lytic infection of human CD4+ type 1 helper T cells with macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **71**:465-470.
355. **Mikovits JA, Taub DD, Turcovski-Corrales SM, Ruscetti FW.** 1998. Similar levels of human immunodeficiency virus type 1 replication in human TH1 and TH2 clones. *J Virol* **72**:5231-5238.
356. **Moonis M, Lee B, Bailer RT, Luo Q, Montaner LJ.** 2001. CCR5 and CXCR4 expression correlated with X4 and R5 HIV-1 infection yet not sustained replication in Th1 and Th2 cells. *AIDS* **15**:1941-1949.
357. **Vetter ML, Johnson ME, Antons AK, Unutmaz D, D'Aquila RT.** 2009. Differences in APOBEC3G expression in CD4+ T helper lymphocyte subtypes modulate HIV-1 infectivity. *PLoS Pathog* **5**:e1000292.
358. **Oswald-Richter K, Grill SM, Leelawong M, Tseng M, Kalams SA, Hulgand T, Haas DW, Unutmaz D.** 2007. Identification of a CCR5-expressing T cell subset that is resistant to R5-tropic HIV infection. *PLoS Pathog* **3**:e58.
359. **Haase AT.** 2005. Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts. *Nat Rev Immunol* **5**:783-792.
360. **Haase AT.** 2011. Early events in sexual transmission of HIV and SIV and opportunities for interventions. *Annu Rev Med* **62**:127-139.
361. **Bomsel M, Alfsen A.** 2003. Entry of viruses through the epithelial barrier: pathogenic trickery. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:57-68.
362. **Hladik F, McElrath MJ.** 2008. Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat Rev Immunol* **8**:447-457.
363. **Haase AT.** 2010. Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. *Nature* **464**:217-223.
364. **Jolly C, Sattentau QJ.** 2005. Human immunodeficiency virus type 1 virological synapse formation in T cells requires lipid raft integrity. *J Virol* **79**:12088-12094.
365. **Quinn TC.** 2007. Circumcision and HIV transmission. *Curr Opin Infect Dis* **20**:33-38.
366. **Pantaleo G, Fauci AS.** 1996. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol* **50**:825-854.
367. **Stacey AR, Norris PJ, Qin L, Haygreen EA, Taylor E, Heitman J, Lebedeva M, DeCamp A, Li D, Grove D, Self SG, Borrow P.** 2009. Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *J Virol* **83**:3719-3733.
368. **Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE.** 1997. The Interactions of Retroviruses and their Hosts. *In* Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE (ed), *Retroviruses*, Cold Spring Harbor (NY).
369. **Mellors JW, Rinaldo CR, Jr., Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA.** 1996. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* **272**:1167-1170.
370. **Cerf-Bensussan N, Guy-Grand D.** 1991. Intestinal intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterol Clin North Am* **20**:549-576.

371. **Veazey RS, Marx PA, Lackner AA.** 2001. The mucosal immune system: primary target for HIV infection and AIDS. *Trends Immunol* **22**:626-633.
372. **Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, Orenstein JM, Kotler DP, Fauci AS.** 1993. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* **362**:355-358.
373. **Anton PA, Elliott J, Poles MA, McGowan IM, Matud J, Hultin LE, Grovit-Ferbas K, Mackay CR, Chen ISY, Giorgi JV.** 2000. Enhanced levels of functional HIV-1 co-receptors on human mucosal T cells demonstrated using intestinal biopsy tissue. *AIDS* **14**:1761-1765.
374. **Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, Boden D, Racz P, Markowitz M.** 2004. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* **200**:761-770.
375. **Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, Nguyen PL, Khoruts A, Larson M, Haase AT, Douek DC.** 2004. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* **200**:749-759.
376. **Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A, Dandekar S.** 2003. Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol* **77**:11708-11717.
377. **Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M.** 2005. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* **434**:1093-1097.
378. **Gougeon ML, Lecoœur H, Dulioust A, Enouf MG, Crouvoiser M, Goujard C, Debord T, Montagnier L.** 1996. Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *J Immunol* **156**:3509-3520.
379. **Garg H, Mohl J, Joshi A.** 2012. HIV-1 induced bystander apoptosis. *Viruses* **4**:3020-3043.
380. **Finkel TH, Tudor-Williams G, Banda NK, Cotton MF, Curiel T, Monks C, Baba TW, Ruprecht RM, Kupfer A.** 1995. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nat Med* **1**:129-134.
381. **Biard-Piechaczyk M, Robert-Hebmann V, Richard V, Roland J, Hipskind RA, Devaux C.** 2000. Caspase-dependent apoptosis of cells expressing the chemokine receptor CXCR4 is induced by cell membrane-associated human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein (gp120). *Virology* **268**:329-344.
382. **Banda NK, Bernier J, Kurahara DK, Kurrle R, Haigwood N, Sekaly RP, Finkel TH.** 1992. Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis. *J Exp Med* **176**:1099-1106.
383. **Chougnnet CA, Shacklett BL.** 2012. T Cell Responses During Human Immunodeficiency Virus (HIV)-1 Infection. doi:10.1007/978-1-4614-0484-2_8:141-169.
384. **Boasso A, Hardy AW, Landay AL, Martinson JL, Anderson SA, Dolan MJ, Clerici M, Shearer GM.** 2008. PDL-1 upregulation on monocytes and T cells by

- HIV via type I interferon: restricted expression of type I interferon receptor by CCR5-expressing leukocytes. *Clin Immunol* **129**:132-144.
385. **Doitsh G, Cavrois M, Lassen KG, Zepeda O, Yang Z, Santiago ML, Hebbeler AM, Greene WC.** 2010. Abortive HIV infection mediates CD4 T cell depletion and inflammation in human lymphoid tissue. *Cell* **143**:789-801.
386. **Doitsh G, Galloway NL, Geng X, Yang Z, Monroe KM, Zepeda O, Hunt PW, Hatano H, Sowinski S, Munoz-Arias I, Greene WC.** 2014. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature* **505**:509-514.
387. **Hadida F, Vieillard V, Mollet L, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Debre P.** 1999. Cutting edge: RANTES regulates Fas ligand expression and killing by HIV-specific CD8 cytotoxic T cells. *J Immunol* **163**:1105-1109.
388. **Isaaz S, Baetz K, Olsen K, Podack E, Griffiths GM.** 1995. Serial killing by cytotoxic T lymphocytes: T cell receptor triggers degranulation, re-filling of the lytic granules and secretion of lytic proteins via a non-granule pathway. *Eur J Immunol* **25**:1071-1079.
389. **Eller MA, Goonetilleke N, Tassaneetrithep B, Eller LA, Costanzo MC, Johnson S, Betts MR, Krebs SJ, Slike BM, Nitayaphan S, Rono K, Tovnanabutra S, Maganga L, Kibuuka H, Jagodzinski L, Peel S, Rolland M, Marovich MA, Kim JH, Michael NL, Robb ML, Streeck H.** 2016. Expansion of Inefficient HIV-Specific CD8 T Cells during Acute Infection. *J Virol* **90**:4005-4016.
390. **Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB.** 1994. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **68**:6103-6110.
391. **Jin X, Bauer DE, Tuttleton SE, Lewin S, Gettie A, Blanchard J, Irwin CE, Safrit JT, Mittler J, Weinberger L, Kostrikis LG, Zhang L, Perelson AS, Ho DD.** 1999. Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp Med* **189**:991-998.
392. **Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, Farthing C, Ho DD.** 1994. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* **68**:4650-4655.
393. **Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, Racz P, Tenner-Racz K, Dalesandro M, Scallon BJ, Ghayeb J, Forman MA, Montefiori DC, Rieber EP, Letvin NL, Reimann KA.** 1999. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* **283**:857-860.
394. **Trimble LA, Lieberman J.** 1998. Circulating CD8 T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals have impaired function and downmodulate CD3 zeta, the signaling chain of the T-cell receptor complex. *Blood* **91**:585-594.
395. **Streeck H, Lu R, Beckwith N, Milazzo M, Liu M, Routy JP, Little S, Jessen H, Kelleher AD, Hecht F, Sekaly RP, Alter G, Heckerman D, Carrington M, Rosenberg ES, Altfeld M.** 2014. Emergence of individual HIV-specific CD8 T cell responses during primary HIV-1 infection can determine long-term disease outcome. *J Virol* **88**:12793-12801.
396. **Walker B, McMichael A.** 2012. The T-cell response to HIV. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**.
397. **Goonetilleke N, Liu MK, Salazar-Gonzalez JF, Ferrari G, Giorgi E, Ganosov VV, Keele BF, Learn GH, Turnbull EL, Salazar MG, Weinhold KJ, Moore S, B CCC, Letvin N, Haynes BF, Cohen MS, Hraber P, Bhattacharya T, Borrow P,**

- Perelson AS, Hahn BH, Shaw GM, Korber BT, McMichael AJ.** 2009. The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *J Exp Med* **206**:1253-1272.
398. **Lichterfeld M, Yu XG, Cohen D, Addo MM, Malenfant J, Perkins B, Pae E, Johnston MN, Strick D, Allen TM, Rosenberg ES, Korber B, Walker BD, Altfeld M.** 2004. HIV-1 Nef is preferentially recognized by CD8 T cells in primary HIV-1 infection despite a relatively high degree of genetic diversity. *AIDS* **18**:1383-1392.
399. **Turnbull EL, Wong M, Wang S, Wei X, Jones NA, Conrod KE, Aldam D, Turner J, Pellegrino P, Keele BF, Williams I, Shaw GM, Borrow P.** 2009. Kinetics of expansion of epitope-specific T cell responses during primary HIV-1 infection. *J Immunol* **182**:7131-7145.
400. **Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA, Walker BD.** 1997. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* **278**:1447-1450.
401. **Rychert J, Saindon S, Placek S, Daskalakis D, Rosenberg E.** 2007. Sequence variation occurs in CD4 epitopes during early HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* **46**:261-267.
402. **Erdmann N, Du VY, Carlson J, Schaefer M, Jureka A, Sterrett S, Yue L, Dilernia D, Lakhi S, Tang J, Sidney J, Gilmour J, Allen S, Hunter E, Heath S, Bansal A, Goepfert PA.** 2015. HLA Class-II Associated HIV Polymorphisms Predict Escape from CD4+ T Cell Responses. *PLoS Pathog* **11**:e1005111.
403. **Appay V, Zaunders JJ, Papagno L, Sutton J, Jaramillo A, Waters A, Easterbrook P, Grey P, Smith D, McMichael AJ, Cooper DA, Rowland-Jones SL, Kelleher AD.** 2002. Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. *J Immunol* **168**:5954-5958.
404. **Zaunders JJ, Munier ML, Kaufmann DE, Ip S, Grey P, Smith D, Ramacciotti T, Quan D, Finlayson R, Kaldor J, Rosenberg ES, Walker BD, Cooper DA, Kelleher AD.** 2005. Early proliferation of CCR5(+) CD38(+++) antigen-specific CD4(+) Th1 effector cells during primary HIV-1 infection. *Blood* **106**:1660-1667.
405. **Johnson S, Eller M, Teigler JE, Maloveste SM, Schultz BT, Soghoian DZ, Lu R, Oster AF, Chenine AL, Alter G, Dittmer U, Marovich M, Robb ML, Michael NL, Bolton D, Streeck H.** 2015. Cooperativity of HIV-Specific Cytolytic CD4 T Cells and CD8 T Cells in Control of HIV Viremia. *J Virol* **89**:7494-7505.
406. **Soghoian DZ, Jessen H, Flanders M, Sierra-Davidson K, Cutler S, Pertel T, Ranasinghe S, Lindqvist M, Davis I, Lane K, Rychert J, Rosenberg ES, Piechocka-Trocha A, Brass AL, Brenchley JM, Walker BD, Streeck H.** 2012. HIV-specific cytolytic CD4 T cell responses during acute HIV infection predict disease outcome. *Sci Transl Med* **4**:123ra125.
407. **Moukambi F, Rabezanahary H, Rodrigues V, Racine G, Robitaille L, Krust B, Andreani G, Soundaramourty C, Silvestre R, Laforge M, Estaquier J.** 2015. Early Loss of Splenic Tfh Cells in SIV-Infected Rhesus Macaques. *PLoS Pathog* **11**:e1005287.
408. **Muir R, Metcalf T, Tardif V, Takata H, Phanuphak N, Kroon E, Colby DJ, Trichavaroj R, Valcour V, Robb ML, Michael NL, Ananworanich J, Trautmann L, Haddad EK, Groups RSRSS.** 2016. Altered Memory Circulating T Follicular Helper-B Cell Interaction in Early Acute HIV Infection. *PLoS Pathog* **12**:e1005777.
409. **Hong JJ, Amancha PK, Rogers K, Ansari AA, Villinger F.** 2012. Spatial alterations between CD4(+) T follicular helper, B, and CD8(+) T cells during

- simian immunodeficiency virus infection: T/B cell homeostasis, activation, and potential mechanism for viral escape. *J Immunol* **188**:3247-3256.
410. **Liu P, Overman RG, Yates NL, Alam SM, Vandergrift N, Chen Y, Graw F, Freel SA, Kappes JC, Ochsenbauer C, Montefiori DC, Gao F, Perelson AS, Cohen MS, Haynes BF, Tomaras GD.** 2011. Dynamic antibody specificities and virion concentrations in circulating immune complexes in acute to chronic HIV-1 infection. *J Virol* **85**:11196-11207.
411. **Moore JP, Cao Y, Ho DD, Koup RA.** 1994. Development of the anti-gp120 antibody response during seroconversion to human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **68**:5142-5155.
412. **Richman DD, Wrin T, Little SJ, Petropoulos CJ.** 2003. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:4144-4149.
413. **Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Kilby JM, Saag MS, Komarova NL, Nowak MA, Hahn BH, Kwong PD, Shaw GM.** 2003. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **422**:307-312.
414. **Garces F, Sok D, Kong L, McBride R, Kim HJ, Saye-Francisco KF, Julien JP, Hua Y, Cupo A, Moore JP, Paulson JC, Ward AB, Burton DR, Wilson IA.** 2014. Structural evolution of glycan recognition by a family of potent HIV antibodies. *Cell* **159**:69-79.
415. **Trama AM, Moody MA, Alam SM, Jaeger FH, Lockwood B, Parks R, Lloyd KE, Stolarchuk C, Scarce R, Foulger A, Marshall DJ, Whitesides JF, Jeffries TL, Jr., Wiehe K, Morris L, Lambson B, Soderberg K, Hwang KK, Tomaras GD, Vandergrift N, Jackson KJ, Roskin KM, Boyd SD, Kepler TB, Liao HX, Haynes BF.** 2014. HIV-1 envelope gp41 antibodies can originate from terminal ileum B cells that share cross-reactivity with commensal bacteria. *Cell Host Microbe* **16**:215-226.
416. **Muro-Cacho CA, Pantaleo G, Fauci AS.** 1995. Analysis of apoptosis in lymph nodes of HIV-infected persons. Intensity of apoptosis correlates with the general state of activation of the lymphoid tissue and not with stage of disease or viral burden. *J Immunol* **154**:5555-5566.
417. **Fackler OT, Murooka TT, Imle A, Mempel TR.** 2014. Adding new dimensions: towards an integrative understanding of HIV-1 spread. *Nat Rev Microbiol* **12**:563-574.
418. **Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, Taylor H, Hermankova M, Chadwick K, Margolick J, Quinn TC, Kuo YH, Brookmeyer R, Zeiger MA, Barditch-Crovo P, Siliciano RF.** 1997. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* **387**:183-188.
419. **Chun TW, Finzi D, Margolick J, Chadwick K, Schwartz D, Siliciano RF.** 1995. In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat Med* **1**:1284-1290.
420. **Eisele E, Siliciano RF.** 2012. Redefining the viral reservoirs that prevent HIV-1 eradication. *Immunity* **37**:377-388.
421. **Davey RT, Jr., Bhat N, Yoder C, Chun TW, Metcalf JA, Dewar R, Natarajan V, Lempicki RA, Adelsberger JW, Miller KD, Kovacs JA, Polis MA, Walker RE, Falloon J, Masur H, Gee D, Baseler M, Dimitrov DS, Fauci AS, Lane HC.** 1999. HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral

- therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:15109-15114.
422. **Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, Kovacs C, Gange SJ, Siliciano RF.** 2003. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med* **9**:727-728.
423. **Brenchley JM, Hill BJ, Ambrozak DR, Price DA, Guenaga FJ, Casazza JP, Kuruppu J, Yazdani J, Migueles SA, Connors M, Roederer M, Douek DC, Koup RA.** 2004. T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis. *J Virol* **78**:1160-1168.
424. **Pierson T, Hoffman TL, Blankson J, Finzi D, Chadwick K, Margolick JB, Buck C, Siliciano JD, Doms RW, Siliciano RF.** 2000. Characterization of chemokine receptor utilization of viruses in the latent reservoir for human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **74**:7824-7833.
425. **Bohnelein E, Lowenthal JW, Siekevitz M, Ballard DW, Franza BR, Greene WC.** 1988. The same inducible nuclear proteins regulates mitogen activation of both the interleukin-2 receptor-alpha gene and type 1 HIV. *Cell* **53**:827-836.
426. **Nabel G, Baltimore D.** 1987. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature* **326**:711-713.
427. **Archin NM, Sung JM, Garrido C, Soriano-Sarabia N, Margolis DM.** 2014. Eradicating HIV-1 infection: seeking to clear a persistent pathogen. *Nat Rev Microbiol* **12**:750-764.
428. **Costiniuk CT, Jenabian MA.** 2014. Cell-to-cell transfer of HIV infection: implications for HIV viral persistence. *J Gen Virol* **95**:2346-2355.
429. **Carter CC, Onafuwa-Nuga A, McNamara LA, Riddell Jt, Bixby D, Savona MR, Collins KL.** 2010. HIV-1 infects multipotent progenitor cells causing cell death and establishing latent cellular reservoirs. *Nat Med* **16**:446-451.
430. **Perreau M, Savoye AL, De Crignis E, Corpataux JM, Cubas R, Haddad EK, De Leval L, Graziosi C, Pantaleo G.** 2012. Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *J Exp Med* doi:10.1084/jem.20121932.
431. **Banga R, Procopio FA, Noto A, Pollakis G, Cavassini M, Ohmiti K, Corpataux JM, de Leval L, Pantaleo G, Perreau M.** 2016. PD-1(+) and follicular helper T cells are responsible for persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals. *Nat Med* **22**:754-761.
432. **Moir S, Chun TW, Fauci AS.** 2011. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu Rev Pathol* **6**:223-248.
433. **Brenchley JM, Paiardini M, Knox KS, Asher AI, Cervasi B, Asher TE, Scheinberg P, Price DA, Hage CA, Kholi LM, Khoruts A, Frank I, Else J, Schacker T, Silvestri G, Douek DC.** 2008. Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood* **112**:2826-2835.
434. **Cecchinato V, Trindade CJ, Laurence A, Heraud JM, Brenchley JM, Ferrari MG, Zaffiri L, Trynieszewska E, Tsai WP, Vaccari M, Parks RW, Venzon D, Douek DC, O'Shea JJ, Franchini G.** 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.
435. **Brenchley JM, Douek DC.** 2012. Microbial translocation across the GI tract. *Annu Rev Immunol* **30**:149-173.
436. **Klatt NR, Funderburg NT, Brenchley JM.** 2013. Microbial translocation, immune activation, and HIV disease. *Trends Microbiol* **21**:6-13.

437. **Betts MR, Ambrozak DR, Douek DC, Bonhoeffer S, Brenchley JM, Casazza JP, Koup RA, Picker LJ.** 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.
438. **Papagno L, Appay V, Sutton J, Rostron T, Gillespie GM, Ogg GS, King A, Makadzanhe AT, Waters A, Balotta C, Vyakarnam A, Easterbrook PJ, Rowland-Jones SL.** 2002. Comparison between HIV- and CMV-specific T cell responses in long-term HIV infected donors. *Clin Exp Immunol* **130**:509-517.
439. **Cook CH, Trgovcich J.** 2011. Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent hosts: a decade of progress and remaining challenges. *Antiviral Res* **90**:151-159.
440. **Doisne JM, Urrutia A, Lacabaratz-Porret C, Goujard C, Meyer L, Chaix ML, Sinet M, Venet A.** 2004. CD8+ T cells specific for EBV, cytomegalovirus, and influenza virus are activated during primary HIV infection. *J Immunol* **173**:2410-2418.
441. **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.
442. **Fry TJ, Connick E, Falloon J, Lederman MM, Liewehr DJ, Spritzler J, Steinberg SM, Wood LV, Yarchoan R, Zuckerman J, Landay A, Mackall CL.** 2001. A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis. *Blood* **97**:2983-2990.
443. **Napolitano LA, Grant RM, Deeks SG, Schmidt D, De Rosa SC, Herzenberg LA, Herndier BG, Andersson J, McCune JM.** 2001. Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. *Nat Med* **7**:73-79.
444. **Miura Y, Koyanagi Y.** 2005. Death ligand-mediated apoptosis in HIV infection. *Rev Med Virol* **15**:169-178.
445. **Oberg HH, Lengel-Janssen B, Kabelitz D, Janssen O.** 1997. Activation-induced T cell death: resistance or susceptibility correlate with cell surface fas ligand expression and T helper phenotype. *Cell Immunol* **181**:93-100.
446. **Zhang XR, Zhang LY, Devadas S, Li L, Keegan AD, Shi YF.** 2003. Reciprocal expression of TRAIL and CD95L in Th1 and Th2 cells: role of apoptosis in T helper subset differentiation. *Cell Death Differ* **10**:203-210.
447. **Aillet F, Masutani H, Elbim C, Raoul H, Chene L, Nugeyre MT, Paya C, Barre-Sinoussi F, Gougerot-Pocidalo MA, Israel N.** 1998. Human immunodeficiency virus induces a dual regulation of Bcl-2, resulting in persistent infection of CD4(+) T- or monocytic cell lines. *J Virol* **72**:9698-9705.
448. **Fevrier M, Dorgham K, Rebollo A.** 2011. CD4+ T cell depletion in human immunodeficiency virus (HIV) infection: role of apoptosis. *Viruses* **3**:586-612.
449. **Khaitan A, Unutmaz D.** 2011. Revisiting immune exhaustion during HIV infection. *Curr HIV/AIDS Rep* **8**:4-11.
450. **Addo MM, Yu XG, Rathod A, Cohen D, Eldridge RL, Strick D, Johnston MN, Corcoran C, Wurcel AG, Fitzpatrick CA, Feeney ME, Rodriguez WR, Basgoz N, Draenert R, Stone DR, Brander C, Goulder PJ, Rosenberg ES, Altfeld M, Walker BD.** 2003. Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire

- expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *J Virol* **77**:2081-2092.
451. **Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, Gillespie GM, Dong T, King A, Ogg GS, Spiegel HM, Conlon C, Spina CA, Havlir DV, Richman DD, Waters A, Easterbrook P, McMichael AJ, Rowland-Jones SL.** 2000. HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* **192**:63-75.
452. **Lieberman J, Shankar P, Manjunath N, Andersson J.** 2001. Dressed to kill? A review of why antiviral CD8 T lymphocytes fail to prevent progressive immunodeficiency in HIV-1 infection. *Blood* **98**:1667-1677.
453. **Speiser DE, Utzschneider DT, Oberle SG, Munz C, Romero P, Zehn D.** 2014. T cell differentiation in chronic infection and cancer: functional adaptation or exhaustion? *Nat Rev Immunol* **14**:768-774.
454. **Streeck H, Nixon DF.** 2010. T cell immunity in acute HIV-1 infection. *J Infect Dis* **202 Suppl 2**:S302-308.
455. **Wherry EJ, Ahmed R.** 2004. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J Virol* **78**:5535-5545.
456. **Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, Betts MR, Freeman GJ, Vignali DA, Wherry EJ.** 2009. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* **10**:29-37.
457. **Petrovas C, Mueller YM, Katsikis PD.** 2005. Apoptosis of HIV-specific CD8+ T cells: an HIV evasion strategy. *Cell Death Differ* **12 Suppl 1**:859-870.
458. **Xu XN, Laffert B, Screaton GR, Kraft M, Wolf D, Kolanus W, Mongkolsapay J, McMichael AJ, Baur AS.** 1999. Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor zeta chain. *J Exp Med* **189**:1489-1496.
459. **Mudd JC, Lederman MM.** 2014. CD8 T cell persistence in treated HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS* **9**:500-505.
460. **Geertsma MF, van Wengen-Stevenhagen A, van Dam EM, Risberg K, Kroon FP, Groeneveld PH, Nibbering PH.** 1999. Decreased expression of zeta molecules by T lymphocytes is correlated with disease progression in human immunodeficiency virus-infected persons. *J Infect Dis* **180**:649-658.
461. **Trimble LA, Shankar P, Patterson M, Daily JP, Lieberman J.** 2000. Human immunodeficiency virus-specific circulating CD8 T lymphocytes have down-modulated CD3zeta and CD28, key signaling molecules for T-cell activation. *J Virol* **74**:7320-7330.
462. **Wood GS.** 1990. The immunohistology of lymph nodes in HIV infection: a review. *Prog AIDS Pathol* **2**:25-32.
463. **Cubas R, Perreau M.** 2014. The dysfunction of T follicular helper cells. *Curr Opin HIV AIDS* **9**:485-491.
464. **Petrovas C, Yamamoto T, Gerner MY, Boswell KL, Wloka K, Smith EC, Ambrozak DR, Sandler NG, Timmer KJ, Sun X, Pan L, Poholek A, Rao SS, Brenchley JM, Alam SM, Tomaras GD, Roederer M, Douek DC, Seder RA, Germain RN, Haddad EK, Koup RA.** 2012. CD4 T follicular helper cell dynamics during SIV infection. *J Clin Invest* **122**:3281-3294.
465. **Lane HC, Masur H, Edgar LC, Whalen G, Rook AH, Fauci AS.** 1983. Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* **309**:453-458.

466. **Buckner CM, Moir S, Ho J, Wang W, Posada JG, Kardava L, Funk EK, Nelson AK, Li Y, Chun TW, Fauci AS.** 2013. Characterization of plasmablasts in the blood of HIV-infected viremic individuals: evidence for nonspecific immune activation. *J Virol* **87**:5800-5811.
467. **Malaspina A, Moir S, Kottlil S, Hallahan CW, Ehler LA, Liu S, Planta MA, Chun TW, Fauci AS.** 2003. Deleterious effect of HIV-1 plasma viremia on B cell costimulatory function. *J Immunol* **170**:5965-5972.
468. **Ng VL.** 1996. B-lymphocytes and autoantibody profiles in HIV disease. *Clin Rev Allergy Immunol* **14**:367-384.
469. **Martinez-Maza O, Breen EC.** 2002. B-cell activation and lymphoma in patients with HIV. *Curr Opin Oncol* **14**:528-532.
470. **De Milito A, Morch C, Sonnerborg A, Chiodi F.** 2001. Loss of memory (CD27) B lymphocytes in HIV-1 infection. *AIDS* **15**:957-964.
471. **Titanji K, De Milito A, Cagigi A, Thorstensson R, Grutzmeier S, Atlas A, Hejdeman B, Kroon FP, Lopalco L, Nilsson A, Chiodi F.** 2006. Loss of memory B cells impairs maintenance of long-term serologic memory during HIV-1 infection. *Blood* **108**:1580-1587.
472. **van Grevenynghe J, Cubas RA, Noto A, DaFonseca S, He Z, Peretz Y, Filali-Mouhim A, Dupuy FP, Procopio FA, Chomont N, Balderas RS, Said EA, Boulassel MR, Tremblay CL, Routy JP, Sekaly RP, Haddad EK.** 2011. Loss of memory B cells during chronic HIV infection is driven by Foxo3a- and TRAIL-mediated apoptosis. *J Clin Invest* **121**:3877-3888.
473. **Swingler S, Zhou J, Swingler C, Dauphin A, Greenough T, Jolicoeur P, Stevenson M.** 2008. Evidence for a pathogenic determinant in HIV-1 Nef involved in B cell dysfunction in HIV/AIDS. *Cell Host Microbe* **4**:63-76.
474. **Iwajomo OH, Finn A, Moons P, Nkhata R, Sepako E, Ogunniyi AD, Williams NA, Heyderman RS.** 2011. Deteriorating pneumococcal-specific B-cell memory in minimally symptomatic African children with HIV infection. *J Infect Dis* **204**:534-543.
475. **Hart M, Steel A, Clark SA, Moyle G, Nelson M, Henderson DC, Wilson R, Gotch F, Gazzard B, Kelleher P.** 2007. Loss of discrete memory B cell subsets is associated with impaired immunization responses in HIV-1 infection and may be a risk factor for invasive pneumococcal disease. *J Immunol* **178**:8212-8220.
476. **Moir S, Fauci AS.** 2013. Insights into B cells and HIV-specific B-cell responses in HIV-infected individuals. *Immunol Rev* **254**:207-224.
477. **Moir S, Ho J, Malaspina A, Wang W, DiPoto AC, O'Shea MA, Roby G, Kottlil S, Arthos J, Proschan MA, Chun TW, Fauci AS.** 2008. Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J Exp Med* **205**:1797-1805.
478. **Meffre E, Louie A, Bannock J, Kim LJ, Ho J, Frear CC, Kardava L, Wang W, Buckner CM, Wang Y, Fankuchen OR, Gittens KR, Chun TW, Li Y, Fauci AS, Moir S.** 2016. Maturation characteristics of HIV-specific antibodies in viremic individuals. *JCI Insight* **1**.
479. **Kardava L, Moir S, Shah N, Wang W, Wilson R, Buckner CM, Santich BH, Kim LJ, Spurlin EE, Nelson AK, Wheatley AK, Harvey CJ, McDermott AB, Wucherpfennig KW, Chun TW, Tsang JS, Li Y, Fauci AS.** 2014. Abnormal B cell memory subsets dominate HIV-specific responses in infected individuals. *J Clin Invest* **124**:3252-3262.

480. **Moir S, Malaspina A, Pickeral OK, Donoghue ET, Vasquez J, Miller NJ, Krishnan SR, Planta MA, Turney JF, Justement JS, Kottlil S, Dybul M, Mican JM, Kovacs C, Chun TW, Birse CE, Fauci AS.** 2004. Decreased survival of B cells of HIV-viremic patients mediated by altered expression of receptors of the TNF superfamily. *J Exp Med* **200**:587-599.
481. **Tomaras GD, Yates NL, Liu P, Qin L, Fouda GG, Chavez LL, Decamp AC, Parks RJ, Ashley VC, Lucas JT, Cohen M, Eron J, Hicks CB, Liao HX, Self SG, Landucci G, Forthal DN, Weinhold KJ, Keele BF, Hahn BH, Greenberg ML, Morris L, Karim SS, Blattner WA, Montefiori DC, Shaw GM, Perelson AS, Haynes BF.** 2008. Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. *J Virol* **82**:12449-12463.
482. **Keele BF, Giorgi EE, Salazar-Gonzalez JF, Decker JM, Pham KT, Salazar MG, Sun C, Grayson T, Wang S, Li H, Wei X, Jiang C, Kirchherr JL, Gao F, Anderson JA, Ping LH, Swanstrom R, Tomaras GD, Blattner WA, Goepfert PA, Kilby JM, Saag MS, Delwart EL, Busch MP, Cohen MS, Montefiori DC, Haynes BF, Gaschen B, Athreya GS, Lee HY, Wood N, Seoighe C, Perelson AS, Bhattacharya T, Korber BT, Hahn BH, Shaw GM.** 2008. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:7552-7557.
483. **Moog C, Fleury HJ, Pellegrin I, Kirn A, Aubertin AM.** 1997. Autologous and heterologous neutralizing antibody responses following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* **71**:3734-3741.
484. **Frost SD, Wrin T, Smith DM, Kosakovsky Pond SL, Liu Y, Paxinos E, Chappey C, Galovich J, Beauchaine J, Petropoulos CJ, Little SJ, Richman DD.** 2005. Neutralizing antibody responses drive the evolution of human immunodeficiency virus type 1 envelope during recent HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:18514-18519.
485. **Deeks SG, Schweighardt B, Wrin T, Galovich J, Hoh R, Sinclair E, Hunt P, McCune JM, Martin JN, Petropoulos CJ, Hecht FM.** 2006. Neutralizing antibody responses against autologous and heterologous viruses in acute versus chronic human immunodeficiency virus (HIV) infection: evidence for a constraint on the ability of HIV to completely evade neutralizing antibody responses. *J Virol* **80**:6155-6164.
486. **Overbaugh J, Rudensey LM.** 1992. Alterations in potential sites for glycosylation predominate during evolution of the simian immunodeficiency virus envelope gene in macaques. *J Virol* **66**:5937-5948.
487. **Chackerian B, Rudensey LM, Overbaugh J.** 1997. Specific N-linked and O-linked glycosylation modifications in the envelope V1 domain of simian immunodeficiency virus variants that evolve in the host alter recognition by neutralizing antibodies. *J Virol* **71**:7719-7727.
488. **Herrera C, Spenlehauer C, Fung MS, Burton DR, Beddows S, Moore JP.** 2003. Nonneutralizing antibodies to the CD4-binding site on the gp120 subunit of human immunodeficiency virus type 1 do not interfere with the activity of a neutralizing antibody against the same site. *J Virol* **77**:1084-1091.
489. **Bunnik EM, Pisas L, van Nuenen AC, Schuitemaker H.** 2008. Autologous neutralizing humoral immunity and evolution of the viral envelope in the course

- of subtype B human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **82**:7932-7941.
490. **Landais E, Huang X, Havenar-Daughton C, Murrell B, Price MA, Wickramasinghe L, Ramos A, Bian CB, Simek M, Allen S, Karita E, Kilembe W, Lakhi S, Inambao M, Kamali A, Sanders EJ, Anzala O, Edward V, Bekker LG, Tang J, Gilmour J, Kosakovsky-Pond SL, Phung P, Wrin T, Crotty S, Godzik A, Poignard P.** 2016. Broadly Neutralizing Antibody Responses in a Large Longitudinal Sub-Saharan HIV Primary Infection Cohort. *PLoS Pathog* **12**:e1005369.
491. **Barouch DH, Whitney JB, Moldt B, Klein F, Oliveira TY, Liu J, Stephenson KE, Chang HW, Shekhar K, Gupta S, Nkolola JP, Seaman MS, Smith KM, Borducchi EN, Cabral C, Smith JY, Blackmore S, Sanisetty S, Perry JR, Beck M, Lewis MG, Rinaldi W, Chakraborty AK, Poignard P, Nussenzweig MC, Burton DR.** 2013. Therapeutic efficacy of potent neutralizing HIV-1-specific monoclonal antibodies in SHIV-infected rhesus monkeys. *Nature* **503**:224-228.
492. **Mouquet H.** 2014. Antibody B cell responses in HIV-1 infection. *Trends Immunol* **35**:549-561.
493. **Pissani F, Streeck H.** 2014. Emerging concepts on T follicular helper cell dynamics in HIV infection. *Trends Immunol* **35**:278-286.
494. **Sok D, Le KM, Vadnais M, Saye-Francisco K, Jardine JG, Torres J, Berndsen ZT, Kong L, Stanfield R, Ruiz J, Ramos A, Liang CH, Chen PL, Criscitiello MF, Mwangi W, Wilson IA, Ward AB, Smider VV, Burton DR.** 2017. Rapid elicitation of broadly neutralizing antibodies to HIV by immunization in cows. *Nature* doi:10.1038/nature23301.
495. **Biancotto A, Iglehart SJ, Vanpouille C, Condack CE, Lisco A, Ruecker E, Hirsch I, Margolis LB, Grivel JC.** 2008. HIV-1 induced activation of CD4+ T cells creates new targets for HIV-1 infection in human lymphoid tissue ex vivo. *Blood* **111**:699-704.
496. **Douek DC, Betts MR, Brenchley JM, Hill BJ, Ambrozak DR, Ngai KL, Karandikar NJ, Casazza JP, Koup RA.** 2002. A novel approach to the analysis of specificity, clonality, and frequency of HIV-specific T cell responses reveals a potential mechanism for control of viral escape. *J Immunol* **168**:3099-3104.
497. **Brenchley JM, Ruff LE, Casazza JP, Koup RA, Price DA, Douek DC.** 2006. Preferential infection shortens the life span of human immunodeficiency virus-specific CD4+ T cells in vivo. *J Virol* **80**:6801-6809.
498. **Harari A, Rizzardi GP, Ellefsen K, Ciuffreda D, Champagne P, Bart PA, Kaufmann D, Telenti A, Sahli R, Tambussi G, Kaiser L, Lazzarin A, Perrin L, Pantaleo G.** 2002. Analysis of HIV-1- and CMV-specific memory CD4 T-cell responses during primary and chronic infection. *Blood* **100**:1381-1387.
499. **Harari A, Vallelian F, Meylan PR, Pantaleo G.** 2005. Functional heterogeneity of memory CD4 T cell responses in different conditions of antigen exposure and persistence. *J Immunol* **174**:1037-1045.
500. **Palmer BE, Boritz E, Wilson CC.** 2004. Effects of sustained HIV-1 plasma viremia on HIV-1 Gag-specific CD4+ T cell maturation and function. *J Immunol* **172**:3337-3347.
501. **Sun Y, Schmitz JE, Acierno PM, Santra S, Subbramanian RA, Barouch DH, Gorgone DA, Lifton MA, Beaudry KR, Manson K, Philippon V, Xu L, Maecker HT, Mascola JR, Panicali D, Nabel GJ, Letvin NL.** 2005. Dysfunction of simian

- immunodeficiency virus/simian human immunodeficiency virus-induced IL-2 expression by central memory CD4⁺ T lymphocytes. *J Immunol* **174**:4753-4760.
502. **Zhang R, Fichtenbaum CJ, Hildeman DA, Lifson JD, Chougnnet C.** 2004. CD40 ligand dysregulation in HIV infection: HIV glycoprotein 120 inhibits signaling cascades upstream of CD40 ligand transcription. *J Immunol* **172**:2678-2686.
503. **D'Souza M, Fontenot AP, Mack DG, Lozupone C, Dillon S, Meditz A, Wilson CC, Connick E, Palmer BE.** 2007. Programmed death 1 expression on HIV-specific CD4⁺ T cells is driven by viral replication and associated with T cell dysfunction. *J Immunol* **179**:1979-1987.
504. **Cockerham LR, Jain V, Sinclair E, Glidden DV, Hartogenesis W, Hatano H, Hunt PW, Martin JN, Pilcher CD, Sekaly R, McCune JM, Hecht FM, Deeks SG.** 2014. Programmed death-1 expression on CD4(+) and CD8(+) T cells in treated and untreated HIV disease. *AIDS* **28**:1749-1758.
505. **Porichis F, Kwon DS, Zupkosky J, Tighe DP, McMullen A, Brockman MA, Pavlik DF, Rodriguez-Garcia M, Pereyra F, Freeman GJ, Kavanagh DG, Kaufmann DE.** 2011. Responsiveness of HIV-specific CD4 T cells to PD-1 blockade. *Blood* **118**:965-974.
506. **Frahm N, Kaufmann DE, Yusim K, Muldoon M, Kesmir C, Linde CH, Fischer W, Allen TM, Li B, McMahon BH, Faircloth KL, Hewitt HS, Mackey EW, Miura T, Khatry A, Wolinsky S, McMichael A, Funkhouser RK, Walker BD, Brander C, Korber BT.** 2007. Increased sequence diversity coverage improves detection of HIV-specific T cell responses. *J Immunol* **179**:6638-6650.
507. **Kassu A, Marcus RA, D'Souza MB, Kelly-McKnight EA, Golden-Mason L, Akkina R, Fontenot AP, Wilson CC, Palmer BE.** 2010. Regulation of virus-specific CD4⁺ T cell function by multiple costimulatory receptors during chronic HIV infection. *J Immunol* **185**:3007-3018.
508. **Brockman MA, Kwon DS, Tighe DP, Pavlik DF, Rosato PC, Sela J, Porichis F, Le Gall S, Waring MT, Moss K, Jessen H, Pereyra F, Kavanagh DG, Walker BD, Kaufmann DE.** 2009. IL-10 is up-regulated in multiple cell types during viremic HIV infection and reversibly inhibits virus-specific T cells. *Blood* **114**:346-356.
509. **Said EA, Dupuy FP, Trautmann L, Zhang Y, Shi Y, El-Far M, Hill BJ, Noto A, Ancuta P, Peretz Y, Fonseca SG, Van Grevenynghe J, Boulassel MR, Bruneau J, Shoukry NH, Routy JP, Douek DC, Haddad EK, Sekaly RP.** 2010. Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4⁺ T cell activation during HIV infection. *Nat Med* **16**:452-459.
510. **Tian X, Zhang A, Qiu C, Wang W, Yang Y, Qiu C, Liu A, Zhu L, Yuan S, Hu H, Wang W, Wei Q, Zhang X, Xu J.** 2015. The upregulation of LAG-3 on T cells defines a subpopulation with functional exhaustion and correlates with disease progression in HIV-infected subjects. *J Immunol* **194**:3873-3882.
511. **Trimble LA, Kam LW, Friedman RS, Xu Z, Lieberman J.** 2000. CD3zeta and CD28 down-modulation on CD8 T cells during viral infection. *Blood* **96**:1021-1029.
512. **Schweneker M, Favre D, Martin JN, Deeks SG, McCune JM.** 2008. HIV-induced changes in T cell signaling pathways. *J Immunol* **180**:6490-6500.
513. **Nyakeriga AM, Fichtenbaum CJ, Goebel J, Nicolaou SA, Conforti L, Chougnnet CA.** 2009. Engagement of the CD4 receptor affects the redistribution of Lck to the immunological synapse in primary T cells: implications for T-cell activation during human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **83**:1193-1200.

514. **Lichterfeld M, Kaufmann DE, Yu XG, Mui SK, Addo MM, Johnston MN, Cohen D, Robbins GK, Pae E, Alter G, Wurcel A, Stone D, Rosenberg ES, Walker BD, Altfeld M.** 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.
515. **Nakanishi Y, Lu B, Gerard C, Iwasaki A.** 2009. CD8(+) T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4(+) T-cell help. *Nature* **462**:510-513.
516. **Demoustier A, Gubler B, Lambotte O, de Goer MG, Wallon C, Goujard C, Delfraissy JF, Taoufik Y.** 2002. In patients on prolonged HAART, a significant pool of HIV infected CD4 T cells are HIV-specific. *AIDS* **16**:1749-1754.
517. **Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, Casazza JP, Kuruppu J, Kunstman K, Wolinsky S, Grossman Z, Dybul M, Oxenius A, Price DA, Connors M, Koup RA.** 2002. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature* **417**:95-98.
518. **Petrovas C, Yamamoto T, Gerner MY, Boswell KL, Wloka K, Smith EC, Ambrozak DR, Sandler NG, Timmer KJ, Sun X, Pan L, Poholek A, Rao SS, Brenchley JM, Alam SM, Tomaras GD, Roederer M, Douek DC, Seder RA, Germain RN, Haddad EK, Koup RA.** 2012. CD4 T follicular helper cell dynamics during SIV infection. *J Clin Invest* doi:10.1172/JCI63039.
519. **Xu Y, Weatherall C, Bailey M, Alcantara S, De Rose R, Estaquier J, Wilson K, Suzuki K, Corbeil J, Cooper DA, Kent SJ, Kelleher AD, Zaunders J.** 2013. Simian immunodeficiency virus infects follicular helper CD4 T cells in lymphoid tissues during pathogenic infection of pigtail macaques. *J Virol* **87**:3760-3773.
520. **Lindqvist M, van Lunzen J, Soghoian DZ, Kuhl BD, Ranasinghe S, Kranias G, Flanders MD, Cutler S, Yudanin N, Muller MI, Davis I, Farber D, Hartjen P, Haag F, Alter G, Schulze zur Wiesch J, Streeck H.** 2012. Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. *J Clin Invest* **122**:3271-3280.
521. **Mylvaganam GH, Velu V, Hong JJ, Sadagopal S, Kwa S, Basu R, Lawson B, Villinger F, Amara RR.** 2014. Diminished viral control during simian immunodeficiency virus infection is associated with aberrant PD-1hi CD4 T cell enrichment in the lymphoid follicles of the rectal mucosa. *J Immunol* **193**:4527-4536.
522. **Fukazawa Y, Lum R, Okoye AA, Park H, Matsuda K, Bae JY, Hagen SI, Shoemaker R, Deleage C, Lucero C, Morcock D, Swanson T, Legasse AW, Axthelm MK, Hesselgesser J, Geleziunas R, Hirsch VM, Edlefsen PT, Piatak M, Jr., Estes JD, Lifson JD, Picker LJ.** 2015. B cell follicle sanctuary permits persistent productive simian immunodeficiency virus infection in elite controllers. *Nat Med* **21**:132-139.
523. **Breen EC, Rezai AR, Nakajima K, Beall GN, Mitsuyasu RT, Hirano T, Kishimoto T, Martinez-Maza O.** 1990. Infection with HIV is associated with elevated IL-6 levels and production. *J Immunol* **144**:480-484.
524. **Xu H, Wang X, Malam N, Aye PP, Alvarez X, Lackner AA, Veazey RS.** 2015. Persistent Simian Immunodeficiency Virus Infection Drives Differentiation, Aberrant Accumulation, and Latent Infection of Germinal Center Follicular T Helper Cells. *J Virol* **90**:1578-1587.
525. **Chowdhury A, Del Rio Estrada PM, Tharp GK, Tribble RP, Amara RR, Chahroudi A, Reyes-Teran G, Bosinger SE, Silvestri G.** 2015. Decreased T

- Follicular Regulatory Cell/T Follicular Helper Cell (TFH) in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Rhesus Macaques May Contribute to Accumulation of TFH in Chronic Infection. *J Immunol* **195**:3237-3247.
526. **de Armas LR, Cotugno N, Pallikkuth S, Pan L, Rinaldi S, Sanchez MC, Gonzalez L, Cagigi A, Rossi P, Palma P, Pahwa S.** 2017. Induction of IL21 in Peripheral T Follicular Helper Cells Is an Indicator of Influenza Vaccine Response in a Previously Vaccinated HIV-Infected Pediatric Cohort. *J Immunol* **198**:1995-2005.
527. **Colineau L, Rouers A, Yamamoto T, Xu Y, Urrutia A, Pham HP, Cardinaud S, Samri A, Dorgham K, Coulon PG, Cheynier R, Hosmalin A, Oksenhendler E, Six A, Kelleher AD, Zaunders J, Koup RA, Autran B, Moris A, Graff-Dubois S.** 2015. HIV-Infected Spleens Present Altered Follicular Helper T Cell (Tfh) Subsets and Skewed B Cell Maturation. *PLoS One* **10**:e0140978.
528. **Kohler SL, Pham MN, Folkvord JM, Arends T, Miller SM, Miles B, Meditz AL, McCarter M, Levy DN, Connick E.** 2016. Germinal Center T Follicular Helper Cells Are Highly Permissive to HIV-1 and Alter Their Phenotype during Virus Replication. *J Immunol* **196**:2711-2722.
529. **Pallikkuth S, Sharkey M, Babic DZ, Gupta S, Stone GW, Fischl MA, Stevenson M, Pahwa S.** 2015. Peripheral T Follicular Helper Cells Are the Major HIV Reservoir within Central Memory CD4 T Cells in Peripheral Blood from Chronically HIV-Infected Individuals on Combination Antiretroviral Therapy. *J Virol* **90**:2718-2728.
530. **Mylvaganam GH, Rios D, Abdelaal HM, Iyer S, Tharp G, Mavinger M, Hicks S, Chahroudi A, Ahmed R, Bosinger SE, Williams IR, Skinner PJ, Velu V, Amara RR.** 2017. Dynamics of SIV-specific CXCR5+ CD8 T cells during chronic SIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**:1976-1981.
531. **Xu Y, Phetsouphanh C, Suzuki K, Aggrawal A, Graff-Dubois S, Roche M, Bailey M, Alcantara S, Cashin K, Sivasubramaniam R, Koelsch KK, Autran B, Harvey R, Gorry PR, Moris A, Cooper DA, Turville S, Kent SJ, Kelleher AD, Zaunders J.** 2017. HIV-1 and SIV Predominantly Use CCR5 Expressed on a Precursor Population to Establish Infection in T Follicular Helper Cells. *Front Immunol* **8**:376.
532. **Miles B, Miller SM, Folkvord JM, Kimball A, Chamanian M, Meditz AL, Arends T, McCarter MD, Levy DN, Rakasz EG, Skinner PJ, Connick E.** 2015. Follicular regulatory T cells impair follicular T helper cells in HIV and SIV infection. *Nat Commun* **6**:8608.
533. **Cohen K, Altfeld M, Alter G, Stamatatos L.** 2014. Early preservation of CXCR5+ PD-1+ helper T cells and B cell activation predict the breadth of neutralizing antibody responses in chronic HIV-1 infection. *J Virol* **88**:13310-13321.
534. **Borrow P, Moody MA.** 2017. Immunologic characteristics of HIV-infected individuals who make broadly neutralizing antibodies. *Immunol Rev* **275**:62-78.
535. **Yamamoto T, Lynch RM, Gautam R, Matus-Nicodemos R, Schmidt SD, Boswell KL, Darko S, Wong P, Sheng Z, Petrovas C, McDermott AB, Seder RA, Keele BF, Shapiro L, Douek DC, Nishimura Y, Mascola JR, Martin MA, Koup RA.** 2015. Quality and quantity of TFH cells are critical for broad antibody development in SHIVAD8 infection. *Sci Transl Med* **7**:298ra120.
536. **Moris A, Pajot A, Blanchet F, Guivel-Benhassine F, Salcedo M, Schwartz O.** 2006. Dendritic cells and HIV-specific CD4+ T cells: HIV antigen presentation, T-cell activation, and viral transfer. *Blood* **108**:1643-1651.

537. **Candotti D, Costagliola D, Joberty C, Bonduelle O, Rouzioux C, Autran B, Agut H.** 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.
538. **Okulicz JF, Marconi VC, Landrum ML, Wegner S, Weintrob A, Ganesan A, Hale B, Crum-Cianflone N, Delmar J, Barthel V, Quinnan G, Agan BK, Dolan MJ.** 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.
539. **Deeks SG, Walker BD.** 2007. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity* **27**:406-416.
540. **Grabar S, Selinger-Leneman H, Abgrall S, Pialoux G, Weiss L, Costagliola D.** 2009. Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV. *AIDS* **23**:1163-1169.
541. **Okulicz JF, Lambotte O.** 2011. Epidemiology and clinical characteristics of elite controllers. *Curr Opin HIV AIDS* **6**:163-168.
542. **Okulicz JF, Marconi VC, Landrum ML, Wegner S, Weintrob A, Ganesan A, Hale B, Crum-Cianflone N, Delmar J, Barthel V, Quinnan G, Agan BK, Dolan MJ, Infectious Disease Clinical Research Program HIVWG.** 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.
543. **Walker BD.** 2007. Elite control of HIV Infection: implications for vaccines and treatment. *Top HIV Med* **15**:134-136.
544. **Sauce D, Larsen M, Fastenackels S, Pauchard M, Ait-Mohand H, Schneider L, Guihot A, Boufassa F, Zaunders J, Iguertsira M, Bailey M, Gorochov G, Duvivier C, Carcelain G, Kelleher AD, Simon A, Meyer L, Costagliola D, Deeks SG, Lambotte O, Autran B, Hunt PW, Katlama C, Appay V.** 2011. HIV disease progression despite suppression of viral replication is associated with exhaustion of lymphopoiesis. *Blood* **117**:5142-5151.
545. **Yang Y, Al-Mozaini M, Buzon MJ, Beamon J, Ferrando-Martinez S, Ruiz-Mateos E, Rosenberg ES, Pereyra F, Yu XG, Lichterfeld M.** 2012. CD4 T-cell regeneration in HIV-1 elite controllers. *AIDS* **26**:701-706.
546. **Pereyra F, Palmer S, Miura T, Block BL, Wiegand A, Rothchild AC, Baker B, Rosenberg R, Cutrell E, Seaman MS, Coffin JM, Walker BD.** 2009. Persistent low-level viremia in HIV-1 elite controllers and relationship to immunologic parameters. *J Infect Dis* **200**:984-990.
547. **Dinoso JB, Kim SY, Wiegand AM, Palmer SE, Gange SJ, Cranmer L, O'Shea A, Callender M, Spivak A, Brennan T, Kearney MF, Proschan MA, Mican JM, Rehm CA, Coffin JM, Mellors JW, Siliciano RF, Maldarelli F.** 2009. Treatment intensification does not reduce residual HIV-1 viremia in patients on highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:9403-9408.
548. **Hatano H, Delwart EL, Norris PJ, Lee TH, Dunn-Williams J, Hunt PW, Hoh R, Stramer SL, Linnen JM, McCune JM, Martin JN, Busch MP, Deeks SG.** 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.

549. **Mens H, Kearney M, Wiegand A, Shao W, Schonning K, Gerstoft J, Obel N, Maldarelli F, Mellors JW, Benfield T, Coffin JM.** 2010. HIV-1 continues to replicate and evolve in patients with natural control of HIV infection. *J Virol* **84**:12971-12981.
550. **Yao XD, Omange RW, Henrick BM, Lester RT, Kimani J, Ball TB, Plummer FA, Rosenthal KL.** 2013. Acting locally: innate mucosal immunity in resistance to HIV-1 infection in Kenyan commercial sex workers. *Mucosal Immunol* **7**:268-279.
551. **Goujard C, Chaix ML, Lambotte O, Deveau C, Sinet M, Guernon J, Cournaud V, Rouzioux C, Delfraissy JF, Venet A, Meyer L, Agence Nationale de Recherche sur le Sida PSG.** 2009. Spontaneous control of viral replication during primary HIV infection: when is "HIV controller" status established? *Clin Infect Dis* **49**:982-986.
552. **Madec Y, Boufassa F, Porter K, Prins M, Sabin C, Monforte AD, Amornkul P, Bartmeyer B, Sannes M, Venet A, Lambotte O, Meyer L, on behalf of the CCIE.** 2013. Natural History of HIV control since seroconversion. *AIDS* **27**:2451-2460.
553. **Miura T, Brumme ZL, Brockman MA, Rosato P, Sela J, Brumme CJ, Pereyra F, Kaufmann DE, Trocha A, Block BL, Daar ES, Connick E, Jessen H, Kelleher AD, Rosenberg E, Markowitz M, Schafer K, Vaida F, Iwamoto A, Little S, Walker BD.** 2010. Impaired replication capacity of acute/early viruses in persons who become HIV controllers. *J Virol* **84**:7581-7591.
554. **Madec Y, Boufassa F, Rouzioux C, Delfraissy JF, Meyer L, Group SS.** 2005. Undetectable viremia without antiretroviral therapy in patients with HIV seroconversion: an uncommon phenomenon? *Clin Infect Dis* **40**:1350-1354.
555. **Boufassa F, Saez-Cirion A, Lechenadec J, Zucman D, Avettand-Fenoel V, Venet A, Rouzioux C, Delfraissy JF, Lambotte O, Meyer L, Group AEHCS.** 2011. CD4 dynamics over a 15 year-period among HIV controllers enrolled in the ANRS French observatory. *PLoS One* **6**:e18726.
556. **Noel N, Lerolle N, Lecuroux C, Goujard C, Venet A, Saez-Cirion A, Avettand-Fenoel V, Meyer L, Boufassa F, Lambotte O, group ACCs.** 2015. Immunologic and Virologic Progression in HIV Controllers: The Role of Viral "Blips" and Immune Activation in the ANRS CO21 CODEX Study. *PLoS One* **10**:e0131922.
557. **Alexander L, Weiskopf E, Greenough TC, Gaddis NC, Auerbach MR, Malim MH, O'Brien SJ, Walker BD, Sullivan JL, Desrosiers RC.** 2000. Unusual polymorphisms in human immunodeficiency virus type 1 associated with nonprogressive infection. *J Virol* **74**:4361-4376.
558. **Mariani R, Kirchhoff F, Greenough TC, Sullivan JL, Desrosiers RC, Skowronski J.** 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.
559. **Michael NL, Chang G, d'Arcy LA, Ehrenberg PK, Mariani R, Busch MP, Bix DL, Schwartz DH.** 1995. Defective accessory genes in a human immunodeficiency virus type 1-infected long-term survivor lacking recoverable virus. *J Virol* **69**:4228-4236.
560. **Miura T, Brockman MA, Brumme CJ, Brumme ZL, Carlson JM, Pereyra F, Trocha A, Addo MM, Block BL, Rothchild AC, Baker BM, Flynn T, Schneidewind A, Li B, Wang YE, Heckerman D, Allen TM, Walker BD.** 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.

561. **Bailey JR, O'Connell K, Yang HC, Han Y, Xu J, Jilek B, Williams TM, Ray SC, Siliciano RF, Blankson JN.** 2008. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a patient who developed AIDS to an elite suppressor. *J Virol* **82**:7395-7410.
562. **Buckheit RW, 3rd, Allen TG, Alme A, Salgado M, O'Connell KA, Huculak S, Falade-Nwulia O, Williams TM, Gallant JE, Siliciano RF, Blankson JN.** 2012. Host factors dictate control of viral replication in two HIV-1 controller/chronic progressor transmission pairs. *Nat Commun* **3**:716.
563. **Migueles SA, Sabbaghian MS, Shupert WL, Bettinotti MP, Marincola FM, Martino L, Hallahan CW, Selig SM, Schwartz D, Sullivan J, Connors M.** 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.
564. **Pereyra F, Addo MM, Kaufmann DE, Liu Y, Miura T, Rathod A, Baker B, Trocha A, Rosenberg R, Mackey E, Ueda P, Lu Z, Cohen D, Wrin T, Petropoulos CJ, Rosenberg ES, Walker BD.** 2008. Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *J Infect Dis* **197**:563-571.
565. **Honeyborne I, Prendergast A, Pereyra F, Leslie A, Crawford H, Payne R, Reddy S, Bishop K, Moodley E, Nair K, van der Stok M, McCarthy N, Rousseau CM, Addo M, Mullins JI, Brander C, Kiepiela P, Walker BD, Goulder PJ.** 2007. Control of human immunodeficiency virus type 1 is associated with HLA-B*13 and targeting of multiple gag-specific CD8+ T-cell epitopes. *J Virol* **81**:3667-3672.
566. **Ntale RS, Chopera DR, Ngandu NK, Assis de Rosa D, Zembe L, Gamielien H, Mlotshwa M, Werner L, Woodman Z, Mlisana K, Abdool Karim S, Gray CM, Williamson C, Team CS.** 2012. Temporal association of HLA-B*81:01- and HLA-B*39:10-mediated HIV-1 p24 sequence evolution with disease progression. *J Virol* **86**:12013-12024.
567. **Lecuroux C, Saez-Cirion A, Girault I, Versmisse P, Boufassa F, Avettand-Fenoel V, Rouzioux C, Meyer L, Pancino G, Lambotte O, Sinet M, Venet A.** 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.
568. **Huang J, Goedert JJ, Sundberg EJ, Cung TD, Burke PS, Martin MP, Preiss L, Lifson J, Lichterfeld M, Carrington M, Yu XG.** 2009. HLA-B*35-Px-mediated acceleration of HIV-1 infection by increased inhibitory immunoregulatory impulses. *J Exp Med* **206**:2959-2966.
569. **Stephens HA.** 2005. HIV-1 diversity versus HLA class I polymorphism. *Trends Immunol* **26**:41-47.
570. **Fellay J, Shianna KV, Ge D, Colombo S, Ledergerber B, Weale M, Zhang K, Gumbs C, Castagna A, Cossarizza A, Cozzi-Lepri A, De Luca A, Easterbrook P, Francioli P, Mallal S, Martinez-Picado J, Miro JM, Obel N, Smith JP, Wyniger J, Descombes P, Antonarakis SE, Letvin NL, McMichael AJ, Haynes BF, Telenti A, Goldstein DB.** 2007. A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1. *Science* **317**:944-947.
571. **Guergnon J, Dalmaso C, Broet P, Meyer L, Westrop SJ, Imami N, Vicenzi E, Morsica G, Tinelli M, Zanone Poma B, Goujard C, Potard V, Gotch FM, Casoli C, Cossarizza A, Macciardi F, Debre P, Delfraissy JF, Galli M, Autran B, Costagliola D, Poli G, Theodorou I, Riva A, Consortium G.** 2012. Single-nucleotide polymorphism-defined class I and class III major histocompatibility

- complex genetic subregions contribute to natural long-term nonprogression in HIV infection. *J Infect Dis* **205**:718-724.
572. **Thomas R, Apps R, Qi Y, Gao X, Male V, O'HUigin C, O'Connor G, Ge D, Fellay J, Martin JN, Margolick J, Goedert JJ, Buchbinder S, Kirk GD, Martin MP, Telenti A, Deeks SG, Walker BD, Goldstein D, McVicar DW, Moffett A, Carrington M.** 2009. HLA-C cell surface expression and control of HIV/AIDS correlate with a variant upstream of HLA-C. *Nat Genet* **41**:1290-1294.
573. **Ferre AL, Hunt PW, McConnell DH, Morris MM, Garcia JC, Pollard RB, Yee HF, Jr., Martin JN, Deeks SG, Shacklett BL.** 2010. HIV controllers with HLA-DRB1*13 and HLA-DQB1*06 alleles have strong, polyfunctional mucosal CD4+ T-cell responses. *J Virol* **84**:11020-11029.
574. **Malhotra U, Holte S, Dutta S, Berrey MM, Delpit E, Koelle DM, Sette A, Corey L, McElrath MJ.** 2001. Role for HLA class II molecules in HIV-1 suppression and cellular immunity following antiretroviral treatment. *J Clin Invest* **107**:505-517.
575. **Julg B, Moodley ES, Qi Y, Ramduth D, Reddy S, Mncube Z, Gao X, Goulder PJ, Detels R, Ndung'u T, Walker BD, Carrington M.** 2011. Possession of HLA class II DRB1*1303 associates with reduced viral loads in chronic HIV-1 clade C and B infection. *J Infect Dis* **203**:803-809.
576. **Ranasinghe S, Cutler S, Davis I, Lu R, Soghoian DZ, Qi Y, Sidney J, Kranias G, Flanders MD, Lindqvist M, Kuhl B, Alter G, Deeks SG, Walker BD, Gao X, Sette A, Carrington M, Streeck H.** 2013. Association of HLA-DRB1-restricted CD4 T cell responses with HIV immune control. *Nat Med* doi:10.1038/nm.3229.
577. **Quigley M, Pereyra F, Nilsson B, Porichis F, Fonseca C, Eichbaum Q, Julg B, Jesneck JL, Brosnahan K, Imam S, Russell K, Toth I, Piechocka-Trocha A, Dolfi D, Angelosanto J, Crawford A, Shin H, Kwon DS, Zupkosky J, Francisco L, Freeman GJ, Wherry EJ, Kaufmann DE, Walker BD, Ebert B, Haining WN.** 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.
578. **Yan J, Sabbaj S, Bansal A, Amatya N, Shacka JJ, Goepfert PA, Heath SL.** 2013. HIV-specific CD8+ T cells from elite controllers are primed for survival. *J Virol* **87**:5170-5181.
579. **Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, Sabbaghian MS, Rabin R, Hallahan 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.
580. **Lichterfeld M, Mou D, Cung TD, 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.
581. **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.
582. **Ndhlovu ZM, Proudfoot J, Cesa K, Alvino DM, McMullen A, Vine S, Stampouloglou E, Piechocka-Trocha A, Walker BD, Pereyra F.** 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.

583. **Saez-Cirion A, Lacabaratz C, Lambotte O, Vermisse P, Urrutia A, Boufassa F, Barre-Sinoussi F, Delfraissy J, Sinet M, Pancino G, Venet A, ANRS EP36 HIV CONTROLLERS study group.** 2007. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar CTL activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:6776-6781.
584. **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.
585. **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.
586. **Shan L, Deng K, Shroff NS, Durand CM, Rabi SA, Yang HC, Zhang H, Margolick JB, Blankson JN, Silciano RF.** 2012. Stimulation of HIV-1-specific cytolytic T lymphocytes facilitates elimination of latent viral reservoir after virus reactivation. *Immunity* **36**:491-501.
587. **Ferre AL, Hunt PW, Critchfield JW, Young DH, Morris MM, Garcia JC, Pollard RB, Yee HF, Jr., Martin JN, Deeks SG, Shacklett BL.** 2009. Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers: a potential correlate of immune control. *Blood* **113**:3978-3989.
588. **Edwards BH, Bansal A, Sabbaj S, Bakari J, Mulligan MJ, Goepfert PA.** 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.
589. **Kiepiela P, Ngumbela K, Thobakgale C, Ramduth D, Honeyborne I, Moodley E, Reddy S, de Pierres C, Mncube Z, Mkhwanazi N, Bishop K, van der Stok M, Nair K, Khan N, Crawford H, Payne R, Leslie A, Prado J, Prendergast A, Frater J, McCarthy N, Brander C, Learn GH, Nickle D, Rousseau C, Coovadia H, Mullins JI, Heckerman D, Walker BD, Goulder P.** 2007. CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat Med* **13**:46-53.
590. **Zuniga R, Lucchetti A, Galvan P, Sanchez S, Sanchez C, Hernandez A, Sanchez H, Frahm N, Linde CH, Hewitt HS, Hildebrand W, Altfeld M, Allen TM, Walker BD, Korber BT, Leitner T, Sanchez J, Brander C.** 2006. Relative dominance of Gag p24-specific cytotoxic T lymphocytes is associated with human immunodeficiency virus control. *J Virol* **80**:3122-3125.
591. **Saez-Cirion A, Sinet M, Shin SY, Urrutia A, Vermisse P, Lacabaratz C, Boufassa F, Avettand-Fenoel V, Rouzioux C, Delfraissy JF, Barre-Sinoussi F, Lambotte O, Venet A, Pancino G.** 2009. Heterogeneity in HIV suppression by CD8 T cells from HIV controllers: association with Gag-specific CD8 T cell responses. *J Immunol* **182**:7828-7837.
592. **Julg B, Williams KL, Reddy S, Bishop K, Qi Y, Carrington M, Goulder PJ, Ndung'u T, Walker BD.** 2010. Enhanced anti-HIV functional activity associated with Gag-specific CD8 T-cell responses. *J Virol* doi:JVI.02031-09 [pii] 10.1128/JVI.02031-09.
593. **Almeida JR, Price DA, Papagno L, Arkoub ZA, Sauce D, Bornstein E, Asher TE, Samri A, Schnuriger A, Theodorou I, Costagliola D, Rouzioux C, Agut H, Marcelin AG, Douek D, Autran B, Appay V.** 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.
594. **Mothe B, Llano A, Ibarrodo J, Zamarreno J, Schiaulini M, Miranda C, Ruiz-Riol M, Berger CT, Herrero MJ, Palou E, Plana M, Rolland M, Khatri A, Heckerman D, Pereyra F, Walker BD, Weiner D, Paredes R, Clotet B, Felber BK, Pavlakis GN, Mullins JI, Brander C.** 2012. CTL responses of high functional avidity and broad variant cross-reactivity are associated with HIV control. *PLoS One* **7**:e29717.
595. **Almeida JR, Sauce D, Price DA, Papagno L, Shin SY, Moris A, Larsen M, Pancino G, Douek DC, Autran B, Saez-Cirion A, Appay V.** 2009. Antigen sensitivity is a major determinant of CD8+ T-cell polyfunctionality and HIV-suppressive activity. *Blood* **113**:6351-6360.
596. **Berger CT, Frahm N, Price DA, Mothe B, Ghebremichael M, Hartman KL, Henry LM, Brenchley JM, Ruff LE, Venturi V, Pereyra F, Sidney J, Sette A, Douek DC, Walker BD, Kaufmann DE, Brander C.** 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.
597. **Iglesias MC, Almeida JR, Fastenackels S, van Bockel DJ, Hashimoto M, Venturi V, Gostick E, Urrutia A, Wooldridge L, Clement M, Gras S, Wilmann PG, Autran B, Moris A, Rossjohn J, Davenport MP, Takiguchi M, Brander C, Douek DC, Kelleher AD, Price DA, Appay V.** 2011. Escape from highly effective public CD8+ T-cell clonotypes by HIV. *Blood* doi:10.1182/blood-2011-01-328781.
598. **Price DA, Asher TE, Wilson NA, Nason MC, Brenchley JM, Metzler IS, Venturi V, Gostick E, Chattopadhyay PK, Roederer M, Davenport MP, Watkins DI, Douek DC.** 2009. Public clonotype usage identifies protective Gag-specific CD8+ T cell responses in SIV infection. *J Exp Med* **206**:923-936.
599. **Lambotte O, Ferrari G, Moog C, Yates NL, Liao HX, Parks RJ, Hicks CB, Owzar K, Tomaras GD, Montefiori DC, Haynes BF, Delfraissy JF.** 2009. Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. *AIDS* **23**:897-906.
600. **Ackerman ME, Mikhailova A, Brown EP, Dowell KG, Walker BD, Bailey-Kellogg C, Suscovich TJ, Alter G.** 2016. Polyfunctional HIV-Specific Antibody Responses Are Associated with Spontaneous HIV Control. *PLoS Pathog* **12**:e1005315.
601. **Doria-Rose NA, Klein RM, Daniels MG, O'Dell S, Nason M, Lapedes A, Bhattacharya T, Migueles SA, Wyatt RT, Korber BT, Mascola JR, Connors M.** 2010. Breadth of human immunodeficiency virus-specific neutralizing activity in sera: clustering analysis and association with clinical variables. *J Virol* **84**:1631-1636.
602. **Li Y, Migueles SA, Welcher B, Svehla K, Phogat A, Louder MK, Wu X, Shaw GM, Connors M, Wyatt RT, Mascola JR.** 2007. Broad HIV-1 neutralization mediated by CD4-binding site antibodies. *Nat Med* **13**:1032-1034.
603. **Dugast AS, Arnold K, Lofano G, Moore S, Hoffner M, Simek M, Poignard P, Seaman M, Suscovich TJ, Pereyra F, Walker BD, Lauffenburger D, Kwon DS, Keele BF, Alter G.** 2017. Virus-driven Inflammation Is Associated With the Development of bNAbs in Spontaneous Controllers of HIV. *Clin Infect Dis* **64**:1098-1104.

604. **Pernas M, Casado C, Sandonis V, Arcones C, Rodriguez C, Ruiz-Mateos E, Ramirez de Arellano E, Rallon N, Del Val M, Grau E, Lopez-Vazquez M, Leal M, Del Romero J, Lopez Galindez C.** 2013. Prevalence of HIV-1 dual infection in LTNP-Elite Controllers. *J Acquir Immune Defic Syndr* doi:10.1097/QAI.0b013e31829bdc85.
605. **Scheid JF, Mouquet H, Feldhahn N, Seaman MS, Velinzon K, Pietzsch J, Ott RG, Anthony RM, Zebroski H, Hurley A, Phogat A, Chakrabarti B, Li Y, Connors M, Pereyra F, Walker BD, Wardemann H, Ho D, Wyatt RT, Mascola JR, Ravetch JV, Nussenzweig MC.** 2009. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature* **458**:636-640.
606. **Scheid JF, Mouquet H, Feldhahn N, Walker BD, Pereyra F, Cutrell E, Seaman MS, Mascola JR, Wyatt RT, Wardemann H, Nussenzweig MC.** 2009. A method for identification of HIV gp140 binding memory B cells in human blood. *J Immunol Methods* **343**:65-67.
607. **Scheid JF, Mouquet H, Ueberheide B, Diskin R, Klein F, Oliveira TY, Pietzsch J, Fenyo D, Abadir A, Velinzon K, Hurley A, Myung S, Boulad F, Poignard P, Burton DR, Pereyra F, Ho DD, Walker BD, Seaman MS, Bjorkman PJ, Chait BT, Nussenzweig MC.** 2011. Sequence and structural convergence of broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding. *Science* **333**:1633-1637.
608. **Pensiero S, Galli L, Nozza S, Ruffin N, Castagna A, Tambussi G, Hejdeman B, Misciagna D, Riva A, Malnati M, Chiodi F, Scarlatti G.** 2013. B-cell subset alterations and correlated factors in HIV-1 infection. *AIDS* **27**:1209-1217.
609. **Buckner CM, Kardava L, Zhang X, Gittens K, Justement JS, Kovacs C, McDermott AB, Li Y, Sajadi MM, Chun TW, Fauci AS, Moir S.** 2016. Maintenance of HIV-Specific Memory B-Cell Responses in Elite Controllers Despite Low Viral Burdens. *J Infect Dis* **214**:390-398.
610. **Cubas R, van Grevenynghe J, Wills S, Kardava L, Santich BH, Buckner CM, Muir R, Tardif V, Nichols C, Procopio F, He Z, Metcalf T, Ghneim K, Locci M, Ancuta P, Routy JP, Trautmann L, Li Y, McDermott AB, Koup RA, Petrovas C, Migueles SA, Connors M, Tomaras GD, Moir S, Crotty S, Haddad EK.** 2015. Reversible Reprogramming of Circulating Memory T Follicular Helper Cell Function during Chronic HIV Infection. *J Immunol* **195**:5625-5636.
611. **Buranapraditkun S, Pissani F, Teigler JE, Schultz BT, Alter G, Marovich M, Robb ML, Eller MA, Martin J, Deeks S, Michael NL, Streeck H.** 2017. Preservation of Peripheral T Follicular Helper Cell Function in HIV Controllers. *J Virol* **91**.
612. **Bussmann BM, Reiche S, Bieniek B, Krznaric I, Ackermann F, Jassoy C.** 2010. Loss of HIV-specific memory B-cells as a potential mechanism for the dysfunction of the humoral immune response against HIV. *Virology* **397**:7-13.
613. **Rouers A, Klingler J, Su B, Samri A, Laumond G, Even S, Avettand-Fenoel V, Richetta C, Paul N, Boufassa F, Hocqueloux L, Mouquet H, Rouzioux C, Lambotte O, Autran B, Graff-Dubois S, Moog C, Moris A, Cohort AC.** 2017. HIV-Specific B Cell Frequency Correlates with Neutralization Breadth in Patients Naturally Controlling HIV-Infection. *EBioMedicine* **21**:158-169.
614. **Lichterfeld M, Pantaleo G, Altfeld M.** 2005. Loss of HIV-1-specific T cell proliferation in chronic HIV-1 infection: cause or consequence of viral replication? *AIDS* **19**:1225-1227.

615. **Hunt PW, Hatano H, Sinclair E, Lee TH, Busch MP, Martin JN, McCune JM, Deeks SG.** 2011. HIV-specific CD4+ T cells may contribute to viral persistence in HIV controllers. *Clin Infect Dis* **52**:681-687.
616. **Staprans SI, Barry AP, Silvestri G, Safrit JT, Kozyr N, Sumpter B, Nguyen H, McClure H, Montefiori D, Cohen JI, Feinberg MB.** 2004. Enhanced SIV replication and accelerated progression to AIDS in macaques primed to mount a CD4 T cell response to the SIV envelope protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:13026-13031.
617. **Ranasinghe S, Flanders M, Cutler S, Soghoian DZ, Ghebremichael M, Davis I, Lindqvist M, Pereyra F, Walker BD, Heckerman D, Streeck H.** 2012. HIV-specific CD4 T cell responses to different viral proteins have discordant associations with viral load and clinical outcome. *J Virol* **86**:277-283.
618. **Seth N, Kaufmann D, Lahey T, Rosenberg ES, Wucherpfennig KW.** 2005. Expansion and contraction of HIV-specific CD4 T cells with short bursts of viremia, but physical loss of the majority of these cells with sustained viral replication. *J Immunol* **175**:6948-6958.
619. **Lubong Sabado R, Kavanagh DG, Kaufmann DE, Fru K, Babcock E, Rosenberg E, Walker B, Lifson J, Bhardwaj N, Larsson M.** 2009. In vitro priming recapitulates in vivo HIV-1 specific T cell responses, revealing rapid loss of virus reactive CD4 T cells in acute HIV-1 infection. *PLoS One* **4**:e4256.
620. **Emu B, Sinclair E, Favre D, Moretto WJ, Hsue P, Hoh R, Martin JN, Nixon DF, McCune JM, Deeks SG.** 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.
621. **Dyer WB, Zaunders JJ, Yuan FF, Wang B, Learmont JC, Geczy AF, Saksena NK, McPhee DA, Gorry PR, Sullivan JS.** 2008. Mechanisms of HIV non-progression; robust and sustained CD4+ T-cell proliferative responses to p24 antigen correlate with control of viraemia and lack of disease progression after long-term transfusion-acquired HIV-1 infection. *Retrovirology* **5**:112.
622. **Younes SA, Yassine-Diab B, Dumont AR, Boulassel MR, Grossman Z, Routy JP, Sekaly RP.** 2003. HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity. *J Exp Med* **198**:1909-1922.
623. **Vingert B, Perez-Patrigeon S, Jeannin P, Lambotte O, Boufassa F, Lemaitre F, Kwok WW, Theodorou I, Delfraissy JF, Theze J, Chakrabarti LA, Group AEHCS.** 2010. HIV controller CD4+ T cells respond to minimal amounts of Gag antigen due to high TCR avidity. *PLoS Pathog* **6**:e1000780.
624. **Vingert B, Benati D, Lambotte O, de Truchis P, Slama L, Jeannin P, Galperin M, Perez-Patrigeon S, Boufassa F, Kwok WW, Lemaitre F, Delfraissy JF, Theze J, Chakrabarti LA.** 2012. HIV controllers maintain a population of highly efficient Th1 effector cells in contrast to patients treated in the long term. *J Virol* **86**:10661-10674.
625. **Laher F, Ranasinghe S, Porichis F, Mewalal N, Pretorius K, Ismail N, Buus S, Stryhn A, Carrington M, Walker BD, Ndung'u T, Ndhlovu ZM.** 2017. HIV Controllers Exhibit Enhanced Frequencies of Major Histocompatibility Complex Class II Tetramer+ Gag-Specific CD4+ T Cells in Chronic Clade C HIV-1 Infection. *J Virol* **91**.

626. **Owen RE, Heitman JW, Hirschhorn DF, Lanteri MC, Biswas HH, Martin JN, Krone MR, Deeks SG, Norris PJ, Immunology NCFHAV.** 2010. HIV+ elite controllers have low HIV-specific T-cell activation yet maintain strong, polyfunctional T-cell responses. *AIDS* **24**:1095-1105.
627. **Van Braeckel E, Desombere I, Clement F, Vandekerckhove L, Verhofstede C, Vogelaers D, Leroux-Roels G.** 2013. Polyfunctional CD4(+) T cell responses in HIV-1-infected viral controllers compared with those in healthy recipients of an adjuvanted polyprotein HIV-1 vaccine. *Vaccine* **31**:3739-3746.
628. **van Grevenynghe J, Procopio FA, He Z, Chomont N, Riou C, Zhang Y, Gimmig S, Boucher G, Wilkinson P, Shi Y, Yassine-Diab B, Said EA, Trautmann L, El Far M, Balderas RS, Boulassel MR, Routy JP, Haddad EK, Sekaly RP.** 2008. Transcription factor FOXO3a controls the persistence of memory CD4(+) T cells during HIV infection. *Nat Med* **14**:266-274.
629. **Kaufmann DE, Kavanagh DG, Pereyra F, Zaunders JJ, Mackey EW, Miura T, Palmer S, Brockman M, Rathod A, Piechocka-Trocha A, Baker B, Zhu B, Le Gall S, Waring MT, Ahern R, Moss K, Kelleher AD, Coffin JM, Freeman GJ, Rosenberg ES, Walker BD.** 2007. Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat Immunol* **8**:1246-1254.
630. **Williams MA, Ravkov EV, Bevan MJ.** 2008. Rapid culling of the CD4+ T cell repertoire in the transition from effector to memory. *Immunity* **28**:533-545.
631. **Zehn D, Lee SY, Bevan MJ.** 2009. Complete but curtailed T-cell response to very low-affinity antigen. *Nature* **458**:211-214.
632. **Alexander-Miller MA.** 2005. High-avidity CD8+ T cells: optimal soldiers in the war against viruses and tumors. *Immunol Res* **31**:13-24.
633. **Neveu B, Debeaupuis E, Echasserieau K, le Moullac-Vaidye B, Gassin M, Jegou L, Decalf J, Albert M, Ferry N, Gournay J, Houssaint E, Bonneville M, Saulquin X.** 2008. Selection of high-avidity CD8 T cells correlates with control of hepatitis C virus infection. *Hepatology* **48**:713-722.
634. **Kuchen S, Robbins R, Sims GP, Sheng C, Phillips TM, Lipsky PE, Ettinger R.** 2007. Essential role of IL-21 in B cell activation, expansion, and plasma cell generation during CD4+ T cell-B cell collaboration. *J Immunol* **179**:5886-5896.
635. **Monteleone G, Pallone F, MacDonald TT.** 2008. Interleukin-21: a critical regulator of the balance between effector and regulatory T-cell responses. *Trends Immunol* **29**:290-294.
636. **Zeng R, Spolski R, Finkelstein SE, Oh S, Kovanen PE, Hinrichs CS, Pise-Masison CA, Radonovich MF, Brady JN, Restifo NP, Berzofsky JA, Leonard WJ.** 2005. Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. *J Exp Med* **201**:139-148.
637. **Elsaesser H, Sauer K, Brooks DG.** 2009. IL-21 is required to control chronic viral infection. *Science* **324**:1569-1572.
638. **Frohlich A, Kisielow J, Schmitz I, Freigang S, Shamshiev AT, Weber J, Marsland BJ, Oxenius A, Kopf M.** 2009. IL-21R on T cells is critical for sustained functionality and control of chronic viral infection. *Science* **324**:1576-1580.
639. **Yi JS, Du M, Zajac AJ.** 2009. A vital role for interleukin-21 in the control of a chronic viral infection. *Science* **324**:1572-1576.
640. **Iannello A, Boulassel MR, Samarani S, Debbeche O, Tremblay C, Toma E, Routy JP, Ahmad A.** 2010. Dynamics and consequences of IL-21 production in

- HIV-infected individuals: a longitudinal and cross-sectional study. *J Immunol* **184**:114-126.
641. **Iannello A, Tremblay C, Routy JP, Boulassel MR, Toma E, Ahmad A.** 2008. Decreased levels of circulating IL-21 in HIV-infected AIDS patients: correlation with CD4+ T-cell counts. *Viral Immunol* **21**:385-388.
642. **Yue FY, Lo C, Sakhdari A, Lee EY, Kovacs CM, Benko E, Liu J, Song H, Jones RB, Sheth P, Chege D, Kaul R, Ostrowski MA.** 2010. HIV-specific IL-21 producing CD4+ T cells are induced in acute and chronic progressive HIV infection and are associated with relative viral control. *J Immunol* **185**:498-506.
643. **Chevalier MF, Julg B, Pyo A, Flanders M, Ranasinghe S, Soghoian DZ, Kwon DS, Rychert J, Lian J, Muller MI, Cutler S, McAndrew E, Jessen H, Pereyra F, Rosenberg ES, Altfeld M, Walker BD, Streeck H.** 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.
644. **Norris PJ, Moffett HF, Yang OO, Kaufmann DE, Clark MJ, Addo MM, Rosenberg ES.** 2004. Beyond help: direct effector functions of human immunodeficiency virus type 1-specific CD4(+) T cells. *J Virol* **78**:8844-8851.
645. **Zaunders JJ, Dyer WB, Wang B, Munier ML, Miranda-Saksena M, Newton R, Moore J, Mackay CR, Cooper DA, Saksena NK, Kelleher AD.** 2004. Identification of circulating antigen-specific CD4+ T lymphocytes with a CCR5+, cytotoxic phenotype in an HIV-1 long-term nonprogressor and in CMV infection. *Blood* **103**:2238-2247.
646. **Johnson S, Eller M, Teigler JE, Maloveste SM, Schultz BT, Soghoian DZ, Lu R, Oster AF, Chenine AL, Alter G, Dittmer U, Marovich M, Robb ML, Michael NL, Bolton D, Streeck H.** 2015. Cooperativity of HIV-specific cytolytic CD4+ T cells and CD8+ T cells in control of HIV viremia. *J Virol* doi:10.1128/JVI.00438-15.
647. **Sacha JB, Giraldo-Vela JP, Buechler MB, Martins MA, Maness NJ, Chung C, Wallace LT, Leon EJ, Friedrich TC, Wilson NA, Hiraoka A, Watkins DI.** 2009. Gag- and Nef-specific CD4+ T cells recognize and inhibit SIV replication in infected macrophages early after infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:9791-9796.
648. **Gauduin MC, Yu Y, Barabasz A, Carville A, Piatak M, Lifson JD, Desrosiers RC, Johnson RP.** 2006. Induction of a virus-specific effector-memory CD4+ T cell response by attenuated SIV infection. *J Exp Med* **203**:2661-2672.
649. **Martin-Gayo E, Cronin J, Hickman T, Ouyang Z, Lindqvist M, Kolb KE, Schulze Zur Wiesch J, Cubas R, Porichis F, Shalek AK, van Lunzen J, Haddad EK, Walker BD, Kaufmann DE, Lichterfeld M, Yu XG.** 2017. Circulating CXCR5+CXCR3+PD-1lo Tfh-like cells in HIV-1 controllers with neutralizing antibody breadth. *JCI Insight* **2**:e89574.
650. **Chen H, Li C, Huang J, Cung T, Seiss K, Beamon J, Carrington MF, Porter LC, Burke PS, Yang Y, Ryan BJ, Liu R, Weiss RH, Pereyra F, Cress WD, Brass AL, Rosenberg ES, Walker BD, Yu XG, Lichterfeld M.** 2011. CD4+ T cells from elite controllers resist HIV-1 infection by selective upregulation of p21. *J Clin Invest* **121**:1549-1560.
651. **Saez-Cirion A, Hamimi C, Bergamaschi A, David A, Versmisse P, Melard A, Boufassa F, Barre-Sinoussi F, Lambotte O, Rouzioux C, Pancino G, Cohort AC.** 2011. Restriction of HIV-1 replication in macrophages and CD4+ T cells from HIV controllers. *Blood* **118**:955-964.

652. **Walker WE, Kurscheid S, Joshi S, Lopez CA, Goh G, Choi M, Barakat L, Francis J, Fisher A, Kozal M, Zapata H, Shaw A, Lifton R, Sutton RE, Fikrig E.** 2015. Increased Levels of Macrophage Inflammatory Proteins Result in Resistance to R5-Tropic HIV-1 in a Subset of Elite Controllers. *J Virol* **89**:5502-5514.
653. **Meijerink H, Indrati AR, Soedarmo S, Utami F, de Jong CA, Alisjahbana B, van Crevel R, Wisaksana R, Van der Ven AJ.** 2015. Heroin use in Indonesia is associated with higher expression of CCR5 on CD4+ cells and lower ex-vivo production of CCR5 ligands. *AIDS* **29**:385-388.
654. **Noel N, Pena R, David A, Avettand-Fenoel V, Erkizia I, Jimenez E, Lecuroux C, Rouzioux C, Boufassa F, Pancino G, Venet A, Van Lint C, Martinez-Picado J, Lambotte O, Saez-Cirion A, Prado JG.** 2016. Long-Term Spontaneous Control of HIV-1 Is Related to Low Frequency of Infected Cells and Inefficient Viral Reactivation. *J Virol* **90**:6148-6158.
655. **Rabi SA, O'Connell KA, Nikolaeva D, Bailey JR, Jilek BL, Shen L, Page KR, Siliciano RF, Blankson JN.** 2011. Unstimulated primary CD4+ T cells from HIV-1-positive elite suppressors are fully susceptible to HIV-1 entry and productive infection. *J Virol* **85**:979-986.
656. **O'Connell KA, Rabi SA, Siliciano RF, Blankson JN.** 2011. CD4+ T cells from elite suppressors are more susceptible to HIV-1 but produce fewer virions than cells from chronic progressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:E689-698.
657. **Graff-Dubois S, Rouers A, Moris A.** 2016. Impact of Chronic HIV/SIV Infection on T Follicular Helper Cell Subsets and Germinal Center Homeostasis. *Front Immunol* **7**:501.
658. **Benati D, Galperin M, Lambotte O, Gras S, Lim A, Mukhopadhyay M, Nouel A, Campbell KA, Lemercier B, Claireaux M, Hendou S, Lechat P, de Truchis P, Boufassa F, Rossjohn J, Delfraissy JF, Arenzana-Seisdedos F, Chakrabarti LA.** 2016. Public T cell receptors confer high-avidity CD4 responses to HIV controllers. *J Clin Invest* **126**:2093-2108.
659. **Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, Sinigaglia F.** 1998. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* **187**:129-134.
660. **Zhou M, Ouyang W.** 2003. The function role of GATA-3 in Th1 and Th2 differentiation. *Immunol Res* **28**:25-37.
661. **Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M.** 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* **155**:1151-1164.
662. **Kim JM, Rudensky A.** 2006. The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells. *Immunol Rev* **212**:86-98.
663. **Tablet CO, Lucera MB, Haqqani AA, McDonald DJ, Migueles SA, Connors M, Tilton JC.** 2014. CD4+ memory stem cells are infected by HIV-1 in a manner regulated in part by SAMHD1 expression. *J Virol* **88**:4976-4986.
664. **Cavrois M, De Noronha C, Greene WC.** 2002. A sensitive and specific enzyme-based assay detecting HIV-1 virion fusion in primary T lymphocytes. *Nat Biotechnol* **20**:1151-1154.
665. **Flerin NC, Chen H, Glover TD, Lamothe PA, Zheng JH, Fang JW, Ndhlovu ZM, Newell EW, Davis MM, Walker BD, Goldstein H.** 2017. T-Cell Receptor (TCR)

- Clonotype-Specific Differences in Inhibitory Activity of HIV-1 Cytotoxic T-Cell Clones Is Not Mediated by TCR Alone. *J Virol* **91**.
666. **Paris RM, Petrovas C, Ferrando-Martinez S, Moysi E, Boswell KL, Archer E, Yamamoto T, Ambrozak D, Casazza JP, Haubrich R, Connors M, Ake J, Kim JH, Koup RA.** 2015. Selective Loss of Early Differentiated, Highly Functional PD1^{high} CD4 T Cells with HIV Progression. *PLoS One* **10**:e0144767.
667. **Casazza JP, Brenchley JM, Hill BJ, Ayana R, Ambrozak D, Roederer M, Douek DC, Betts MR, Koup RA.** 2009. Autocrine production of beta-chemokines protects CMV-Specific CD4 T cells from HIV infection. *PLoS Pathog* **5**:e1000646.
668. **Sieg SF, Rodriguez B, Asaad R, Jiang W, Bazdar DA, Lederman MM.** 2005. Peripheral S-phase T cells in HIV disease have a central memory phenotype and rarely have evidence of recent T cell receptor engagement. *J Infect Dis* **192**:62-70.
669. **Gattinoni L, Speiser DE, Lichterfeld M, Bonini C.** 2017. T memory stem cells in health and disease. *Nat Med* **23**:18-27.
670. **Klatt NR, Bosinger SE, Peck M, Richert-Spuhler LE, Heigle A, Gile JP, Patel N, Taaffe J, Julg B, Camerini D, Torti C, Martin JN, Deeks SG, Sinclair E, Hecht FM, Lederman MM, Paiardini M, Kirchhoff F, Brenchley JM, Hunt PW, Silvestri G.** 2014. Limited HIV infection of central memory and stem cell memory CD4⁺ T cells is associated with lack of progression in viremic individuals. *PLoS Pathog* **10**:e1004345.
671. **Silvestri G, Sodora DL, Koup RA, Paiardini M, O'Neil SP, McClure HM, Staprans SI, Feinberg MB.** 2003. Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity* **18**:441-452.
672. **Guglielmi L, Gimenez S, Larroque M, Tong X, Portales P, Corbeau P.** 2011. Circulating human CD4⁺ T cells have intracellular pools of CCR5 molecules. *Blood* **118**:1177-1178; author reply 1179.
673. **Barker E, Mackewicz CE, Reyes-Teran G, Sato A, Stranford SA, Fujimura SH, Christopherson C, Chang SY, Levy JA.** 1998. Virological and immunological features of long-term human immunodeficiency virus-infected individuals who have remained asymptomatic compared with those who have progressed to acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* **92**:3105-3114.
674. **Arenzana-Seisdedos F, Parmentier M.** 2006. Genetics of resistance to HIV infection: Role of co-receptors and co-receptor ligands. *Semin Immunol* **18**:387-403.
675. **Porichis F, Kaufmann DE.** 2011. HIV-specific CD4 T cells and immune control of viral replication. *Curr Opin HIV AIDS* **6**:174-180.
676. **Chakrabarti LA, Simon V.** 2010. Immune mechanisms of HIV control. *Curr Opin Immunol* **22**:488-496.
677. **Guan Y, Sajadi MM, Kamin-Lewis R, Fouts TR, Dimitrov A, Zhang Z, Redfield RR, DeVico AL, Gallo RC, Lewis GK.** 2009. Discordant memory B cell and circulating anti-Env antibody responses in HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:3952-3957.
678. **Rouers A, Klingler J, Su B, Samri A, Laumond G, Even S, Avettand-Fenoel V, Richetta C, Paul N, Boufassa F, Hocqueloux L, Mouquet H, Rouzioux C, Lambotte O, Autran B, Graff-Dubois S, Moog C, Moris A, Cohort AC.** 2017. HIV-Specific B Cell Frequency Correlates with Neutralization Breadth in Patients Naturally Controlling HIV-Infection. *EBioMedicine* doi:10.1016/j.ebiom.2017.05.029.

679. **Ranasinghe S, Soghoian DZ, Lindqvist M, Ghebremichael M, Donaghey F, Carrington M, Seaman MS, Kaufmann DE, Walker BD, Porichis F.** 2015. HIV-1 Antibody Neutralization Breadth Is Associated with Enhanced HIV-Specific CD4+ T Cell Responses. *J Virol* **90**:2208-2220.
680. **Storcksdieck genannt Bonsmann M, Niezold T, Temchura V, Pissani F, Ehrhardt K, Brown EP, Osei-Owusu NY, Hannaman D, Hengel H, Ackerman ME, Streeck H, Nabi G, Tenbusch M, Uberla K.** 2015. Enhancing the Quality of Antibodies to HIV-1 Envelope by GagPol-Specific Th Cells. *J Immunol* **195**:4861-4872.
681. **Chavele KM, Merry E, Ehrenstein MR.** 2015. Cutting edge: circulating plasmablasts induce the differentiation of human T follicular helper cells via IL-6 production. *J Immunol* **194**:2482-2485.
682. **Heather JM, Best K, Oakes T, Gray ER, Roe JK, Thomas N, Friedman N, Noursadeghi M, Chain B.** 2015. Dynamic Perturbations of the T-Cell Receptor Repertoire in Chronic HIV Infection and following Antiretroviral Therapy. *Front Immunol* **6**:644.
683. **Hebeisen M, Baitsch L, Presotto D, Baumgaertner P, Romero P, Michielin O, Speiser DE, Rufer N.** 2013. SHP-1 phosphatase activity counteracts increased T cell receptor affinity. *J Clin Invest* **123**:1044-1056.
684. **King CG, Koehli S, Hausmann B, Schmalzer M, Zehn D, Palmer E.** 2012. T cell affinity regulates asymmetric division, effector cell differentiation, and tissue pathology. *Immunity* **37**:709-720.
685. **Tube NJ, Jenkins MK.** 2014. TCR signal quantity and quality in CD4 T cell differentiation. *Trends Immunol* **35**:591-596.
686. **Benjamini Y., and Hochberg Y..** *Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing.* 1995, *Journal of the Royal Statistical Society Series B*, 57, 289-300.
687. **T. Zhao and H. Liu.** *The huge Package for High-dimensional Undirected Graph Estimation in R*, 2012. *Journal of Machine Learning Research*.
688. **Daudin, J.-J., Picard, F., Robin, S.,** *Mixture model for random graphs*, 2008, *Statistics and Computing*.
689. **Venables, W. N. & Ripley, B. D.** (2002) *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0
690. Déplétion du compartiment muqueux de cellules T CD4+ mémoires au cours de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) : causes et conséquences *Virologie* 2007, 11 (5) : 381-8 G. **Carcelain**

ANNEXES

V. ANNEXES

A. Articles

A.1. Annexe 1 : Public T cell receptors confer high avidity CD4 responses to HIV controllers

Public T cell receptors confer high-avidity CD4 responses to HIV controllers

Daniela Benati,¹ Moran Galperin,¹ Olivier Lambotte,^{2,3,4,5} Stéphanie Gras,^{6,7} Annick Lim,⁸ Madhura Mukhopadhyay,¹ Alexandre Nouël,¹ Kristy-Anne Campbell,⁶ Brigitte Lemerrier,⁸ Mathieu Claireaux,¹ Samia Hendou,⁹ Pierre Lechat,¹⁰ Pierre de Truchis,¹¹ Faroudy Boufassa,⁹ Jamie Rossjohn,^{6,7,12} Jean-François Delfraissy,^{2,3,4} Fernando Arenzana-Seisdedos,^{1,13} and Lisa A. Chakrabarti^{1,13}

¹Pasteur Institute, Viral Pathogenesis Unit, Paris, France. ²INSERM U1184, Center for Immunology of Viral Infections and Autoimmune Diseases, Paris, France. ³Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (AP-HP), Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, University Hospital Paris Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France. ⁴Université Paris Sud, UMR1184, Le Kremlin-Bicêtre, France. ⁵CEA, DSV/IMETI, Division of Immuno-Virology, IDMIT, France. ⁶Infection and Immunity Program and Department of Biochemistry and Molecular Biology, Biomedicine Discovery Institute, and ⁷Australian Research Council Centre of Excellence for Advanced Molecular Imaging, Monash University, Clayton, Victoria, Australia. ⁸Pasteur Institute, Department of Immunology, Paris, France. ⁹INSERM U1018, Center for Research in Epidemiology and Population Health (CESP), Le Kremlin-Bicêtre, France. ¹⁰Pasteur Institute, Genomic Bioanalysis Group, Paris, France. ¹¹Raymond Poincaré Hospital, AP-HP, Infectious and Tropical Diseases Department, Garches, France. ¹²Institute of Infection and Immunity, School of Medicine, Cardiff University, Cardiff, Wales, United Kingdom. ¹³INSERM U1108, Paris, France.

The rare patients who are able to spontaneously control HIV replication in the absence of therapy show signs of a particularly efficient cellular immune response. To identify the molecular determinants that underlie this response, we characterized the T cell receptor (TCR) repertoire directed at Gag293, the most immunoprevalent CD4 epitope in the HIV-1 capsid. HIV controllers from the ANRS CODEX cohort showed a highly skewed TCR repertoire that was characterized by a predominance of *TRAV24* and *TRBV2* variable genes, shared CDR3 motifs, and a high frequency of public clonotypes. The most prevalent public clonotypes generated TCRs with affinities at the higher end of values reported for naturally occurring TCRs. The high-affinity Gag293-specific TCRs were cross-restricted by up to 5 distinct *HLA-DR* alleles, accounting for the expression of these TCRs in HIV controllers of diverse genetic backgrounds. Transfer of these TCRs to healthy donor CD4⁺ T cells conferred high antigen sensitivity and polyfunctionality, thus recapitulating key features of the controller CD4 response. Transfer of a high-affinity Gag293-specific TCR also redirected CD8⁺ T cells to target HIV-1 capsid via nonconventional MHC II restriction. Together, these findings indicate that TCR clonotypes with superior functions are associated with HIV control. Amplification or transfer of such clonotypes may contribute to immunotherapeutic approaches aiming at a functional HIV cure.

Introduction

HIV relentlessly destroys CD4⁺ T cells in the course of infection and causes functional impairment in the remaining CD4⁺ T cell population. This leads to the progressive loss of adaptive responses to opportunistic pathogens and ultimately to the collapse of the immune system characteristic of AIDS. Chronic immune activation is thought to drive dysfunction of the remaining CD4⁺ T cell population, with both persistent viral antigenic stimulation and microbial translocation conspiring to exhaust T cell responses (1). Another parameter contributing to the loss of helper function may be the poor quality of CD4⁺ T cells that escape depletion. Early studies of the repertoire of T cell receptors (TCRs) documented a general loss of CD4⁺ T cell diversity in HIV-infected patients (2, 3), while further studies highlighted a preferential depletion of HIV-specific CD4⁺ T cells (4–6), suggesting that the HIV-specific repertoire was especially prone to diversity contraction. To date, the HIV-specific CD4 repertoire remains mostly uncharacterized at the molecular level, even

though this information would be critical to define the potential for immune reconstitution in treated patients.

Rare cases of spontaneously controlled HIV-1 infection provide a unique opportunity to study the molecular characteristics of a fully functional CD4⁺ T cell response directed at HIV. Patients who maintain an undetectable viral load in standard assays (<50 copies of HIV-1 RNA/ml) represent fewer than 0.5% of seropositive individuals but have a remarkably low risk of progressing to AIDS (7). These rare patients, called HIV controllers, or alternatively elite controllers, show signs of particularly efficient cellular responses that actively control the infected cell population (8). Controller CD8⁺ T cells have the capacity to potently inhibit HIV replication when added to cultures of infected autologous CD4⁺ T cells and are thought to play a key role in HIV control (9, 10). Recent evidence suggest that particular TCR clonotypes expressed by controller CD8⁺ T cells are responsible for their efficient cytotoxic responses, while HLA-matched non-controller patients show clonotypes of lower efficacy (11–13). In addition, clonotypes from controllers are able to maintain cross-recognition of dominant epitope variants, thus preventing the emergence of viral escape mutants (11, 12, 14).

The role of the CD4 response in HIV control remains less completely understood. Controllers maintain a population of

Authorship note: D. Benati and M. Galperin are co-first authors.

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Submitted: July 15, 2015; **Accepted:** March 8, 2016.

Reference information: *J Clin Invest.* 2016;126(6):2093–2108. doi:10.1172/JCI83792.

HIV-specific central memory (CM) CD4⁺ T cells endowed with a strong proliferative capacity, which has been linked to autocrine IL-2 production and the upregulation of antiapoptotic molecules (15–18). However, the presence of long-lived CM cells does not appear sufficient to ensure HIV control, as patients treated early in the course of primary HIV infection also maintain specific CM CD4⁺ T cells with strong proliferative capacity, but in most cases fail to control HIV replication upon treatment interruption (19). Multiple lines of evidence indicate that the antiviral CD4 response in controllers is qualitatively different from that in efficiently treated patients, and is not just a consequence of a very low viremia. In particular, controller CD4⁺ T cells preferentially target Gag rather than Env epitopes, suggesting differences in the repertoire of specific CD4⁺ T cells (20). Controller CD4⁺ T cells are also more polyfunctional, as indicated by the capacity to produce multiple cytokines and chemokines simultaneously (21). A key difference lies in the persistence of specific CD4⁺ T cells with an effector differentiation status, even though the amount of HIV antigens available to drive these responses is minimal. We reported that Gag-specific CD4⁺ T cells in controllers maintain a Th1 effector profile with IFN- γ production and degranulation capacity, while such effectors disappear in patients treated in the long term (22). Controller CD4⁺ T cells express low levels of negative costimulatory molecules such as CTLA-4 and PD-1, compatible with preserved effector functions (23, 24). Taken together, these findings suggest that Th1 effectors escape depletion and retain optimal functions to sustain the antiviral response in controlled HIV infection.

An explanation for the remarkable properties of HIV-specific CD4 responses in controllers may lie in the nature of the TCRs that mediate these responses. We previously identified a population of CD4⁺ T cells with a high antigen sensitivity to immunoprevalent Gag peptides in HIV controllers, while this population was absent in treated patients (25). The sensitive detection of Gag antigens depended on intrinsic differences in the set of TCRs expressed by controller CD4⁺ T cells, as indicated by a high TCR avidity measured in MHC II tetramer dilution assays. High TCR avidity is a hallmark of viral control in several models of chronic viral infections (26) and has been associated with antiviral efficacy in HIV-specific CD8⁺ T cells (10, 13, 27). In contrast, there are limited data available on the impact of TCR avidity on human CD4⁺ T cell antiviral responses. We reasoned that the presence of high-avidity TCRs may explain why controllers maintained HIV-specific CD4⁺ T cells with an effector differentiation status in spite of their very low viremia, and we set to characterize these TCRs at the molecular and functional level. The study was focused on TCRs specific for the most immunoprevalent CD4 epitope in Gag, located at position 293–312 in the capsid major homology region (MHR). This epitope, designated Gag293, is exceptionally immunoprevalent, as it induces an IFN- γ ELISPOT response in close to half of HIV-1-infected patients irrespective of genetic background (20, 28) and gives a greater than 70% response rate in controllers of the Agence nationale de recherches sur le SIDA et les hépatites virales (ANRS) CO21 CODEX cohort (25). We could thus compare the repertoire of Gag293-specific clonotypes in patients of varied HLA backgrounds who controlled HIV infection either naturally or through antiretroviral therapy.

Results

We set out to compare Gag293-specific CD4 responses in HIV controllers and efficiently treated patients, two groups characterized by long-term viral control. The clinical and immunological characteristics of the studied patients are reported in Table 1. A stringent definition of HIV control was applied, based on an undetectable viral load in standard assays (<50 copies HIV-1 RNA/ml) for more than 5 years. The duration of control was actually longer, as patients included in the controller group (HIC group, $n = 14$) had been infected for a median duration of 19.6 years. They were compared with HIV-1-infected patients who had received long-term antiretroviral therapy (HAART group, $n = 15$), with an undetectable viral load for at least 5 years and a median duration of treatment of 11.9 years. Thus, both groups were characterized by long-term viral suppression, which ensured that potential differences in CD4 responses were not primarily determined by levels of residual HIV viremia.

High antigen sensitivity of Gag293-specific CD4 responses in HIV controllers. TCR repertoire studies of specific CD4⁺ T cells have remained scarce in humans due to the limited clonal amplification of CD4⁺ T cells as compared with CD8⁺ T cells, and to the generally lower affinity of TCRs expressed by CD4⁺ T cells, which limits MHC II tetramer detection (29). In the case of HIV infection, these factors are compounded by the general decrease in the CD4⁺ T cell population and the preferential depletion of HIV-specific CD4⁺ T cells (5, 6). To address these issues, we devised a system of short-term primary CD4⁺ T cell line cultures that allowed the amplification of MHC II tetramer-positive cells prior to sorting. Using this system, we previously reported the presence of Gag293-specific CD4⁺ T cells with high antigen sensitivity and high MHC II tetramer binding capacity in controllers, while such cells were absent in treated patients (25). To extend these results, we generated primary CD4⁺ T cell lines by stimulation with decreasing doses of Gag293 peptide. The specificity of CD4⁺ T cell lines was evaluated at equivalent growth stages (doubling time), by restimulation with Gag293 and analysis by IFN- γ ELISPOT assay. As reported in Table 1, viable Gag293-specific cell lines were obtained for all patients of the HIC and HAART groups when initially stimulated with the highest peptide dose of 10^{-5} M. However, a marked difference was observed for cell lines generated at 10^{-7} M peptide, with only 8 of 15 treated patients responding versus all of the 14 controllers ($P = 0.006$). The difference was also marked at the 10^{-9} M peptide dose ($P = 0.005$). Moreover, two of the controllers, but none of the treated patients, responded at the 10^{-11} M peptide dose. These experiments established that Gag293-specific CD4⁺ T cells had a higher antigen sensitivity in the controller group, as indicated by the capacity to proliferate and differentiate into IFN- γ -secreting effectors upon stimulation with minimal peptide doses.

Biased TRAV and TRBV gene usage in Gag293-specific CD4⁺ T cells. To characterize the Gag293-specific TCR repertoire, we first genotyped patients for the *HLA-DRB1* gene. Eight controllers and 8 treated patients who shared at least 1 of 4 *HLA-DR* alleles (*DRI*, *DR11*, *DR15*, or *DRB5*) were included in the TCR study (Supplemental Table 1; supplemental material available online with this article; doi:10.1172/JCI83792DS1). The frequencies of these 4 alleles did not differ significantly between the HIC and the HAART groups

Table 1. Clinical and immunological characteristics of patients

Clinical parameters ^A	HIV controllers (HIC, n = 14)	Treated patients (HAART, n = 15)	P value
Age, yr	50 [34–61]	48 [39–56]	NS ^B
Duration of HIV-1 infection, yr	19.6 [9.8–26.0]	11.9 [6.8–25.3]	0.015 ^B
Duration of antiretroviral treatment, yr	N/A	11.1 [5.6–19.3]	–
Virus load, HIV-1 RNA copies/ml plasma	< 50	< 50	NS ^B
CD4 ⁺ T cells/mm ³	875 [648–1,400]	570 [266–1,534]	0.008 ^B
Nadir of CD4 ⁺ T cells/mm ³	N/A	216 [21–589]	–
Frequency of Gag293-specific CD4 ⁺ T cell lines generated at different peptide doses ^C			
Gag293 dose: 10 ⁻⁵ M	14/14	15/15	NS ^D
Gag293 dose: 10 ⁻⁷ M	14/14	8/15	0.006 ^D
Gag293 dose: 10 ⁻⁹ M	8/14	1/15	0.005 ^D
Gag293 dose: 10 ⁻¹¹ M	2/14	0/15	NS ^D

^AMedian values and ranges are reported. ^BP values were estimated with the Mann-Whitney U test. ^CFrequency of viable cell lines that achieved doubling of input cells and gave a specific response by IFN- γ ELISPOT assay. ^DDifferences in frequencies were evaluated with Fisher's exact test. NS, not significant ($P \geq 0.05$); N/A: not applicable.

($P \geq 0.05$ by Fisher's exact test). CD4⁺ T cell lines from these patients were labeled with HLA-DR-matched Gag293-loaded tetramers and evaluated for the proportion of Tet⁺ cells in the CD4⁺CD8⁻ T cell population (Figure 1A). Samples labeled with matched tetramers loaded with an irrelevant peptide (CLIP or Annexin II) were used as negative controls. The purity of the Tet⁺ population was controlled after sorting, as shown in representative examples (Figure 1A, right). TCR diversity of the sorted cells was evaluated through CDR3 length polymorphism analysis, using the immunoscope technique (30, 31). TCR α variable gene (*TRAV*) expression in controller Tet⁺ cells proved highly skewed, with a median of 44% of Gag293-specific cells expressing the *TRAV24* gene family (Figure 1B), while this family was amplified at lower levels in specific cells of treated patients (median, 13%; $P = 0.037$). In comparison, the *TRAV24* family represented 1% \pm 0.2% of T cells in a control group of 7 healthy donors (data not shown). Analysis of CDR3 length distribution showed a Gaussian pattern for control peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), as expected (Figure 1D). In contrast, Gag293-specific cells appeared oligoclonal, with a dominant peak corresponding to a CDR3 of 10 aa, according to the numbering scheme of the International ImMunoGeneTics Information System (IMGT) (32). This peak was more prominent in cell lines from controllers than those from treated patients, suggesting a stronger TCR bias in controlled HIV infection.

Analysis of TCR β variable gene (*TRBV*) distribution also revealed a major bias in Gag293-specific cells, with a marked predominance of the *TRBV2* family, expressed at a median value of 82% in the controller group (Figure 1C). *TRBV2* was amplified in Tet⁺ cells of 7 of 8 controllers in the present study, while this amplification was seen in only 1 of 4 controllers in a first study, where we tested Gag293-specific TCR profiles with a panel of V β -specific antibodies (25). The lower frequency of *TRBV2* (previously designated V β 22) amplification detected in the initial study may have resulted from suboptimal V β antibody binding due to competition with the MHC II tetramer for binding to the TCR. The *TRBV2* fam-

ily also appeared amplified at high levels in some of the treated patient samples (median, 28%), with a difference between the HIC and HAART groups that did not reach significance ($P = 0.13$; Figure 1C). In comparison, T cells from healthy donors expressed *TRBV2* at low levels (3.7% \pm 1.0%; data not shown). CDR3 length distribution appeared more variable for the *TRBV2* than the *TRAV24* chain (Figure 1E), though a trend toward a predominant CDR3 of 13 aa was apparent in controllers' Tet⁺ cells. Taken together, these data provide evidence for a highly skewed Gag293-specific TCR repertoire characterized by the preferential usage of the *TRAV24* and *TRBV2* variable gene segments. The fact that the bias is more marked in Gag293-specific cells from controllers than treated patients suggests a contribution of the *TRAV24* and *TRBV2* variable regions to the high-avidity recognition of Gag293.

High clonotypic diversity of Gag293-specific cells in controllers. Clonotypic repertoire analysis was carried out for the two variable gene families amplified in Gag293-specific cells, *TRAV24* and *TRBV2*.

PCR products corresponding to these two families were cloned, sequenced, and analyzed with IMGT tools (32). A minimum of 50 productive CDR3 sequences were analyzed for each sample (a full list of CDR3 sequences is provided in Supplemental Tables 2 and 3). Productive *TRAV24* sequences (HIC: $n = 584$; HAART: $n = 496$) were evaluated for diversity by counting the distinct clonotypes, i.e., the number of unique CDR3 aa sequences, present in each patient sample. The normalized number of clonotypes proved significantly higher in the HIC than the HAART group ($P = 0.0011$; Figure 2A). Similarly, analysis of *TRBV2* sequences (HIC: $n = 716$; HAART: $n = 566$) showed higher clonotypic diversity in HIC samples ($P = 0.0047$; Figure 2A). Of note, the number of *TRBV2* clonotypes per 100 sequences was remarkably high in the HIC group (median, 36), indicating the presence of a diverse TCR repertoire in spite of the pronounced bias for *TRBV2*. Computation of Simpson's diversity index confirmed a trend for higher clonotypic diversity in the HIC group, which reached significance for *TRAV24* but not *TRBV2* sequences (Figure 2B). The number of mutations needed to generate the observed CDR3 sequences from their germline counterparts was also significantly higher in the HIC group, for both the *TRAV24* and *TRBV2* datasets (Supplemental Figure 4, A and B). Thus, both the number of clonotypes and the number of CDR3 insertions and deletions were consistent with the persistence of a more diverse Gag293-specific repertoire in controlled HIV infection.

Biased J and D gene usage in Gag293-specific TCRs from controllers. The Gag293-specific CDR3 sequence dataset was analyzed for the distribution of junction (J) and diversity (D) gene segments. *TRAJ* gene usage was restricted, with 15 and 11 distinct *TRAJ* genes detected in *TRAV24* sequences for the HIC and HAART groups, respectively, of 61 *TRAJ* genes reported in the IMGT database (Figure 2C). The *TRAJ17* gene predominated in the HIC group (48%), while the next most abundant genes, *TRAJ39* and *TRAJ32*, were present at 16% and 12%, respectively. *TRAJ* gene usage in the HAART group appeared more evenly distributed among *TRAJ17*

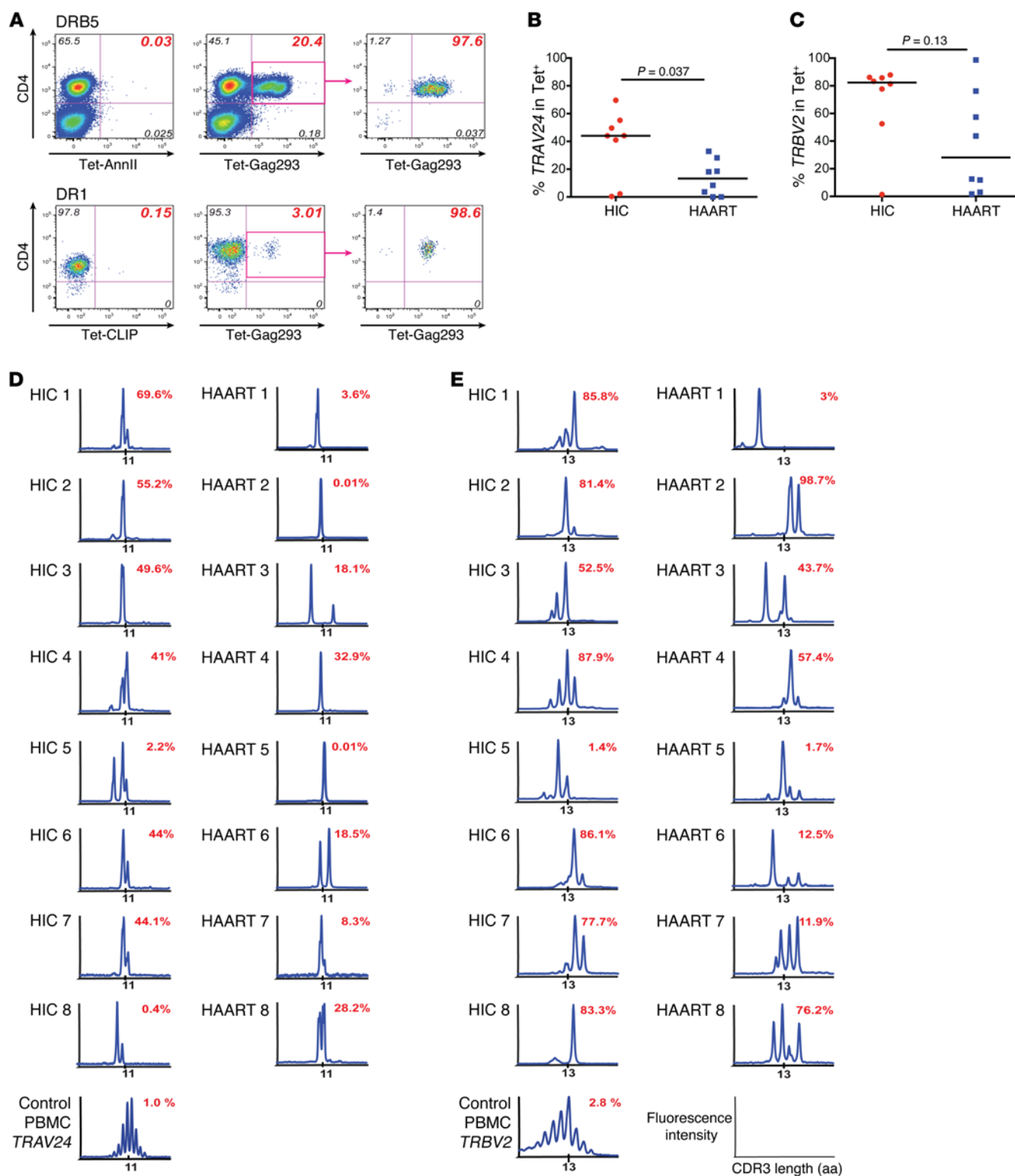


Figure 1. Immunoscope analysis of Gag293-specific CD4⁺ T cells. (A) Sorting of Gag293-specific CD4⁺ T cells with HLA-DR tetramers. Examples of primary CD4⁺ T cell lines labeled with DRB5 and DR1 tetramers. The percentage of Tet⁺ cells in the total CD4⁺ T cell population (middle plots) and in the sorted Tet⁺ population (right plots) is reported in red. Samples labeled with tetramers loaded with an irrelevant peptide (CLIP or Annexin II [AnnII]) were used as negative controls (left plots). (B and C) The percentages of Tet⁺ cells expressing the TRAV24 (B) or TRBV2 family (C) were determined by qPCR in the HIC and the HAART groups and compared by using the Mann-Whitney *U* test. (D and E) CDR3 length profiles for the TRAV24 (D) and TRBV2 families (E) are shown for each patient analyzed. Healthy donor PBMCs were used as controls (bottom left). The percentage of the TRAV24 or TRBV2 family in the total TRAV or TRBV PCR product is reported in red. (B–E) HIC group: *n* = 8; HAART group: *n* = 8.

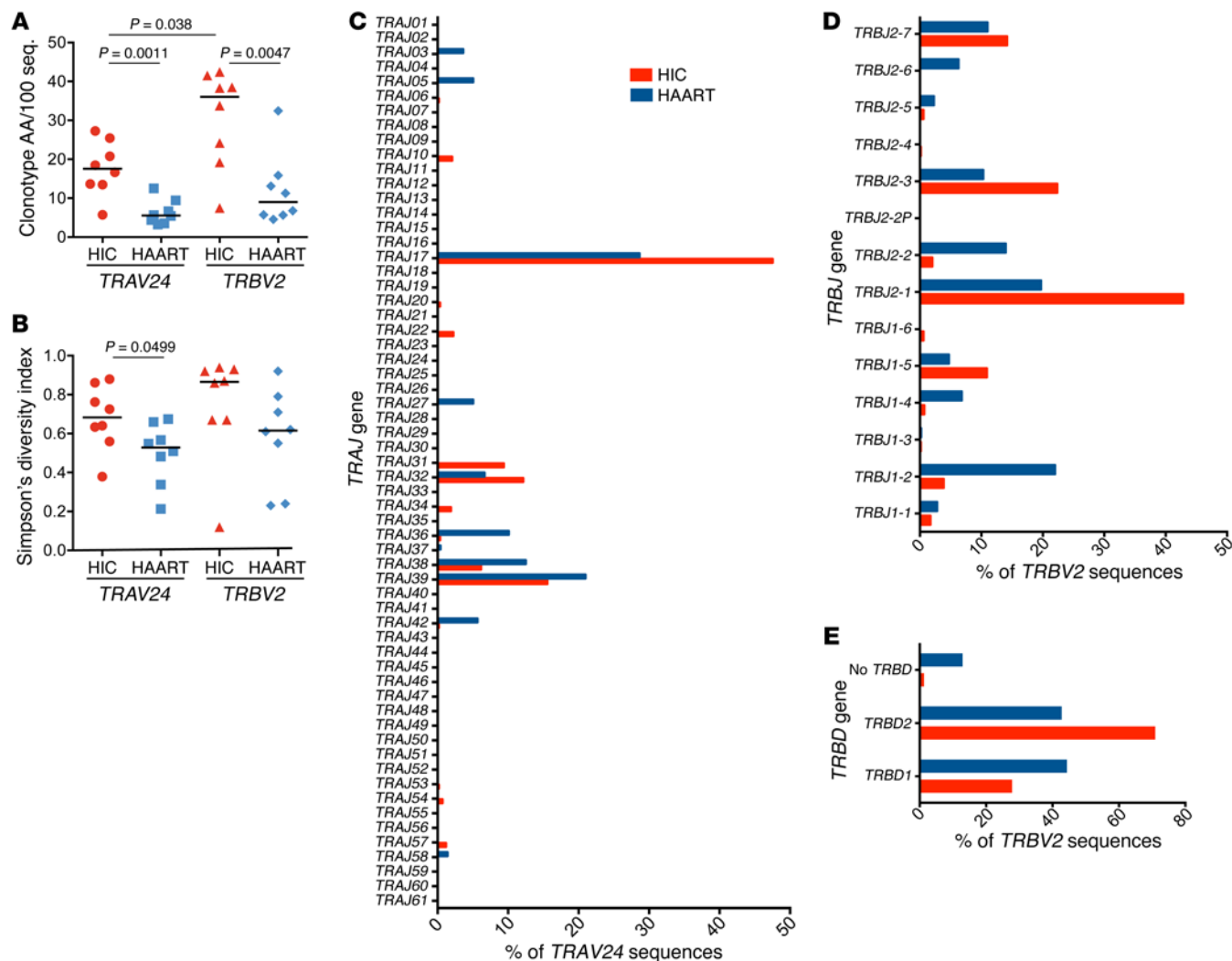


Figure 2. Clonotypic diversity of Gag293-specific TCRs. (A) The number of unique CDR3 amino acid sequences (clonotype AA) obtained per 100 TRAV24 or TRBV2 nucleotide sequences (seq.) was compared in the HIC and HAART groups with the Mann-Whitney *U* test. (B) Simpson's diversity indexes computed for TRAV24 (left) and TRBV2 (right) clonotypes AA obtained in each patient were compared in the HIC and HAART groups with the Mann-Whitney *U* test. (C–E) Frequencies of *TRAJ* genes (C), *TRBJ* genes (D), and *TRBD* genes (E) in Gag293-specific TRA or TRB sequences. Frequencies are reported for the HIC and HAART groups (red and dark blue bars, respectively). Number of sequences analyzed: HIC *TRAJ*: $n = 584$; HAART *TRAJ*: $n = 496$; HIC *TRBJ* and *TRBD*: $n = 716$; HAART *TRBJ* and *TRBD*: $n = 566$.

(29%), *TRAJ39* (21%), and *TRAJ38* (13%). Analysis of the *TRBJ* distribution in *TRBV2* sequences showed again a more biased repertoire in the HIC group, with a predominant *TRBJ2-1* gene present in 43% of sequences, while the most abundant *TRBJ* gene in the HAART group, *TRBJ1-2*, represented only 22% of sequences (Figure 2D). Of note, *TRBJ1-2* was only minimally represented in HIC sequences (4%), emphasizing differences between the HIC and HAART Gag293-specific repertoires. In addition, the *TRBD2* gene segment was more prevalent in HIC sequences, while the two *TRBD* genes were equally represented in HAART sequences (Figure 2E). CDR3 lengths in the HIC group showed a marked peak at 10 and 13 aa for the *TRAV24* and *TRBV2* sequence sets, respectively, while CDR3 lengths were more evenly distributed in the HAART group (Supplemental Figure 4, C and D). These analyses indicated that Gag293-specific CDR3 sequences from controllers were biased in genetic composition, with a predominant use of *TRAJ17*, *TRBJ2-1*,

and *TRBD2*, as well as narrowly distributed CDR3 lengths; in contrast sequences from treated patients appeared more heterogeneous. Thus, controller TCRs showed restricted V(D)J gene usage, indicative of a repertoire shaped under strong selective pressure, while maintaining a high clonotypic diversity.

High prevalence of public motifs in Gag293-specific TCRs from controllers. Given the observed biases in V(D)J gene usage, we next evaluated whether Gag293-specific CDR3 sequences shared common aa motifs. The MEME motif discovery software (<http://meme-suite.org/>) was used in discriminative mode to identify motifs enriched in HIC as compared with HAART *TRAV24* sequences. This approach revealed a highly prevalent but complex motif shared by 81% of HIC CDR3 sequences (Figure 3A). Comparison of the predominant motif in the HIC and HAART datasets highlighted that sequence differences mostly concentrated in the N-terminal part of the CDR3 (Supplemental Fig-

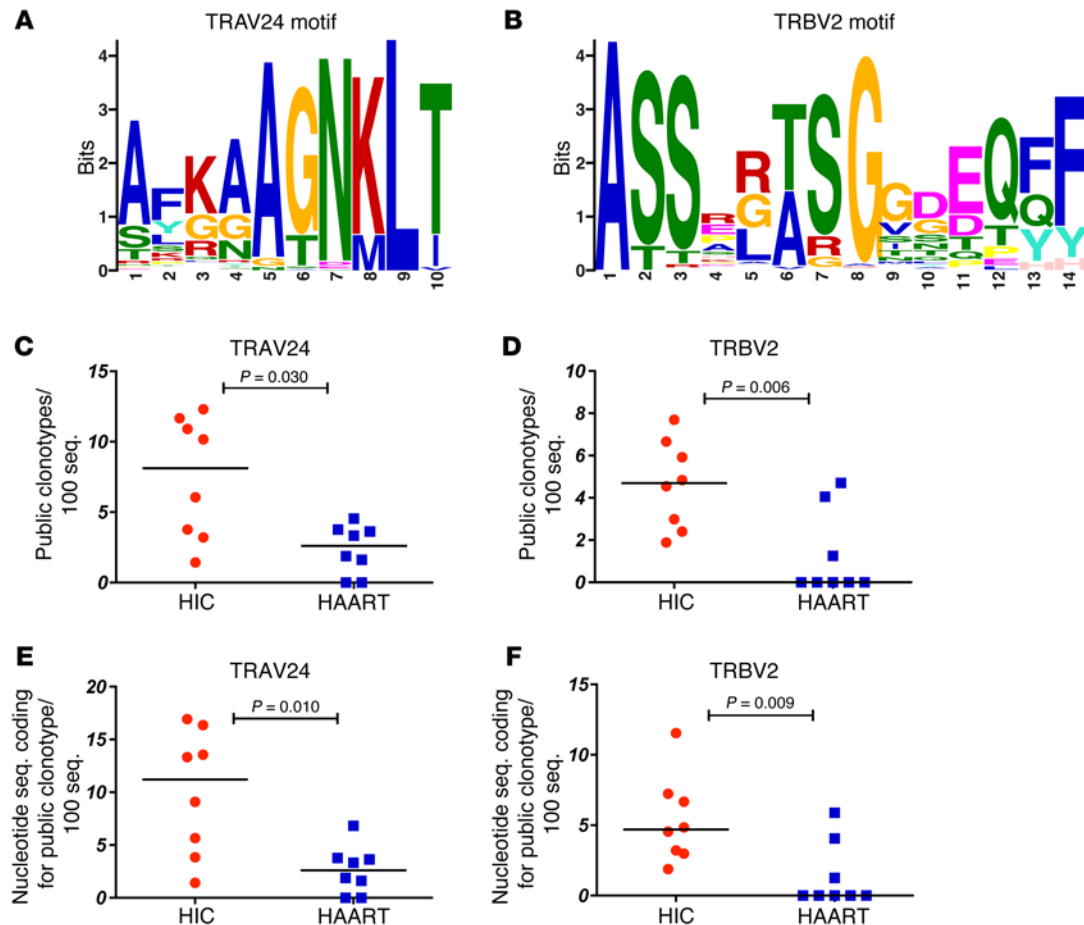


Figure 3. Quantification of public motifs and clonotypes in the Gag293-specific TCR repertoire. (A and B) The MEME motif discovery program was used to identify aa motifs enriched in controller TRAV24 sequences (A) and TRBV2 sequences (B) compared with corresponding sequences in treated patients. The MEME program was used in discriminative mode, which highlights differences between sequence datasets. The relative size of each aa symbol is proportional to its frequency in the HIC dataset, while the total height of aa symbols indicates the information content of the position in bits. (C and D) Frequency of public clonotypes (clono.) per 100 TRAV24 sequences (C) or per 100 TRBV2 sequences (D) for each of the 8 controllers (HIC) and 8 treated patients (HAART) studied. (E and F) Frequency of nucleotide sequences coding for a public clonotype per 100 TRAV24 sequences (E) and per 100 TRBV2 sequences (F). (C–F) Significant differences ($P < 0.05$) obtained by using the Mann-Whitney U test are reported.

ure 5A). More detailed analyses identified two simpler motifs of 10 and 11 aa that were significantly more prevalent in HIC than HAART CDR3 sequences (Table 2). CDR3 α motif AV24-1 ([A/S]x[K/R]AAGNKL; with x denoting any aa) encompassed the highly conserved AGNKL sequence derived from the *TRAJ17* gene, while motif AV24-2 (AxYGGATNKLI) contained a related ATKLI sequence derived from the *TRAJ32* gene. Taken together, these two motifs were found in 49% of HIC versus 29% of HAART TRAV24 sequences ($P < 0.0001$).

MEME analysis of *TRBV2* sequences in discriminative mode identified a complex motif with interspersed highly conserved positions in 79% of HIC sequences (Figure 3B). A predominant motif was apparent in HIC *TRBV2* sequences, while HAART *TRBV2* sequences appeared too diverse for motif identification (Supplemental Figure 5B). Further analyses of HIC sequences revealed the overlap of two simpler motifs of 13 and 14 aa, respectively (Table 2). CDR3 β motifs BV2-1 (ASSx[R/G/L][T/A][S/G]Gxx[E/T]Q[F/Y]) and BV2-2 (ASSx[R/G/L][T/A]SGGxx[E/T]Q[F/Y]) were highly similar and differed only by the presence of

an additional G in the latter. Taken together, these two motifs were found in 50% of HIC versus 10% of HAART *TRBV2* sequences ($P < 0.0001$), indicating a predominance of conserved CDR3 residues in HIC clonotypes. This bias suggested a requirement of particular CDR3 residues for efficient recognition of the Gag293–MHC II complex. It was noteworthy that half of the TRAV24 and TRBV2 clonotypes identified in the HIC group shared the identified public motifs, indicative of a highly constrained Gag293-specific repertoire in controlled HIV infection.

High frequency of TCR sharing in HIV controllers. Public clonotypes were defined as identical CDR3 aa sequences found in at least two individuals, without any mismatch tolerated. A total of 18 public clonotypes were identified in the TRAV24 sequence dataset obtained from the 16 patients studied (Supplemental Figure 6A). The most prevalent public clonotype, AFKAAGNKL (called TRAV24-F), was found in 6 controllers and 2 treated patients (75% and 25%, respectively), which are remarkably high frequencies in humans with diverse HLA II backgrounds. Groups of highly related public clonotypes were apparent, with a first group sharing

Table 2. Prevalence of public motifs in Gag293-specific clonotypes

	Motif sequence	CDR3 length (aa)	HIC group (% seq.)	HAART group (% seq.)	P value, HIC vs. HAART	Public clonotypes (% seq.)
TRAV24 motif						
AV24-1	[A/S]x[K/R]AAGNKL	10	37.16	22.38	<0.0001	33.33
AV24-2	AxYGGATNKLI	11	11.64	6.65	0.0062	27.78
AV24-1 + AV24-2	-	-	48.80	29.03	<0.0001	61.11
TRBV2 motif						
BV2-1	ASSx[R/G/L][T/A][S/G]Gxx[E/T]Q[F/Y]	13	38.55	6.36	<0.0001	50.00
BV2-2	ASSx[R/G/L][T/A]SGGxx[E/T]Q[F/Y]	14	11.87	3.89	<0.0001	33.33
BV2-1 + BV2-2	-	-	50.42	10.25	<0.0001	83.33

The percentage of motif occurrence is reported in total sequences from HIC and HAART patients as well as in the set of public clonotypes. Bold indicates the percentage of sequences carrying both motifs. *P* values for differences between the HIC and HAART groups were computed with Fisher's exact test. x, any amino acid; seq., sequences.

the TRAJ17 chain and motif AxKAAGNKL (AV24-1), and a second group sharing the TRAJ32 chain and motif AxYGGATNKLI (AV24-2). The 18 public clonotypes showed a high degree of motif sharing (61% positive for motifs AV24-1 or AV24-2, Table 2), confirming their similarity. Of note, public clonotypes were more frequent in the HIC than in the HAART group (*P* = 0.03; Figure 3C). Counting the nucleotide sequences encoding public clonotypes, normalized to 100 sequences, confirmed the higher frequency of TCR sharing in the HIC group (*P* = 0.01; Figure 3E).

Interestingly, the majority of TRAV24 public clonotypes (67%) were encoded by multiple nucleotide sequences. The mean number of unique nucleotide sequences encoding a TRAV24 public clonotype was 2.33, versus 1.05 for private (i.e., non-public) TRAV24 clonotypes. Detailed analysis of the 4 sequences coding for the most prevalent TRAV24 public clonotype, AFKAAGNKL, showed that P and N mutations inserted between the *TRAV24* and the *TRAJ17* genes were few, ranging from 0 to 4 nucleotides (Supplemental Table 7). The numbers of nucleotides trimmed from germline sequences were also in the low range (6 to 10) compared with the ensemble of HIC sequences (mean of 9.9 trimmed nucleotides). The two predominant sequences, representing 64.9% and 33.8% of AFKAAGNKL coding sequences, respectively, contained no mutation and were simply obtained by trimming 6 nucleotides from joined *TRAV24-TRAJ17* genes. Thus, the most prevalent TRAV24 public clonotype could be easily generated from germline sequences, suggestive of convergent V(D)J recombination (33).

Public clonotypes were also abundant in Gag293-specific TCRβ chains, with a total of 18 found in the TRBV2 sequence dataset (Supplemental Figure 6B). Public clonotype sequences derived predominantly from the *TRBJ2-3*, *TRBJ2-1*, and *TRBJ2-7* genes, which were all represented to a higher degree in HIC than HAART sequences. TRBV2 public clonotypes showed a remarkably high degree of motif sharing (83%, Table 2), emphasizing the presence of conserved features in spite of relatively high sequence diversity. Again, TRBV2 public clonotypes were clearly more frequent in the HIC than the HAART group, in terms of aa sequences (*P* = 0.006; Figure 3D) and of nucleotide sequences (*P* = 0.009; Figure 3F). The most frequent public clonotype, ASSRRTSGGTDQY (called TRBV2-13), was found in 4 of 8 controllers (50%) and absent in treated patients. The majority of TRBV2 public clonotypes (77%) were encoded by more

than one nucleotide sequence. The mean number of unique nucleotide sequences encoding a TRBV2 public clonotype was 2.28, versus 1.10 for private TRBV2 clonotypes, again suggesting that convergent V(D)J recombination contributes to the amplification of public clonotypes. Taken together, TRAV24 and TRBV2 sequence analyses revealed a highly biased Gag293-specific TCR repertoire, characterized by a high degree of TCR sharing in the controller group. TCR biases were of type III (identical CDR3 sequences) but also of type II (conserved CDR3 motifs) (34, 35), and characterized a substantial fraction of both TCR chains.

It was noteworthy that the majority of public clonotypes were restricted by multiple *HLA-DR* alleles. Specifically, 83% of TRAV24 public clonotypes and 56% of TRBV2 public clonotypes were identified in samples sorted with at least two different *HLA-DR* tetramers (Supplemental Figure 6, A and B). The most prevalent TRAV24 public clonotype, TRAV24-F, was restricted by the 4 *HLA-DR* alleles tested (*DR1*, *DR11*, *DR15*, and *DRB5*), while the most prevalent TRBV2 public clonotype, TRBV2-13, was restricted by 3 of these alleles (*DR1*, *DR15*, and *DRB5*). Thus, highly prevalent public clonotypes showed a high level of HLA cross-restriction, which could help explain their prevalence in patients of diverse genetic backgrounds. Of note, public clonotypes were also frequently restricted by two distinct *HLA-DR* alleles within the same patient (Supplemental Tables 8 and 9), which could contribute to the induction of a more sensitive Gag293-specific response.

Ex vivo detection of Gag293-specific public clonotypes in HIV controllers. The Gag293-specific TCR repertoire was initially analyzed in primary CD4⁺ T cell lines, as the preferential depletion of specific CD4⁺ T cells in HIV-infected patients did not allow a direct ex vivo analysis of Tet⁺ cells. However, the exceptional immunological status of HIV controllers made the ex vivo analysis feasible for a subset of these patients. Four samples sorted from controller PBMCs containing more than 2,000 Tet⁺ cells were analyzed by immunoscope and sequencing. The DRB5 tetramer was used in these experiments, as it yielded the best signal/noise ratio (example in Figure 4A). Quantification of TRAV24 expression showed an amplification of this family in 3 of 4 HIC samples obtained ex vivo, as compared with the percentage of TRAV24 detected in PBMCs from 7 healthy donors (1.0% ± 0.2%) (Figure 4B). Quantification of TRBV2 showed an amplification in

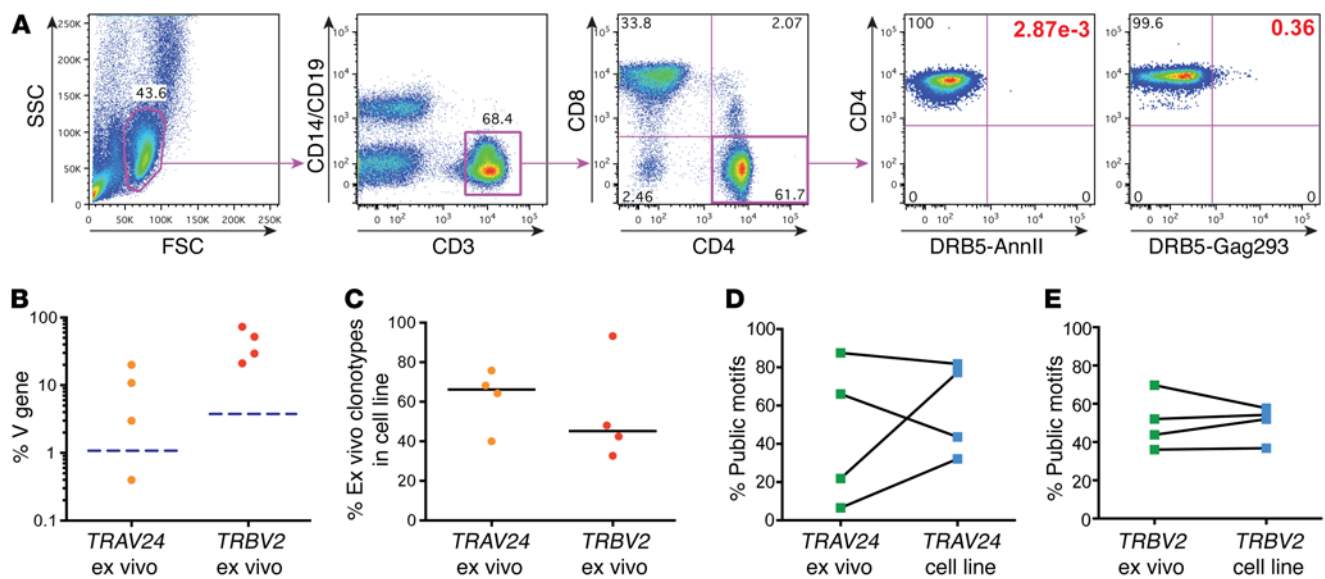


Figure 4. Ex vivo analysis of the Gag293-specific TCR repertoire. (A) Gating strategy for tetramer analysis in controller PBMCs. An example of PBMC staining with a control tetramer (AnnII) and a Gag293-loaded DRB5 tetramer is shown (plots at far right). One representative experiment of 4 is shown. (B) Frequency of *TRAV24* and *TRBV2* families in Gag293-Tet⁺ cells sorted ex vivo. The percentages of *TRAV24* expression in total *TRAV* products and *TRBV2* expression in total *TRBV* products are reported. Dotted lines indicate the mean percentage of *TRAV24* and *TRBV2* families in CD4⁺ T cells from 7 healthy donors. (C) Representation of Gag293-specific clonotypes found ex vivo in the cell line obtained from the same patient. The percentage of sequences matching a *TRAV24* or *TRBV2* ex vivo clonotype in the corresponding cell line is reported, with medians indicated by horizontal lines. (D and E) The percentages of public motifs are compared in sequences obtained ex vivo and in the matched cell line for *TRAV24* (D) and *TRBV2* (E), using paired Student's *t* test.

4 of 4 HIC samples obtained ex vivo, as compared with PBMCs from healthy donors ($3.7 \pm 1.0\%$) (Figure 4B).

The frequency of each *TRAV24* clonotype found ex vivo was computed relative to total *TRAV24* sequences found in the same patient (Supplemental Table 10, third column) and in the matched cell line (fourth column). Ex vivo clonotypes represented a median of 66% of sequences found in matched cell lines, indicating a substantial overlap between the ex vivo and in vitro repertoires (Figure 4C). Similarly, the *TRBV2* clonotypes detected ex vivo (Supplemental Table 3) represented a median of 45% of sequences found in matched cell lines (Figure 4C). Importantly, the frequency of *TRAV24* public motifs (AV24-1 + AV24-2) did not differ significantly between ex vivo and cell line-derived sequences, and could be as high as 87% (Figure 4D). Frequencies of *TRBV2* public motifs (BV2-1 + BV2-2) were also comparable ex vivo and in matched cell lines (Figure 4E). Public motifs were present at median values of 44% and 48% in the ex vivo *TRAV24* and *TRBV2* sequence datasets, respectively, emphasizing the high level of motif sharing in the Gag293-specific repertoire.

Detailed analysis of *TRAV24* sequences obtained ex vivo revealed the presence of previously identified public clonotypes in each of the patient tested (highlighted in color, Supplemental Table 10). Public clonotypes were present at median frequencies of 44% and 25% in ex vivo *TRAV24* and *TRBV2* sequences, respectively, which did not differ significantly from frequencies observed in matched cell lines (data not shown). Overall, the ex vivo analysis confirmed the high degree of TCR sharing among HIV controllers. It was striking that some of the most prevalent public clonotypes, such as AFKAAGNKLT, could represent more than half of *TRAV24* sequences in the Gag293-specific repertoire (54.7% in HIC7). This

suggested that public clonotypes could shape the properties of the Gag-specific response in controlled HIV infection.

TCR transfer confers Gag293 recognition in the context of multiple HLA-DR alleles. We set out to functionally characterize the most prevalent *TRAV24* public clonotype, AFKAAGNKLT (clonotype *TRAV24-F*), by pairing it with different *TRBV2* chains and testing the activity of reconstituted TCRs. The chosen *TRBV2* clonotypes, no. 24 (CASSRLAGMDEQFF) and no. 25 (CATTPGASGISEQFF), were the most abundant in the cell line of patient HIC2 (10.38% and 33.96% of *TRBV2* chains, respectively; Supplemental Table 3), and were coexpressed at high levels with clonotype *TRAV24-F*, resulting in a high probability of functional TCR chain pairing. The third *TRBV2* clonotype, no. 5 (CASSGLAGMDEQFF), was derived from patient HIC3, who also expressed *TRAV24-F* at a high level. Clonotype 5 differed by a single residue (R to G) from clonotype 24 and thus provided information on the contribution of the CDR3 β arginine to TCR function. *TRBV2* clonotypes 24 and 5 carried the public motif BV2-1, while *TRBV2* clonotype 25 was private (see Supplemental Table 11 for a list of all TCR constructs). Full-length *TRA* and *TRB* genes were cloned into a T2A-containing lentiviral vector, ensuring equimolar expression of the two chains. The resulting TCRs, F24, F25, and F5, were transduced in J76, a mutant Jurkat cell line defective for endogenous TCR expression, which provides a favorable cellular context for TCR transfer assays. After transduction, J76 cells expressed equivalent levels of the 3 TCRs at the cell surface ($\geq 60\%$ TCR⁺ cells) and recovered a high level of CD3 surface expression (Figure 5A).

To test the specificity of the transferred TCRs, we labeled transduced J76 cells with a panel of Gag293-loaded HLA-DR tetramers. The F24 TCR was found to bind 3 of the 4 tetramers

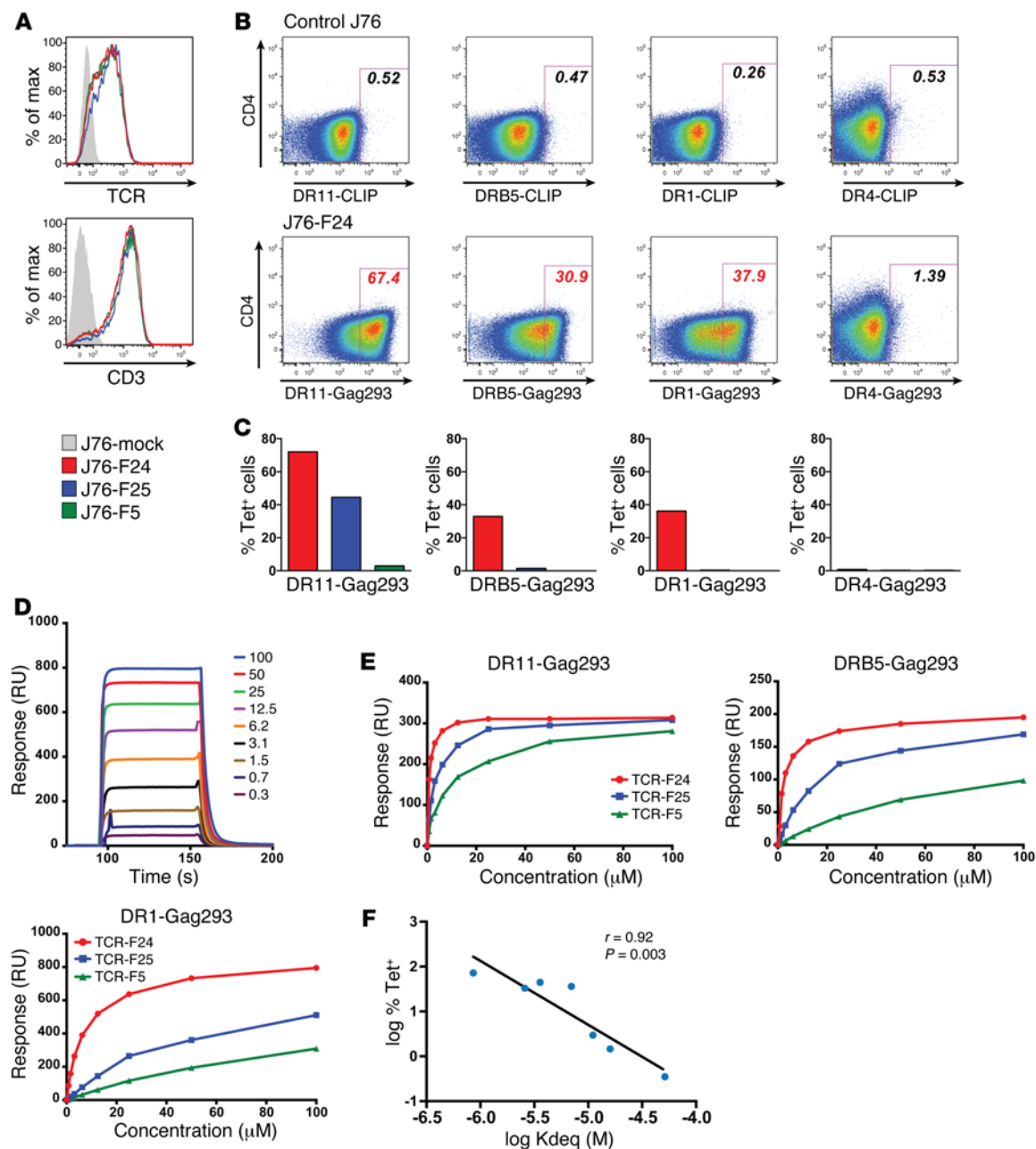


Figure 5. Public TCRs confer MHC II cross-restriction and high-affinity Gag293-MHC binding. (A) Expression of TCR β and CD3 in J76 cells transduced with the F24, F25, and F5 TCRs. Solid gray histograms correspond to mock-transduced J76 cells. (B) Staining of F24-transduced J76 cells with CLIP-loaded tetramers and Gag293-loaded tetramers. The percentage of Tet⁺ cells is reported in each plot. One representative experiment of 4 is shown. (C) The percentage of Tet⁺ cells after transfer of F24, F25, and F5 is reported for each of the 4 tetramers tested after subtraction of CLIP-tetramer background (mean of 2 experiments). (D) Example of SPR sensorgrams. The soluble F24 TCR (concentrations 0.3 to 100 μ M) was flown over immobilized DR11-Gag293 monomers to measure the SPR response. RU, response units. (E) Affinity measurement of the F24, F25, and F5 TCRs for Gag293 complexed to DR11, DRB5, or DR1 monomers. Each soluble TCR was flown over Gag293-DR complexes at different concentrations (x axis) to measure binding RU (y axis). Representative of $n > 2$ experiments. (F) Correlation between TCR affinity and tetramer binding. TCR affinities (log K_{deq}) of the F24, F25, and F5 TCRs for the 3 Gag293-DR complexes are plotted in function of the percentage of Gag293-Tet⁺ cells (log %Tet⁺) for the corresponding TCR/HLA-DR combination (y axis). r , linear regression coefficient. P value: probability that the slope estimated by linear regression is significantly non-zero.

tested, with an efficiency that was higher for DR11 as compared with DRB5 and DR1 (Figure 5B). Quantification of tetramer binding (Figure 5C) showed that the 3 TCRs recognized Gag293 in the context of DR11, with a labeling that was strong for F24 (72% Tet⁺), intermediate for F25 (44% Tet⁺), and low for F5 (3% Tet⁺). F24 bound the DRB5 tetramer at intermediate levels (33% Tet⁺),

while binding was weak for F25 (1.5%) and undetectable for F5. Binding with the DR1 tetramer showed a similar pattern. The DR4 tetramer provided a negative control, as it did not bind any of the TCRs tested. These experiments indicated that the highly prevalent public clonotype TRAV24-F could confer Gag293 recognition in the context of multiple HLA-DR molecules, with an efficiency

Table 3. TCR affinities determined by SPR

TCRs	DRB1*1101 Kdeq (μM)	DRB5*0101 Kdeq (μM)	DRB1*0101 Kdeq (μM)
F24	0.86 \pm 0.15	2.58 \pm 0.19	6.97 \pm 0.22
F25	3.58 \pm 0.25	16.00 \pm 0.60	51.50 \pm 3.00
F5	11.06 \pm 1.73	74.45 \pm 6.25	>100

Affinities (Kdeq) of the F24, F25, and F5 TCRs for Gag293-loaded HLA-DRB monomers. Each Kdeq value represents the mean \pm SEM from at least 2 independent experiments performed in duplicate.

that depended both on the presenting *HLA-DR* allele and on the nature of the TRBV2 chain.

Tetramer titration experiments showed the expected hierarchy among the 3 TCRs (F24>F25>F5) but did not prove sensitive enough to determine TCR avidity for F25 and F5 (Supplemental Figure 12). To precisely determine TCR affinity, we expressed the F24, F25, and F5 TCRs as soluble recombinant proteins and measured their binding to Gag293–HLA-DR monomers by surface plasmon resonance (SPR). The soluble TCRs were passed over chips coated with immobilized DR11, DRB5, or DR1 monomers loaded with Gag293 (example of sensorgram in Figure 5D). In agreement with tetramer binding assays, the 3 TCRs recognized Gag293–HLA-DR complexes with different affinities (F24>F25>F5). This hierarchy was conserved across the different HLA-DR alleles tested (Figure 5E). Of note, the F24 TCR recognized the Gag293–DR11 complex with a very high affinity, of 0.86 μM (Table 3), which is rarely seen for MHC II-restricted TCRs (36). F24 bound the Gag293–DRB5 and Gag293–DR1 complexes with affinities that were 3- and 8-fold lower, respectively, but still remained in the high-affinity range (<10 μM). The F25 and F5 TCRs also interacted with the Gag293–DR11 complex with relatively high affinities (3 and 11 μM , respectively), while affinities were intermediate or low for the two other allomorphs tested. The percentage of Tet⁺ cells in TCR-transduced J76 cells, when measurable, correlated well with affinities measured by SPR ($r = 0.92$; Figure 5F), consistent with the notion that tetramer binding predominantly depends on TCR affinity. These results showed that association of the TRAV24-F public clonotype with highly expressed TRBV2 clonotypes could, for certain combinations, generate HLA-cross-restricted TCRs of unusually high affinity.

Transfer of TCRs containing public TRAV24 and TRBV2 clonotypes confers high antigen sensitivity to J76 cells. TCR function was tested by monitoring the induction of the early activation marker CD69 in transduced J76 cells. Murine fibroblastic L cells engineered to express a single human *HLA-DR* allele were used as antigen-presenting cells (APCs), allowing precise control of the restricting HLA molecule. L cells expressing DR1, DR11, DR15, or DRB5 (Figure 6A) and DR3, DR4, or DR7 (Supplemental Table 11) were pulsed with decreasing doses of Gag293 peptide and cocultured with J76 cells transduced with the F24, F25, and F5 TCRs. The 3 TCRs could signal and trigger T cell activation, as indicated by the induction of CD69 in $\geq 50\%$ of J76 cells in the presence of DR11 APCs. The F24 TCR showed the broadest reactivity, as it induced strong T cell activation in the presence of DR11, DR15, DRB5, and DR1 APCs, and weak but consistent T cell activation in the pres-

ence of DR7 APCs (Supplemental Table 11). When restricted by DR11, F24 antigen sensitivity reached 4×10^{-7} M as measured by the half maximal effective concentration (EC_{50}) for CD69 induction, which represents a high sensitivity for a cell culture system devoid of costimulatory molecules. The F25 TCR did not react with DR7 and showed intermediate reactivity with the other 4 *HLA-DR* alleles. The F5 TCR showed the narrowest restriction, with an antigen sensitivity of 2×10^{-6} M in the presence of DR11 APCs, low responses in the presence of DR15 and DRB5 APCs, and undetectable responses in other cases. TCR affinities measured by SPR for the *DR11*, *DRB5*, and *DR1* alleles correlated well with antigen sensitivities measured in transduced J76 ($r = 0.85$, $P = 0.016$; Figure 6D), suggesting that TCR affinity dictated TCR function.

Two other TRAV24 public clonotypes, TRAV24-S (ASKAAGNKL) and TRAV24-RR (SRRAAGNKL), conferred cross-restriction by 4 *HLA-DR* alleles when paired to TRBV2 chains 24 and 5, respectively (Supplemental Table 11), emphasizing that broad HLA cross-restriction was a frequent property of public clonotypes. We then tested the pairing of TRAV24-F with two TRBV2 public clonotypes: TRBV2-4 (ASSPGTSGVGEQF), shared by 2 controllers; and TRBV2-13 (ASSRRTSGGTDQY), the most prevalent TRBV2 clonotype, shared by 4 controllers. The resulting TCRs, F4 and F13, were cross-restricted by 3 *HLA-DR* alleles (*DR11*, *DR15*, and *DRB5*) (Figure 6B). While F4 had relatively good antigen sensitivity (10^{-6} M) when restricted by DR11, it gave only low responses with the two other alleles. In contrast, F13 showed good antigen sensitivity with DR11 (7.5×10^{-7} M) and intermediate sensitivity with the two other alleles (Supplemental Table 11). F13, like F24, carried an R at position 5 of the TRBV2 CDR3 junction, which may contribute to the efficient detection of Gag293 in varied HLA backgrounds. Two TCRs derived from private clonotypes from treated patients were studied for comparison. TCRs HD5 and HY9 comprised the most prevalent TRAV24 and TRBV2 clonotypes from treated patients HAART3 and HAART6, respectively (Supplemental Table 11). These TCRs yielded responses of medium avidity when restricted by DR15 and DR1 (10^{-5} M $\leq EC_{50} \leq 10^{-6}$ M), gave only low responses in the presence of DRB5 L cells, and did not react with DR11 L cells (Figure 6C). While these TCRs from treated patients could react with several *HLA-DR* alleles, their degree of cross-restriction appeared narrower than that observed for controller TCRs. Taken together, the analysis of recombinant TCRs specific for Gag293 highlighted that the most prevalent public clonotypes conferred efficient Gag293 recognition in the context of multiple *HLA-DR* alleles. Interestingly, antigen sensitivity measured for the 8 TCRs tested in the presence of DR11 correlated with the number of *HLA-DR* alleles restricting each of these TCRs ($r = -0.86$, $P = 0.006$; Figure 6E), suggesting that both properties depended on the same TCR features.

We next verified that the recombinant TCRs could recognize native HIV capsid antigens naturally processed by APCs, in addition to peptide-pulsed APCs. To this end, we used infected monocyte-derived dendritic cells (MDDCs) as alternative APCs. MDDCs from DR11⁺ healthy donors were infected with an HIV-1 pseudotyped virus and incubated with J76 cells expressing the F24, F25, or F5 TCR. The TCR-transduced cells showed robust CD69 induction in the presence of infected MDDCs, while CD69 expression remained moderate in the absence of infection (Figure 6F). CD69

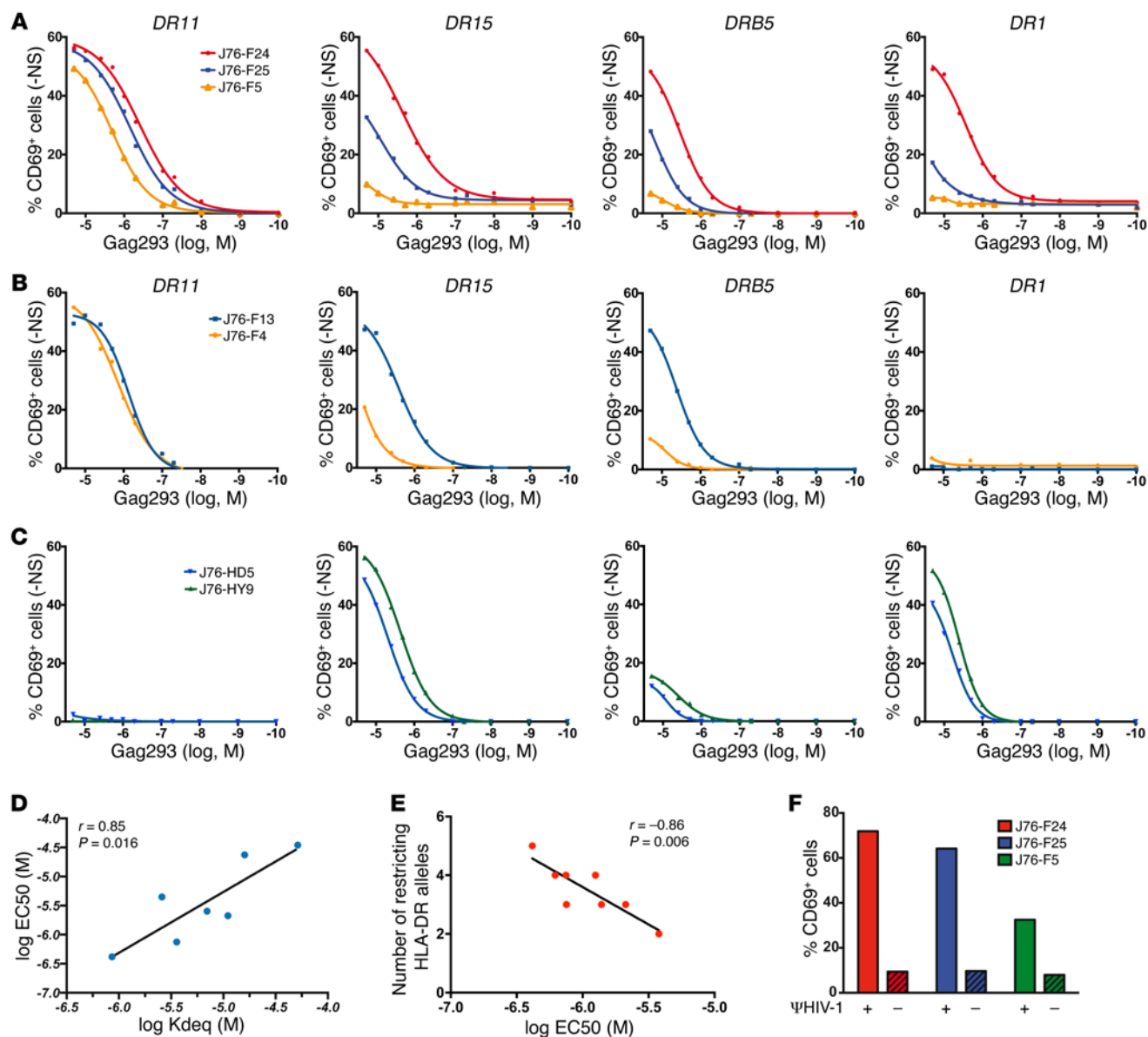


Figure 6. Public TCR transfer confers high antigen sensitivity to J76 cells. (A and B) Antigen sensitivity assay in TCR-transduced J76 cells. Percentages of CD69 expression in J76 cells transduced with TCRs F24, F25, or F5 (A) or with F4 or F13 (B), after coculture with L cells expressing different *HLA-DR* alleles (*DR11*, *DR15*, *DRB5*, or *DR1*) and loaded with decreasing Gag293 concentrations. (C) Antigen sensitivity assay of TCRs HD5 and HY9 from HAART patients. -NS, not stimulated. (A–C) Experiments were conducted in triplicate, with curves corresponding to one experiment shown for clarity. (D) Correlation between binding affinity ($\log K_{deq}$) for Gag293-loaded *HLA-DR* monomers (*DR11*, *DRB5*, and *DR1*) and antigen sensitivity ($\log EC_{50}$ for CD69 induction) of the F24, F25, and F5 TCRs. (E) Correlation between the antigen sensitivity ($\log EC_{50}$) measured for 8 HIC TCRs (described in Supplemental Table 1) in the presence of *DR11* APCs and the number of *HLA-DR* alleles restricting these TCRs. (D and E) r , linear regression coefficient; P value: probability that the slope estimated by linear regression is significantly non-zero. (F) TCR reactivity to native HIV-1 capsid antigens. CD69 induction was quantified in TCR-transduced J76 cells cocultured with dendritic cells infected with the VSV-pseudotyped virus Ψ HIV-1 (solid bars) or left uninfected (striped bars). One representative experiment of 3 is shown.

induction followed the same hierarchy as that observed when L cells were used as APCs (F24>F25>F5), indicating that TCR properties were conserved in different antigen presentation systems.

As the public clonotypes consistently generated TCRs with optimal antigen sensitivity in the context of *DR11*, it was important to verify that differences in antigen sensitivity between the HIC and the HAART group did not depend on a bias in *DR11* expression. Among the 29 patients included in the study, 3 controllers and 4 treated patients expressed a *DR11* allele, including *HLA-*

*DRB1*1101*, *-DRB1*1122*, and *-DRB1*1165* (Supplemental Table 1). Comparison of the last Gag293 peptide dilution that induced a specific cell line showed that, among *DR11* patients, 3 of 3 controllers and 1 of 4 treated patient responded at a dilution less than 10^{-5} M (Supplemental Figure 13A). Trends for a higher Gag293-specific ELISPOT response and for more prominent TRAV24 biases were also noted in *DR11* controllers as compared with *DR11*-treated patients (Supplemental Figure 13, B and C). Taken together, these findings support the notion that particular clonotypes expressed

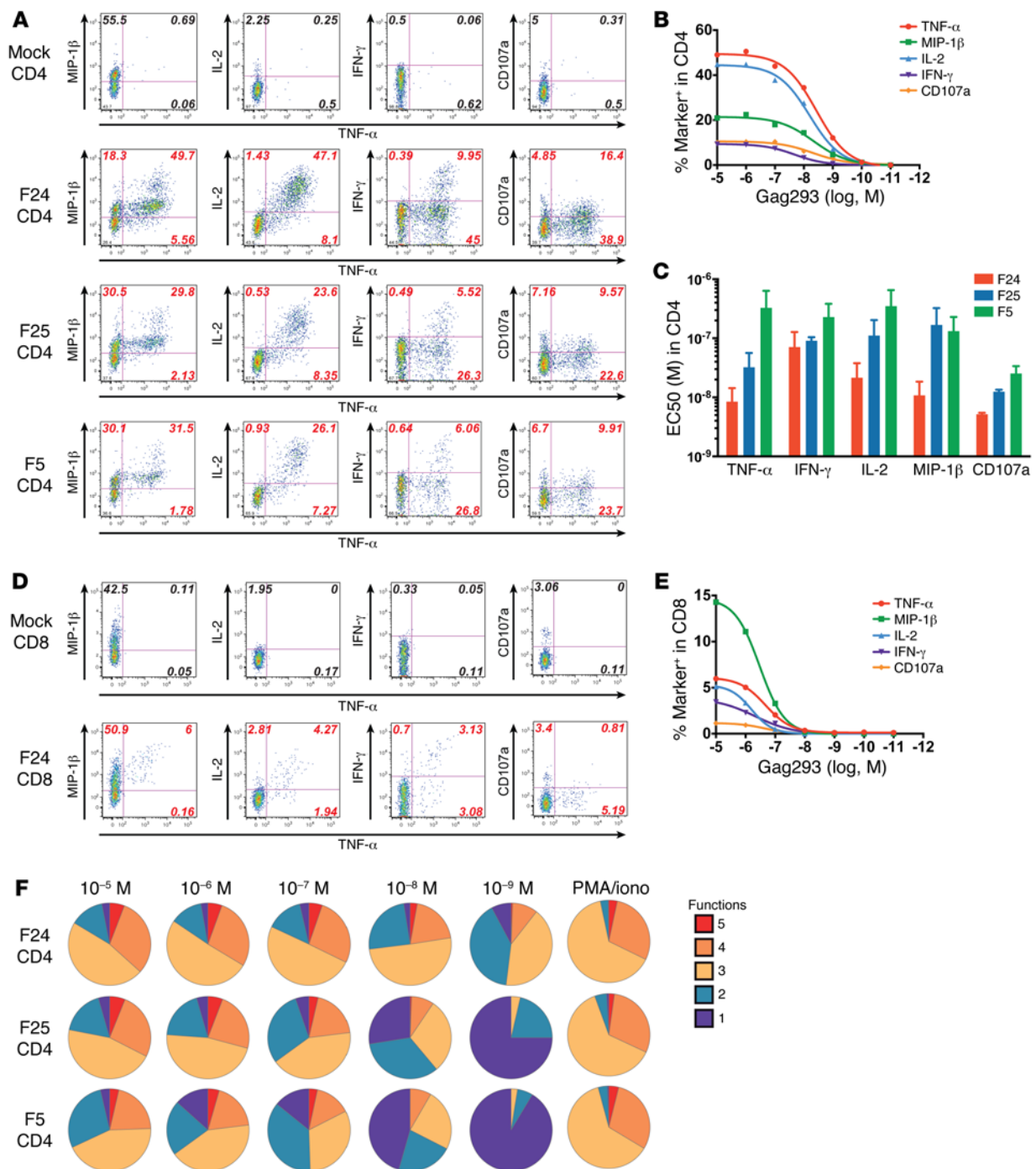


Figure 7. Public TCR transfer confers high-avidity responses and polyfunctionality to primary T cells. (A) Cytokine production in primary CD4⁺ T cells mock transduced or transduced with the F24, F25, or F5 TCR and stimulated with 10⁻⁵ M Gag293. CD4⁺ T cells were analyzed by ICS for expression of TNF- α , MIP-1 β , IL-2, IFN- γ , and CD107a. (B) ICS analysis of CD4⁺ T cells transduced with F24 and stimulated with decreasing Gag293 doses. Expression of the analyzed markers (% marker⁺) is reported as a function of peptide dose, after subtraction of background measured in unstimulated cells. (C) Summary of EC₅₀ values measured by ICS in CD4⁺ T cells after TCR transduction. For each TCR, the Gag293 concentration required to achieve half-maximal expression of the 5 markers studied is reported. Mean \pm SEM of EC₅₀ values obtained for 3 independent experiments are reported. (D) Cytokine production in CD8⁺ T cells that were mock transduced or transduced with the F24 TCR and analyzed as in A. (E) ICS analysis of CD8⁺ T cells transduced with F24 and stimulated with decreasing Gag293 doses. (F) Polyfunctionality of CD4⁺ T cells transduced with the F24, F25, and F5 TCRs and stimulated with decreasing Gag293 doses. The number of coexpressed markers of the 5 studied (TNF- α , MIP-1 β , IL-2, IFN- γ , CD107a) defines the number of functions reported in legend. Stimulation with PMA/ionomycin was used as a positive control. For A, B, D, E, and F, 1 representative experiment of 3 is shown.

in controlled HIV infection, rather than merely the expression of DR11, are associated with high-avidity Gag293-specific responses.

Transfer of the F24 TCR confers polyfunctionality to primary CD4⁺ and CD8⁺ T cells. We next evaluated the properties of the F24, F25, and F5 TCRs when transferred directly into primary T cells, a system physiologically more relevant to potential TCR transfer applications. TCR-transduced PBMCs from healthy donors were analyzed for exogenous TCR expression with a TRBV2-specific mAb. Mock-transduced CD4⁺ T cells expressed endogenous TRBV2 at levels below 5%, while TCR-transduced CD4⁺ T cells showed TRBV2 expression rates in the 25%–35% range (Supplemental Figure 14A). The hierarchy of HLA-DR tetramer binding was consistent with that observed in J76 cells, with F24 showing significant binding to 4 different tetramers (DR11, DR15, DRB5, and DR1); F25 reacting mostly to the DR11 and DRB5 tetramers and minimally to the DR1 tetramer; and F5 showing barely detectable tetramer binding (Supplemental Figure 14, B and C).

For evaluation of TCR function, PBMCs from DR11, DR15, DR1, or DRB5 donors were TCR transduced and cocultured with autologous MDDCs pulsed with Gag293. A panel of 5 markers, including the cytokines TNF- α , IL-2, and IFN- γ , the chemokine MIP-1 β /CCL4, and the degranulation marker CD107a, was assayed by intracellular cytokine staining (ICS). CD4⁺ T cells transduced with the F24, F25, and F5 TCRs showed abundant cytokine production and degranulation capacity after high-dose Gag293 peptide stimulation (Figure 7A). A specific ICS response was detected in $\geq 50\%$ CD4⁺ T cells transduced with F24, while in the same experiment TRBV2 expression increased by only 25% after transduction (Supplemental Figure 14A), pointing to efficient cytokine production even in cells expressing limiting amounts of transduced TCR. ICS responses were then measured in the presence of decreasing Gag293 peptide concentrations (as shown for F24-transduced cells; Figure 7B). The hierarchy of marker induction was conserved across peptide doses, with high expression of TNF- α and IL-2, intermediate expression of MIP-1 β , and more limited expression of CD107a and IFN- γ . Of note, specific expression of these 5 markers persisted at very low peptide doses (10^{-9} to 10^{-10} M). Antigen sensitivity was quantified for the 3 TCRs by measuring the EC₅₀ for induction of the 5 markers tested (Figure 7C). This analysis confirmed the functional hierarchy among the TCRs (F24>F25>F5), which followed the TCR affinity ranking. F24 conferred a highly sensitive detection of Gag293 in primary cells, with EC₅₀ values varying between 10^{-9} and 10^{-8} M when TNF- α , CD107a, or MIP-1 β production was measured. IFN- γ responses appeared comparatively less sensitive, with EC₅₀ values between 10^{-8} and 10^{-7} M, while IL-2 gave intermediate values. Thus, only TCRs with particularly high affinity, such as F24, may lead to full Th1 differentiation with IFN- γ production in situations of low antigen availability.

Polyfunctionality, or the capacity to express multiple cytokines simultaneously, is a hallmark of controller T cells and is thought to provide superior effector functions (16, 21, 37). Quantification of the number of functions (or markers) coexpressed by TCR-transduced cells revealed a high degree of polyfunctionality (Figure 7F). Indeed, the majority (>65%) of F24-, F25-, and F5-expressing cells could be deemed polyfunctional, as they expressed more than 3 functions after high-dose Gag293 stimulation. CD4⁺ T cells coexpressing the full set of markers (5 functions) were detected at

peptide doses as low as 10^{-8} M for F24, and as low as 10^{-7} M for F25 and F5. After F24 transfer, polyfunctional cells expressing at least 3 functions still represented more than half of CD4⁺ T cells responding to 10^{-9} M peptide, emphasizing that polyfunctional responses could be achieved after stimulation with minimal amounts of Gag antigen.

Interestingly, CD8⁺ T cells transduced with the F24 TCR also showed a Gag293-specific cytokine response, with detectable induction of the 5 markers tested (Figure 7, D and E). Cytokine response in CD8⁺ T cells transduced with F25 and F5 remained low or undetectable (data not shown). The F24-dependent response in CD8⁺ T cells could be blocked by treatment with an anti-HLA-DR antibody, indicating that it was restricted by MHC II (Supplemental Figure 15A). Thus, the high-affinity TCR F24 was able to confer a Gag293-specific response in the absence of CD4 coreceptor expression, in a situation where availability of the Lck kinase may be limiting. F24 transfer induced 3 functions or more in greater than 25% of specific CD8⁺ T cells at peptide doses as low as 10^{-7} M (Supplemental Figure 15B), indicating that this high-affinity TCR could confer polyfunctional responses to CD8⁺ T cells. Thus, controller clonotypes could be used to generate TCRs with uncommon properties, including affinities in the micromolar range, broad HLA-DR cross-restriction, high antigen sensitivity, and polyfunctionality in both the CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets.

Discussion

Exploration of the TCR repertoire specific for the most immunoprevalent CD4 epitope in HIV-1 Gag revealed a repertoire markedly biased toward the TRAV24 and TRBV2 gene families. Highly prevalent public motifs and public clonotypes were preferentially shared by HIV controllers, suggesting that particular TCR determinants contributed to the efficiency of the antiviral CD4 response in these patients. This notion was reinforced by functional analysis of the most prevalent public clonotypes, as these were able to confer HLA-cross-restricted, highly sensitive, polyfunctional responses against Gag antigens, indicative of superior function. These findings, which to our knowledge provide the first assessment of the HIV-specific CD4⁺ T cell repertoire at the clonotypic level, emphasize that intrinsic TCR determinants, rather than low antigenemia, specify the remarkable properties of the cellular response in controlled HIV infection.

It was noteworthy that both the TRAV24 and TRBV2 repertoires specific for Gag293 showed a high degree of motif and clonotype sharing. So far, most studies of the human TCR repertoire have focused on TRB genes, but recent analyses suggest that the human TRA repertoire is even more diverse (38). Our findings provide evidence for a dual bias in controlled HIV infection, with both TCR chains showing a significant degree of motif conservation. The most prevalent TRAV24 clonotype (AFKAAGNKLIT) was present in 6 of 8 controllers (75%) studied. In comparison, CD8 TRB public clonotypes reported in previous studies of the HIV-specific repertoire were shared by 2–4 patients (13, 14, 39, 40). When the analysis was extended to less-stringent definitions of TCR biases, close to half of TRAV24 and TRBV2 clonotypes shared defined public motifs, while the corresponding frequencies were of 29% and 10%, respectively, for clonotypes of treated patients. Such strong bias in the Gag293-specific TCR repertoire of control-

lers could not be attributed to amplification of a few clonotypes during culture, as the repertoire of controllers remained highly diverse, with a median of 36 distinct TRBV2 clonotypes per 100 CDR3 sequences. In addition, similar frequencies of public motifs were detected *in vitro* and *ex vivo* when the TCR repertoire of controllers could be analyzed in both conditions. Rather, these findings suggest that strong selective pressures (further discussed in the supplemental material) shaped the Gag293-specific repertoire during the establishment of viral control.

The coexpression of TRAV24 and TRBV2 public clonotypes generated functional TCRs that, for some combinations, displayed a remarkably high affinity for Gag293-MHC II complexes. Human TCRs generally show affinities in the 1 to 100 μM range by SPR analysis (36). MHC II-restricted TCRs show a trend for a lower affinity as compared with MHC I-restricted TCRs, with average K_D values of 70 versus 35 μM , respectively. With a K_D of 0.86 μM for the Gag293-DR11 complex, F24 demonstrated one of the highest affinities reported so far for an MHC I-restricted TCR, ranking second in a list of 22 human and mouse TCRs for which structural data are available (36). The molecular determinants of a high-avidity interaction for the Gag293-MHC complex appear to depend both on the TRAV24 and TRBV2 chains and on the restricting HLA allele. The most conserved CDR3 residues in public motifs represent likely candidates for contact residues with Gag293. However, conserved CDR1/CDR2 residues may also contact the Gag293 peptide, considering the predominance of the TRAV24 and TRBV2 families. Future structural studies should help determine the respective roles of the CDR3 versus the CDR1/2 regions in shaping high-avidity interactions for Gag293-MHC complexes. The expression of high-affinity TCRs for Gag293 in controllers resulted in high antigen sensitivity as measured by CD69 induction, with a good correlation between the two parameters ($r = 0.85$). Thus, TCR biophysical properties largely accounted for TCR function, consistent with multiple studies in animal models (41, 42). It should be noted, however, that in some studies TCRs with very high or supraphysiological affinities were found to have reduced functions (43). A proposed explanation is that a peptide-MHC (pMHC) that interacts too tightly with a very high-affinity TCR cannot disengage to contact additional TCRs and thus does not achieve serial TCR triggering and T cell response amplification (44). We did not observe decreased functions for the TCR/pMHC II combinations showing the highest affinities by SPR, suggesting that TCR affinities in the order of 1 μM are still in the physiological range for optimal TCR function in human CD4⁺ T cells.

The reasons for the preferential amplification of high-affinity Gag293-specific TCRs in controllers compared with treated patients remain to be elucidated. A particular genetic background or a limited duration of acute infection may have promoted the amplification of such TCRs in controllers (45). Conversely, patients who initially progressed to disease may have lost the high-avidity CD4⁺ T cell population due to preferential infection and depletion, a notion supported by the restricted CD4 TCR repertoire observed in treated patients, and by rapid loss of certain CD4 specificities after the acute infection stage (6). It will be informative to determine whether other immunoprevalent HIV epitopes elicit a response pattern similar to that observed for

Gag293, with the induction of a highly biased, high-affinity TCR repertoire in controlled infection. The preferential detection of Gag-specific CD4 responses in HIV controllers (20) suggests that several regions of Gag may be targeted by high-affinity TCRs, though this remains to be investigated. High-affinity CD4 TCRs are endowed with strong proliferative capacity (41), which helps explain how they could reach such a dominance in controlled HIV infection. The high affinity of controller TCRs also translated into efficient cytokine secretion upon Gag293 peptide stimulation. Primary CD4⁺ T cells transduced with the F24 TCR showed EC_{50} values ranging between 10^{-8} M and 10^{-9} M peptide for the different cytokines studied, indicative of a remarkably high antigen sensitivity for the CD4⁺ T cell subset. Polyfunctionality, a property that has been associated with HIV control (37), showed a clear dependence on TCR affinity. Comparison of the F24, F25, and F5 TCRs showed that a difference of 1.1 log in affinity resulted in a 2-log difference in the peptide concentration at which half the specific cells retained 3 functions. Thus, TCR affinity appears critical in determining the range of cytokines produced, particularly at low antigen dose. Of interest, not all cytokines were equally dependent on the strength of the TCR signal, with TNF- α showing the lowest requirements and IFN- γ the most stringent. The notion of a hierarchy in cytokine production is consistent with a report showing that the affinity of Gag-specific T cell clones dictated their cytokine expression profile (10). It is relevant that for CD4⁺ T cells, in contrast to CD8⁺ T cells, IFN- γ is the most “demanding” cytokine, as it can be produced only by high-avidity cells upon limiting antigenic stimulation. IFN- γ plays a key role in CD4⁺ T cell helper function, through its capacity to upregulate MHC II in APCs and prime them for efficient antigen presentation. In addition, IFN- γ production by tissue CD4⁺ T cells plays an underappreciated role in the recruitment of immune effectors, through the triggering of chemokine cascades (46). In controlled HIV infection, high-avidity Gag-specific CD4⁺ T cells may play a similar role, by keeping the immune system in constant alert and rapidly recruiting CD8⁺ T cells and NK cells to sites of HIV replication upon the occurrence of viral replication blips. In addition, IFN- γ secretion may play a direct antiviral role, through the induction of IFN-stimulated genes (ISGs) that inhibit HIV replication (47). For instance, Th1 cells are thought to be less infectable than Th2 cells due to their higher expression of the HIV restriction factor APOBEC3G (48). Highly differentiated Th1 effectors that reexpress CD45RA appear particularly resistant to HIV infection (49). Gag-specific CD4⁺ T cells in controllers maintain a Th1 differentiation status with persistent IFN- γ production (22), raising the possibility that such cells possess a degree of resistance to HIV infection. This would be consistent with studies that documented a lower susceptibility of controller CD4⁺ T cells to HIV replication *in vitro* (50). Thus, high TCR affinity, with the associated capacity for IFN- γ expression at low antigen dose, may contribute to HIV control at several levels, through sensitive immune surveillance, rapid triggering of helper functions, and direct antiviral effector mechanisms.

Of interest, the F24 TCR was able to confer polyfunctional cytokine responses when transferred into CD8⁺ T cells. The responses were MHC II restricted, indicating that the F24 TCR could interact with the Gag293-MHC II complex in the absence of the CD4 coreceptor. The CD4 molecule is not thought to contrib-

ute significantly to the affinity of the pMHC/TCR/CD4 complex but plays an important role in relocating the kinase Lck close to the TCR/CD3 signaling complex (51). The lower cytokine responses in CD8⁺ than in CD4⁺ T cells may thus result from a lower number of Lck molecules available for triggering intracellular signals. The transfer of the F24 TCR to CD8⁺ T cells still conferred the 5 functions tested at the 10⁻⁵ M to 10⁻⁷ M antigen dose, suggesting that transduced CD8⁺ T cells could become efficient effectors in foci of productive HIV replication. These findings open the possibility of reprogramming CD8⁺ T cells to target the highly conserved major homology region (MHR) of capsid, which could be advantageous given the high fitness cost associated with mutations in this region (52). The report that a CMV-based protective SIV vaccine elicited a high frequency of unconventional MHC II-restricted CD8 responses highlights the potential benefits of CD8⁺ T cell reprogramming (53). Studies of TCR transfer for cancer immunotherapy have shown that transferring the same TCR into both CD4⁺ and CD8⁺ T cells could enhance tumoricidal activity (54). Similarly, the transfer of a high-avidity Gag-specific TCRs in both CD4⁺ and CD8⁺ T cell populations may be of interest for adoptive T cell therapies targeting HIV, in order to trigger a full set of antiviral functions.

In conclusion, study of TCRs specific for the immunoprevalent CD4 epitope in capsid revealed that particular clonotypes are associated with HIV control. The TCR repertoire of controllers was characterized by a high prevalence of public TRAV24 and TRBV2 chains. Reconstituted TCRs showed affinities that reached the micromolar range, at the high end of values obtained for naturally expressed TCRs. Public clonotypes conferred MHC II cross-restriction, high antigen sensitivity, and polyfunctionality to CD4⁺ T cells, suggesting a key role in shaping the properties of an efficient CD4 response. The most prevalent public clonotype also proved functional in CD8⁺ T cells, suggesting that it could be used to target the highly conserved capsid MHR region in patients of diverse HLA types. Inducing or transferring such clonotypes may contribute to the development of immunotherapeutic approaches that aim at a functional cure of HIV infection.

Methods

Study design. HIV controllers (HIC group; *n* = 14) were recruited through the CO21 CODEX cohort implemented by ANRS. HIV controllers were defined as HIV-1-infected patients who had been seropositive for more than 5 years, had received no antiretroviral treatment, and for whom more than 90% of plasma viral load measurements were undetectable by standard assays. All HIV controllers included in the study had current viral loads of less than 50 copies/ml. The group of efficiently treated patients (HAART group; *n* = 14) had received antiretroviral therapy for a minimum of 5 years and showed long term HIV-1 suppression with viral loads of less than 50 copies/ml. Treated patients were recruited at the Raymond Poincaré and Bicêtre hospitals (France). Patients were included in the TCR study if their genotype matched at least one of the following alleles: *DRBI*0101 (DR1)*, *DRBI*1101 (DR11)*, *DRBI*1501 (DR15)*, or *DRB5*0101 (DRB5)*. Healthy donors were anonymous volunteers who donated blood at Etablissement Français du Sang.

Molecular and functional TCR analysis. Molecular and functional analyses of the Gag293-specific TCR repertoire are described in Supplemental Methods.

Statistics. Statistics were computed with Prism version 6.0 software (GraphPad) and R version 3.2.3 software (<https://www.r-project.org/>). *P* values less than 0.05 were considered statistically significant. Differences between groups were analyzed with the nonparametric Mann-Whitney *U* test, with the exception of total clonotypic repertoires, for which means were compared by unpaired 2-tailed *t* tests. Differences in cell line response frequencies and HLA-DR allele frequencies were analyzed in contingency tables with Fisher's exact test. Differences in proportions of CDR3 lengths were computed with a 2-sample test for equality of proportions with continuity correction *R*. Correlations were analyzed with the nonparametric Spearman's coefficient. EC₅₀ values were obtained after non-linear curve fit using a sigmoidal dose response model in Prism. All significant differences between groups (*P* < 0.05) were reported in data plots.

Study approval. The study was promoted by ANRS and approved by the Comité de Protection des Personnes Ile-de-France VII under number 05-22. All participants gave written informed consent prior to inclusion in the study.

Author contributions

DB, MG, OL, SG, AL, MM, AN, KAC, BL, MC, PDT, JR, JFD, FAS, and LAC designed and/or performed experiments. DB, MG, SG, AL, SH, PL, FB, and LAC analyzed data. DB, MG, and LAC wrote the manuscript. OL, SG, JR, and FA edited the manuscript.

Acknowledgments

This study was carried out in the framework of the ANRS EP36 HIV Controllers Study Group. We are grateful to the patients who participated in the study. We thank the clinicians who recruited patients for this study: Huguette Berthé, David Zucman, Dominique Bornarel, Olivier Bouchaud, Patricia Honoré, Philippe Genet, Juliette Gerbe, Olivier Patey, Laurent Richier, Katia Bourdic, Pierre-Marie Girard, Bénédicte Lefebvre, Michèle Pauchard, Jean-Michel Molina, Sylvie Parlier, Caroline Lascaux-Combe, Samuel Ferret, Valérie Garrait, and Isabelle DeLacroix-Szmania. We thank Pierre Charneau, Mirjam Heemskerk, Fabrice Lemaître, Bernard Maillère, Christiane Moog, Olivier Schwartz, and Philippe Souque for advice and reagents; the team of the Pasteur Center for Human Immunology for help with cell sorting; and the team of the NIH Tetramer Core facility at Emory University for reagents and advice on tetramer loading. This work was supported by ANRS, Sidaction, the Pasteur Institute, the Australian Research Council (ARC), and the National Health and Medical Research Council of Australia (NHMRC). L.A. Chakrabarti is supported by grants from ANRS (EP36-8) and Agence Nationale de la Recherche (ANR PD1VAX); S. Gras is supported by an ARC Future Fellowship (FF120100416), and J. Rossjohn by an NHMRC Australia Fellowship (AF50). D. Benati was the recipient of postdoctoral fellowships from ANRS, the Fondation pour la Recherche Médicale, and the Institut Servier. M. Galperin is the recipient of an ANRS doctoral fellowship. M. Mukhopadhyay is a scholar in the Pasteur - Paris University (PPU) International PhD program.

Address correspondence to: Lisa A. Chakrabarti or Daniela Benati, Unité de Pathogénie Virale, Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France. Phone: 33.1.45.68.89.45; E-mail: chakra@pasteur.fr (L.A. Chakrabarti), daniela.benati@unimore.it (D. Benati).

1. Deeks SG, et al. Systemic effects of inflammation on health during chronic HIV infection. *Immunity*. 2013;39(4):633–645.
2. Connors M, et al. HIV infection induces changes in CD4⁺ T-cell phenotype and depletions within the CD4⁺ T-cell repertoire that are not immediately restored by antiviral or immune-based therapies. *Nat Med*. 1997;3(5):533–540.
3. Gorochov G, et al. Perturbation of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell repertoires during progression to AIDS and regulation of the CD4⁺ repertoire during antiviral therapy. *Nat Med*. 1998;4(2):215–221.
4. Rosenberg ES, et al. Vigorous HIV-1-specific CD4⁺ T cell responses associated with control of viremia. *Science*. 1997;278(5342):1447–1450.
5. Douek DC, et al. HIV preferentially infects HIV-specific CD4⁺ T cells. *Nature*. 2002;417(6884):95–98.
6. Lubong Sabado R, et al. In vitro priming recapitulates in vivo HIV-1 specific T cell responses, revealing rapid loss of virus reactive CD4 T cells in acute HIV-1 infection. *PLoS One*. 2009;4(1):e4256.
7. Lambotte O, et al. HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clin Infect Dis*. 2005;41(7):1053–1056.
8. Chakrabarti LA, Simon V. Immune mechanisms of HIV control. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(4):488–496.
9. Saez-Cirion A, et al. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar CTL activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(16):6776–6781.
10. Almeida JR, et al. Antigen sensitivity is a major determinant of CD8⁺ T-cell polyfunctionality and HIV-suppressive activity. *Blood*. 2009;113(25):6351–6360.
11. Ladell K, et al. A molecular basis for the control of preimmune escape variants by HIV-specific CD8⁺ T cells. *Immunity*. 2013;38(3):425–436.
12. Chen H, et al. TCR clonotypes modulate the protective effect of HLA class I molecules in HIV-1 infection. *Nat Immunol*. 2012;13(7):691–700.
13. Almeida JR, et al. Superior control of HIV-1 replication by CD8⁺ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J Exp Med*. 2007;204(10):2473–2485.
14. Iglesias MC, et al. Escape from highly effective public CD8⁺ T-cell clonotypes by HIV. *Blood*. 2011;118(8):2138–2149.
15. Younes SA, et al. HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4⁺ T cells endowed with proliferative capacity. *J Exp Med*. 2003;198(12):1909–1922.
16. Harari A, et al. Functional heterogeneity of memory CD4 T cell responses in different conditions of antigen exposure and persistence. *J Immunol*. 2005;174(2):1037–1045.
17. van Grevenynghe J, et al. Transcription factor FOXO3a controls the persistence of memory CD4(+) T cells during HIV infection. *Nat Med*. 2008;14(3):266–274.
18. Potter SJ, et al. Preserved central memory and activated effector memory CD4⁺ T-cell subsets in human immunodeficiency virus controllers: an ANRS EP36 study. *J Virol*. 2007;81(24):13904–13915.
19. Kaufmann DE, et al. Limited durability of viral control following treated acute HIV infection. *PLoS Med*. 2004;1(2):e36.
20. Ranasinghe S, et al. HIV-specific CD4 T cell responses to different viral proteins have discordant associations with viral load and clinical outcome. *J Virol*. 2012;86(1):277–283.
21. Ferre AL, et al. HIV controllers with HLA-DRB1*13 and HLA-DQB1*06 alleles have strong, polyfunctional mucosal CD4⁺ T-cell responses. *J Virol*. 2010;84(21):11020–11029.
22. Vingert B, et al. HIV controllers maintain a population of highly efficient Th1 effector cells in contrast to patients treated in the long term. *J Virol*. 2012;86(19):10661–10674.
23. Kaufmann DE, et al. Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4⁺ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat Immunol*. 2007;8(11):1246–1254.
24. Porichis F, et al. Responsiveness of HIV-specific CD4 T cells to PD-1 blockade. *Blood*. 2011;118(4):965–974.
25. Vingert B, et al. HIV controller CD4⁺ T cells respond to minimal amounts of Gag antigen due to high TCR avidity. *PLoS Pathog*. 2010;6(2):e1000780.
26. Alexander-Miller MA. High-avidity CD8⁺ T cells: optimal soldiers in the war against viruses and tumors. *Immunol Res*. 2005;31(1):13–24.
27. Berger CT, et al. High functional avidity CTL responses to HLA-B-restricted Gag-derived epitopes associate with relative HIV control. *J Virol*. 2011;85(18):9334–9345.
28. Kaufmann DE, et al. Comprehensive analysis of human immunodeficiency virus type 1-specific CD4 responses reveals marked immunodominance of gag and nef and the presence of broadly recognized peptides. *J Virol*. 2004;78(9):4463–4477.
29. Wooldridge L, et al. Tricks with tetramers: how to get the most from multimeric peptide-MHC. *Immunology*. 2009;126(2):147–164.
30. Lim A, et al. Frequent contribution of T cell clonotypes with public TCR features to the chronic response against a dominant EBV-derived epitope: application to direct detection of their molecular imprint on the human peripheral T cell repertoire. *J Immunol*. 2000;165(4):2001–2011.
31. Hacein-Bey-Abina S, et al. Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*. 2010;363(4):355–364.
32. Alamyar E, et al. IMGT((R)) tools for the nucleotide analysis of immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) V-(D)-J repertoires, polymorphisms, and IG mutations: IMGT/V-QUEST and IMGT/HighV-QUEST for NGS. *Methods Mol Biol*. 2012;882:569–604.
33. Venturi V, et al. A mechanism for TCR sharing between T cell subsets and individuals revealed by pyrosequencing. *J Immunol*. 2011;186(7):4285–4294.
34. Turner SJ, et al. Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(12):883–894.
35. Gras S, et al. T-cell receptor bias and immunity. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(1):119–125.
36. Rossjohn J, et al. T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:169–200.
37. Betts MR, et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8⁺ T cells. *Blood*. 2006;107(12):4781–4789.
38. Liu P, et al. Characterization of human alphabeta-TCR repertoire and discovery of D-D fusion in TCRbeta chains. *Protein Cell*. 2014;5(8):603–615.
39. Gillespie GM, et al. Strong TCR conservation and altered T cell cross-reactivity characterize a B*57-restricted immune response in HIV-1 infection. *J Immunol*. 2006;177(6):3893–3902.
40. Kloverpris HN, et al. CD8⁺ TCR bias immunodominance in HIV-1 infection. *J Immunol*. 2015;194(11):5329–5345.
41. Williams MA, et al. Rapid culling of the CD4⁺ T cell repertoire in the transition from effector to memory. *Immunity*. 2008;28(4):533–545.
42. Belyakov IM, et al. Impact of vaccine-induced mucosal high-avidity CD8⁺ CTLs in delay of AIDS viral dissemination from mucosa. *Blood*. 2006;107(8):3258–3264.
43. Corse E, et al. Attenuated T cell responses to a high-potency ligand in vivo. *PLoS Biol*. 2010;8(9):e1000481.
44. Valitutti S. The serial engagement model 17 years after: from TCR triggering to immunotherapy. *Front Immunol*. 2012;3:272.
45. Thorborn G, et al. Clonotypic composition of the CD4⁺ T cell response to a vectored retroviral antigen is determined by its speed. *J Immunol*. 2014;193(4):1567–1577.
46. Swain SL, et al. Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(2):136–148.
47. Blanco-Melo D, et al. Intrinsic cellular defenses against human immunodeficiency viruses. *Immunity*. 2012;37(3):399–411.
48. Vetter ML, et al. Differences in APOBEC3G expression in CD4⁺ T helper lymphocyte subtypes modulate HIV-1 infectivity. *PLoS Pathog*. 2009;5(2):e1000292.
49. Oswald-Richter K, et al. Identification of a CCR5-expressing T cell subset that is resistant to R5-tropic HIV infection. *PLoS Pathog*. 2007;3(4):e58.
50. Saez-Cirion A, et al. Restriction of HIV-1 replication in macrophages and CD4⁺ T cells from HIV controllers. *Blood*. 2011;118(4):955–964.
51. Reinherz EL, Wang JH. Codification of bidentate pMHC interaction with TCR its co-receptor. *Trends Immunol*. 2015;36(5):300–306.
52. Rihn SJ, et al. Extreme genetic fragility of the HIV-1 capsid. *PLoS Pathog*. 2013;9(6):e1003461.
53. Hansen SG, et al. Cytomegalovirus vectors violate CD8⁺ T cell epitope recognition paradigms. *Science*. 2013;340(6135):1237874.
54. Ghorashian S, et al. CD8 T cell tolerance to a tumor-associated self-antigen is reversed by CD4 T cells engineered to express the same T cell receptor. *J Immunol*. 2015;194(3):1080–1089.

A.2. Annexe 2 : MHC Class II Tetramer Labeling of Human Primary CD4⁺ T Cells from HIV Infected Patients

MHC Class II Tetramer Labeling of Human Primary CD4⁺ T Cells from HIV Infected Patients

Moran Galperin^{1, *}, Daniela Benati², Mathieu Claireaux¹,
Madhura Mukhopadhyay¹ and Lisa A. Chakrabarti¹

¹Pasteur Institute, Viral Pathogenesis Unit, Paris, France; ²Center for Regenerative Medicine “Stefano Ferrari”, Department of Life Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy

*For correspondence: moran.galperin@pasteur.fr

[Abstract] Major Histocompatibility Complex (MHC) tetramers have been used for two decades to detect, isolate and characterize T cells specific for various pathogens and tumor antigens. In the context of Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection, antigen-specific CD8⁺ T cells have been extensively studied *ex vivo*, as they can be readily detected by HIV peptide-loaded MHC class I tetramers. In contrast, the detection of HIV-specific CD4⁺ T cells has proven more challenging, due to the intrinsically lower clonal expansion rates of CD4⁺ T cells, and to the preferential depletion of HIV-specific CD4⁺ T cells in the course of HIV infection.

In the following protocol, we describe a simple method that facilitates the identification of CD4⁺ T cells specific for an HIV-1 capsid epitope using peptide-loaded MHC class II tetramers. Tetramer labeled CD4⁺ T cells can be analyzed for their cell surface phenotype and/or FACS-sorted for further downstream applications. A key point for successful detection of specific CD4⁺ T cells *ex vivo* is the choice of a peptide/MHC II combination that results in high-affinity T Cell Receptor (TCR) binding (Benati *et al.*, 2016). A second key point for reliable detection of MHC II tetramer-positive cells is the systematic use of a control tetramer loaded with an irrelevant peptide, with the sample and control tubes being processed in identical conditions.

Keywords: Major histocompatibility complex class II, Tetramer, T cell receptor, CD4⁺ T cell, HIV

[Background] Rare HIV-specific MHC II tetramer-positive cells have been detected in purified CD4⁺ T cells, after magnetic enrichment of tetramer-PE labeled cells with anti-PE microbeads (Seth *et al.*, 2005). We found that with validated peptide/MHC II tetramer combinations, a simpler protocol based on direct tetramer labeling of 5 x 10⁶ patient Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC), followed by acquisition of all events on a flow cytometer, resulted in reliable detection of HIV-specific CD4⁺ T cells. Exclusion of irrelevant cells (CD14⁺, CD20⁺, CD8⁺) and dead cells (Fixable Viability dye+) through an appropriate gating strategy improved labeling specificity.

Materials and Reagents

1. Falcon[®] round-bottom 5 ml polypropylene tubes (Corning, Falcon[®], catalog number: 352063)
2. Falcon[®] round-bottom 5 ml polystyrene tubes with a 35 µm Cell-Strainer cap (Corning, Falcon[®], catalog number: 352235)

3. APC-conjugated antigen-loaded MHC II tetramers can be obtained through the NIH Tetramer Core Facility, Emory University, USA. The tetramers are provided at a concentration in the 1-1.5 mg/ml range, in aliquots of 200 μ l
4. APC-conjugated MHC II tetramers loaded with an irrelevant peptide (usually the CLIP peptide: PVSKMRMATPLLMQA can be obtained through the NIH Tetramer Core Facility, Emory University, USA)
5. Mouse-anti-human CD3 APC-eFluor[®] 780 (clone UCHT1) (Affymetrix, eBioscience, catalog number: 47-0038-42)
6. Mouse-anti-human CD4 BD Horizon[™] PE-CF594 (clone RPA-T4) (BD, BD Biosciences, catalog number: 562281)
7. Mouse-anti-human CD8 Brilliant Violet 785[™] (clone RPA-T8) (BioLegend, catalog number: 301045)
8. Mouse-anti-human CD14 VioGreen[®] (clone TÜK4) (Miltenyi Biotec, catalog number: 130-096-875)
9. Mouse-anti-human CD20 VioGreen[®] (clone LT20) (Miltenyi Biotec, catalog number: 130-096-904)
10. Fixable Viability Dye eFluor 506[®] (Affymetrix, eBioscience, catalog number: 65-0866-14)
11. 16% paraformaldehyde (PFA) solution (Electron Microscopy Sciences, catalog number: 15710)
12. Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 (Thermo Fisher Scientific, Gibco[™], catalog number: 10010023)
13. RPMI 1604 GlutaMAX I[™] (Thermo Fisher Scientific, Gibco[™], catalog number: 61870044)
14. HyClone[™] Fetal bovine serum (FBS) (South America), research grade (GE Healthcare, catalog number: SV30160.03)
15. Penicillin-streptomycin (10,000 U/ml) (Thermo Fisher Scientific, Gibco[™], catalog number: 15140122)
16. 1 M HEPES buffer (Dominique Dutscher SAS, catalog number: P05-01100P)
17. Bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, catalog number: A3912)
18. Sodium azide (NaN₃) 5% (w/v) (VWR, BDH[®], catalog number: BDH7465-2)
19. Human AB serum (PAN-Biotech, catalog number: P30-2901)
20. Complete RPMI (see Recipes)
21. FACS buffer (see Recipes)
22. Tetramer labeling buffer (see Recipes)
23. FACS sorting buffer (see Recipes)

Equipment

1. Benchtop centrifuge (Thermo Fisher Scientific, model: Sorvall[™] Legend[™] XTR)
2. Benchtop microcentrifuge (Eppendorf, model: 5254 R)
3. BD LSRFortessa[™] cell analyzer (BD, BD Biosciences, model: BD LSRFortessa[™] Cell Analyzer)

4. BD FACSAria II™ flow cytometer (BD, BD Biosciences, model: BD FACSAria II™ Cell Sorter)

Software

1. FACSDiva™ version 8.0 (BD)
2. FlowJo™ version 10.2 (FlowJo, LLC)

Procedure

Ex vivo tetramer labeling of CD4⁺ T cells from HIV infected patients

1. PBMC from HIV infected samples are either thawed from frozen vials or freshly processed from whole blood in a biosafety level-3 environment.
2. 15-50 x 10⁶ cells are dispatched into 5 ml polypropylene tubes (5 x 10⁶ cells per tube) and washed once with 2 ml complete RPMI at 600 x g for 7 min at 4 °C.

Notes:

- a. *A wash entails the addition of the indicated volume of the specified washing buffer followed by centrifugation and careful removal of the supernatant.*
- b. *A minimum of 5 x 10⁶ PBMC is required per tetramer labeling; the same number of PBMC is required for the control tetramer labeling. When scaling up, it is preferable to process multiple identical sample tubes in parallel, so that the amount of cells required for the control tube remains constant at 5 x 10⁶ PBMC.*
- c. *Individual tubes containing 0.5 x 10⁶ cells in 50 µl FACS buffer should be prepared at this stage to be used as single stained compensation controls. These tubes should be kept at 4 °C for the duration of the tetramer labeling until the point of addition of cell surface antibodies.*
3. Supernatants are removed and the cell pellets are re-suspended in 100 µl pre-chilled tetramer labeling buffer and placed on ice.
4. Solutions of MHC II tetramers loaded with either a validated HIV-1 peptide, or an irrelevant control peptide (CLIP) are spun at full speed for 5 min at 4 °C to remove protein aggregates.
Note: Spinning the MHC II tetramer solution before usage reduces background labeling.
5. APC-conjugated tetramers are added to the cell suspension at 1 µg per 10⁶ cells (*i.e.*, 5 µg per tube).
6. Important: One tube containing 5 x 10⁶ cells has to be labeled with tetramers loaded with an irrelevant peptide (CLIP) and used as a negative control for tetramer labeling.
7. Tetramer labeling is performed at 0-4 °C for 60 min, protected from light.
Note: Staining under cold conditions contributes to reduction of background; however, these conditions are appropriate only for the detection of high-avidity pMHC/TCR interactions.
8. A mixture of antibodies targeting cell surface markers is added to each tube as follows (v/10⁶ cells): 1 µl CD3 APC-eFluor 780; 0.5 µl CD4 PE-CF594; 0.5 µl CD8 BV 785; 3 µl CD14-VioGreen;

3 μ l CD20-VioGreen and 0.5 μ l Fixable Viability Dye eFluor 506.

Notes:

- a. *Additional antibodies for cell surface phenotyping can be added at this point.*
- b. *At this point, tubes containing 0.5×10^6 cells in 50 μ l FACS buffer are singly labeled with individual antibodies to be used as compensation controls. For the AmCyan-dump channel (including CD14-VioGreen; CD20-VioGreen and Fixable Viability Dye eFluor 506), a single tube containing 0.5×10^6 cells in 50 μ l FACS buffer is labeled with 1.5 μ l CD14-VioGreen.*

9. Cells are further incubated with the antibody mixture for 30 min at 4 °C in the dark.

10. For flow cytometric analysis

- a. Labeled cells are washed twice with (pre-chilled) FACS buffer and fixed with 2% PFA diluted in PBS.

Note: Fixation entails complete removal of the supernatants following centrifugation and resuspension in 400 μ l of the fixation solution.

- b. All cells in the tube are acquired on a flow cytometer (LSR Fortessa).

11. For cell sorting

- a. Labeled cells are washed once with FACS sorting buffer and the cell concentration is adjusted to 10×10^6 cells per ml in FACS sorting buffer.
- b. Cells are filtered using a Cell-Strainer cap to obtain a single-cell suspension. Subsequently, all cells are acquired on a cell sorter (FACSAria II) installed in a microbiological safety cabinet.

12. Viable tetramer-labeled CD4⁺ T cells are visualized in the viable CD3⁺, CD4⁺, CD14⁻, CD20⁻, CD8⁻ lymphocyte gate (see gating strategy, Figure 1A).

13. Gates are set according to the negative control, consisting in CLIP-loaded tetramer labeled CD4⁺ T cells (Figure 1B).

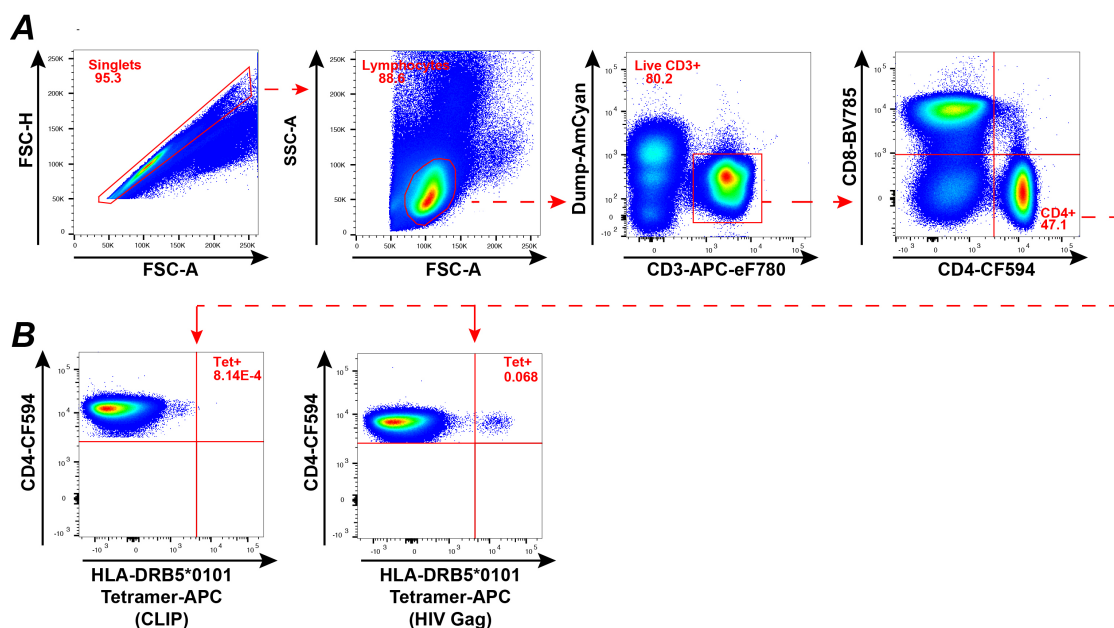


Figure 1. Ex vivo detection of viable HIV-specific CD4⁺ T cells from patient PBMC. A. Gating strategy: The Dump channel includes the following antibodies: CD14-VioGreen, CD20-VioGreen and viability dye-eFluor 506. B. FACS plots depicting CD4⁺ T cells from an HIV-1 infected patient labeled with an HLA DRB5*0101 tetramer loaded either with a control CLIP peptide [PVSKMRMATPLLMQA] (left) or with an immunodominant HIV-1 Gag peptide [FRDYVDRFYKTLRAEQASQE] (right).

Data analysis

Flow cytometry data was analyzed with the Flowjo v10.2 software (FlowJo, LLC.).

Recipes

1. Complete RPMI
 - 440 ml RPMI 1640
 - 50 ml FBS
 - 5 ml penicillin-streptomycin
 - 5 ml HEPES
2. FACS buffer (For 1 L)
 - 982 ml 1x PBS
 - 10 g BSA
 - 18 ml 5% (w/v) sodium azide
3. Tetramer labeling buffer (1 ml)
 - 850 µl RPMI (no FBS)
 - 150 µl human AB serum

4. FACS sorting buffer (50 ml)
49.5 ml 1x PBS
0.5 ml FBS

Acknowledgments

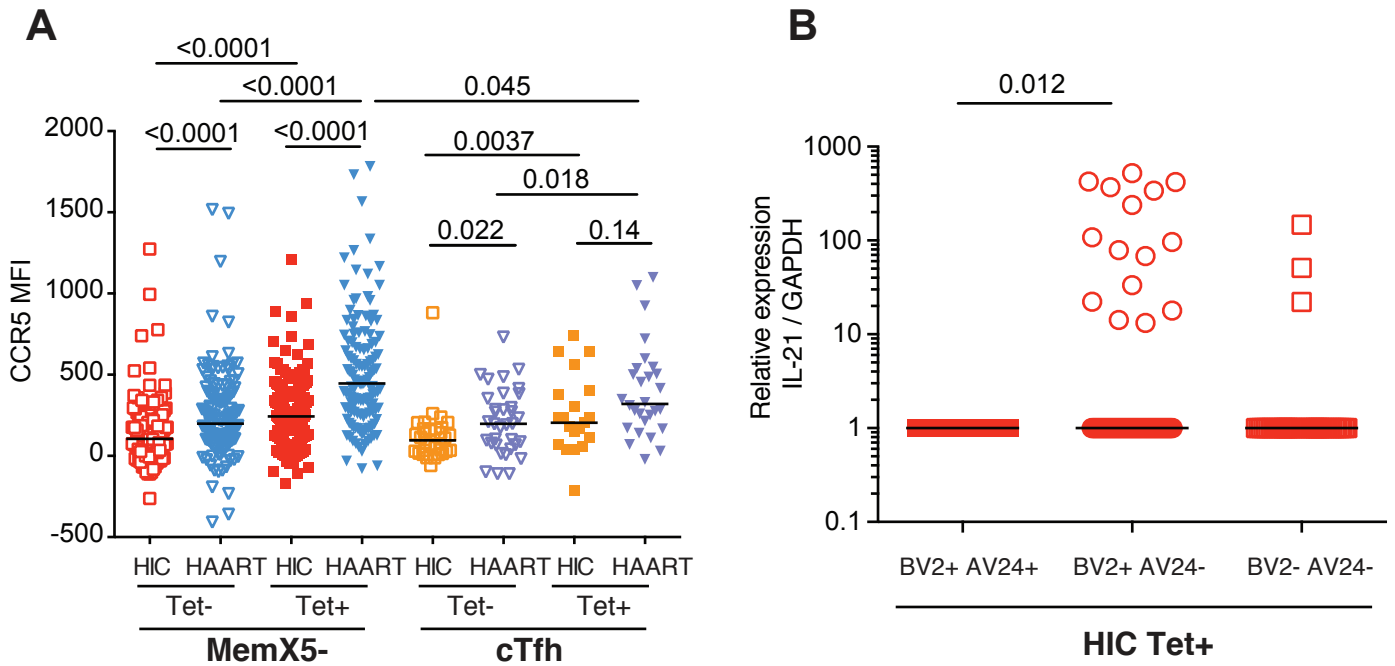
This protocol was adapted from Benati *et al.* (2016). We acknowledge funding from Agence Nationale de la Recherche sur le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS EP36-8) and Agence Nationale de la Recherche (ANR PD1VAX).

References

1. Benati, D., Galperin, M., Lambotte, O., Gras, S., Lim, A., Mukhopadhyay, M., Nouel, A., Campbell, K. A., Lemerrier, B., Claireaux, M., Hendou, S., Lechat, P., de Truchis, P., Boufassa, F., Rossjohn, J., Delfraissy, J. F., Arenzana-Seisdedos, F. and Chakrabarti, L. A. (2016). [Public T cell receptors confer high-avidity CD4 responses to HIV controllers](#). *J Clin Invest* 126(6): 2093-2108.
2. Seth, N., Kaufmann, D., Lahey, T, Rosenberg, E. S. and Wucherpfennig K. W. (2005). [Expansion and contraction of HIV-specific CD4 T cells with short bursts of viremia, but physical loss of the majority of these cells with sustained viral replication](#). *J Immunol* 175(10): 6948-58.

B. Figures : Annexe 3 Compléments

Annexe 3



Annexe 3: Analyse cTfh en cellule unique. (A-B) Analyse phénotypique sur cellule unique, de 371 cellules T CD4+ mémoires spécifiques du VIH et 360 cellules non spécifiques provenant de PBMC congelées de Contrôleurs du VIH (HIC, n=9) et de patients traités (ART, n=9). Nous avons divisé ces cellules en quatre groupes, les cellules triées par marquage tétramère de HLA-DR chargé avec le peptide Gag293 (HIC Tet+; HAART Tet+) et les cellules non spécifiques (HIC Tet-; HAART Tet-) (cf stratégie de tri présentée en Figure 1). **(A)** Nous avons séparé chaque groupe en 2 pour un total de 8 groupes en fonction de leur expression de CXCR5: CXCR5- (HIC MemX5- Tet-: 130 ; ART MemX5- Tet-: 133 ; HIC MemX5- Tet+: 153 ; ART MemX5- Tet+: 135) et CXCR5+ (HIC cTfh Tet-: 32 ; HAART cTfh Tet-: 34 ; HIC cTfh Tet+: 20 ; HAART cTfh Tet+: 29). L'expression de CCR5 membranaire est représentée par sa MFI détectée par cytométrie en flux (pendant le tri) par cellule. **(B)** Nous avons regardé dans le groupe HIC Tet+ l'expression de l'IL21 en fonction des chaînes variables des TCR, nous avons constitué 3 groupes (BV2+ AV24+: 43; BV2+ AV24-: 106; BV2- AV24- : 47). L'expression ARNm de AV24, BV2 et de IL21 a été rapportée à l'expression ARNm de la GAPDH (post tri)

