



HAL
open science

Etude de la dynamique des réponses immunitaires et génération d'anticorps monoclonaux à visée thérapeutique dans la pathogenèse du SIV/VIH

Sixtine Coindre

► **To cite this version:**

Sixtine Coindre. Etude de la dynamique des réponses immunitaires et génération d'anticorps monoclonaux à visée thérapeutique dans la pathogenèse du SIV/VIH. Maladies infectieuses. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASQ027 . tel-03482475

HAL Id: tel-03482475

<https://theses.hal.science/tel-03482475>

Submitted on 16 Dec 2021

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

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

Etude de la dynamique des réponses
immunitaires et génération d'anticorps
monoclonaux à visée thérapeutique
dans la pathogenèse du SIV/VIH

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569, Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)

Spécialité de doctorat : Immunologie

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, Inserm, CEA, Immunologie des maladies virales,
auto-immunes, hématologiques et bactériennes, 92265, Fontenay-aux-Roses, France.

Référent : Faculté de pharmacie

**Thèse présentée et soutenue à Fontenay-aux-Roses,
le 15 décembre 2020,
par**

Sixtine COINDRE

Composition du Jury

Jean-Daniel LELIÈVRE

Professeur-Praticien Hospitalier, Université Paris-Est Créteil

Président

Asier SÁEZ-CIRIÓN

Directeur de Recherche, Institut Pasteur

Rapporteur & Examineur

Daniel OLIVE

Professeur-Praticien Hospitalier, Aix-Marseille Université

Rapporteur & Examineur

Géraldine SCHLECHT-LOUF

Professeure des Universités, Université Paris-Saclay

Examinatrice

Ingrid SASSOON

Directrice de Recherche, Sanofi

Examinatrice

Benoit FAVIER

Chargé de Recherche, CEA/INSERM U1184/Université Paris-Saclay

Directeur de thèse

*À mes parents et à ma famille que j'aime tant,
À mes amis et leur soutien sans faille,
À tous ceux qui ont contribué à ces travaux,
À toutes les personnes atteintes du VIH et à leurs proches,*

Je vous dédie cette thèse.

Remerciements

Je tiens à remercier Asier Sáez-Cirión, Directeur de recherche à l'Institut Pasteur, d'avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse ainsi que d'avoir accepté par la suite d'être rapporteur de mon manuscrit de thèse de doctorat. Je remercie Daniel Olive, Praticien Hospitalier et Professeur à l'Université d'Aix-Marseille, de m'avoir fait également l'honneur d'accepter d'être rapporteur de mon manuscrit de thèse.

De même, je remercie Géraldine Schlecht-Louf, Professeur des Universités à l'Université Paris-Saclay, ainsi qu'Ingrid Sassoon, Directrice de recherche à Sanofi et Jean-Daniel Lelièvre, Praticien Hospitalier et Professeur à l'Université Paris-Est Créteil, d'avoir accepté d'examiner ma thèse de doctorat.

Merci à chacun des membres du jury pour leur temps et pour leurs précieux conseils ainsi que pour la discussion très enrichissante que nous avons eue lors de ma soutenance de thèse de doctorat. Merci également pour vos compliments, qui m'ont rendue fière de vous avoir présenté mes travaux de recherche et d'avoir obtenu le grade de docteur en immunologie.

Un grand Merci à Benoit Favier, mon directeur de thèse, pour m'avoir donnée l'opportunité de réaliser ce doctorat. J'ai énormément appris pendant ma thèse, en sciences et sur moi-même, et je t'en suis très reconnaissante. Merci pour ta disponibilité, tes conseils et pour ton soutien lors des difficultés rencontrées tout au long de cette thèse. Enfin, merci d'avoir rendu ces années scientifiquement et humainement enrichissantes et agréables par nos nombreux échanges professionnels et amicaux.

Merci également au Professeur Olivier Lambotte, chef du laboratoire de recherche Contrôle des infections virales chroniques (CoVir), pour son soutien tant scientifique qu'humain tout au long de cette thèse. Votre expertise dans le domaine du VIH ainsi que vos conseils lors des réunions d'équipe et votre gentillesse m'ont permis d'évoluer sereinement dans un environnement de travail mêlant l'excellence à la bienveillance.

Merci au Docteur Roger Le Grand, directeur du Centre de recherche en Immunologie des maladies virales, auto-immunes, hématologiques et bactériennes (IMVA-HB), de m'avoir donnée l'opportunité de venir faire ma thèse au sein de son centre de recherche et de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet de doctorat.

Cette aventure a commencé par un stage de master 2 en janvier 2016 et s'est terminée par un diplôme de doctorat en immunologie en décembre 2020. Pendant ces 5 années riches en émotions, j'ai eu la chance de rencontrer des personnes extraordinaires que ce soit sur le plan professionnel, scientifique et/ou humain. C'est grâce à vous, chers collègues et amis, qu'il a toujours été un plaisir de venir travailler au labo et grâce à vous aussi que ce doctorat s'est aussi bien déroulé.

Alors un profond merci :

Aux différents membres de l'équipe CoVir pour leur aide et leurs conseils toujours constructifs ainsi que leur enthousiasme lors des réunions d'équipe : Christine B., Nicolas N., Camille L., Aurélie T-B., Delphine D., Anaëlle O. (Nanaëlle pour les intimes), Florence A., Margaux G., Marie B., Florian M., Thibaut G., Melis A., avec une mention spéciale au docteur Bruno Vaslin pour sa bienveillance et pour avoir contribué à rendre ce manuscrit de qualité.

Aux chercheurs et scientifiques passés et présents des différentes équipes pour leur gentillesse et leurs conseils tout au long de cette aventure : Anne-Sophie B., Nicolas T. (On ne lâche rien !! Merci Nicolas pour ton aide inestimable en bio-info et pour ta motivation inégalable à faire avancer les papiers !), Elisabeth M., Frédéric D., Catherine C., Frédéric M., Pierre R., Nathalie B., Stéphane P., Antonio C., Jamila E-Y., Mariangela C. et Georges S..

Aux membres du LERI avec lesquels il a été un vrai plaisir de travailler : Stéphanie S., Anne W., Anita B. et Marc P.

À la team apéro & jeux pour leur amitié, leur soutien et leurs encouragements dans les moments de doutes : Isa, Anne-So, Pauline, Vaness, Fabienne, Quentin et Romain (mon Câlin, merci pour toutes ces douceurs qui ont ruiné chaque jour mes efforts faits à la salle de sport mais qui m'ont tellement réconfortée).

À toute l'équipe ASW (Benoit, Jean-Marie, Seb, Francis, Nina, Emma, Oriane, Joanna, Pauline et Raphaël) et aux membres de l'équipe Animalliance, un énorme merci pour votre aide lors des études, vous avez toujours fait en sorte que tout se passe pour le mieux. Merci pour votre immense gentillesse.

À tous les jeunes et moins jeunes du labo qui font ou qui ont fait d'IDMIT un endroit accueillant où l'on se sent intégré et apprécié : Marcotito, Djadjito, Laeti, Fanny, Samuel (twerk un jour, twerk toujours), Pierre, Mo, Oscar, Stéphane, Sabine, Naya, Sylvie, Julie, Brice, Cindy, Antoine, Juliette, Wesley, Karine, Jérôme, Thibaut, Céline, Nidhal, Sophie, Marie-

Thérèse, Claude, Matthieu, Mathilde, Noémie, Justina, André, Gaëlle, Katia, Anna, Maxence, Matis, Sabrina, Pascal, Deborah, Yann, Sébastien, Martine, Camille, Blanche, Louis, Ernesto, Nasta, Laurine, Elodie, Karl-Stephan, Mohamed, Alec, Adrien, Luc, Maxime, Hadjer, Naïma, ... Je n'oublierai pas toutes ces soirées passées à vos côtés et j'espère qu'il y en aura encore bien d'autres !

À l'équipe Bertin/Oncodesign pour tous ces midis à rire ensemble, je n'aurais pas pu rêver meilleurs collègues de repas que vous : Julien, Céline, Karen, Rara, Elodie, Christine, Pascal, Ingrid, Guillaume, Aurore et Cécile.

À Laminou, Mymy, Dond, Nat, Jean-LouLou et ma Pouille, vous avez toujours été là dans les bons comme dans les mauvais moments, je ne l'oublierai jamais. Merci pour votre joie de vivre et votre amitié, cette aventure aurait été bien triste sans vous...

À Ma taa et My Love, comme dirait Dario Moreno vous savez « tout l'amour que j'ai pour vous » ! Vous êtes la sauce de ma vie, vous permettez de la rendre meilleure ! Je sais que quoi qu'il arrive, on deviendra de vieilles pommes toutes ridées ensemble, mais toujours juicy juicy !! Merci de faire partie de ma vie... Je vous aiiiiimeuuuh, du plus fort que je peuuuux !!!

Chers collègues et amis, chacun d'entre vous a permis de rendre ces années vraiment inoubliables. Alors merci pour tout ! J'ai un pincement au cœur en me disant que cette aventure se termine. Mais une autre va bientôt commencer et je garderai en mémoire les moments riches en émotions de cette thèse ainsi que chacun des instants passés à vos côtés.

Parce qu'en dehors des journées de travail, j'ai eu aussi énormément de soutien grâce à des amis exceptionnels : Florine, Céline, Vincent, Sarah, Adeline, Peter, Johanna, Louise, Séverine, Thibault, Seb ... Merci à vous d'être là depuis toutes ces années, je vous aime fort.

Enfin un profond merci à ma famille, d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir toujours soutenue avec amour. Merci Maman et Papa, je n'y serai tout simplement pas arrivée sans vous. Merci à ma sœur, mes frères, mes belles-sœurs, mon beau-frère et leurs enfants, merci à mes tatas et tontons (avec une mention particulière pour mon tonton Patrick qui a permis que ce manuscrit soit écrit dans le respect de notre belle langue française), merci à mes cousines et cousins et leurs enfants et enfin merci à mes grands-parents. Merci ma famille, pour votre amour, pour tout, je vous aime tant.

Table des matières

Abréviations	5
Liste des figures	9
Avant-Propos	10
Introduction	12
I. Infection par le VIH-1 : physiopathologie et contrôle.....	13
A. Cibles cellulaires et persistance du VIH-1	13
a. Récepteur et corécepteurs du VIH-1	13
b. Tropisme cellulaire du VIH-1 et infection productive.....	14
c. Réservoirs du VIH-1 et persistance virale	18
B. Phases cliniques et biologiques de l'infection par le VIH-1	20
a. La primo-infection	21
b. La phase de latence clinique	23
c. La phase SIDA	24
C. Mécanismes physiopathologiques de l'infection.....	25
a. Altérations immunologiques induites par l'infection au VIH-1.....	25
b. Activation immunitaire chronique et inflammation : causes et conséquences.....	32
D. Contrôle de l'infection et stratégies thérapeutiques	34
a. Les traitements antirétroviraux : contrôle induit du VIH-1	35
b. Les contrôleurs naturels et contrôleurs post-traitement du VIH-1	37
c. Stratégies thérapeutiques contre la persistance du VIH-1.....	40

II.	Les récepteurs immunomodulateurs de la famille des LILRs.....	42
A.	Organisation génétique, structurale et fonctionnelle des LILRs	42
a.	LILRs membranaires et solubles et fonctions immunomodulatrices	42
b.	Les ligands des LILRs.....	45
c.	Homologues des récepteurs LILRs dans les modèles murins et simiens	47
B.	Rôle immunomodulateur des récepteurs LILRB1 et LILRB2 dans les réponses immunitaires et les pathologies	50
a.	Rôle de LILRB1 et LILRB2 dans les pathologies infectieuses	50
b.	Implication de LILRB1 et LILRB2 en cancérologie	53
c.	LILRB1 et LILRB2 dans les maladies auto-immunes.....	55
C.	Rôle des récepteurs LILRB1 et LILRB2 dans l'infection au VIH-1.....	56
a.	Rôle de LILRB1 et LILRB2 sur la régulation des réponses immunitaire induites au cours de l'infection par le VIH	56
b.	Interaction LILRB1/B2 et HLA-I : Déterminants génétiques et effets des mutations virales sur la pathogénèse	57
c.	Implication des autres membres de la famille des LILRs dans l'infection au VIH-1.....	59
III.	Immunothérapie et modèle macaque d'infection par le SIV dans la lutte contre le VIH-1.....	60
A.	Intérêt des anticorps monoclonaux ciblant des points de contrôle immunitaire: parallèles entre immunothérapie anti-VIH-1 et -cancers	61
a.	Anticorps monoclonaux anti-immune checkpoints dans l'infection VIH-1	61
b.	Anticorps monoclonaux anti-LILRB1 et LILRB2 dans le cancer	63
B.	Le modèle simien d'infection par le SIV dans l'immunothérapie anti-LILRB1 et LILRB2 contre le VIH-1	66
a.	Le modèle simien dans la lutte contre le VIH-1	66
b.	Intérêt du modèle macaque d'infection par le SIV	66
c.	Intérêt du modèle macaque pour l'étude des LILRs dans l'infection VIH-1	68

Objectifs 70

Résultats 74

Article 1 : Mass Cytometry Analysis Reveals the Landscape and Dynamics of CD32a⁺ CD4⁺ T Cells From Early HIV Infection to Effective cART 75

Article 2 : Mass Cytometry Analysis Reveals Complex Cell-State Modifications of Blood Myeloid Cells During HIV Infection 89

Article 3 : Development of novel immune checkpoint inhibitors that work across human and cynomolgus macaque: application for preclinical studies in SIV model 105

Brevet : Anticorps monoclonaux anti-LILRs et leurs applications 143

Discussion, Conclusions & Perspectives 144

I. CD32a : Marqueur spécifique de latence ou reflet de l'activation de sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ au cours de l'infection par le VIH ? 145

II. Analyse en cytométrie de masse de la diversité des cellules myéloïdes et de leur dynamique au cours de l'infection par le VIH. 148

III. Anticorps monoclonaux anti-LILRB1 et -LILRB2 de macaque : Des outils uniques pour l'étude préclinique des nouveaux inhibiteurs de point de contrôle immunitaire dans l'infection par le SIV/VIH..... 152

Bibliographie..... 166

Abréviations

AcM : anticorps monoclonaux

ADCC : cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps

ADN : acide désoxyribonucléique

ALT : acide lipotéichoïque

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

β 2m : β 2-microglobuline

cART : thérapie antirétrovirale combinée

CCR5 : corécepteur CC-chimiokine 5

CD : cluster de différenciation

cDCs : cellules dendritiques classiques

CMH-I : complexe majeur d'histocompatibilité de classe I

CMH-II : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

CMV : cytomégalovirus

CPAs : cellules présentatrices d'antigène

CpG : C-phosphate-G

CPNPC : cancer du poumon « non à petites cellules »

CTLA-4 : récepteur à l'antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques

CTLs : lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques

CV : charge virale

CXCR4 : corécepteur CXC-chimiokine 4

DCs : cellules dendritiques

DC-SIGN : molécule 3 d'adhésion intercellulaire, non-intégrine, spécifique des DCs

DENV : virus de la dengue

dNTPs : désoxyribonucléoside triphosphates

EBV : virus d'Epstein-Barr

fDCs : cellules dendritiques folliculaires

FcγRs : récepteurs Fc-gamma

FHC : chaînes lourde libres du CMH-I

GALT : tissu lymphoïde associé à l'intestin

Gp : glycoprotéines

HCMV : cytomégalovirus humain

HICs : contrôleurs du VIH-1

HLA-G : antigène G des leucocytes humains de classe I non classique

HLA-I : antigènes des leucocytes humains de classe I

HSV : virus herpès simplex

IFN-I : interférons de type I

Ig : immunoglobuline

IL : interleukine

ILTs : Ig-like transcrits

INIs : inhibiteurs de l'intégrase

INNTIs : inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse

INTIs : inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques de la transcriptase inverse

IP : inhibiteurs de protéases virales

ISG : gènes stimulés par les interférons

ITIMs : immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs

ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activation motif

KIR : récepteurs des cellules NK

LED : lupus érythémateux disséminé

LILRs : leukocyte immunoglobulin-like receptors

LLC : leucémie lymphoïde chronique

LRC : complexe de récepteurs des leucocytes

LT : lymphocyte T

LTNPs : patients non-progressseurs ou asymptomatiques à long terme

MDSC : cellules myéloïdes suppressives

NK : cellules tueuses naturelles ou « cellules NK »

PD-1 : récepteur de mort cellulaire programmée 1

pDCs : cellules dendritiques plasmacytoïdes

PD-L1 : ligand de récepteur de mort cellulaire programmée 1

PIRs : paired immunoglobulin-like receptors

PNH : primate non humain

PR : polyarthrite rhumatoïde

pré-DC : précurseurs circulants des cellules dendritiques

PRRs : récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes

PsA : arthrite psoriasique

PTCs : contrôleurs post-traitement

SEP : sclérose en plaques

SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise

siRNA : petits ARN interférants

SIV : virus de l'immunodéficience simienne

T_{CM} : lymphocyte T centrale mémoire

TCR : T cell receptor (récepteur des cellules T)

T_{EM} : lymphocyte T effecteur mémoire

T_{fh} : lymphocyte T folliculaire

Th1 : lymphocyte T auxiliaire 1

Th2 : lymphocyte T auxiliaire 2

Th17 : lymphocyte T auxiliaire 17

TLR : récepteurs de type Toll

TNF- α : facteur de nécrose tumorale alpha

Treg : lymphocytes T régulateurs

T_{SCM} : lymphocyte T mémoires souches

T_{TM} : lymphocyte T mémoire transitionnel

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VISCONTI : viro-immunological sustained control after treatment interruption

Liste des figures

Figure 1: Phases cliniques de l'infection par le VIH-1.	21
Figure 2: Physiopathologie de l'infection par le VIH-1.....	31
Figure 3: Etapes d'infection de la cellule hôte par le VIH-1 et mécanisme d'action des traitements antirétroviraux.	35
Figure 4: Schéma des variations hypothétiques des principaux paramètres sanguins au cours de l'infection, par le VIH-1 ou le SIV, contrôlée et non contrôlée.	39
Figure 5: Schéma représentant les récepteurs de la famille LILR chez l'humain et leur profil d'expression par les cellules immunitaires.....	43
Figure 6: Modèle des mécanismes de signalisations des LILRs.....	44
Figure 7: Modèle d'interaction de LILRB1 et LILRB2 avec leurs ligands du CMH-I.	46
Figure 8: Ligands des LILRs.....	47
Figure 9: Structure des Mm-LILRs clonés chez le macaque rhésus et homologie de séquence avec leurs orthologues humains.	49
Figure 10: Rôle de LILRB1 et LILRB2 dans les pathologies infectieuses autre que VIH-1..	52
Figure 11: Implication des LILRs dans la pathogenèse de l'infection au VIH-1.	59
Figure 12: Implication de LILRB1 et LILRB2 dans l'échappement tumorale.	65

Avant-Propos

Depuis le début de l'épidémie de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) dans les années 1980 (Gottlieb et al., 1981), et la découverte de son agent étiologique en 1983 (Barré-Sinoussi et al., 1983), le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) a infecté 75,7 millions [55,9 millions - 100 millions] de personnes à travers le monde. Parmi ces personnes séropositives, 32,7 millions [24,8 millions - 42,2 millions] sont décédées de suite de maladies liées au SIDA (ONUSIDA/UNAIDS, 2020). Par sa propagation massive et sa forte létalité, cette infection est rapidement devenue un problème de santé publique mondiale. La communauté scientifique et médicale s'est alors engagée dans une lutte sans relâche contre ce virus afin de découvrir son origine, son mode de transmission et sa physiopathologie dans le but de mettre en place les outils nécessaires à son diagnostic, son contrôle et sa prévention. Bien que les nombreuses études menées sur le VIH depuis près de 40 ans aient permis des avancées scientifiques majeures dans ce domaine, il n'existe toujours pas de vaccin efficace permettant de protéger contre l'infection. De même, aucune des thérapies disponibles n'est capable d'éliminer définitivement le virus. Ainsi en 2019, on recensait encore 38 millions [31,6 millions - 44,5 millions] de personnes vivant avec le VIH dans le monde. Cette même année, 1,7 millions [1,2 millions - 2,2 millions] de nouvelles infections par le VIH et 690 000 [500 000 – 970 000] décès causés par le SIDA ont été recensés (ONUSIDA/UNAIDS, 2020).

Actuellement, deux sérotypes de VIH sont connus : Le VIH-1, prédominant et mondialement endémique, représente 95% des infections à VIH dans le monde, le VIH-2, minoritaire est principalement restreint à l'Afrique de l'ouest (Barré-Sinoussi et al., 1983; Campbell-Yesufu & Gandhi, 2011; Clavel et al., 1986; Quinn, 1994). Le VIH-1 et le VIH-2 partagent de nombreuses caractéristiques génomiques, structurelles et antigéniques ainsi qu'un mode de transmission et un mécanisme de réplication similaires (Azevedo-Pereira & Santos-Costa, 2016; Nyamweya et al., 2013). Cependant des différences majeures existent au niveau de leur infectiosité et de leur pathogénicité. En effet contrairement à celle due au VIH-1, l'infection par le VIH-2 est moins virulente, moins transmissible et entraîne une progression plus lente vers le stade SIDA (Azevedo-Pereira & Santos-Costa, 2016; Esbjörnsson et al., 2019). Sur la base de ces différences, les recherches se sont accentuées dès l'origine sur le VIH-1 et la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans son tropisme cellulaire, sa réplication, sa pathogénèse, son échappement à la réponse immunitaire et enfin sa persistance. Ces recherches

ont alors ouvert la voie à de nombreux traitements préventifs et thérapeutiques contre le VIH-1 ainsi que le VIH-2.

Parmi ces thérapies, l'avènement des traitements antirétroviraux a permis d'enrayer la montée de l'épidémie et d'améliorer la qualité de vie et le pronostic de nombreux patients (Cihlar & Fordyce, 2016). Cependant, la thérapie antirétrovirale combinée (cART) est nécessaire à vie pour une suppression virologique durable. De plus, la sélection de mutants de résistance, l'apparition d'effets secondaires, un manque d'observance chez certains patients et la persistance virale/l'absence d'éradication, nécessitent le développement d'une gamme plus large d'options de traitements. Ces nouveaux traitements visent notamment à induire une réponse immunitaire efficace permettant aux personnes séropositives de contrôler leur infection, à l'instar des patients contrôleurs du VIH et des contrôleurs post-traitement qui maintiennent une charge virale indétectable en l'absence de traitements. A cet égard, les anticorps monoclonaux ciblant des points de contrôle inhibiteurs du système immunitaire semblent susciter beaucoup d'intérêt comme immunothérapies visant à restaurer une réponse immunitaire fonctionnelle après infection (Kaufmann & Walker, 2009; Porichis & Kaufmann, 2012; J. Zhang et al., 2017). Les travaux de James P. Allison et Tasuku Honjo basés sur cette stratégie « d'inhibition des régulations immunitaires négatives », à l'aide d'anticorps monoclonaux bloquants CTLA-4 et PD-1, respectivement, ont révolutionné le traitement de certains cancers, maladies qui échappent tout comme l'infection au VIH-1 aux réponses immunitaires, et leur ont valu l'attribution du prix Nobel de médecine en 2018.

Dans le but de mettre au point des stratégies d'immunothérapie efficaces contre le VIH-1, il est indispensable de continuer à mieux caractériser les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le contrôle de l'infection virale et dans l'échappement du virus aux réponses immunitaires. Ces découvertes pourraient ainsi aboutir à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques permettant une rémission fonctionnelle durable de l'infection au VIH-1. En parallèle, il reste nécessaire de poursuivre les recherches sur la conception d'un vaccin préventif efficace et sur l'identification de marqueurs permettant de cibler les réservoirs persistants du VIH-1, stratégies inéluctables pour éradiquer ce virus.

Introduction

I. Infection par le VIH-1 : physiopathologie et contrôle

Après sa transmission, majoritairement par voie sexuelle (Shaw & Hunter, 2012), le VIH-1 va infecter et détruire rapidement les lymphocytes T CD4⁺ et induire un dysfonctionnement important des réponses immunitaires innée et adaptative (Deeks et al., 2015). L'inflammation persistante couplée à l'activation chronique de la réponse immunitaire vont conduire à un épuisement du système immunitaire (Victor Appay et al., 2007; Deeks et al., 2012, 2013; P. W. Hunt, 2012; Sokoya et al., 2017). L'ensemble de ces événements va provoquer au fil des années, un déficit immunitaire sévère aboutissant à la phase SIDA. Les personnes infectées par le VIH présentent à ce stade, une sensibilité accrue aux infections par des pathogènes opportunistes, aux réactivations de virus en latences (CMV, EBV et HSV) et à l'apparition de comorbidités telles que l'ostéoporose, les maladies cardiovasculaires, la neurodégénérescence, l'insuffisance organique et certains types de cancers (Sokoya et al., 2017). Sans traitement antirétroviral, les patients décéderont dans les années qui suivront l'une de ces maladies.

A. Cibles cellulaires et persistance du VIH-1

a. Récepteur et corécepteurs du VIH-1

Dès son entrée dans l'organisme, le virus va chercher à lier et pénétrer les cellules pour s'intégrer dans leur génome, se répliquer et se disséminer dans les différents tissus et organes. Le principal récepteur permettant l'entrée du VIH-1 dans la cellule est le cluster de différenciation 4 (CD4) (Dalglish et al., 1984; Klatzmann et al., 1984). Cette glycoprotéine permet normalement d'amplifier le signal généré par le récepteur des cellules T (TCR) lorsque celui-ci entre en interaction avec le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) lors de la présentation antigénique. Le VIH-1 dispose à sa surface de complexes hétérotrimériques formés des glycoprotéines gp120 et gp41 de l'enveloppe virale. Lors de l'infection, la glycoprotéine virale gp120 va se lier aux récepteurs CD4 présents à la surface des cellules cibles, première étape nécessaire à l'entrée du virus dans la cellule (Mcdougal et al., 1986). Pour terminer son entrée, le VIH-1 doit interagir avec un corécepteur cellulaire spécifique : principalement le récepteur à CC-chimiokine 5 (CCR5) et le récepteur à CXC-chimiokine 4 (CXCR4) (H. K. Deng et al., 1996; Dragic et al., 1996; Feng et al., 1996). En effet, la liaison de la gp120 au CD4 induit un changement conformationnel du complexe hétérotrimérique, permettant l'interaction d'un domaine spécifique de la gp120 avec le CCR5 ou le CXCR4. La liaison de la gp120 au corécepteur engendre l'exposition du peptide de fusion

hydrophobe de la gp41 qui s'insère alors dans la membrane de la cellule hôte et entraîne la fusion des membranes virale et cellulaire (Wilén et al., 2012). La capside virale entre alors dans la cellule et le cycle viral commence. D'autres membres de la famille des récepteurs de chimiokines (ou étroitement liés à celle-ci) ont également été identifiés comme corécepteurs potentiels du VIH-1 (Clapham & McKnight, 2002).

Les souches de VIH-1 peuvent être classées en fonction de leur tropisme pour les corécepteurs. En effet, les virus qui utilisent le CCR5 sont appelés virus R5, ceux qui utilisent CXCR4, virus X4 et les virus qui peuvent utiliser les deux corécepteurs sont appelés virus R5X4 (Berger et al., 1998). À de rares exceptions près, seuls les virus R5 et R5X4 sont transmis entre les individus (Clapham & McKnight, 2001; Joseph et al., 2015; Keele, Giorgi, et al., 2008). Néanmoins, il a été montré que tardivement au cours l'infection, les virus transmis peuvent évoluer d'un tropisme R5 ou R5X4 vers un tropisme X4 (Connor et al., 1997). Ceci pourrait permettre au virus de cibler plus de sous-populations de lymphocytes au cours de la phase SIDA (Bleul et al., 1997).

b. Tropisme cellulaire du VIH-1 et infection productive

Le tropisme cellulaire du VIH-1 est lié à l'expression du récepteur CD4 et des corécepteurs CCR5 et CXCR4 à la surface des cellules. La codistribution de ces récepteurs facilite une fusion potentielle des enveloppes virales et cellulaires, non seulement des lymphocytes T CD4⁺, mais aussi d'autres cellules impliquées dans la mise en place des réponses immunitaires innée et adaptative, telles que les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques. Bien que le VIH-1 soit capable d'infecter ces cellules, seulement une partie d'entre elles permettent une infection productive, c'est-à-dire l'intégration du génome viral ou « provirus » dans le génome de la cellule hôte et la production de virions.

Les lymphocytes T CD4⁺

Les lymphocytes T CD4⁺ CCR5⁺ sont les principales cibles du VIH-1, mais leurs différentes sous-populations (naïve, mémoire centrale, mémoire transitionnelle et mémoire effectrice) ne sont pas sensibles de façon égale à l'infection. La permissivité de ces cellules, capacité à permettre un cycle viral complet, dépend de leur état d'activation et de leur niveau de différenciation (Stevenson, 2003), tous deux étroitement contrôlés par le métabolisme cellulaire (Sáez-Cirión & Sereti, 2020).

Les lymphocytes T CD4⁺ CCR5⁺ activés sont métaboliquement et transcriptionnellement actifs, et vont donc permettre une infection productive, contrairement à leurs homologues naïfs au repos (Pan et al., 2013; Valle-Casuso et al., 2019). Ces cellules activées ont néanmoins une courte durée de vie en raison des effets cytopathiques du virus ou de leur destruction médiée par les lymphocytes T cytotoxiques (Coffin & Swanstrom, 2013). Les lymphocytes T CD4⁺ au repos, quant à eux, permettent l'entrée du VIH-1 mais ne permettent généralement pas une transcription inverse complète de son ARN en ADN, étape nécessaire à son intégration dans le génome de la cellule hôte pour la poursuite de son cycle viral (Descours et al., 2012). Ce phénomène serait en partie dû à la présence du facteur de restriction SAMHD1 qui maintient un réservoir de dNTPs très bas dans ces cellules au repos, empêchant la synthèse d'ADN du VIH-1 (Descours et al., 2012).

La majorité des lymphocytes T CD4⁺ résident dans les tissus lymphoïdes, tels que les ganglions lymphatiques, la rate et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses. Les lymphocytes T CD4⁺ des muqueuses présentent majoritairement un profil CCR5⁺ mémoire avec un statut relativement activé, faisant de ces cellules des cibles préférentielles pour le VIH-1 dans ces tissus (Jason M. Brenchley et al., 2004; R. S. Veazey et al., 2000; Ronald S. Veazey et al., 2003). Au sein des lymphocytes T CD4⁺ mémoires, les lymphocytes T auxiliaires 17 (Th17) et folliculaires (Tfh), sont infectés à des taux plus élevés que les autres sous-populations de T CD4⁺ mémoires (El Hed et al., 2010; Kohler et al., 2016). Leur répartition tissulaire, leur niveau d'activation élevé, leur forte expression du CCR5 et le tropisme préférentiel des virus R5 transmis expliquent en partie la forte production virale observée dans ces sous-populations de lymphocytes T CD4⁺, contrairement aux lymphocytes T naïfs qui expriment majoritairement le CXCR4 (Bermejo et al., 1998; Bleul et al., 1997; Deeks et al., 2015; Groot et al., 2006).

L'infection productive des lymphocytes T CD4⁺ entraîne une déplétion importante de ces cellules au cours du temps et un épuisement de ce compartiment, phénomène caractéristique de l'infection par le VIH-1 (Hazenbergh et al., 2000).

Les macrophages et monocytes

Alors que les lymphocytes T CD4⁺ ont été identifiés comme les cibles principales du VIH-1, les macrophages, qui expriment également le CCR5 (Blanpain et al., 2002; Tuttle et al., 1998), sont la seconde cible majeure de ce virus (Koppensteiner et al., 2012; A. Kumar & Herbein, 2014). L'infection des macrophages par le VIH-1 peut survenir par différentes voies, y compris par phagocytose des lymphocytes T infectés d'après l'étude *in vitro* de Baxter et al. (Baxter et

al., 2014). Ces cellules présentent cependant une faible permissivité à l'infection (Chun et al., 1997), en partie dû à la présence du facteur de restriction SAMHD1 (Hrecka et al., 2011). Néanmoins, il semblerait que des protéines du cycles cellulaires soient capables d'inactiver SAMHD1 à un temps donné permettant au VIH-1 d'infecter ces cellules (Badia et al., 2016; Kyei et al., 2015; Mlcochova et al., 2017). De l'ADN, de l'ARN et la protéine de capsid p24 du VIH-1 ont ainsi pu être détectés dans divers macrophages tissulaires de patients sous cART (M. E. Wong et al., 2019). Par leur capacité à produire des virions, même sous cART (Shen et al., 2009; P. D. Smith et al., 1997; Zalar et al., 2010), à migrer dans les différents compartiments tissulaires et à résister aux effets cytopathiques du VIH-1 (Simon Swingler et al., 2007), les macrophages sont des acteurs clés de l'infection persistante et de la transmission virale aux lymphocytes (Kedzierska & Crowe, 2012; Kruize & Kootstra, 2019).

Les monocytes présentent également des mécanismes de restriction qui limitent leur infection productive par le VIH-1, tels que les facteurs de restriction SAMHD1 et APOBEC3 et les microARN cellulaires (M. E. Wong et al., 2019). Cependant, des études indiquent que des monocytes infectés par le VIH-1 capables de produire des virions sont retrouvés chez des patients sous cART (Lambotte et al., 2000; Sonza et al., 2001; Zhu et al., 2002). Bien que les monocytes classiques ($CD14^{++}CD16^{-}$) semblent relativement résistants à l'infection par le VIH-1, probablement en raison d'une plus faible expression de CCR5 (Ellery et al., 2007; Weber et al., 2000), les monocytes intermédiaires ($CD14^{++}CD16^{+}$) ou non classiques ($CD14^{+}CD16^{++}$), qui expriment des niveaux plus élevés de CCR5, sont d'avantage permissifs à l'infection par le virus (Ellery et al., 2007). Néanmoins, la présence de niveaux élevés de CXCR4 sur les monocytes classiques pourrait permettre une infection productive de ces derniers à un stade plus avancé de l'infection, lorsque les virus X4 tendent à émerger (Innocenti-Francillard et al., 1994).

Bien qu'une infection productive des monocytes par le VIH-1 soit possible, les macrophages restent cependant la principale source de production virale et de réservoir pour le VIH-1 au sein du compartiment myéloïde.

Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DCs) expriment le récepteur CD4 (à de faibles niveaux) et les corécepteurs d'entrée du VIH-1 (B. Lee et al., 1999) mais leur capacité à être infectées et à produire de nouveaux virions a longtemps été controversée en raison de leur environnement hostile et restrictif au VIH-1 (Ahmed et al., 2015; Martin-Gayo & Yu, 2019). Il semblerait que

les DCs soient tout de même capables de répliquer le virus à de faibles niveaux (10 à 100 fois moins que les lymphocytes T CD4⁺), selon leur état de maturation. En effet, contrairement aux DCs matures, les DCs immatures peuvent soutenir la réplication des virus R5 (Canque et al., 1999; Granelli-Piperno et al., 1998; Kawamura et al., 2003; Turville et al., 2008). Les DCs immatures infectées par le VIH-1 vont alors migrer vers les ganglions lymphatiques et transmettre les nouveaux virions produits aux lymphocytes T par un processus appelé *cis*-infection (Wu & KewalRamani, 2006). Les DCs plus matures, quant à elles, n'ont pas la capacité de répliquer le VIH-1 mais peuvent néanmoins, tout comme les DCs immatures, internaliser et transmettre des virus R5 et X4 de la muqueuse aux organes lymphoïdes secondaires riches en lymphocytes Tfh (Cavrois et al., 2007; Garcia et al., 2005; Granelli-Piperno et al., 1998). Des récepteurs présents à la surface des DCs, tels que DC-SIGN, DCIR et Siglec1 ont été montrés comme impliqués dans ce phénomène, par leur capacité à lier et capturer le VIH-1 dans des compartiments cellulaires (Kijewski & Gummuluru, 2015). Le virus est par la suite transmis des DCs aux lymphocytes T CD4⁺ par *trans*-infection via une synapse virologique ou la voie de sécrétion des exosomes (Geijtenbeek et al., 2000; Izquierdo-Useros et al., 2014; Kijewski & Gummuluru, 2015; Wu & KewalRamani, 2006). Les DCs folliculaires (fDCs), présentent dans les centres germinatifs des follicules lymphoïdes, jouent un rôle très important dans ce phénomène puisqu'elles sont capables de capturer de grandes quantités de virions et de les préserver infectieux pendant plusieurs semaines et mois, avant de les transmettre par *trans*-infection aux lymphocytes T des follicules (Keele, Tazi, et al., 2008; B. A. Smith et al., 2001).

Enfin, comme pour les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺, de monocytes et de macrophages, certaines sous-populations de DCs semblent plus susceptibles que d'autres à l'infection par le VIH-1. Parmi celles-ci, les précurseurs circulants des DCs (pré-DC), ainsi que les DCs CD1c⁺, les DCs CD1a⁺ et les cellules de Langherans peuvent être infectées par le VIH-1, le répliquer et le transmettre aux lymphocytes T (Ahmed et al., 2015; Cavrois et al., 2007; Kawamura et al., 2003; Pena-Cruz et al., 2018; Ruffin et al., 2019; Silvin et al., 2017). En revanche, les DCs CD141⁺ et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) semblent plus résistantes à l'infection par le VIH-1 (Silvin et al., 2017), même si certaines études montrent tout de même une infection et une réplication possible du VIH-1 dans les pDCs (Patterson et al., 2001; Schmidt et al., 2004).

c. Réservoirs du VIH-1 et persistance virale

Les réservoirs du VIH-1 comprennent tout type cellulaire ou site anatomique contenant de l'ADN du virus capable de se répliquer (ADN compétent) et de persister même sous cART (Chun et al., 2015; Vanhamel et al., 2019). Le réservoir est défini comme « latent » lorsque l'ADN compétent intégré dans le génome de la cellule est transcriptionnellement silencieux mais conserve la capacité de produire des particules virales infectieuses lors d'une stimulation (Eisele & Siliciano, 2012; Plantin et al., 2018). Ainsi, cette définition n'inclut pas la plupart des ADN du VIH-1 intégrés, car beaucoup sont défectueux (Bruner et al., 2016; Chun et al., 1997), ni les formes non intégrées qui sont éliminées en raison de leur labilité ou perdues lors de la division cellulaire (Trémeaux et al., 2019).

Les réservoirs cellulaires et tissulaires du VIH-1

Environ 0,01 à 1% des lymphocytes T CD4⁺ circulants contiennent de l'ADN VIH-1 intégré dont 5 à 10% sont intacts (Y. C. Ho et al., 2013) et seulement une petite proportion de ces génomes intacts peut être inductible et capable de supporter la réplication du virus post-cART (Y. C. Ho et al., 2013; Hosmane et al., 2017).

Parmi les lymphocytes T CD4⁺ au repos, la sous-population mémoire centrale (T_{CM}) est considérée comme le principal réservoir latent du VIH-1 (Soriano-Sarabia et al., 2014). D'autres sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ mémoires (T_{TM}, T_{EM}, T_{SCM}) mais également naïfs et auxiliaires (Th1, Th2, Th17 et principalement T_{fh}) sont infectées par le VIH-1 et peuvent contribuer à la persistance virale (Falcinelli et al., 2019). Bien que les macrophages et les DCs soient faiblement susceptibles de contenir des provirus compétents, ces cellules constituent un réservoir important pour la persistance du VIH-1 par leur forte résistance à la cART et par leur capacité à capturer et transmettre les virions aux lymphocytes T dans différents tissus et organes. A cet égard les fDCs constituent un réservoir à long terme de virus infectieux important et cela même en présence de cART (Heesters et al., 2015). Une étude récente indique tout de même que les macrophages issus de prélèvement urétral de patients sous cART contiennent du virus latent et compétent (Ganor et al., 2019). Bien que le VIH-1 soit capable d'infecter d'autres macrophages tissulaires, leur rôle en tant que réservoirs latents reste en débat (Kruize & Kootstra, 2019).

L'entrée dans la circulation sanguine de virions sous forme libre ou associés à des cellules immunitaires (par infection ou capture) entraîne la propagation du VIH-1 dans tout l'organisme (Bracq et al., 2018; Wu & KewalRamani, 2006). Des cellules infectées par le VIH-1 ont été

trouvées dans le cerveau et le liquide céphalorachidien, les poumons, les reins, le foie, le tissu adipeux, le tractus gastro-intestinal, les systèmes génito-urinaires masculin et féminin et la moelle osseuse (Mzingwane & Tiemessen, 2017; J. K. Wong & Yukl, 2016; M. E. Wong et al., 2019). Cependant, les tissus lymphoïdes (rate, thymus, ganglions lymphatiques et GALT) sont les sites réservoirs majeurs de réplication du virus, et l'ADN du VIH-1 peut toujours être détecté dans les ganglions lymphatiques après des années sous cART (J. K. Wong & Yukl, 2016). Au sein de ces organes, le virus se trouve généralement intégré dans les lymphocytes T CD4⁺ et les macrophages, mais aussi dans des types cellulaires spécifiques de ces tissus tels que la microglie, les astrocytes, les cellules épithéliales, les fibrocytes, les podocytes et les cellules souches hématopoïétiques (Al-Harti et al., 2018; Barton et al., 2016; Canaud et al., 2014; Carter et al., 2010; Ko et al., 2019; Mzingwane & Tiemessen, 2017; J. K. Wong & Yukl, 2016). La contribution de toutes ces cellules et de tous ces compartiments anatomiques en tant que réservoirs latents reste également en débat.

Mécanismes de persistance du VIH-1

La présence de provirus latents dans le génome des cellules au repos est la cause majeure de persistance du VIH-1. Deux principaux modèles sont proposés pour expliquer l'établissement de la latence virale : la latence post-activation et la latence pré-activation (Vanhamel et al., 2019). Dans le modèle de latence post-activation, certaines cellules activées et infectées échappant à la mort cellulaire peuvent revenir à un état de repos et se différencier en lymphocytes T CD4⁺ à mémoire longue durée (Chomont et al., 2009). Dans le modèle de latence pré-activation, les lymphocytes T CD4⁺ au repos sont directement infectés par le VIH-1. Ce processus d'infection directe des cellules au repos est généralement considéré comme très inefficace en raison de divers blocages au cours du cycle viral (Y. Zhou et al., 2005). Néanmoins, il a été démontré que des chimiokines peuvent faciliter les premières étapes de réplication du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4⁺ au repos et conduire à l'intégration de l'ADN du virus dans le génome de la cellule (Cameron et al., 2010; Saleh et al., 2007). Ce dernier modèle expliquerait l'établissement rapide de réservoirs latents observé dès la phase aiguë de la primo-infection (Ananworanich et al., 2015). Dans les deux modèles, il en résulte la présence de provirus intégrés dans des cellules au repos capables de se réactiver et de produire de nouveaux virions. En l'absence de stimuli, ces cellules au repos ont un niveau d'activation insuffisant pour permettre l'expression des gènes viraux et la production de virions mais présentent une durée de vie plus longue que les lymphocytes T CD4⁺ activés, leur conférant un rôle important en tant que réservoirs viraux latents (Stevenson, 2003).

Une fois intégré et malgré les traitements antirétroviraux, le provirus est stable et persiste des années en partie du fait de la longue durée de vie et de la prolifération homéostatique des cellules l'hébergeant (Murray et al., 2016; Siliciano et al., 2003). Ce mécanisme d'intégration rend le VIH-1 extrêmement difficile à éradiquer par les thérapies actuelles (Chun et al., 2015; Kalidasan & Theva Das, 2020). De plus, l'état de latence dans lequel se trouve la majorité des provirus (Wiegand et al., 2017) permet aux cellules infectées, qui ne produisent donc pas de protéines virales, d'échapper à la reconnaissance et à la clairance par le système immunitaire. Cet état de latence est maintenu par de multiples mécanismes transcriptionnels empêchant la réactivation (Cohn et al., 2018) et la transcription (Yukl et al., 2018) du virus et l'entrée en apoptose de la cellule (Kuo et al., 2018). La réactivation de ces provirus latents conduit presque inévitablement au rebond de la charge virale, notamment lors de l'arrêt des traitements antirétroviraux.

D'autres réservoirs cellulaires, présents au sein de tissus où la pénétration de la cART est insuffisante, constituent des sanctuaires où le virus présente un faible niveau de réplication (Fletcher et al., 2014). Cette réplication virale résiduelle, contribue à la persistance virale par la constitution de nouveaux pools de cellules infectées (Chun et al., 2005). Enfin, la persistance du VIH-1 résulte également dans le fait qu'une partie des virions produits et des cellules nouvellement infectées échapperaient à la reconnaissance et à la clairance par le système immunitaire dû aux nombreuses altérations immunologiques induites par l'infection (Nichole R. Klatt, Chomont, et al., 2013). Ces altérations seront décrites plus en détail dans la partie C petit a « Altérations immunologiques induites par l'infection au VIH-1 ».

B. Phases cliniques et biologiques de l'infection par le VIH-1

L'infection par le VIH-1 évolue avec le temps en trois phases distinctes : la primo-infection, phase aiguë et rapide de l'infection lors de laquelle le virus va se disséminer du site initial de l'infection vers les différents tissus et organes ; la phase de latence clinique asymptomatique pendant laquelle le VIH-1 va progressivement détruire le système immunitaire et finir par faire entrer l'individu dans la dernière phase de l'infection ; la phase de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Cette dernière phase de l'infection se caractérise par un déficit immunitaire sévère s'accompagnant de maladies opportunistes qui se révéleront mortelles (**Figure 1**). Néanmoins, les traitements antirétroviraux limitent la destruction des effecteurs de l'immunité et freinent ainsi la progression vers la phase SIDA.

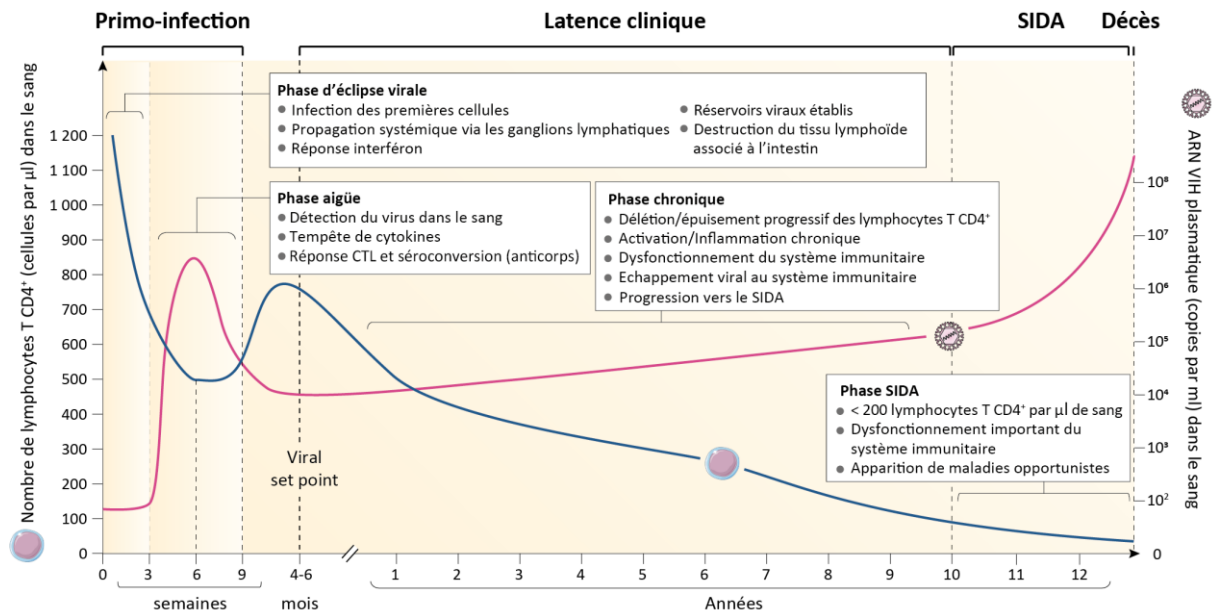


Figure 1: Phases cliniques de l'infection par le VIH-1. (D'après Deeks et al. (2015) Nat. Rev. Dis. Primers)

a. La primo-infection

La primo-infection par le VIH-1 correspond généralement aux neuf premières semaines de l'infection et est composée elle-même de deux phases : la phase d'éclipse virale pendant laquelle le virus n'est pas détectable et se dissémine, suivie de la phase aiguë de l'infection, période intense de réplication virale détruisant une partie du pool de lymphocytes T CD4⁺. La charge virale plasmatique est alors très élevée, augmentant considérablement le risque de transmission du virus. La primo-infection peut-être asymptomatique mais certaines personnes présentent, lors de la phase aiguë de l'infection, des symptômes pseudo-grippaux tels que de la fièvre, des myalgies, des arthralgies, une poly-adénopathie et des manifestations cutanéomuqueuses et digestives.

Les infections naturelles par le VIH-1 surviennent par transmission sexuelle à travers les voies génitales ou la muqueuse rectale, la transmission hétérosexuelle étant responsable de près de 70% des infections à VIH-1 dans le monde (Shaw & Hunter, 2012). Bien qu'il ne soit possible d'étudier *in vivo* les tout premiers événements de la transmission du VIH-1 chez l'Homme, de nombreuses études menées sur des échantillons de sang et de tissus provenant de personnes primo-infectées par le VIH-1 (Hu et al., 2004; Saba et al., 2010) ou de modèles animaux tel que le modèle macaque d'infection par le virus de l'immunodéficience simienne (SIV) (Estes et al., 2018) dans lesquelles la date de contamination est précise, ont permis une meilleure

compréhension des mécanismes immunologiques et physiopathologiques se produisant au cours de la primo-infection.

La phase d'éclipse virale

Après transmission du VIH-1, la phase d'éclipse virale commence. Les premières cellules à rencontrer le virus sont généralement les cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules dendritiques résidant dans les tissus et les macrophages. Ces cellules vont transmettre le virus aux lymphocytes T CD4⁺ du site d'infection et des ganglions lymphatiques drainants (Kijewski & Gummuluru, 2015; Wu & KewalRamani, 2006). Le VIH-1 se réplique alors rapidement dans les lymphocytes T CD4⁺ activés des ganglions et se propage à d'autres tissus, en particulier au tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT) (Jason M. Brenchley et al., 2004). Au cours des trois premières semaines de l'infection environ 80% des lymphocytes T CD4⁺ du GALT sont détruits, du fait de leur infection ou de leur suractivation (Gasper-Smith et al., 2008). A la fin de cette phase, de nombreux réservoirs viraux se sont établis dans les différents sites infectés par le virus (Ananworanich et al., 2015).

La phase aigüe de l'infection

La réplication intensive du VIH-1 dans le GALT et les autres tissus lymphoïdes marque l'entrée dans la phase aigüe de l'infection. La virémie augmente alors de façon exponentielle dans les 20 jours suivant l'infection (Mattapallil et al., 2005; Ronald S. Veazey et al., 1998), pour atteindre un pic généralement de plus d'un million de copies d'ARN par ml de sang (Ribeiro et al., 2010). Cet envahissement viral couplé à une activation immunitaire importante induisent une libération massive de cytokines pro-inflammatoires par les différents effecteurs de l'immunité. Cette « tempête de cytokines » contribue fortement à une activation immunitaire intense et délétère pour de nombreuses cellules immunitaires (Doisne et al., 2004; Keating et al., 2016; Shyam Kottilil et al., 2007; Roberts et al., 2010). Parallèlement, la réponse immunitaire adaptative se développe (Koup et al., 1994) et on observe l'apparition de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (CTLs) et d'anticorps spécifiques du VIH-1 (Deeks et al., 2015; McMichael et al., 2010). Grâce à cette réponse immunitaire adaptative, une diminution drastique de la virémie est observée. Néanmoins, la présence de réservoirs viraux capables de se réactiver et l'échappement du virus à la réponse immunitaire ne permettent pas d'enrayer totalement l'infection. Les erreurs non corrigées de la transcriptase inverse contribuent à l'échappement viral et une sélection rapide des variants résistants aux anticorps neutralisants et à la reconnaissance des antigènes viraux par les CTLs s'opère (Ganusov et al., 2011; Leslie et

al., 2004; Wei et al., 2003). Bien que le nombre de lymphocytes T CD4⁺ soit faible (moins de 500 cellules/mm³) au moment du pic de virémie, il revient plus tard à des niveaux presque normaux dans le sang mais pas dans le GALT (Jason M. Brenchley et al., 2004; Mattapallil et al., 2005; Mehandru et al., 2004).

A la fin de la primo-infection un certain équilibre s'établit entre le niveau d'échappement du VIH-1 à la réponse immunitaire et la capacité de celle-ci à contenir l'infection. On appelle en anglais ce niveau d'équilibre le « viral set point », la charge virale plasmatique se stabilisant en plateau quelques temps pour la durée de la latence clinique.

b. La phase de latence clinique

La deuxième étape de l'infection par le VIH-1 est la phase de latence clinique également appelée phase d'infection chronique ou d'infection asymptomatique. Pendant cette période, le VIH-1 continue de se répliquer dans l'organisme induisant une délétion et un épuisement progressif des lymphocytes T CD4⁺ ainsi qu'un dysfonctionnement important de la réponse immunitaire. Les personnes séropositives peuvent, durant cette phase, ne présenter aucun symptôme lié à l'infection. Sans cART, l'infection chronique par le VIH-1 évolue généralement vers la phase SIDA sous 10 ans ou plus, bien qu'elle puisse progresser plus rapidement chez certaines personnes (Babiker et al., 2000). La transmission du virus à un partenaire séronégatif par le biais des relations sexuelles est moindre à ce stade, comparé à la primo-infection, mais augmente progressivement au fil des années, lorsque l'individu se rapproche de la phase SIDA, la charge virale augmentant (Galvin & Cohen, 2004).

La phase de latence virale débute au « viral set point » c'est-à-dire lorsque le système immunitaire atteint un certain contrôle du niveau de réplication du VIH-1. La virémie est alors maintenue de façon relativement stable, à un niveau généralement plus faible que pendant la phase aiguë, et souvent pendant des années. Le niveau de la charge virale au moment du « viral set point » est hautement prédictif de la progression de la maladie (Lyles et al., 2000; Mellors et al., 1996). En effet, les individus présentant à ce moment une charge virale élevée progressent généralement plus rapidement vers la phase SIDA et la mort que ceux avec des niveaux viraux plus bas (Mellors et al., 1996). Cette progression au fil des années vers la phase SIDA est due à la déplétion progressive des lymphocytes T CD4⁺ tissulaires et circulants, à un épuisement du système immunitaire dû à son activation chronique, à un dysfonctionnement des réponses immunitaires et enfin à un échappement du virus au système immunitaire adaptatif (Deeks et al., 2015). De nombreux mécanismes sont impliqués dans cette pathogenèse. Parmi eux, la perte

d'intégrité des muqueuses intestinales conduit à une translocation systémique importante des produits bactériens contribuant à une inflammation locale et à une activation chronique intense du système immunitaire (Jason M. Brechley et al., 2006; Nichole R. Klatt, Funderburg, et al., 2013). Les lymphocytes T CD4⁺ sont alors majoritairement activés et recrutés aux différents foyers d'infection, devenant de nouvelles cibles pour le VIH-1. Le virus va alors détruire les lymphocytes T CD4⁺ directement par cytolyse lors de sa réplication ou bien indirectement par pyroptose induite par la présence de transcrits ADN viraux incomplets engendrant une réponse inflammatoire intense et la mort des cellules locales non infectées (Doitsh et al., 2010, 2014). D'autres cellules non infectées mais suractivées meurent également par apoptose et libèrent des microparticules et des facteurs apoptotiques possédant des propriétés immunosuppressives qui favorisent l'échappement du VIH-1 (Gasper-Smith et al., 2008). Enfin, la sélection rapide des virus mutés qui abrogent la reconnaissance des antigènes viraux par la réponse adaptative contribue également à l'échappement du virus au système immunitaire (Ganusov et al., 2011; Leslie et al., 2004; Wei et al., 2003).

Après plusieurs années le système immunitaire est épuisé et ne peut plus contenir l'infection par le VIH-1 ni empêcher le développement de maladies opportunistes. L'individu entre alors dans la dernière phase de l'infection, la phase SIDA.

c. La phase SIDA

L'entrée d'une personne séropositive dans la phase de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) est définie par l'apparition de maladies opportunistes et de cancers (Deeks et al., 2015; Selik et al., 2014) et est généralement associée à un taux de lymphocytes T CD4⁺ inférieur à 200 cellules/mm³ (contre environ 500-1 200 cellules/mm³ chez une personne séronégative).

De nombreux marqueurs sont des indicateurs du risque de progression vers le SIDA. Parmi ces marqueurs on retrouve le niveau d'inflammation et d'activation chronique de la réponse immunitaire (Hazenbergh et al., 2003), le niveau de la virémie au moment du « viral set point » (Lyles et al., 2000; Mellors et al., 1996) ou encore le nombre de lymphocytes T CD4⁺ circulant qui est l'indicateur du risque de SIDA le plus utilisé à ce jour chez les patients traités et non traités par cART (De Wolf et al., 1997; C. Goujard et al., 2006; Phillips & Lundgren, 2006).

A ce stade, le système immunitaire est épuisé, en parti détruit, et n'est plus capable de lutter contre la réplication intensive du VIH-1 et contre la survenue de nombreuses complications infectieuses ou oncologiques (Deeks et al., 2015). Ces complications comprennent des manifestations respiratoires causées par des champignons opportunistes ou des bactéries

(pneumocystose, candidose œsophagienne, histoplasmosse, tuberculose, pneumopathie bactérienne), des cancers (lymphome, sarcome de Kaposi), des manifestations neurologiques (leuco-encéphalopathie multifocale progressive, toxoplasmose cérébrale, cryptococcose, encéphalite à Cytomégalo virus) et enfin des atteintes digestives, oculaires et cutanées (Lloyd, 1996). Sans cART, ces personnes survivront à la phase SIDA en moyenne 2 ans (Poorolajal et al., 2016).

C. Mécanismes physiopathologiques de l'infection

Bien que l'immunodéficience induite par la déplétion progressive des lymphocytes T CD4⁺ soit caractéristique de l'infection par le VIH-1, les nombreux dysfonctionnements et dérégulations de la réponse immunitaire et son activation exacerbée jouent un rôle critique dans la pathogenèse de l'infection. En effet, l'activation chronique de la réponse immunitaire entraîne une inflammation délétère pour l'organisme et une immunosuppression qui, couplée aux altérations immunitaires induites au cours de l'infection, rend le système immunitaire incapable de lutter efficacement contre le VIH-1 et les diverses maladies opportunistes. La compréhension de l'ensemble des mécanismes impliqués dans cette pathogenèse est nécessaire pour l'élaboration de thérapies visant à restituer une fonction immunitaire performante et adaptée (**Figure 2**).

a. Altérations immunologiques induites par l'infection au VIH-1

L'infection par le VIH-1 induit une dérégulation, un dysfonctionnement ainsi que la destruction de nombreux acteurs cellulaires et tissulaires des réponses immunitaires innées et adaptatives. Ces altérations contribuent à l'échappement du virus à la réponse immunitaire en modifiant qualitativement et quantitativement les fonctions effectrices du système immunitaire (**Figure 2**).

Altérations des effecteurs cellulaires de la réponse immunitaire innée

Les cellules dendritiques classiques (cDCs) sont à l'interface des systèmes immunitaires inné et adaptatif et jouent un rôle majeur dans la mise en place de réponses immunitaires spécifiques et efficaces contre les infections (Banchereau et al., 2000). De par leur localisation dans les muqueuses, les cDCs sont parmi les premières cellules à rencontrer le VIH-1. Bien que cette rencontre puisse leur permettre d'amorcer rapidement les réponses immunitaires, elle contribue fortement, par la même occasion, à la dissémination du virus dans l'organisme (Wu & KewalRamani, 2006). Dès la primo-infection, le VIH-1 et le SIV inhibent la capacité d'une

partie des cDCs à présenter l'antigène aux lymphocytes T, ne permettant plus à ces cellules d'induire une réponse cellulaire efficace (Heather Donaghy et al., 2003; Jinghe Huang et al., 2011, 2012; Wonderlich et al., 2015). Ces cDCs présentent également un défaut de maturation révélé par une expression faible des marqueurs d'activation et de costimulation CD80, CD83 et CD86 ainsi qu'une altération de leur profil cytokinique avec une faible sécrétion d'IL-12 et de TNF- α et une forte induction d'IL-10 (Frleta et al., 2012; Jinghe Huang et al., 2011; Majumder et al., 2005; Miller & Bhardwaj, 2013). L'augmentation de la production d'IL-10 par ces cDCs immatures, possédant de faibles capacités de présentation antigénique, leur confère une résistance à la lyse médiée par les cellules tueuses naturelles ou « natural killer » (NK) (Alter et al., 2010). Ceci entraînant donc l'accumulation dans les ganglions lymphatiques d'un pool de cDCs incapable d'induire une réponse immunitaire efficace.

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) sont également une composante essentielle des réponses immunitaires innées contre les virus. En effet celles-ci produisent des interférons de type I (IFN-I), qui ont des propriétés antivirales très puissantes via l'induction de nombreux gènes permettant aux cellules cibles de résister à l'infection (Reizis, 2019; Stetson & Medzhitov, 2006). Au cours de la primo-infection par le VIH-1 et le SIV on observe une importante diminution des pDCs dans le sang (Kamga et al., 2005; Killian et al., 2006; Malleret et al., 2008; Pacanowski et al., 2001). Cette diminution peut être attribuée à la fois à leur migration vers les ganglions lymphatiques et la muqueuse intestinale (H. Li et al., 2015; Malleret et al., 2008), à leur mort par apoptose (K. N. Brown et al., 2009; Malleret et al., 2008; Meyers et al., 2007) et aussi peut-être par infection directe (Heather Donaghy et al., 2003). Les pDCs du sang et des organes lymphoïdes secondaires sont alors renouvelées à partir de la moelle osseuse (Bruel et al., 2014; H. Li et al., 2015) et seulement une faible fraction de ces cellules produit de l'IFN- α à un instant t dans les organes lymphoïdes secondaire (ganglions lymphatiques, rate, muqueuse intestinale) (Bruel et al., 2014). Des études indiquent que la suractivation des pDCs dans les organes lymphoïdes entraîne également leur mort. Ces cellules sont alors renouvelées par des précurseurs Ki67⁺ issus de la moelle osseuse, lesquels n'ont pas la capacité de produire de l'interféron alpha (Bruel et al., 2014; Martín-Martín et al., 2009), ce qui expliquent en partie le déclin rapide de la réactivité des pDCs et de la production d'IFN- α observé quelques semaines après l'infection (Bruel et al., 2014). Au cours de l'infection chronique par le VIH-1, on constate une diminution progressive du nombre de pDCs dans le sang, corrélée positivement au nombre de lymphocytes T CD4⁺, négativement à la charge virale et généralement partiellement restaurée sous cART (Barron et al., 2003; Finke et al., 2004).

Cette diminution du nombre de pDCs au cours de l'infection chronique peut être attribuée aux mêmes phénomènes observés lors de la primo-infection par le VIH-1 et le SIV (K. N. Brown et al., 2007; Dillon et al., 2008; Meyers et al., 2007; Nascimbeni et al., 2009). En phase chronique de l'infection, les pDCs apparaissent partiellement activées (Bruehl et al., 2014; Dillon et al., 2008; Krathwohl et al., 2006) et des études indiquent que ces cellules ne sont capables de produire que de faibles taux d'IFN- α suite à des stimulations *ex vivo* (H Donaghy et al., 2001; Heather Donaghy et al., 2003; Feldman et al., 2001; Pacanowski et al., 2001; Soumelis et al., 2001).

Les macrophages tissulaires et les monocytes du sang périphérique ont un rôle important dans la détection des pathogènes, la coordination des réponses immunitaires précoces et la clairance microbienne (Ginhoux & Jung, 2014). L'infection par le VIH-1 induit l'altération des fonctions effectrices des monocytes et des macrophages, notamment la phagocytose (Espíndola et al., 2018; Kedzierska et al., 2003), la destruction intracellulaire de pathogènes par explosion oxydative (Espíndola et al., 2018; Koziel et al., 2000; Müller et al., 2008), leurs réponses à des stimuli bactériens et aux chimiokines (Noursadeghi et al., 2006; Ueda et al., 1998; J. M. Wang et al., 1998) et dérégule également leurs productions de cytokines et de chimiokines (Espíndola et al., 2018; Ito et al., 1998; S. Swingler et al., 1999). De plus, ces cellules présentent une expression altérée de leurs récepteurs de l'immunité innée, tels que le CD14 et le TLR4 (Noursadeghi et al., 2006). Un dérèglement dans la balance des sous-populations de monocytes, avec une augmentation de monocytes au profil inflammatoire, est également observé (Thieblemont et al., 1995). Enfin, le VIH-1 et le SIV augmentent la sensibilité des monocytes et des macrophages à l'apoptose (Hasegawa et al., 2009; Laforge et al., 2011) et induisent indirectement en phase chronique de l'infection une suractivation et un renouvellement massif des monocytes (Hasegawa et al., 2009; Sandler & Douek, 2012). L'altération des fonctions effectrices des monocytes et des macrophages contribue considérablement à la pathogenèse de l'infection par le VIH-1 en empêchant notamment la phagocytose des pathogènes opportunistes en phase SIDA.

Les cellules NK ont la capacité d'éliminer les cellules tumorales et les cellules infectées présentant de faibles niveaux de HLA-I et produisent des facteurs qui stimulent et orientent la réponse immunitaire adaptative (Flórez-Álvarez et al., 2018; Vivier et al., 2011). Dès la primo-infection, la distribution des sous-populations de cellules NK ainsi que leurs fonctions sont dérégulées par le VIH-1 (Alter et al., 2005). Le VIH-1 induit une diminution d'expression des récepteurs activateurs et une augmentation d'expression des récepteurs inhibiteurs à la surface

de ces cellules (De Maria et al., 2003; S. Kottlil et al., 2004; Mavilio et al., 2003). Ce phénomène, couplé à la préservation des ligands de leurs récepteurs inhibiteurs à la surface des cellules infectées, entrave la lyse de ces dernières par les cellules NK (Bonaparte & Barker, 2003; G. B. Cohen et al., 1999; Ward et al., 2004). Le VIH-1 empêche également la séquestration des virions à la surface des cellules infectées limitant l'induction de la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) des cellules NK (Arias et al., 2014). Enfin, en présence d'une virémie importante, les cellules NK sécrètent des quantités réduites de CC-chimiokines et de cytokines ne permettant plus d'inhiber l'entrée du virus dans les cellules cibles (Shyam Kottlil et al., 2003; Oliva et al., 1998) et de façonner la réponse immunitaire adaptative (Fauci et al., 2005; Mavilio et al., 2003; Tasca et al., 2003), respectivement.

Enfin les granulocytes, dont font partie les neutrophiles, constituent par leur grand nombre un des principaux effecteurs de l'immunité innée pouvant sécréter des molécules effectrices, phagocyter les micro-organismes et présenter des antigènes aux lymphocytes T (Ang Lin & Loré, 2017). Cependant, ces cellules sont elles aussi affectées par l'infection au VIH-1. Les neutrophiles présentent de nombreuses dysfonctions telles qu'un défaut de chimiotaxie, de phagocytose, et de destruction microbienne (Ellis et al., 1988; Pitrak, 1999). Une apoptose des neutrophiles est également observée au cours de l'infection, contribuant à une neutropénie importante particulièrement en phase SIDA (Elbim et al., 2009; Salmen et al., 2004). Cette neutropénie et les dérégulations fonctionnels des neutrophiles sont liés à un risque accru d'infections secondaires chez les personnes vivant avec le VIH-1 et dont la maladie progresse vers la phase de SIDA (Brettle, 1997; Keizer et al., 1996; Kuritzkes, 2000; Shi et al., 2014).

Altérations des effecteurs cellulaires de la réponse immunitaire adaptative

En plus de leur destruction massive au cours de l'infection par le VIH-1, les lymphocytes T CD4⁺ présentent de nombreuses anomalies phénotypiques et fonctionnelles. En effet, ces cellules présentent un défaut d'expression du marqueur d'activation CD40 ligand (R. Zhang et al., 2004), une augmentation d'expression des molécules inhibitrices CTLA-4 (Kaufmann et al., 2007) et PD-1 (D'Souza et al., 2007; Day et al., 2006) et une augmentation d'expression de marqueurs d'apoptose ainsi qu'un niveau d'apoptose important (Herbeuval et al., 2005). Bien que les lymphocytes T CD4⁺ des individus virémiques soient capables de produire de l'IFN- γ , ces cellules présentent une sécrétion d'IL-2 altérée ne permettant pas leur prolifération et leur persistance en tant que cellules mémoires à long terme (Palmer et al., 2004; Tilton et al., 2007; Younes et al., 2003). Enfin, l'infection par le VIH-1 induit un déséquilibre dans les sous-

populations de lymphocytes T CD4⁺ avec une diminution accrue du nombre de lymphocytes Th17 dans le GALT (J. M. Brechley et al., 2008) et une accumulation importante de lymphocytes T régulateurs (Treg) aux sites de répliquions du VIH-1 (Andersson et al., 2005; Nilsson et al., 2006). Ce déséquilibre cellulaire favorise l'anergie immunitaire et est corrélé à une progression plus rapide de la maladie (Falivene et al., 2015).

Les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (CTLs) spécifiques de virus exercent une grande partie de leur activité cytotoxique en sécrétant des facteurs solubles tels que des protéines cytolytiques, des cytokines et des chimiokines. Or, les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du VIH-1 ont une capacité réduite à sécréter des cytokines, proliférer et produire de la perforine, molécule nécessaire à l'initiation de la lyse cellulaire (Andersson et al., 2002; Victor Appay et al., 2000; Stephen A. Migueles et al., 2002; Shankar et al., 2000). Ce défaut de production de perforines ne serait cependant pas spécifique au VIH-1 mais représenterait un dérèglement de la réponse immunitaire face à une exposition antigénique chronique (D. Zhang et al., 2003). La protéine Nef du VIH-1 quant à elle induit spécifiquement une régulation négative des molécules HLA-I, à la surface des cellules infectées, empêchant leur reconnaissance et leur lyse par les CTLs (Collins et al., 1998; O. O. Yang et al., 2002). Enfin, les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du VIH-1 présentent une surexpression de la molécule PD-1 qui est associée à l'épuisement et au dysfonctionnement de ces cellules ainsi qu'à la progression de la maladie (Day et al., 2006; Peretz et al., 2012; Trautmann et al., 2006; J. Y. Zhang et al., 2007). Même sous cART, la capacité de prolifération, la polyfonctionnalité cytokinique et la fonction cytotoxique des CTLs spécifiques du VIH-1 ne sont pas totalement restaurées (S. A. Migueles et al., 2009).

Les lymphocytes B quant à eux, sont responsables de la réponse humorale mais activent également les lymphocytes T en leur présentant l'antigène, des molécules de costimulation et des cytokines (Hoffman et al., 2016; Lund & Randall, 2010). L'infection par le VIH-1 induit également une dérégulation phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes B. En effet, en présence d'une virémie élevée on observe pour ces cellules une augmentation de l'expression de certains marqueurs, notamment CD70, CD80 et CD86 (De Milito et al., 2004; Malaspina et al., 2003) associée à une incapacité des lymphocytes B à stimuler la réponse T (Malaspina et al., 2003). De plus, le VIH-1 induit une diminution de lymphocytes B mémoires circulants, due à leur différenciation en plasmocytes (Nagase et al., 2001), et une accumulation de lymphocytes B naïfs sécrétant des immunoglobulines de façon incontrôlée (De Milito et al., 2004). Ceci conduit, à une plasmocytose associée à une hypergammaglobulinémie (De Milito et al., 2004; S. Moir et al., 2001; Nagase et al., 2001; Notermans et al., 2001). L'infection par le VIH-1

entraîne également une augmentation de l'activation polyclonale des lymphocytes B (Lane et al., 1983; Shirai et al., 1992) conduisant à des niveaux réduits d'anticorps spécifiques (De Milito et al., 2004; Opravil et al., 1991) ainsi qu'à un défaut de commutation de classe des immunoglobulines (Qiao et al., 2006) et à une augmentation de production d'auto-anticorps (Haynes et al., 2005; Shirai et al., 1992). Ces dérégulations contribuent à l'inefficacité des réponses humorales contre le virus. Enfin, l'hyperactivation des lymphocytes B entraîne une augmentation de la fréquence des tumeurs malignes associées aux lymphocytes B (Martínez-Maza & Breen, 2002) et induit parallèlement le renouvellement, l'épuisement et l'apoptose de certaines de leurs sous-populations (J. Ho et al., 2006; Susan Moir et al., 2004, 2008; Samuelsson et al., 1997).

Altérations des organes et tissus associées à la réponse immunitaire

Le GALT, qui est le lieu d'activation et d'action du système immunitaire contre les agents pathogènes du tractus intestinal, subit de nombreux dommages dus au VIH-1. En effet, la primo-infection par ce virus entraîne une déplétion importante des lymphocytes T CD4⁺ du GALT (Jason M. Brenchley et al., 2004; Mehandru et al., 2004; Ronald S. Veazey et al., 1998) dont ceux produisant de l'IL-17 et de l'IL-22 (J. M. Brenchley et al., 2008; N. R. Klatt et al., 2012), cytokines nécessaires à la défense et au maintien de la barrière intestinale (Eyerich et al., 2010). On observe également le dysfonctionnement, la prolifération anormale et la mort d'entérocytes (Buccigrossi et al., 2011; Canani et al., 2003; Nazli et al., 2010; Sankaran et al., 2008). Ces événements sont dus en partie à des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α qui engendrent l'apoptose des entérocytes et une perturbation des jonctions serrées (Nazli et al., 2010; Schmitz et al., 2002). L'ensemble de ces dérégulations induit une perte d'intégrité de la barrière intestinale entraînant une translocation microbienne importante (Nazli et al., 2010). Le passage chronique de produits microbiens dans la circulation sanguine provoque une activation immunitaire systémique persistante et une inflammation, même sous cART, associée à la progression de la maladie (Jason M. Brenchley et al., 2006; Nichole R. Klatt, Funderburg, et al., 2013; Kuller et al., 2008; Lichtfuss et al., 2011).

Le VIH-1 induit également des dommages importants au thymus, lieu de maturation des lymphocytes T, en détruisant par cytololyse ou par apoptose les progéniteurs et les thymocytes et en perturbant l'architecture stromale thymique. Il en résulte une thymopoïèse défectueuse, l'apoptose des lymphocytes T CD4⁺ naïfs et une involution du thymus (Meissner et al., 2003; Ye et al., 2005). Une récupération du thymus peut survenir chez certains patients sous cART.

Cependant, les dommages thymiques importants entravent généralement la reconstitution immunitaire.

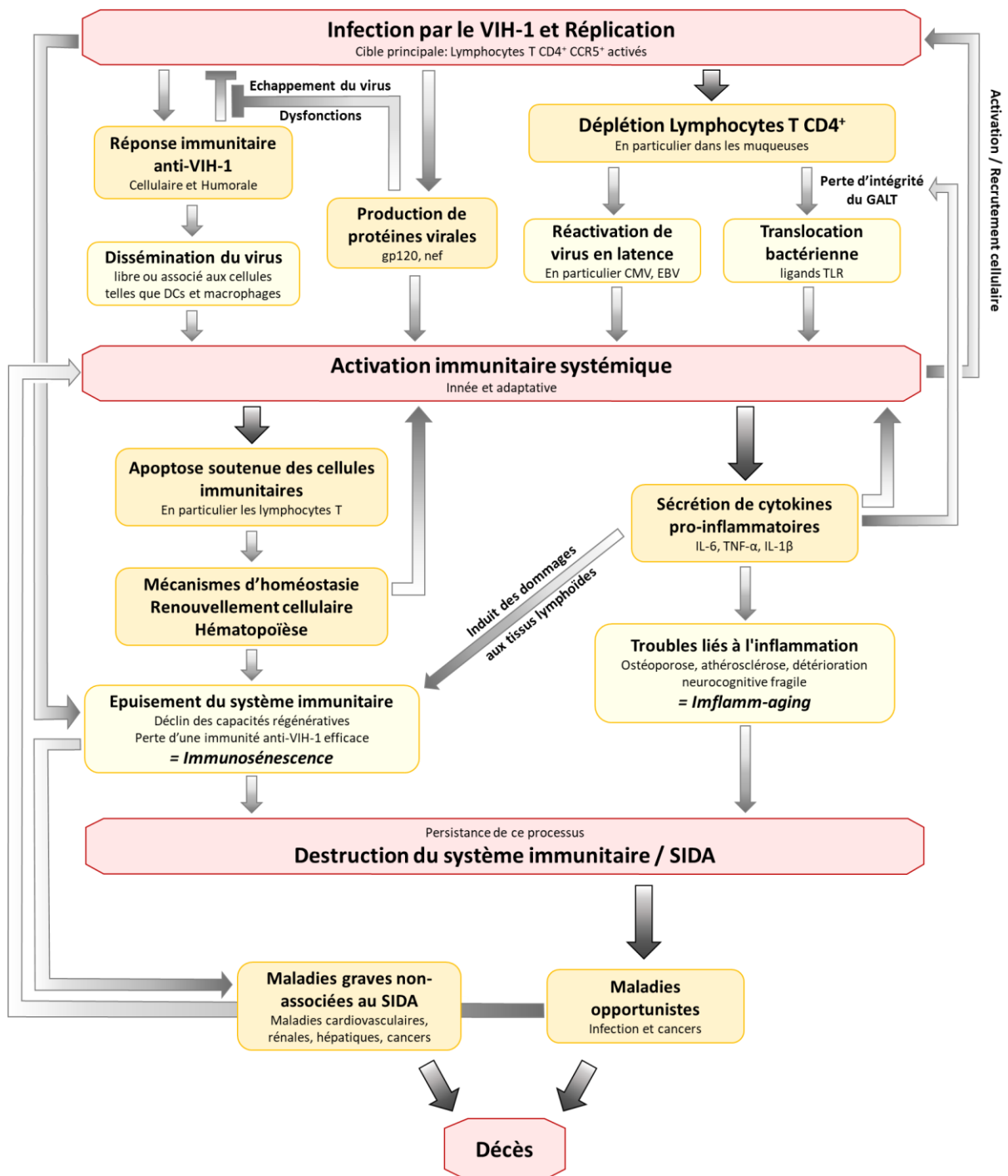


Figure 2: Physiopathologie de l'infection par le VIH-1. (D'après Appay et al. (2008) *J Pathol.*, Deeks et al. (2011) *Annu Rev Med.* et Hsu et al. (2013) *AIDS Res Ther.*)

Les ganglions lymphatiques, lieu d'initiation, d'activation, de maintien et de survie homéostatique des lymphocytes T et B, sont également altérés par l'infection au VIH-1. La

primo-infection engendre une lymphadénopathie (Metroka et al., 1983) ainsi qu'une fibrose avec perte du réseau cellulaire fibroblastique réticulaire, détruisant progressivement l'architecture des ganglions lymphatiques (Schacker et al., 2002, 2006; Zeng et al., 2012). Ces modifications restreignent le drainage lymphatique et l'accès des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ naïfs à des facteurs de survie entraînant leur déplétion progressive (Estes, 2013; Zeng et al., 2012). À mesure que l'infection non traitée progresse et que la lymphopénie devient plus prononcée, les ganglions lymphatiques deviennent davantage fibreux et on observe leur involution (Biberfeld et al., 1987; Metroka et al., 1983).

b. Activation immunitaire chronique et inflammation : causes et conséquences

Contrairement à l'infection par le VIH-1 chez l'Homme et le SIV chez le macaque, l'infection par le SIV chez ses hôtes naturels (singes verts mangabeys et singes verts d'Afrique) est non pathogène et est associée à une absence d'activation immunitaire malgré une réplication virale élevée (Cumont et al., 2008; Silvestri et al., 2007). Cette activation immunitaire chronique a été montrée comme jouant un rôle majeur dans la pathogenèse de l'infection par le VIH-1 (V. Appay & Sauce, 2008; Hazenberg et al., 2003; P. Hunt, 2014; Lori, 2008) et le SIV (Bosinger et al., 2011; Manches & Bhardwaj, 2009) et est hautement prédictive de la progression de la maladie (Hazenberg et al., 2003; Utay & Hunt, 2016). Les causes et les conséquences néfastes de cette activation immunitaire et de cette inflammation sont complexes et multifactorielles (**Figure 2**).

Au début de l'infection par le VIH-1, les cellules de la réponse immunitaire innée et adaptative sont activées directement par les protéines virales issues de la réplication du virus (Meier et al., 2007; Merrill et al., 1989; J. K. Wang et al., 2000). Mais aussi par la présentation de peptides du VIH-1 par les cellules infectées (M R Betts et al., 2001) et par la destruction des lymphocytes T CD4⁺ par cytolysse, apoptose ou pyroptose (Doitsh et al., 2010, 2014). Les cellules détruites ou activées, libèrent alors de nombreuses cytokines en majorité pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IFN- α , l'IL-1 β et l'IL-6, et des chimiokines permettant d'activer et recruter les différents effecteurs de la réponse immunitaire aux différents foyers d'infection (Decrion et al., 2005; C. Lee et al., 2003; Merrill et al., 1989; Stacey et al., 2009; S. Swingler et al., 1999). Les lymphocytes T CD4⁺ activés et recrutés deviennent alors de nouvelles cibles pour le VIH-1 qui initie une réplication intensive engendrant une nouvelle déplétion massive de ces cellules. D'autres cellules activées présentant un profil pro-inflammatoire sont recrutées, telles que les pDCs, les neutrophiles et les monocytes (Thieblemont et al., 1995; Weber et al., 2000). L'accumulation de ces cellules sécrétant des produits pro-inflammatoires et la diminution

concomitante des cellules qui régulent l'homéostasie épithéliale, telles que les lymphocytes T CD4⁺ produisant de l'IL-17 et de l'IL-22, compromettent progressivement l'intégrité des muqueuses (J. M. Brechley et al., 2008; N. R. Klatt et al., 2012). Les dommages occasionnés au tissu lymphoïde associé à l'intestin provoquent une translocation chronique importante de produits microbiens de la lumière intestinale à la circulation sanguine (Jason M. Brechley et al., 2006; Nichole R. Klatt, Funderburg, et al., 2013; Nazli et al., 2010). Ces produits microbiens (peptidoglycane, LPS, flagelline, ADN CpG) vont être détectés par des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PRRs), présents à la surface des cellules du système immunitaire inné dont les monocytes, les macrophages et les DCs (Takeuchi & Akira, 2010). L'Activation de ces PRRs induit une cascade de signalisations entraînant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IFN- α , l'IFN- β , l'IL-1 β et l'IL-6 (Birx et al., 1990; Molina et al., 1989; Sandler & Douek, 2012; Takeuchi & Akira, 2010). Ces cytokines vont à leur tour contribuer à la persistance de l'inflammation et à l'activation immunitaire, même sous cART (Jason M. Brechley et al., 2006; Nichole R. Klatt, Funderburg, et al., 2013; Kuller et al., 2008; Lichtfuss et al., 2011). Les produits microbiens transloqués passent par le foie et contribuent aux lésions hépatiques déjà induits par l'infection (Balagopal et al., 2009; A. L. French et al., 2013; Tuyama et al., 2010). Ceci engendre alors une altération de la synthèse de protéines hépatiques et de la clairance microbienne (Deeks et al., 2013). Il en résulte une inflammation et une fibrose hépatique (Chamroomkul & Bansal, 2019) ainsi qu'une hypercoagulabilité pouvant induire des dysfonctionnements vasculaires et une multimorbidité (Deeks et al., 2013).

La déplétion des lymphocytes T CD4⁺ couplée à l'environnement inflammatoire peuvent également entraîner une réactivation et limiter le contrôle immunitaire de virus en latence tels que le CMV et l'EBV (Doisne et al., 2004; M. Z. Smith et al., 2013), contribuant à la boucle d'activation chronique de la réponse immunitaire (V. Appay & Sauce, 2008; Sokoya et al., 2017). De plus, l'environnement pro-inflammatoire chronique entraîne une suppression et/ou une dérégulation fonctionnelle des cellules du système immunitaire inné et adaptatif (Lane et al., 1983; Susan Moir & Fauci, 2009), et peut altérer la capacité de la moelle osseuse, du thymus et des ganglions lymphatiques à régénérer convenablement celui-ci (Estes et al., 2007; Marandin et al., 1996; Schacker et al., 2002; Zeng et al., 2012). La déplétion et le dysfonctionnement important des différents effecteurs de la réponse immunitaire compromettent la capacité de l'hôte à combattre diverses infections et cancers (Bandera et al.,

2018; Operskalski & Kovacs, 2011). Ces maladies contribuent à leur tour à l'inflammation et à l'activation chronique de la réponse immunitaire.

L'ensemble de ces événements inflammatoires favorisent des niveaux accrus de réplication virale conduisant à un cercle vicieux dans lequel l'infection stimule l'activation et l'activation stimule l'infection (V. Appay & Sauce, 2008).

Avec le temps, cette inflammation et cette activation persistante, même sous cART (M. A. French et al., 2009; P. W. Hunt et al., 2003; Neuhaus et al., 2010), conduisent à l'épuisement de la réponse immunitaire (Victor Appay et al., 2007; P. W. Hunt, 2012). En effet, la stimulation antigénique répétée des cellules entraîne un épuisement irréversible de leur fonction effectrice et de leur capacité répliquative, associée à une augmentation d'expression de marqueurs spécifiques à ces événements (Jason M. Brenchley et al., 2003; Day et al., 2006; Papagno et al., 2004; Peretz et al., 2012). Ces processus ressemblent au phénomène d'immunosénescence observé lors du vieillissement cellulaire. Les cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IFN- α , IL-1 β et IL-6 produites au cours de la phase chronique de l'infection par le VIH-1 jouent un rôle majeur dans ce phénomène (Victor Appay & Rowland-Jones, 2002; Bruunsgaard et al., 2001; HY et al., 2001). De plus, le renouvellement exacerbé du pool de lymphocytes T, dans le but de reconstituer le compartiment lymphoïde appauvri au cours de l'infection par le VIH-1, induit une accumulation de cellules T vieillissantes et une perte de capacité régénérative du système immunitaire, ce qui contribue au final à son vieillissement prématuré (Papagno et al., 2004; Sauce et al., 2011; Schacker et al., 2006). Finalement, l'épuisement et la sénescence du système immunitaire dû à sa suractivation contribuent, même sous cART, à augmenter le risque de maladies graves non associées au SIDA. Les individus séropositifs sont donc plus susceptibles de développer des maladies, notamment cardiovasculaires (Kaplan et al., 2011; Nou et al., 2016), rénales (Islam et al., 2012), hépatiques (Kaspar & Sterling, 2017) et des cancers (Bandera et al., 2018) entraînant toujours plus d'inflammation.

D. Contrôle de l'infection et stratégies thérapeutiques

La pathogenèse induite par le VIH-1 a rapidement poussé les recherches vers des thérapies visant à diminuer la charge virale et à restaurer la fonction immunitaire de façon quantitative et qualitative. La découverte des traitements antirétroviraux a permis cette prouesse contribuant à prolonger considérablement la durée et la qualité de vie des personnes vivant avec le VIH-1. Néanmoins, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires, cellulaires et viraux survenant chez les individus contrôlant naturellement l'infection et lors de l'établissement des

réservoirs viraux latents, reste nécessaire pour l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques qui puissent permettre une rémission durable ou une guérison totale du VIH-1.

a. Les traitements antirétroviraux : contrôle induit du VIH-1

Le VIH-1 appartient à la famille des *Retroviridae*, par conséquent ce virus est capable d'intégrer son ADN dans le génome de la cellule afin d'initier sa réplication. Après avoir pénétré dans la cellule, l'ARN viral simple brin du VIH-1 est rétrotranscrit en ADN par la transcriptase inverse et intégré à l'ADN de l'hôte par l'intégrase. Le VIH-1 profite alors de la machinerie transcriptionnelle de l'hôte pour se répliquer et produire ses protéines. Les protéines virales sont ensuite clivées par la protéase virale, et les virions matures sont libérés (Pasternak et al., 2013). Chacune de ces étapes est désormais bloquée grâce à des traitements antirétroviraux ciblés permettant : l'inhibition de l'entrée du virus grâce à des inhibiteurs d'attachement et de fusion ; l'inhibition de la transcription avec des inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques (INTIs) et non nucléosidiques (INNTIs) de la transcriptase inverse ; l'inhibition de l'intégration par des inhibiteurs de l'intégrase (INIs) et de la maturation des virions avec les inhibiteurs de l'aspartyl protéase virale (IP) (Engelman & Cherepanov, 2012) (**Figure 3**).

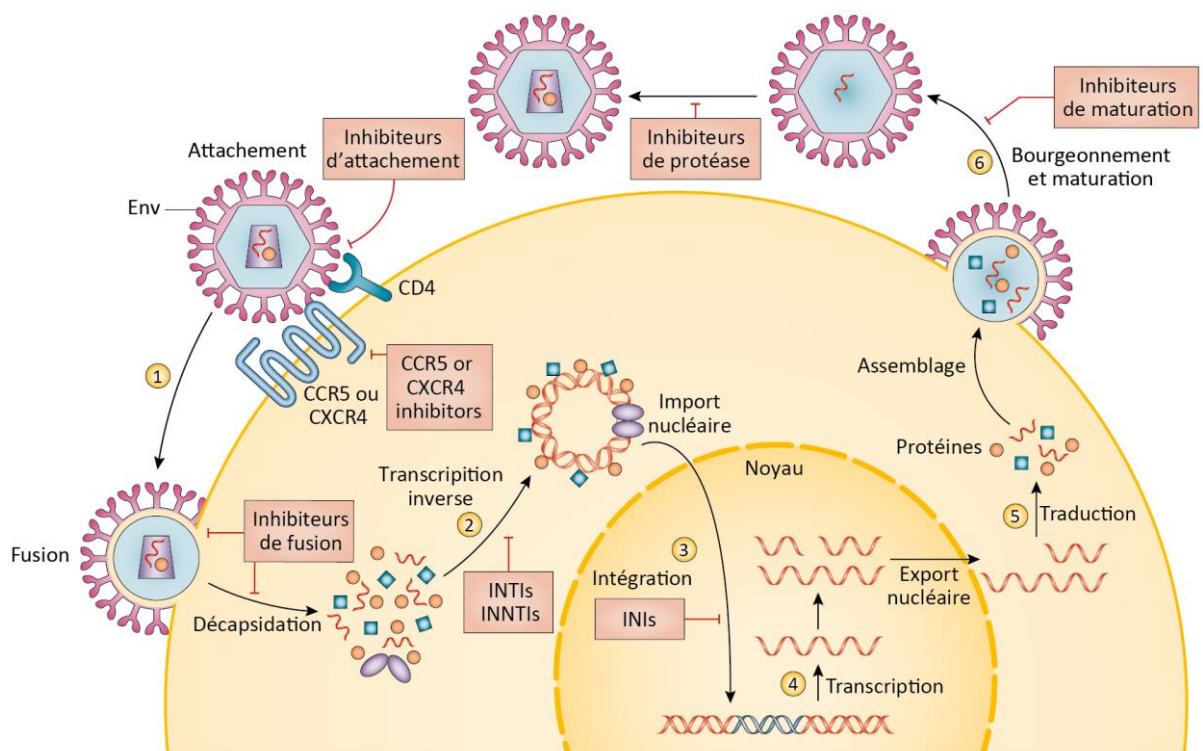


Figure 3: Etapes d'infection de la cellule hôte par le VIH-1 et mécanisme d'action des traitements antirétroviraux. (D'après Deeks et al. (2015) *Nat. Rev. Dis. Primers*)

La thérapie antirétrovirale combinée (cART) reste à ce jour la thérapie la plus efficace contre le VIH-1. Elle comporte généralement deux INTIs combinés à un troisième agent tel qu'un INI, un INNTI ou un IP boosté (Cihlar & Fordyce, 2016). Cette thérapie combinée associant plusieurs inhibiteurs ciblant différentes enzymes virales permet depuis plus de deux décennies de contrôler la charge virale plasmatique en dessous des seuils de détection (< 50 copies d'ARN viral/ml) (Autran et al., 1997). Ce contrôle virologique est associé à une réduction de la transmission du virus (M. S. Cohen & Gay, 2010) et une amélioration de la fonction immunitaire avec une restauration importante mais non totale du nombre de lymphocytes T CD4⁺ (Autran et al., 1997; Lederman, 2001). On observe également chez ces patients sous cART une réduction de nouveaux cas de SIDA (D'Arminio Monforte et al., 2005; Vittinghoff et al., 1999) et une réduction de morbidité et de mortalité liées au SIDA (Battegay et al., 2006; Palella et al., 1998; Vittinghoff et al., 1999). Néanmoins, la trithérapie est imparfaite et ne permet pas de contracter totalement l'activation immunitaire et l'inflammation destructrices induites par l'infection au VIH-1 (P. Hunt, 2014; Nichole R. Klatt, Funderburg, et al., 2013). La fonction du système immunitaire n'est donc pas restaurée de façon optimale et on assiste peu à peu à son épuisement (Victor Appay et al., 2007; P. W. Hunt, 2012; Lichtfuss et al., 2011; Schacker et al., 2006). Les traitements antirétroviraux sont également associés à des effets indésirables à court et long terme, principalement en présence de comorbidités (Carr & Cooper, 2000; Reisler et al., 2003). Des complications cardiovasculaires (Kaplan et al., 2011; Nou et al., 2016), rénales (Islam et al., 2012), hépatiques (Kaspar & Sterling, 2017), métaboliques (Carr et al., 1999; S. Kumar & Samaras, 2018), neurocognitives (Saylor et al., 2016), osseuses (Ahmad et al., 2017) et malignes (Bandera et al., 2018) résultent également de l'infection aux VIH-1. Malgré la cART, les personnes sous traitements présentant des comorbidités ont alors un risque plus important de mourir de ces maladies non associées au SIDA comparées aux personnes séronégatives (Hsu et al., 2013; Palella et al., 2006).

Malheureusement, l'élimination du VIH-1 grâce à la cART reste à ce jour impossible en raison du pool de cellules réservoirs infectées de manière latente résistantes ou non accessibles aux antirétroviraux. L'apparition de mutants résistants à la cART (Clavel & Hance, 2004), en particulier si l'observance est mauvaise, et l'arrêt du traitement induisent presque toujours un rebond viral en quelques semaines (Davey et al., 1999). Cependant, l'initiation de la trithérapie rapidement au cours de la primo-infection par le VIH-1 peut limiter la diversification des virus et la taille du réservoir, mais aussi préserver d'avantage la fonction immunitaire, minimiser les complications liées au VIH-1 et empêcher la transmission du virus grâce à la diminution de la

charge virale (Ananworanich et al., 2015, 2016; Crowell et al., 2016; Hocqueloux et al., 2013; Susan Moir et al., 2010; Ndhlovu et al., 2019; Oxenius et al., 2000). De plus, l'initiation précoce de la cART augmente la probabilité d'obtenir une rémission durable après interruption du traitement. Ce phénomène fut initialement décrit pour les contrôleurs post-traitement (PTCs) de la cohorte française VISCONTI (Viro-Immunological Sustained CONTROL after Treatment Interruption) (Frangé et al., 2016; Sáez-Cirión et al., 2013). Ces patients ainsi que les patients contrôleurs naturels du VIH-1 (HICs) sont très étudiés puisqu'ils maintiennent une charge virale indétectable en l'absence de traitement (Saez-Cirion et al., 2014).

b. Les contrôleurs naturels et contrôleurs post-traitement du VIH-1

Comme indiqué précédemment, certaines rares personnes vivant avec le VIH-1 ont la capacité de maintenir une charge virale ARN indétectable pendant plusieurs années sans signes de progression vers la maladie. Parmi ces personnes certaines ont la capacité de contrôler l'infection chronique à long terme en l'absence de traitement, les contrôleurs du VIH (HICs) et d'autre après arrêt d'un traitement initié très précocement lors de l'infection, les contrôleurs post-traitement (PTCs) (**Figure 4**).

Les patients contrôleurs du VIH-1

Les patients contrôleurs du VIH-1 ou « HIV controllers » (HICs) font partie des patients non-progresseurs ou asymptomatiques à long terme du VIH-1 (LTNPs). Les LTNPs représentent environ 10% des personnes séropositives et ont la capacité de maintenir un taux de lymphocytes T CD4⁺ normal et stable, généralement pendant plus de 10 ans et cela en l'absence de traitement (Barker et al., 1998; S. P. Buchbinder et al., 1994; Y. Cao et al., 1995). Les LTNPs forment une population hétérogène, présentant des taux variables, généralement bas, de réplication virale et dont la majorité finit par progresser vers le stade SIDA après de longues années (Lefrère et al., 1997). Néanmoins, une faible partie d'entre eux, les HICs, qui représentent moins d'1% des personnes vivant avec le VIH-1, montrent un contrôle spontané très efficace à long terme de la réplication virale (Lambotte et al., 2005; Okulicz et al., 2009). En effet, les HICs présentent des charges virales de moins de 400 copies d'ARN par ml dans 90% de leurs mesures plasmatiques après plus de 5 ans de séroconversion et possèdent également de petits réservoirs viraux au vu de la faible charge d'ADN VIH-1 retrouvée dans leurs cellules (Lambotte et al., 2005; Noel et al., 2015). Bien que les HICs contrôlent l'infection par le VIH-1, un faible niveau de réplication peut tout de même être détecté en utilisant des techniques ultrasensibles (Hatano et al., 2009). Des sursauts de réplication à bas bruits ou « blips » contribuent à une activation immunitaire

chronique pouvant être associée à la perte de lymphocytes T CD4⁺ (Boufassa et al., 2011; P. W. Hunt et al., 2008; Noel et al., 2014; Pereyra et al., 2009) mais aussi aux complications cardiovasculaires (Hsue et al., 2009; Pereyra et al., 2012) observées chez ces patients. Néanmoins, cette réplication à bas bruit pourrait servir de stimulus nécessaire au maintien de la puissante réponse immunitaire anti-VIH-1 des HICs. En effet, les lymphocytes T CD4⁺ des HICs montrent une avidité, une spécificité et une polyfonctionnalité importante contre le VIH-1 (Vingert et al., 2010). Leurs lymphocytes T CD4⁺ sont également moins sensibles à l'infection par le VIH-1 (H. Chen et al., 2011) et présentent une persistance de leurs sous-populations centrales mémoires (Potter et al., 2007). Les lymphocytes T CD8⁺ des HICs présentent quant à eux une forte capacité proliférative en présence de peptides du VIH-1 (Sáez-Cirión et al., 2007) ainsi qu'une polyfonctionnalité importante (Michael R. Betts et al., 2006) et une puissante et spécifique cytotoxicité envers les lymphocytes T CD4⁺ infectés (Hersperger et al., 2010; Stephen A. Migueles et al., 2002; Sáez-Cirión et al., 2007, 2009). Une étude récente indique que les lymphocytes T CD8⁺ mémoires des HICs présentent des ressources métaboliques plus diversifiées, non dépendante du glucose contrairement à ceux des non-contrôleurs du VIH-1, améliorant à la fois leur potentiel de survie et leur capacité à développer des fonctions effectrices contre le VIH-1 (Angin et al., 2019). Deux autres nouvelles études, dans le modèle macaque d'infection par le SIV et chez l'Homme, indiquent que l'aptitude des contrôleurs à contenir l'infection résulterait de la capacité de leurs lymphocytes T CD8⁺ mémoires spécifiques du virus à régénérer de nouvelles cellules face aux stimulations répétées du VIH et du SIV (Passaes et al., 2020; Rutishauser et al., 2020). Les HICs disposent aussi d'une proportion importante de sous-populations de lymphocytes T CD8⁺ activés (HLA-DR⁺/CD38⁺) (P. W. Hunt et al., 2008) et un patrimoine génétique enrichi en allèles HLA-B*57 et -B*27 (den Uyl et al., 2004; Zaunders & Van Bockel, 2013). Cependant, la présence de ces allèles dits « protecteurs », n'est ni suffisante, ni nécessaire, pour maîtriser l'infection (Sáez-Cirión & Pancino, 2013; Thèze et al., 2011). Enfin, les HICs ont des cDCs faiblement permissives à l'infection par le VIH-1 (Hamimi et al., 2016; Martin-Gayo et al., 2015) et qui possèdent une forte capacité de présentation antigénique (J. Huang et al., 2010; Martin-Gayo et al., 2015, 2018). L'expression de certains récepteurs immunomodulateurs appartenant à la famille des leukocyte immunoglobulin-like receptors (LILRs) est capable d'affecter cette dernière capacité (Bashirova, Martin-Gayo, et al., 2014; J. Huang et al., 2010). Ce profil fonctionnel unique des cDCs pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la virémie en induisant des réponses immunitaires adaptatives efficaces (Martin-Gayo & Yu, 2019).

Les patients contrôleurs post-traitement du VIH-1

La présence de réservoirs viraux chez les individus infectés par le VIH-1 engendre, presque inéluctablement, un rebond de la charge virale dès l'interruption des traitements antirétroviraux (Colby et al., 2018; J. Z. Li et al., 2016; Pannus et al., 2020). Cependant, 2 à 15% des individus séropositifs pour le VIH-1 présentent une rémission prolongée après arrêt des traitements (Etemad et al., 2019). Ces patients, nommés contrôleurs post-traitements (PTCs), ont pour particularité d'avoir initié un traitement antirétroviral précocement lors de la primo-infection (Fidler et al., 2017; Cécile Goujard et al., 2012; Hocqueloux et al., 2010; Namazi et al., 2018; Sáez-Cirión et al., 2013). Néanmoins quelques PTCs peuvent être retrouvés parmi les individus ayant initié les traitements en phase chronique de l'infection (Namazi et al., 2018; Perkins et al., 2017). Bien que le virus persiste sous forme de réservoir il n'y a pas, suite à l'arrêt des traitements, de reprise active de la réplication virale pendant un temps chez ces individus. Le devenir des PTCs est très hétérogène, certains individus perdent le contrôle en un an et d'autres conservent une suppression virale pendant plus de 10 ans (Etemad et al., 2019; Namazi et al., 2018; Sáez-Cirión et al., 2013). La question de la durée optimale d'initiation et d'arrêt du traitement afin d'obtenir ce contrôle post-traitement fait l'objet de nombreuses recherches.

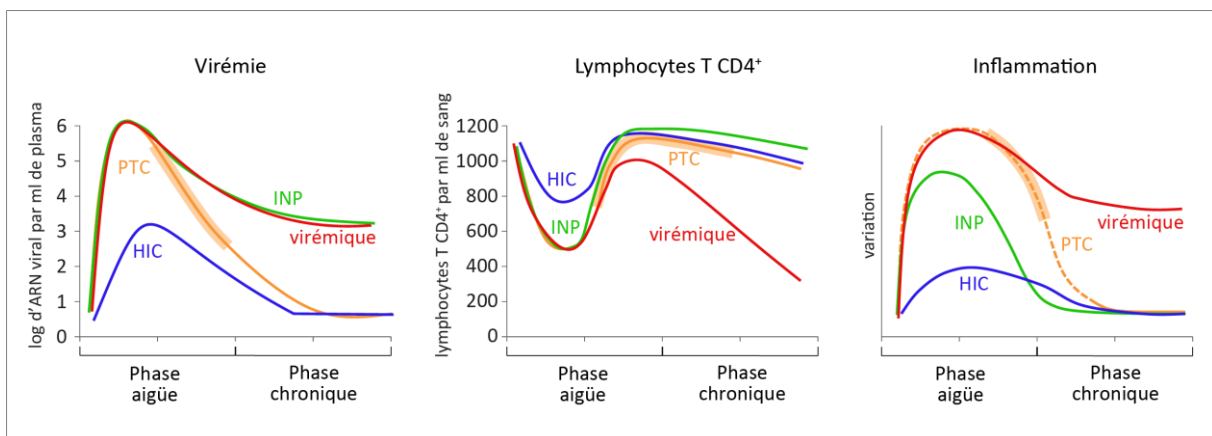


Figure 4: Schéma des variations hypothétiques des principaux paramètres sanguins au cours de l'infection, par le VIH-1 ou le SIV, contrôlée et non contrôlée. (D'après Saez-Cirion et al. (2014) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*). Contrôleurs du VIH-1 (HIC, bleu) ; contrôleurs post-traitement (PTC, orange) ; infections SIV non pathogènes des hôtes naturels (INP, vert) ; progresseurs virémiques (rouge). Le surlignage orange sur les courbes PTC indique la période d'initiation du cART. La ligne pointillée indique les niveaux hypothétiques d'inflammation.

Bien qu'au final les PTCs soient capables de contrôler l'infection sans cART, ces individus diffèrent des HICs sur de nombreux aspects. Contrairement aux HICs, les PTCs présentent fréquemment une primo-infection symptomatique avec des charges virales plus élevées et un nombre de lymphocytes T CD4⁺ plus faible que la normale, comparables à ceux des

progresseurs (Sáez-Ciri3n et al., 2013). De plus, la r3ponse cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ sp3cifiques du VIH-1 est plus faible chez les PTCs par rapport aux HICs et aux individus vir3miques (Frange et al., 2016; Sáez-Ciri3n et al., 2013; Salgado et al., 2011). Les niveaux d'activation des lymphocytes T CD8⁺ sont 3galement plus bas pour les PTCs compar3s aux HICs (Sáez-Ciri3n et al., 2013). Enfin, les PTCs ne portent pas d'all3les HLA-I dits « protecteurs » mais plut3t des all3les « neutres » ou « 3 haut risque » 3 l'inverse des HICs (Maggiolo et al., 2018; Sáez-Ciri3n et al., 2013). Cependant, tout comme les HICs, les PTCs semblent pr3senter de faibles r3servoirs viraux (Sáez-Ciri3n et al., 2013).

Ces donn3es sugg3rent que le m3canisme de contr3le viral observ3 chez les PTCs est distinct de ceux rapport3s chez les contr3leurs du VIH-1 et qu'une r3mission apr3s arr3t de traitement est possible (Saez-Cirion et al., 2014). D'avantage de recherches devront 3tre men3es afin d'identifier les divers facteurs li3s au virus, 3 l'h3te et au syst3me immunitaire contribuant au contr3le spontan3 ou post-traitement du VIH-1 chez ces individus.

c. Strat3gies th3rapeutiques contre la persistance du VIH-1

Plusieurs m3canismes semblent 3tre impliqu3s dans la persistance des r3servoirs du VIH-1 chez les personnes sous cART. Parmi eux, on retrouve notamment la stabilit3 intrins3que (Siliciano et al., 2003) et la prolif3ration hom3ostatique des lymphocytes T CD4⁺ infect3s de mani3re latente (Chomont et al., 2009). Mais aussi, la persistance du VIH-1 dans les divers compartiments tissulaires (Cory et al., 2013) avec la pr3sence de sanctuaire viraux o3 le VIH-1 continue de se r3pliquer 3 bas bruit, en raison d'une p3n3tration tissulaire insuffisante des antir3troviraux, constituant de nouveaux r3servoirs de cellules infect3es (Chun et al., 2005; Fletcher et al., 2014). Et enfin, la persistance du VIH-1 r3sulte 3galement de l'inefficacit3 du syst3me immunitaire, alt3r3 par l'infection, 3 3liminer ces r3servoirs viraux (Nichole R. Klatt, Chomont, et al., 2013).

Des strat3gies ont 3t3 mises en place pour diminuer, voire 3radiquer le r3servoir latent. L'initiation pr3coce de traitements antir3troviraux lors de la primo-infection semblerait r3duire la taille de ce r3servoir (Buzon et al., 2014; Crowell et al., 2016; Hocqueloux et al., 2013). La strat3gie « shock/kick and kill » quant 3 elle vise 3 r3activer la production de virions dans les cellules en infection latente afin d'induire leur lyse par effet cytopathique ou par reconnaissance et clairance par le syst3me immunitaire (Ndung'u et al., 2019). Cette strat3gie visant une cure total du VIH-1 est pour le moment infructueuse et doit 3tre absolument associ3e 3 des traitements permettant d'am3liorer l'3limination des cellules infect3es et des virions par le

système immunitaire (Margolis et al., 2016; Thorlund et al., 2017). D'autres stratégies ont été mises en place afin de restaurer et/ou améliorer les réponses immunitaires contre le VIH-1 dans le but d'une rémission fonctionnelle durable. Celles-ci comprennent l'immunothérapie active avec la vaccination et le blocage de récepteurs inhibiteurs des réponses immunitaires tel que PD-1 et CTLA-4, l'immunothérapie passive avec l'utilisation d'anticorps neutralisants, la thérapie génique pour rendre les cellules non permissives à l'infection ou l'édition du génome, à l'aide de la technologie CRISPR/Cas9, pour exciser le provirus et enfin la stratégie de « block and lock » visant à induire un état de latence irréversible (Cillo & Mellors, 2016; Elsheikh et al., 2019; Xiao et al., 2019). Parmi ces travaux, des études de Nishimura et *al.* ont démontré que l'administration précoce (J+3, J+15 post-infection) d'anticorps neutralisants dans un modèle macaque d'infection par un virus recombinant SIV/HIV (SHIV), est associée à l'établissement d'une puissante immunité médiée par les lymphocytes T CD8⁺ capable de supprimer durablement la réplication virale et d'établir un contrôle de l'infection à long terme chez certains macaques (Nishimura et al., 2017, 2020). Mise à part ces deux études prometteuses, les autres stratégies d'immunothérapie active et passive sont pour le moment infructueuses et nécessitent de plus amples investigations.

Afin d'optimiser ces stratégies de nombreuses recherches visent à identifier des marqueurs permettant de cibler spécifiquement les cellules infectées de manière latente par le VIH-1. A cet égard, Descours et *al.* ont identifié le CD32a, un récepteur de faible affinité pour la partie Fc des immunoglobulines, comme étant le marqueur spécifique de réservoirs latents compétents au sein des lymphocytes T CD4⁺ quiescents (Descours et al., 2017). En effet, chez des patients sous cART, la quantification de la charge d'ADN virale dans cette sous-population a montré un enrichissement important de provirus qui, une fois sous stimulation, sont capables de produire des virions infectieux. Néanmoins, seul Darcis et *al.* ont pu confirmer ces résultats (Darcis et al., 2020), parmi l'ensemble des études réalisées ultérieurement par d'autres équipes de recherche (Abdel-Mohsen et al., 2018; Badia et al., 2018; Bertagnolli et al., 2018; G. E. Martin et al., 2018; Osuna et al., 2018; Pérez et al., 2018; Wittner et al., 2017). D'autres marqueurs tels que des récepteurs de point de contrôle de l'immunité, des marqueurs d'activation, de prolifération, des membres de la familles des facteurs de nécrose tumorale mais aussi des marqueurs d'adhésion et de migration cellulaire présentent une expression associée à des cellules enrichies en ADN du VIH-1 et semblent être des pistes potentielles pour cibler le réservoir latent (Darcis et al., 2019; Fromentin et al., 2016; Ndung'u et al., 2019).

II. Les récepteurs immunomodulateurs de la famille des LILRs

L'homéostasie de notre système immunitaire repose sur une combinaison complexe de signaux activateurs et inhibiteurs provenant de l'engagement de récepteurs, à la surface des cellules immunitaires, avec leurs ligands. On retrouve sur une même cellule des récepteurs activateurs et des récepteurs inhibiteurs dont les niveaux d'activation maintiennent l'équilibre fonctionnel de la cellule. En effet, en cas d'infection, les récepteurs activateurs induisent une activation puissante de la cellule immunitaire et les récepteurs inhibiteurs évitent une réponse excessive de celle-ci. En outre, les récepteurs inhibiteurs jouent un rôle important dans les mécanismes conduisant à la résolution de l'inflammation et au retour à l'état basal des réponses immunitaires lorsque les pathogènes sont éliminés. Leur capacité inhibitrice leur permet également de maintenir un contrôle constant des réponses immunitaires, prévenant ainsi l'induction d'auto-immunité. Ces récepteurs inhibiteurs sont nommés « immune checkpoints » puisqu'ils fonctionnent comme des points de contrôle du système immunitaire (Granier et al., 2017). Les leukocyte immunoglobulin-like receptors (LILRs) aussi connus sous le nom de Ig-like transcripts (ILTs) ou récepteurs de la famille CD85 comprennent des récepteurs inhibiteurs et activateurs, majoritairement retrouvés sur les cellules de la lignée myéloïde. Les LILRs jouent un rôle important dans la modulation des réponses immunitaires innée et adaptative (D. Brown et al., 2004). De par leur fonction immunomodulatrice, les LILRs inhibiteurs constituent des cibles de choix pour les mécanismes d'échappement au système immunitaire de nombreux pathogènes. Leur implication dans de nombreuses maladies, notamment dans l'infection par le VIH-1, est désormais bien connue et pousse les recherches vers une meilleure compréhension des mécanismes de régulation immunitaire médiée par ces récepteurs (Anderson & Allen, 2009; Hudson & Allen, 2016; Kang et al., 2015; M. Lichterfeld & Yu, 2012; J. Zhang et al., 2017).

A. Organisation génétique, structurale et fonctionnelle des LILRs

a. LILRs membranaires et solubles et fonctions immunomodulatrices

Les Leukocytes Immunoglobulin-Like Receptors, sont une famille multigénique dont les *loci* sont localisés dans la région q13.4 du chromosome 19 au sein du complexe de récepteurs des leucocytes (LRC) (Barrow & Trowsdale, 2008; Volz et al., 2001; Wilson et al., 2000). Cette famille se compose chez l'Homme de 2 pseudogènes et de 11 gènes fonctionnels codant pour 10 récepteurs membranaires et un récepteur soluble (Hirayasu & Arase, 2015) (**Figure 5**). Les LILRs présentent un polymorphisme génétique important et la variation du nombre de copies

des gènes contribue à la diversité au sein de cette famille multigénique (Bashirova, Apps, et al., 2014; Chih Chao Chang et al., 2008; Davidson et al., 2010; Hirayasu et al., 2008; López-Álvarez et al., 2014).

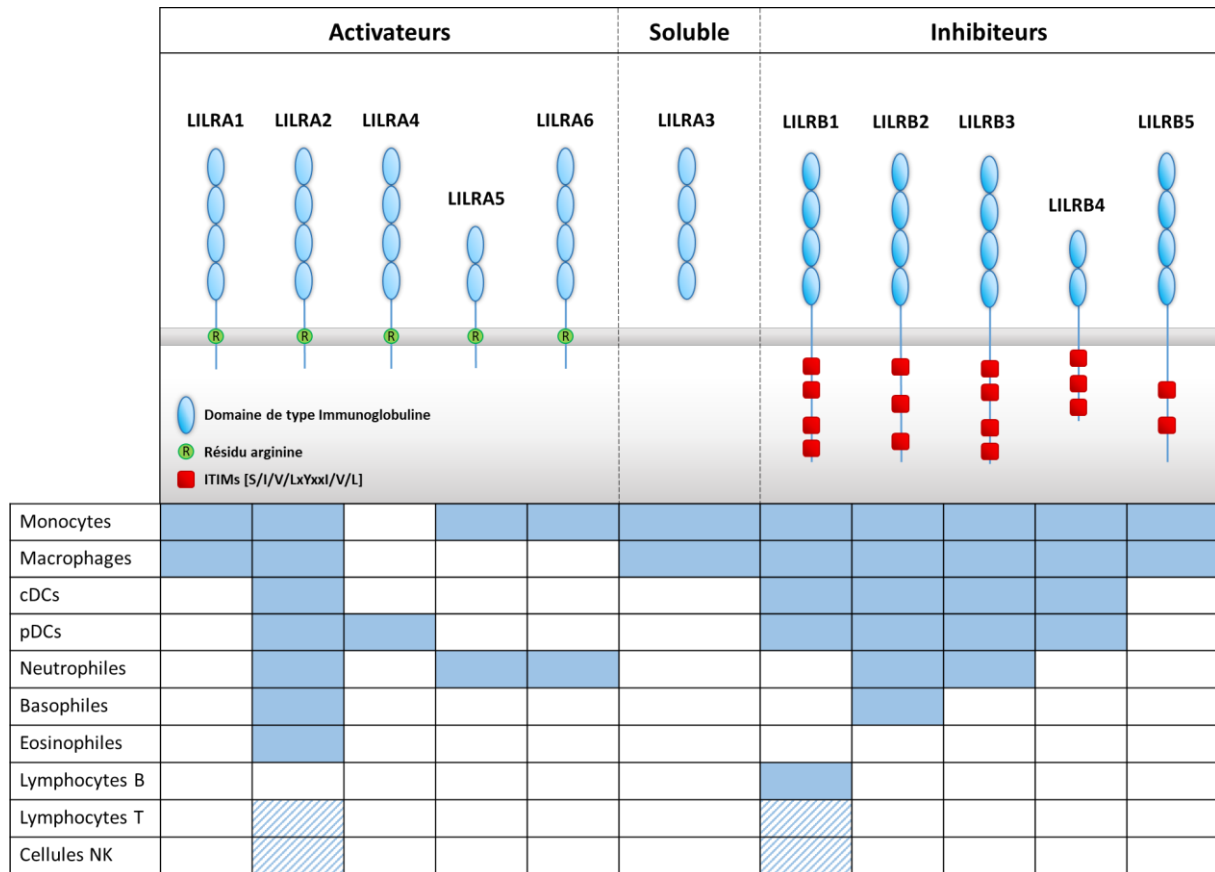


Figure 5: Schéma représentant les récepteurs de la famille LILR chez l'humain et leur profil d'expression par les cellules immunitaires. L'expression des différents LILRs par les cellules immunitaires est représentée en bleu. L'expression des LILRs par des sous-populations de cellules immunitaires est indiquée par des hachures.

Les LILRs membranaires, majoritairement exprimés par les cellules de la lignée myéloïde (J. Zhang et al., 2017), sont composés d'une partie extracellulaire qui interagit avec leurs ligands, d'un domaine transmembranaire et d'une partie intracellulaire impliqués dans la signalisation du récepteur (Anderson & Allen, 2009; D. Brown et al., 2004) (**Figure 5**). On retrouve également un LILR qui n'existe que sous forme soluble (LILRA3) et qui ne contient que la partie extracellulaire du récepteur. Les LILRs appartiennent à la superfamille des immunoglobulines, leurs parties extracellulaires sont composées de 2 à 4 domaines de type immunoglobuline présentant de fortes homologies de séquences entre membres de cette famille (Borges et al., 1997). Les domaines transmembranaires et intracytoplasmiques en revanche, présentent des différences suffisamment importantes et permettent de répartir les 10 récepteurs LILRs membranaires en 2 groupes fonctionnels distincts selon leur capacité de signalisation.

Introduction

On retrouve ainsi cinq LILRs activateurs (LILRA1, A2, A4-A6) et cinq LILRs inhibiteurs (LILRB1-B5) (D. Brown et al., 2004; Hirayasu & Arase, 2018) (**Figure 5**).

Les LILRA possèdent une partie intracytoplasmique courte qui ne permet pas la transduction d'un signal. Néanmoins, leur domaine transmembranaire contient un résidu d'arginine chargé positivement capable de s'associer avec une protéine adaptatrice telle que le FcεRIγ portant un immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) dans sa partie intracellulaire (Nakajima et al., 1999). Les ITAMs sont des séquences peptidiques conservées composées du motif YxxL/Ix₆₋₈YxxL/I qui est à l'origine du signal activateur induit par les LILRA (Kang et al., 2015). La liaison du ligand au récepteur LILRA induit la phosphorylation des résidus tyrosines de l'ITAM du FcεRIγ par des tyrosines kinases Src. Par la suite, les tyrosines kinases Syk pour les cellules myéloïdes et ZAP-70 pour les cellules lymphoïdes, sont recrutées et activées, entraînant une cascade de signalisations impliquant notamment les voies calciques, NF-κB et MAPKs. Ceci aboutit à l'activation de la cellule immunitaire (Ivashkiv, 2009; Van der Touw et al., 2017) (**Figure 6**).

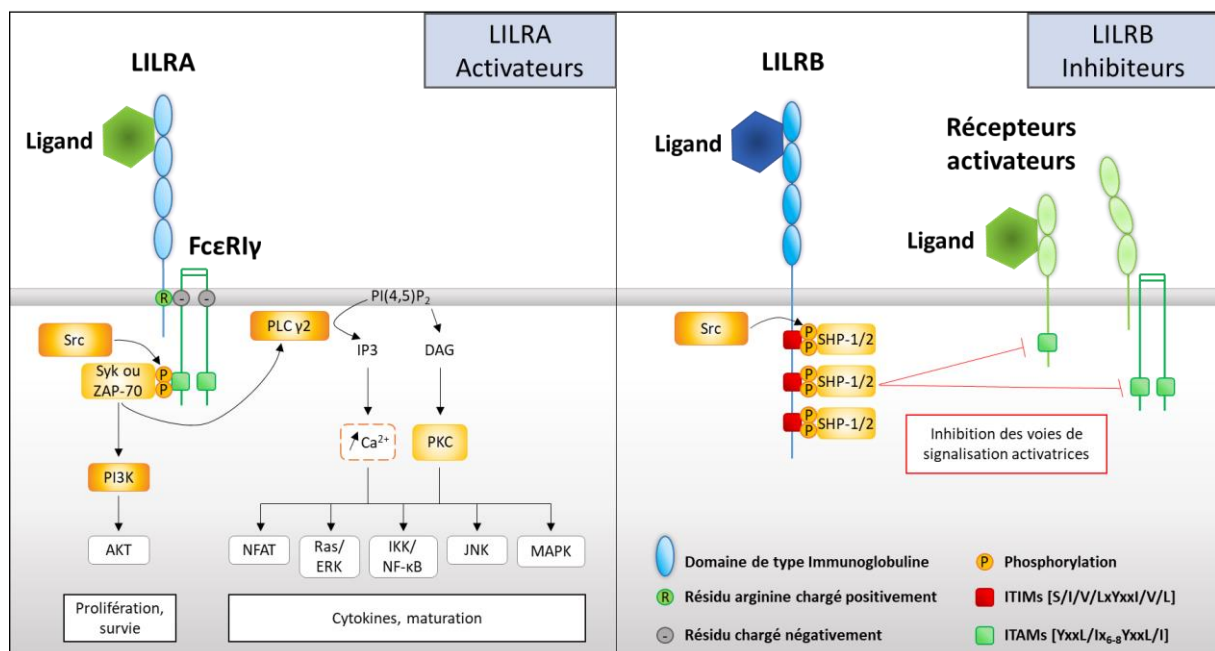


Figure 6: Modèle des mécanismes de signalisations des LILRs. (D'après van der Touw et al. (2017) *Cancer Immunol Immunother.*)

Les LILRB quant à eux, ne présentent pas de résidu chargé dans leur domaine transmembranaire mais possèdent une longue partie intracytoplasmique portant deux à quatre Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIMs) (Kang et al., 2015). Les ITIMs sont à l'origine du signal inhibiteur produit par les LILRB et sont formés, de façon similaire aux

ITAMs, d'une séquence peptidique conservée (S/I/V/LxYxxI/V/L). L'interaction du récepteur LILRB avec son ligand induit le changement de sa conformation entraînant la phosphorylation des tyrosines de ses ITIMs par des tyrosines kinases Src. Les phosphatases SHP-1 et SHP-2 sont alors recrutées et se lient, via leurs domaines SH2, aux ITIMs du récepteur. La cascade de signalisations inhibitrices qui en découle est encore mal connue mais impliquerait la déphosphorylation par ces phosphatases des ITAMs et de nombreuses kinases telles que Src, Syk et ZAP-70 ainsi que d'autres facteurs jouant un rôle clé dans l'activation cellulaire (Kang et al., 2015) (**Figure 6**).

b. Les ligands des LILRs

Les LILRs présentent divers profils d'interactions avec des ligands membranaires et/ou solubles dont l'affinité et la spécificité diffèrent pour chacun des récepteurs (Burshtyn & Morcos, 2016).

À ce jour, il a été démontré que cinq LILRs (LILRA1, A3, B1, B2 et B5) se lient aux protéines du complexe majeur d'histocompatibilité humaine de classe I ou HLA-I (Burshtyn & Morcos, 2016). LILRB1 et LILRB2 peuvent reconnaître l'ensemble des molécules HLA-I classiques (HLA-A, -B et -C) et une partie des HLA-I non classiques (HLA-F et -G) (Jones et al., 2011; Lepin et al., 2000; Navarro et al., 1999; Shiroishi et al., 2006). Des études structurales ont permis la caractérisation détaillée de l'interaction de LILRB1 et LILRB2 avec des HLA-I (Shiroishi et al., 2006; Q. Wang et al., 2019; Willcox et al., 2003). Ainsi, il a été montré que ces deux récepteurs interagissent via leur domaine D1 avec le domaine $\alpha 3$ de la chaîne lourde de la molécule HLA-I alors que leur domaine D1 et D2 interagissent avec la sous-unité $\beta 2$ -microglobuline ($\beta 2m$) (**Figure 7**).

Il est important de noter que LILRB2 a une interface d'interaction plus grande avec le domaine $\alpha 3$, tandis que LILRB1 dépend fortement de l'interaction avec la $\beta 2m$ pour former un complexe stable. Par conséquent, LILRB2 peut interagir avec la chaîne lourde de HLA-I associée ou non à la $\beta 2m$ alors que LILRB1 se lie exclusivement avec les complexes de HLA-I associés à la $\beta 2m$ (Jones et al., 2011; Shiroishi et al., 2006). LILRB1 et LILRB2 peuvent reconnaître leurs ligands HLA-I via des interactions en *trans* (cellule-cellule) ou en *cis* sur la même cellule mais également reconnaître les formes solubles de HLA-I (Held & Mariuzza, 2008; N. L. Li et al., 2013; Q. Wang et al., 2019) (**Figure 7**). LILRA1 et A3 présentent quant à eux, une spécificité plus restreinte pour la chaîne lourde de certains HLA-I classiques (Allen et al., 2001; Jones et al., 2011; Z. Zhang et al., 2015). LILRA1 et A3 sont également capables d'interagir avec des

HLA-I associés à la $\beta 2m$ mais avec une affinité plus faible comparée à LILRB1 et B2 (Allen et al., 2001; Ryu et al., 2011).

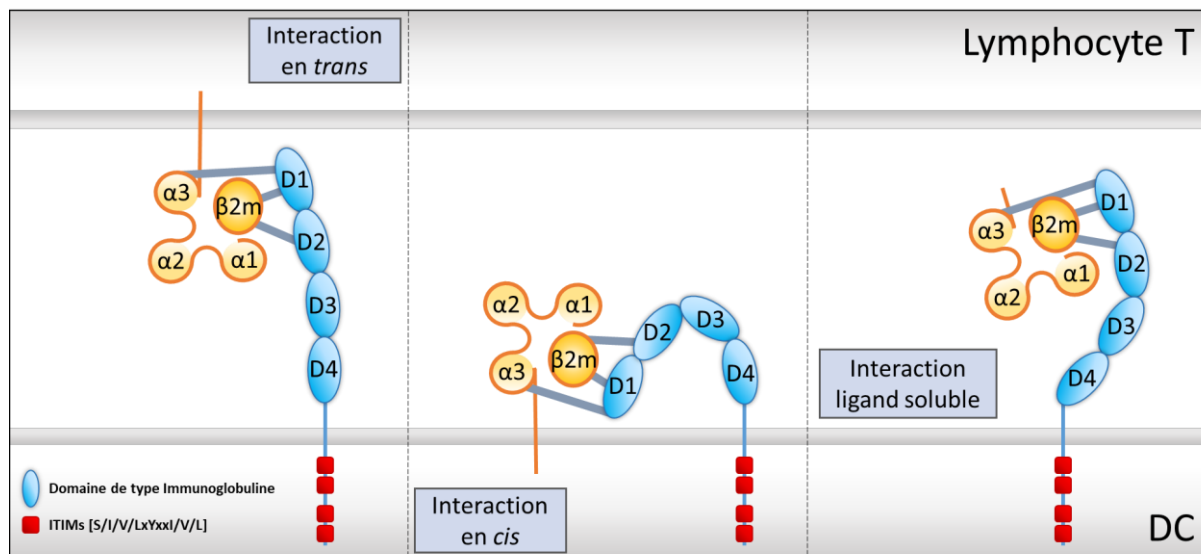


Figure 7: Modèle d'interaction de LILRB1 et LILRB2 avec leurs ligands du CMH-I. (D'après Lichterfeld and Yu (2012) *J Leukoc Biol.* et Wang et al. (2019) *Cellular & Molecular Immunology.*)

Les LILRs présentent des niveaux d'affinités différents selon la séquence allélique du HLA-I. Ce phénomène serait dû à la présence de motifs d'acides aminés spécifiques au site d'interaction avec les LILRs (Jones et al., 2011). Cette liaison serait également influencée par la séquence du peptide présenté par le HLA-I (Mathias Lichterfeld et al., 2007).

D'autres ligands non-HLA-I interagissent avec LILRB1 et LILRB2 (Burshtyn & Morcos, 2016). On retrouve pour LILRB1, les protéines de liaison au calcium S100A8 et S100A9 (Arnold et al., 2013), des ligands provenant de virus tels que le cytomégalo virus (Cosman et al., 1997) et le DENV (Chan et al., 2014) et enfin la protéine RIFIN du parasite *Plasmodium falciparum* (Saito et al., 2017). LILRB1 ainsi que LILRB3, sembleraient interagir avec la bactérie *Staphylococcus aureus* et LILRB1 se lierait également à *Escherichia coli* (Nakayama et al., 2007). Pour LILRB2 ont été identifiés comme autres ligands, les protéines CD1c et CD1d (D. Li et al., 2009, 2012), des protéines de type angiopoïétine (M. Deng et al., 2014; Zheng et al., 2012), des protéines β -amyloïde oligomères (T. Kim et al., 2013), et des protéines de la myéline ou associées à la myéline (dans le cas de PIR-B) (Atwal et al., 2008) (**Figure 8**).

LILRB4 interagit avec l'apolipoprotéine E (M. Deng et al., 2018). LILRA2 quant à lui, peut se lier aux immunoglobulines clivées par des protéases bactériennes et induire une réponse cellulaire antibactérienne (Hirayasu et al., 2016). Enfin LILRA4, qui est exclusivement exprimé par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs), interagit avec le facteur de restriction viral

Tetherin aussi appelé CD317 ou BST2 (bone marrow stromal cell antigen 2) (W. Cao et al., 2009) (**Figure 8**).

A ce jour, aucun ligand pour LILRA5, A6 et B5 n'a pu être identifié. Néanmoins, de futures recherches devraient permettre de découvrir pour ces récepteurs, ainsi que pour l'ensemble des LILRs, de nouveaux ligands endogènes et exogènes et leurs possibles rôles physiologiques et pathogéniques.

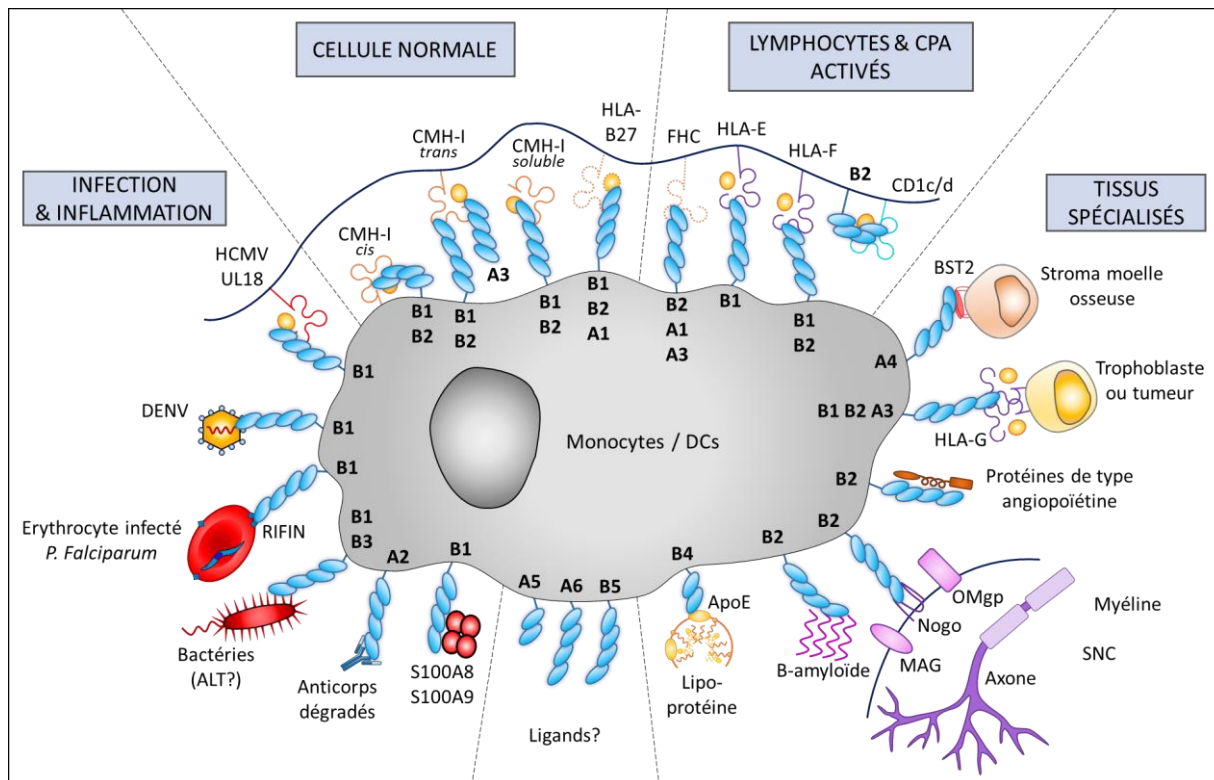


Figure 8: Ligands des LILRs. (D'après Burshtyn et al. (2016) *J Immunol.*, Hirayasu et al. (2016) *Nat Microbiol.*) et Zhang et al. (2017) *J Leukoc Biol.*). Schéma représentant les interactions connues des LILRs avec leurs ligands. Les lignes pointillées des chaînes lourdes libres du CMH-I (FHC) et du HLA-B27 indiquent leur conformation $\alpha 1$ et $\alpha 2$ modifiée par rapport au complexe complet. Les étiquettes des récepteurs ne sont pas précédées de « LILR » pour la clarté de la figure.

c. Homologues des récepteurs LILRs dans les modèles murins et simiens

Des homologues des LILRs sont retrouvés dans plusieurs espèces de mammifères et des familles de récepteurs apparentées existent chez les marsupiaux et de façon plus éloignée chez les oiseaux, les grenouilles et peut-être même les poissons (Dennis et al., 2000; Hogan et al., 2012; Nikolaidis et al., 2005; Truong et al., 2019; Volz et al., 2001).

Des homologues des LILRs humains ont également été identifiés chez la souris et nommés récepteurs PIRs pour « paired immunoglobulin-like receptors » (Hayami et al., 1997; Kubagawa et al., 1997). Les PIRs présentent des similitudes avec les LILRs, notamment au

niveau de leur localisation génomique, de leur homologie de séquence, de leurs ligands du CMH-I, de leur mode de signalisation et enfin de leur fonction (Kubagawa et al., 1999; A. M. Martin et al., 2002; Takai, 2004, 2005a, 2005b; Van der Touw et al., 2017). Cependant, il existe certaines différences dans la structure et la distribution tissulaire des PIRs par rapport à celles des LILRs. De plus, ces récepteurs diffèrent fortement des LILRs par la faible diversité de leurs gènes. En effet, la souris ne présente qu'un récepteur activateur (PIR-A) et qu'un récepteur inhibiteur (PIR-B) qui ne peuvent rendre compte de la complexité et de la diversité des régulations immunitaires pouvant être médiées par les onze récepteurs activateurs et inhibiteurs retrouvés chez l'Homme (A. M. Martin et al., 2002). Enfin, la partie extracellulaire des PIRs est composée de six domaines (D1-D6) de type immunoglobuline (Ig), contrairement aux LILRs qui n'en possèdent que deux à quatre. Chez les PIRs des rongeurs, D1 et D2 auraient été dupliqués pour donner D3 et D4 respectivement, et ces domaines D1/D3 et D2/D4 seraient homologues aux deux premiers domaines Ig des LILRs. Enfin, D5 et D6 correspondraient aux domaines Ig trois et quatre des LILRs humains (Volz et al., 2001). Pour toutes ces raisons, les PIRs des rongeurs ne sont pas les modèles les plus appropriés pour l'étude des LILRs *in vivo*.

Des recherches ultérieures ont montré l'existence de plusieurs récepteurs activateurs et inhibiteurs orthologues aux LILRs chez les primates non-humains. En effet, une première étude a démontré que les séquences LILRs des chimpanzés correspondent étroitement à celles retrouvées chez l'Homme. Parmi ces séquences, quatre récepteurs orthologues aux récepteurs LILRA2, LILRA4, LILRB4 et LILB5 ont été retrouvés chez le chimpanzé (Canavez et al., 2001). Enfin une étude chez le macaque rhésus a identifié huit récepteurs orthologues aux LILRs, nommés *M. mulatta* (Mm)-LILRs (Slukvin et al., 2006) (**Figure 9**). Comme les LILRs humains, les LILRs chez le macaque possèdent deux à quatre domaines Ig dans leur partie extracellulaire et sont subdivisés en deux groupes, Mm-LILRA et Mm-LILRB, selon la présence de motifs ITIM dans leur partie intracytoplasmique. Le groupe Mm-LILRA est composé de cinq récepteurs orthologues aux récepteurs humains. Trois Mm-LILRA possèdent une partie intracytoplasmique courte avec un résidu d'arginine dans la région transmembranaire et sont les orthologues de LILRA6, de LILRA1 et de la version deux Ig de LILRA1 chez l'Homme. Les deux Mm-LILRA restants sont solubles et seraient les orthologues de LILRA2, qui est membranaire chez l'humain, et de la molécule LILRA3 soluble. Le groupe Mm-LILRB quant à lui comprend trois récepteurs, avec une partie intracytoplasmique contenant des ITIMs, orthologues à LILRB1, B2 et B4. Néanmoins, certains Mm-LILRB affichent une différence dans le nombre de leurs ITIMs et présentent des délétions dans leur partie intracytoplasmique,

comparés aux LILRs humains. Ces études se basent sur des clonages de cDNA à partir d'ARNm. Des analyses génomiques complémentaires sont donc nécessaires afin de caractériser l'ensemble des membres de la famille LILRs chez le macaque ainsi que l'organisation de leurs gènes à l'échelle du génome. L'analyse phylogénétique des séquences des LILRs retrouvées chez le chimpanzé, le macaque rhésus et l'humain indique que ces récepteurs dérivent bien d'un gène ancestral commun ayant subi une évolution plus rapide et plus complexe chez les primates comparée aux rongeurs (Canavez et al., 2001; Slukvin et al., 2006). Ces données indiquent que la famille multigénique des LILRs retrouvée chez l'Homme serait spécifique aux primates.

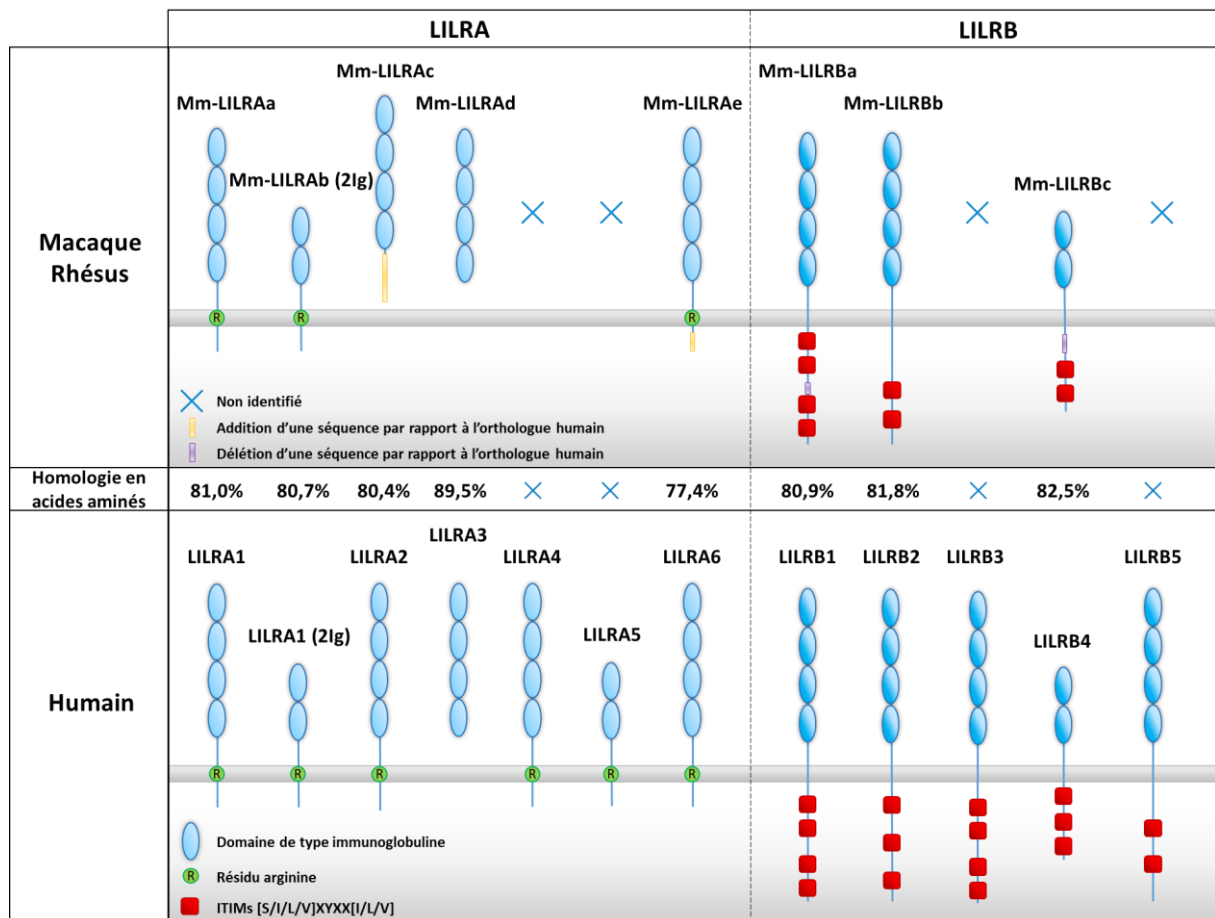


Figure 9: Structure des Mm-LILRs clonés chez le macaque rhésus et homologie de séquence avec leurs orthologues humains. (D'après Slukvin II et al. (2006) *Tissue antigens*.)

Des études complémentaires, notamment de leur distribution cellulaire, de leurs ligands et de leur fonction seront nécessaires pour mieux caractériser la biologie des LILRs chez les primates non humains. Les fortes homologies de séquences et de structures retrouvées entre les LILRs humains et macaques font de ces derniers un modèle expérimental de choix pour étudier les fonctions immunomodulatrices de ces récepteurs *in vivo* et ouvrir la voie à des essais pré-cliniques d'immuno-modulation.

B. Rôle immunomodulateur des récepteurs LILRB1 et LILRB2 dans les réponses immunitaires et les pathologies

Bien que des études aient pu caractériser l'interaction des LILRs avec leurs ligands, les conséquences sur la fonction biologique et la signification clinique issues de cette interaction ne sont toujours pas bien comprises. Néanmoins, du fait de leur distribution cellulaire, notamment sur les cellules sentinelles du système immunitaire, et leur capacité à réguler les réponses immunitaires, il n'est pas étonnant de retrouver ces récepteurs impliqués dans diverses pathologies humaines. LILRB1 et LILRB2, sont les récepteurs de la famille des LILRs les mieux caractérisés et ont été largement montrés comme jouant un rôle important dans la progression ou le contrôle de nombreuses infections, cancers et maladies auto-immunes.

a. Rôle de LILRB1 et LILRB2 dans les pathologies infectieuses

Les LILRs jouent un rôle pivot dans l'équilibre immunologique, néanmoins, dans certaines circonstances et notamment lors d'infections, leurs propriétés immunomodulatrices peuvent être détournées par les pathogènes afin d'échapper à la reconnaissance par le système immunitaire.

Infections virales

Le Cytomégalovirus humain (HCMV) produit un homologue de HLA-I, la glycoprotéine membranaire UL18, afin d'exploiter la capacité inhibitrice de LILRB1 et ainsi échapper aux réponses antivirales (Cosman et al., 1997; Z. Yang & Bjorkman, 2008) (**Figure 10, HCMV**). En effet, UL18 a une affinité 1 000 fois supérieure à celles des HLA-I endogènes (Wagner et al., 2007) et son interaction avec LILRB1 à la surface des cellules NK induit une inhibition de leur fonction effectrice cytotoxique (N. L. Li et al., 2013; Prod'homme et al., 2007). Néanmoins, l'interaction d'UL18 avec LILRB1 à la surface des lymphocytes T CD8⁺ serait capable, par un mécanisme de signalisation indépendant du TCR, d'induire l'activation de ces cellules et la lyse des cellules infectées par le HCMV (Saverino et al., 2004). LILRB1 a également été montré comme surexprimé à la surface des cellules infectées par le HCMV (Cadena-Mota et al., 2018) et est considéré par Gustafson et *al.* comme marqueur de sénescence immunitaire prématurée pour cette infection virale (Gustafson et al., 2017). La réduction de HLA-G soluble observée dans l'arthrite rhumatoïde (Verbruggen et al., 2006) et la diminution d'expression du HLA-G membranaire par les cellules infectées par le HCMV (Pizzato et al., 2003) pourraient induire un défaut de contrôle des lymphocytes T CD8⁺ surexprimant LILRB1

spécifiques du HCMV et contribuer à la pathogenèse de la maladie (Rothe et al., 2016). Enfin, une augmentation d'expression de LILRB1 a également été corrélée à l'infection au HCMV dans les transplantations pulmonaires. L'expression de ce récepteur pourrait être utilisé comme biomarqueur précoce de complications dues au HCMV qui sont les causes majeures de morbidité chez ces patients (Berg et al., 2003).

L'infection secondaire par un sérotype hétérologue du virus de la dengue (DENV) augmente le risque de dengue sévère par un phénomène impliquant les anticorps anti-DENV (Dejnirattisai et al., 2010; Guzman et al., 2013; Katzelnick et al., 2017) et le récepteur LILRB1 (Chan et al., 2014; Ong et al., 2017) (**Figure 10, DENV**). En effet, l'opsonisation du DENV par des anticorps non ou sous-neutralisants permet son entrée dans les cellules via les récepteurs Fc-gamma (FcγRs) (Ayala-Nunez et al., 2016). Parallèlement, le DENV interagit également avec LILRB1 et induit l'inhibition des voies de signalisation des FcγRs. Cette inhibition empêche l'induction des gènes stimulés par les interférons (ISG) qui limiteraient normalement la réplication du virus (Chan et al., 2014; Nimmerjahn & Lux, 2014), et ralentit l'acidification des phagosomes contenant le virus lui permettant d'échapper à la dégradation lysosomale (Ong et al., 2017). Ainsi, LILRB1 contribue à la pathogenèse du DENV en permettant la réplication et la survie intracellulaire du virus.

Enfin, LILRB1 et LILRB2 ont largement été impliqués dans la pathogenèse de l'infection par le VIH-1 (M. Lichterfeld & Yu, 2012). En effet, l'expression de ces récepteurs par les cellules immunitaires a souvent été associée à leur dérégulation phénotypique et fonctionnelle chez les patients vivant avec le VIH-1 (Bashirova, Martin-Gayo, et al., 2014; Jinghe Huang et al., 2010, 2011, 2012; M. Lichterfeld & Yu, 2012; Mathias Lichterfeld et al., 2007; O'Connor et al., 2007; Vlad et al., 2003). Néanmoins, LILRB1 semble également impliqué dans des mécanismes de contrôle de l'infection par le VIH-1 (Arnold et al., 2013; J. Huang et al., 2010). Les mécanismes de régulation induits au cours de l'infection par ces récepteurs, menant à l'échappement ou au contrôle du VIH-1 à la réponse immunitaire, seront décrits plus en détail dans la partie C. « Rôle des récepteurs LILRB1 et LILRB2 dans l'infection au VIH-1 ».

Infections parasitaires

Une étude a montré que les patients présentant une infection sévère à *Plasmodium falciparum* arborent une proportion importante de lymphocytes B LILRB1⁺ apoptotiques (Kalmbach et al., 2006) (**Figure 10, P. falciparum**). Les auteurs de cette étude suggèrent que ces cellules peuvent contribuer à la libération importante de cytokines pro-inflammatoires observée dans le sang lors

des paludismes sévères (Clark et al., 2006; Dunst et al., 2017). Une étude plus récente a démontré que *P. falciparum* interagit via certaines de ses protéines RIFINs avec LILRB1 présent à la surface des lymphocytes B et des cellules NK. Cette interaction résulte en une inhibition de la production d'IgM par les lymphocytes B et une inhibition de la cytotoxicité des cellules NK. L'inhibition de l'activation de ces cellules permet ainsi l'échappement du parasite à la réponse immunitaire (Saito et al., 2017).

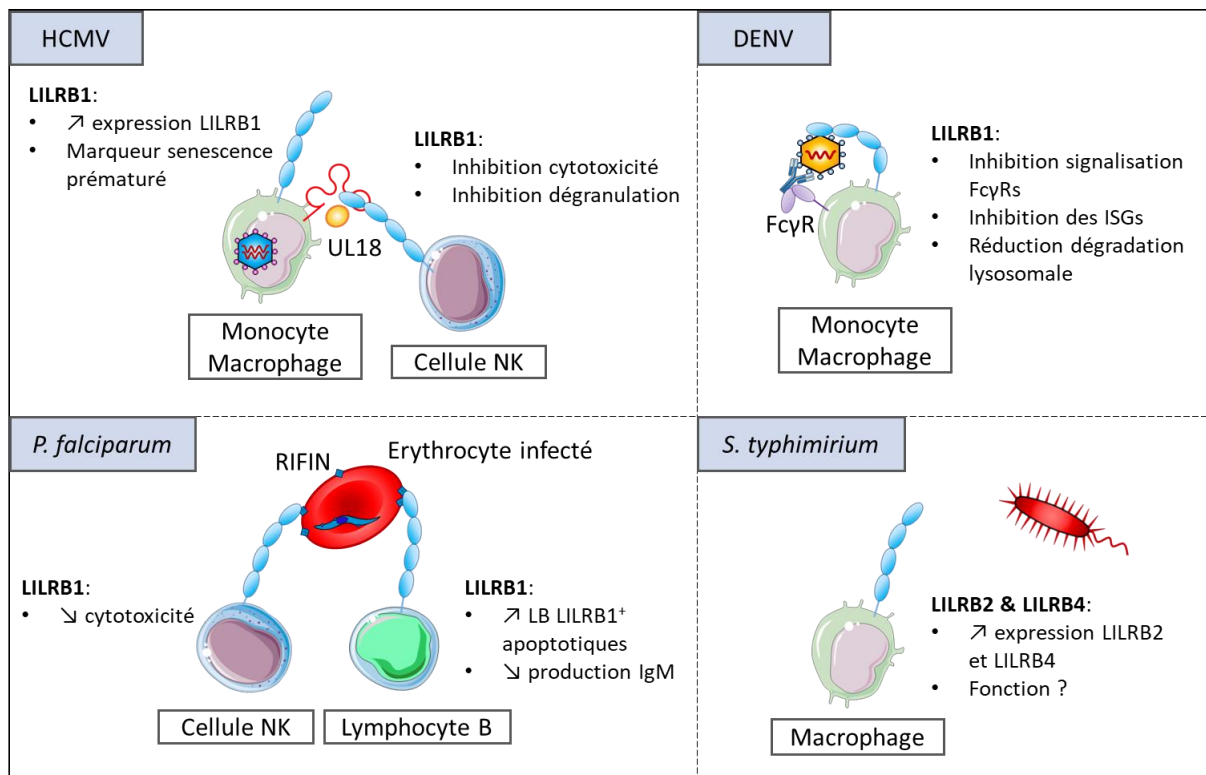


Figure 10: Rôle de LILRB1 et LILRB2 dans les pathologies infectieuses autre que VIH-1.

Infections bactériennes

L'infection par *Salmonella typhimirium* induit une augmentation d'expression de LILRB2 et de LILRB4 à la surface des macrophages (D. P. Brown et al., 2009) (**Figure 10, *S. typhimirium***). Néanmoins aucune fonctionnalité physiologique ou pathologique n'a pu être associée à ces récepteurs dans le cadre de cette infection bactérienne. De même, bien que LILRB1 soit capable de se lier aux bactéries *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (Nakayama et al., 2007), aucune caractérisation des conséquences fonctionnelles de cette interaction n'a pu être décrite.

b. Implication de LILRB1 et LILRB2 en cancérologie

Les agents pathogènes infectieux ne sont pas les seuls à utiliser la capacité immunomodulatrice des LILRs pour échapper à la réponse immunitaire. En effet, l'interaction de LILRB1 et LILRB2 avec leurs ligands du HLA-I serait impliquée dans le dysfonctionnement de la réponse immunitaire antitumorale participant à l'échappement et à la progression des tumeurs (Kang et al., 2015; Aifen Lin & Yan, 2015).

LILRB1 dans le cancer

Les cellules NK jouent un rôle primordial dans l'immuno-surveillance et dans l'induction de réponses antitumorales puissantes (Morvan & Lanier, 2016). Cependant, la surexpression de LILRB1 par ces cellules chez des patients souffrant d'un cancer du sein est associée à une réduction de leur capacité d'ADCC (Roberti et al., 2015). Chez les patients atteints de leucémie lymphoïde chronique (LLC), une forte expression de LILRB1 est induite sur les cellules NK ainsi que sur les lymphocytes T, et est également associée à leur dysfonctionnement (Villa-Álvarez et al., 2017, 2018). En effet, il a été montré que LILRB1 altère chez ces patients : 1) l'activation et la prolifération des cellules NK, des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺, 2) la cytotoxicité des cellules NK et 3) la production de cytokines des lymphocytes T avec la diminution d'IL-2 et l'augmentation de cytokines, telle que l'IFN- γ , favorisant la survie des cellules malignes (Villa-Álvarez et al., 2017, 2018). Les cellules malignes de la LLC quant à elles, présentent à leur surface une faible expression de LILRB1 (Villa-Alvarez 2017). En revanche, ces cellules malignes ainsi que celles du cancer du sein expriment fortement le HLA-I (Roberti et al., 2015; Villa-Álvarez et al., 2017), offrant de nombreux ligands pour activer les récepteurs inhibiteurs LILRB1 hautement exprimés par les cellules immunitaires.

LILRB1 peut aussi jouer un rôle sur l'apoptose et la prolifération des cellules cancéreuses. En effet, les cellules cancéreuses CD4⁺ LILRB1⁺ du syndrome de Sézary (une forme agressive de lymphome T cutané) présentent une résistance élevée à l'apoptose induite par l'anticorps anti-CD3. En revanche, la stimulation de LILRB1 inhibe leur prolifération normalement déclenchée par l'engagement de leur TCR (Nikolova et al., 2002). La médiation par LILRB1 de cette inhibition de prolifération a également été observée pour les cellules lymphoblastique B Raji mais l'utilisation de petits ARN interférant ou d'anticorps dirigés contre LILRB1 permet de restaurer leur prolifération (A. Naji et al., 2012).

Ainsi, le rôle protecteur ou néfaste de LILRB1 dans les cancers semble dépendre du contexte tumoral. D'avantage de recherches sont nécessaires pour la compréhension de son mécanisme d'action.

LILRB2 dans le cancer

LILRB2 est aussi impliqué dans la pathogenèse de certains cancers. La forte expression de LILRB2 est associée à celle de l'IL10 dans les tissus du cancer du sein et ces expressions corrélaient avec une augmentation de métastases ganglionnaires et une diminution de lymphocytes infiltrant les tumeurs (J. Liu et al., 2014). LILRB2, tout comme son ligand HLA-G, est surexprimé dans les tissus de carcinomes hépatocellulaires et corréla avec une mauvaise différenciation cellulaire, une plus grande taille de tumeur primaire et une survie globale plus courte des patients (X. Li et al., 2018). De même, la co-expression de LILRB2 et de HLA-G dans les tissus du cancer colorectal primaire est associée à une atteinte des ganglions lymphatiques régionaux et à un temps de survie plus court chez ces patients. La progression de ce cancer serait favorisée par l'activation des voies de signalisation comprenant AKT et ERK lors de l'interaction LILRB2/HLA-G (Cai et al., 2019). Enfin, l'implication de LILRB2 dans la pathogenèse du cancer du poumon « non à petites cellules » (CPNPC) a été mise en avant dans plusieurs études. En effet, les co-expressions LILRB2-HLA-G et LILRB2-ANGPTL2 ont été détectées dans les tissus de patients ayant un CPNPC (L. Wang et al., 2015; Y. Zhang et al., 2016). Ces co-expressions sont associées à des niveaux plus élevés de métastases ganglionnaires et des temps de survie des patients plus courts (L. Wang et al., 2015; Y. Zhang et al., 2016). Zhang et al., ont montré que l'interaction de LILRB2 avec HLA-G active aussi la voie de signalisation ERK dans ce contexte (Y. Zhang et al., 2016). Une étude supplémentaire a prouvé que l'activation par LILRB2 de cette voie de signalisation régule à la hausse l'expression de VEGF-C et favorise la croissance tumorale et les métastases (P. Zhang, Guo, et al., 2015). De même, la voie de signalisations impliquant LILRB2 et ANGPTL2 semble importante pour le développement du cancer du poumon (X. Liu et al., 2015). LILRB2 stimule également l'expression de B7-H3 via la signalisation PI3K/AKT/mTOR et la co-expression de ces deux récepteurs corréla avec une réduction de lymphocytes T infiltrant les tumeurs et avec une survie amoindrie des patients avec un CPNPC (P. Zhang, Yu, et al., 2015).

D'une façon générale, l'expression de LILRB2 dans les cancers est associée à un pronostic défavorable quant à l'évolution de la maladie.

c. LILRB1 et LILRB2 dans les maladies auto-immunes

Lorsque la fonction inhibitrice de LILRB1 et LILRB2 n'est pas détournée au profit de pathogènes ou de cellules cancéreuses, ces récepteurs sont capables de maintenir l'homéostasie du système immunitaire en régulant son activation. Il n'est donc pas étonnant qu'un défaut d'expression ou de fonction de ces récepteurs puisse être associé à des maladies auto-immunes. En effet, il a été montré que les patients atteints d'un lupus érythémateux disséminé (LED) ont des pDCs et des cDCs circulantes exprimant faiblement LILRB1 et LILRB2 (Blas et al., 2016; Adriana Monsiváis-Urenda et al., 2013). Ces patients présentent moins de lymphocytes B LILRB1⁺ ainsi qu'une faible capacité inhibitrice des récepteurs LILRB1 exprimés par leurs lymphocytes T (A. Monsiváis-Urenda et al., 2007). Sous stimulation, les monocytes de patients atteints d'arthrite psoriasique (PsA) révèlent une expression diminuée de LILRB2 mais élevée des molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86 et une capacité accrue de production de TNF- α (Bergamini et al., 2014). Un traitement anti-TNF permet d'augmenter l'expression de LILRB2 et de diminuer celle des molécules de costimulation (Bergamini et al., 2014) et est associée à l'amélioration clinique des patients vivant avec une PsA (Salvarani et al., 2012). LILRB2 ainsi que LILRB3 et LILRA2 sont en revanche surexprimés par le tissu synovial des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR) et leur expression est réduite en réponse aux traitements médicamenteux anti-rhumatismes. L'engagement de LILRA2 présent à la surface des macrophages, semblerait induire une production exacerbée de TNF- α , cytokine jouant un rôle clé dans l'inflammation et la destruction articulaire caractéristiques de la PR (Huynh et al., 2007). Un défaut de fonction ou d'activation de LILRB2 pourrait expliquer son incapacité à inhiber l'activité de LILRA2 dans la PR. En accord avec cette hypothèse, les patients atteints de thyroïdites auto-immunes ont des lymphocytes T présentant une forte expression de LILRB1 dont la capacité à inhiber la prolifération cellulaire est néanmoins altérée (Doníz-Padilla et al., 2011). Enfin LILRB1 et HLA-G, absents du parenchyme du système nerveux central dans des conditions non pathologiques, sont abondamment coexprimés sur les macrophages et les cellules microgliales dérivées de lésions de sclérose en plaques (SEP) (Wiendl et al., 2005). L'axe LILRB1/HLA-G pourrait agir comme un rétrocontrôle négatif, néanmoins insuffisant, visant à réguler à la baisse les effets délétères de l'infiltration des lymphocytes T dans la SEP.

Le rôle exact de LILRB1 et LILRB2 dans la physiopathologie de ces maladies auto-immunes n'est toujours pas bien caractérisé. Néanmoins, des traitements visant à restituer leurs fonctions physiologiques semblent être une voie possible pour certaines de ces maladies.

C. Rôle des récepteurs LILRB1 et LILRB2 dans l'infection au VIH-1

Comme indiqué précédemment, de nombreuses études ont démontré un lien étroit entre les LILRs, leurs interactions avec le CMH-I et le dysfonctionnement de la réponse immunitaire dans de multiples pathologies. Les recherches indiquent que ces dysfonctions du système immunitaire, médiées par les LILRs, surviennent également dans le contexte de l'infection par le VIH-1 et pourrait contribuer à l'échappement du virus à la réponse immunitaire et par conséquent à la progression de la maladie (**Figure 11**).

a. Rôle de LILRB1 et LILRB2 sur la régulation des réponses immunitaire induites au cours de l'infection par le VIH

Les patients vivant avec le VIH-1 présentent une augmentation d'expression de LILRB1 à la surface des lymphocytes T CD8⁺ et des cellules NK (Anfossi et al., 2004; O'Connor et al., 2007), tandis que l'expression de LILRB2 est augmentée à la surface des cellules de la lignée myéloïde (Vlad et al., 2003). L'augmentation d'expression de ces récepteurs chez les personnes vivant avec le VIH-1 est associée à une diminution de la cytotoxicité des cellules NK (O'Connor et al., 2007), à une réduction de la capacité de présentation de l'antigène des monocytes (Vlad et al., 2003) et enfin surtout à un profond dysfonctionnement des cDCs (Jinghe Huang et al., 2011). Les cDCs sont des cellules présentatrices d'antigène (CPAs) professionnelles dont la fonction est cruciale pour amorcer, maintenir et affiner les réponses des cellules effectrices spécifiques de l'antigène et réguler l'activation immunitaire par la sécrétion de cytokines. Au cours de l'infection par le VIH-1, l'engagement de LILRB2 à la surface des cDCs avec les molécules de HLA-I solubles ou membranaires est associé à une inhibition de leurs fonctions (Jinghe Huang et al., 2010, 2012). En effet, dans le cas des cDCs, l'interaction LILRB2/HLA-I inhibe : 1) leur capacité de maturation, constatée par une diminution d'expression des molécules de costimulation, 2) leurs fonctions de présentation antigénique et 3) leur capacité à produire des cytokines. Les cDCs se retrouvent alors dans l'incapacité d'activer les lymphocytes T et d'induire leur prolifération (Jinghe Huang et al., 2010, 2011, 2012). L'utilisation de petits ARN interférants (siRNA) bloquant l'expression de LILRB2, permet de restaurer l'ensemble des fonctions des cDCs, et d'induire l'activation des lymphocytes T. Ceci confirme le rôle majeur de ce récepteur dans les dysfonctions des cDCs induites lors de l'infection par le VIH-1 (Bashirova, Martin-Gayo, et al., 2014; J. Huang et al., 2010; Jinghe Huang et al., 2010).

L'étude d'Alaoui et *al.* indique que la primo-infection par le VIH-1 induit une augmentation forte et simultanée de l'expression de LILRB2 et du HLA-I à la surface des cDCs du sang périphérique (Alaoui et al., 2018). Une autre étude indique que l'augmentation d'expression de LILRB2 au cours de l'infection serait induite par une surproduction plasmatique d'IL-10 de la part des monocytes (Vlad et al., 2003). L'expression élevée de LILRB2 par les cDCs pendant l'infection a également été associée à des niveaux accrus de ligands HLA-I solubles (Jinghe Huang et al., 2010, 2012). Ces niveaux élevés de HLA-I solubles sont quant à eux un marqueur fort de la progression de la maladie vers le stade SIDA (Puppo et al., 1994). Au cours de l'infection par le VIH-1, d'avantage de molécules HLA-I sont alors susceptibles d'interagir en *cis* et en *trans* avec les récepteurs LILRB2 des cDCs, d'inhiber leurs fonctions ce qui pourrait ainsi contribuer à l'échappement du virus et à la progression de la maladie. En accord avec cette hypothèse, il a été démontré qu'une affinité importante entre LILRB2 et le HLA-I est associée à une charge virale plus élevée chez les patients vivant avec le VIH-1 (Bashirova, Martin-Gayo, et al., 2014).

A l'inverse, les patients contrôleurs du VIH-1 (HICs) présentent des niveaux de HLA-I solubles beaucoup plus faibles (Jinghe Huang et al., 2010). De plus, comparés aux patients VIH-1⁺ progresseurs ou aux personnes non infectées par le virus, les HICs possèdent des cDCs avec une forte capacité de présentation antigénique et une faible aptitude à sécréter des cytokines pro-inflammatoires. Huang et *al.* ont montré que ce profil fonctionnel est associé à une surexpression de LILRB1 et LILRB3 par les cDCs et que l'inhibition de ces deux récepteurs à l'aide d'anticorps bloquants ou de siRNA abolit la capacité de présentation antigénique des cDCs (J. Huang et al., 2010).

L'ensemble de ces études suggère que le profil d'expression de LILRB1, LILRB2 mais aussi de LILRB3 à la surface des cellules immunitaires et l'interaction spécifique avec leurs ligands HLA-I pourraient avoir une répercussion majeure sur la réponse immunitaire contre le VIH-1 et la pathogénèse induite par l'infection.

b. Interaction LILRB1/B2 et HLA-I : Déterminants génétiques et effets des mutations virales sur la pathogénèse

L'association étroite de certains allèles de HLA-I avec la progression de la maladie due au VIH-1 est bien connue. En effet, les allèles HLA-B*27 et HLA-B*57 sont associés à une progression ralentie de la maladie et sont très enrichis chez les non-progresseurs à long terme (LTNPs) et plus particulièrement chez les contrôleurs du VIH-1 (Zaunders & Van Bockel, 2013). Ces

allèles dit « protecteurs » influencent le devenir de l'infection par leur niveau d'interaction avec les récepteurs des lymphocytes T (TCR) et des cellules NK (KIR) mais aussi avec les LILRs des cellules présentatrices d'antigènes. En effet pour LILRB2, une faible affinité de liaison avec ces allèles a été démontrée et corrèle avec une meilleure capacité de présentation antigénique et, au final, avec le contrôle de la réplication virale (Bashirova, Martin-Gayo, et al., 2014; Jones et al., 2011).

Le polymorphisme au sein des allèles HLA-I joue également un rôle très important sur les forces de liaison entre les molécules LILRs et HLA-I. Cet effet a notamment été démontré pour l'allèle HLA-B*35 qui est associé à une progression rapide de la maladie (Jinghe Huang et al., 2009). En effet, le sous-type B*3503 présente une forte affinité pour LILRB2 exprimé par les cDCs contrairement au sous-type B*3501 et cela, même si ces deux molécules diffèrent d'un seul acide aminé et présentent des épitopes du VIH-1 identiques. Contrairement à B*3501, l'interaction préférentielle entre B*3503 et LILRB2 est associée à un dysfonctionnement plus important des cDCs dans des tests fonctionnels *in vitro* et à une incapacité des cDCs provenant de patients porteurs de cet allèle à induire la prolifération de lymphocytes T allogéniques dans des tests *ex vivo* (Jinghe Huang et al., 2009). Ces données suggèrent donc que des sous-types d'allèles pourraient accélérer la progression de la maladie en inhibant davantage la fonction des cDCs via LILRB2.

Dans une moindre mesure, les formes HLA-C non associées à la $\beta 2m$ possédant la mutation « -35C » présentent également une liaison accrue à LILRB2 mais aussi à LILRA1 et LILRA3. La liaison de LILRB1 aux molécules HLA-I quant à elle, est plus homogène, bien que certains sites de liaison semblent tout de même influencer l'affinité entre LILRB1 et les HLA-A (Jones et al., 2011). L'effet de ces variations d'affinité sur la progression de la maladie reste à déterminer.

Enfin, étant donné que les LILRs interagissent avec le domaine $\alpha 3$ et la sous-unité $\beta 2m$ du HLA-I, il a été supposé que cette interaction serait indépendante des peptides antigéniques et donc non affectée par les mutations d'échappement du virus. Néanmoins, des mutations au sein des peptides VIH-1 présentés par les HLA-I semblent également jouer un rôle important sur l'affinité de ces molécules avec LILRB2. En effet, une mutation d'échappement du peptide Gag KK10 (vKK10) du VIH-1 restreint au HLA-B*2705 conduit à une perte de reconnaissance de ce complexe par le TCR des CTLs spécifiques du peptide natif, mais améliore drastiquement son interaction avec LILRB2 exprimé par les cDCs et les monocytes (Mathias Lichterfeld et al., 2007). L'interaction du HLA-B*2705-vKK10 avec LILRB2 des cDCs induit une expression

plus faible de leurs marqueurs de maturation et des molécules de costimulation et inhibe leur capacité à induire la prolifération des lymphocytes T (Mathias Lichterfeld et al., 2007). D'autres variants d'échappement de peptides du VIH-1 portés par les allèles HLA-A*11, -B*08 et -B*07 sont également susceptibles d'augmenter l'affinité du complexe avec LILRB2 (Y. Yang et al., 2010). Les mécanismes moléculaires et les déterminants structuraux impliquant le peptide dans la reconnaissance spécifique du HLA-I par LILRB2 restent inconnus à ce jour.

Ainsi, le polymorphisme des gènes HLA-I et les mutations d'échappement du VIH-1 (dues à la pression des CTLs) dans les épitopes présentés par ces molécules, sembleraient influencer leur niveau d'interaction avec LILRB2, conduisant à l'altération des fonctions des cDCs et influençant de façon critique la progression de la maladie. Néanmoins, ces déterminants génétiques ne sont ni suffisants, ni nécessaires pour maîtriser l'infection, ce qui sous-tend l'implication de bien d'autres mécanismes plus complexes.

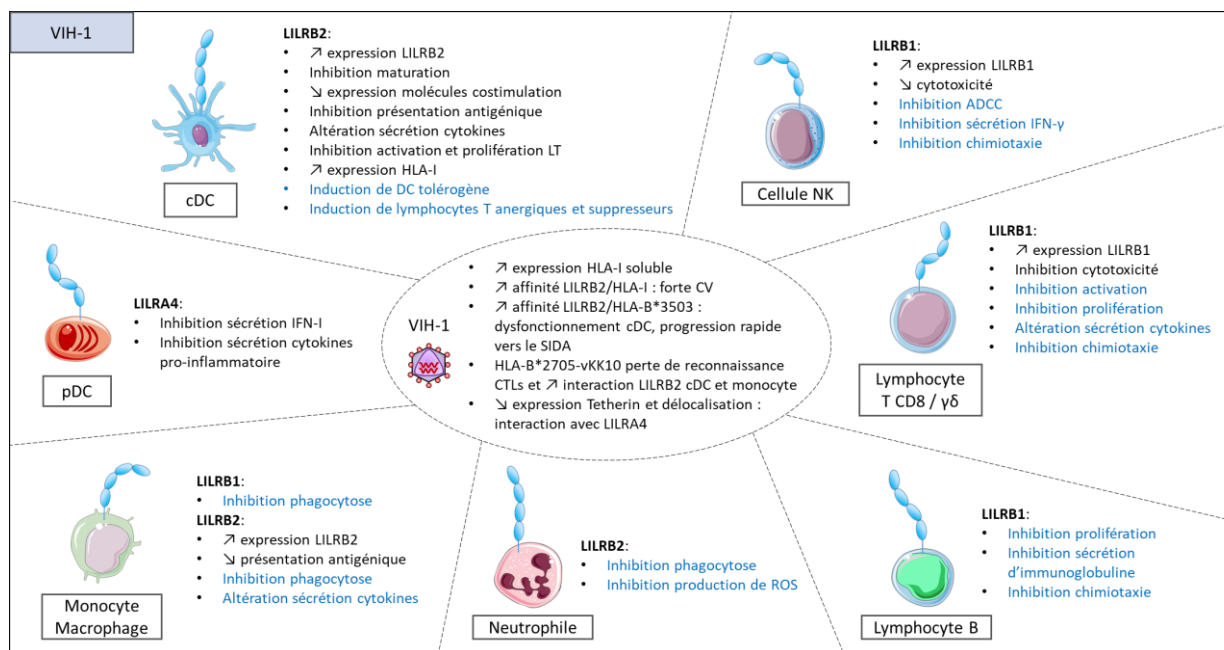


Figure 11: Implication des LILRs dans la pathogenèse de l'infection au VIH-1. Les dysfonctions du système immunitaire médiées par les LILRs ou associées aux LILRs au cours de l'infection par le VIH-1 sont indiquées en noir. Les dysfonctions du système immunitaire médiées par les LILRs ou associées aux LILRs hors contexte d'infection au VIH-1, mais pouvant jouer un rôle au cours de l'infection par le VIH-1, sont représentées en bleu.

c. Implication des autres membres de la famille des LILRs dans l'infection au VIH-1

LILRB1, LILRB2 mais aussi LILRB3 ne sont pas les seuls membres de la famille des LILRs à pouvoir jouer un rôle dans la régulation des réponses immunitaires au cours de l'infection par

le VIH-1. En effet, chez les personnes VIH-1⁺ sans cART, l'expression de LILRA3 par les cellules immunitaires corrèle positivement avec une faible charge virale et un nombre plus élevé de lymphocytes T CD4⁺. Cependant, l'induction de l'expression de ce récepteur dans les monocytes semble être en partie abrogée par l'infection au VIH-1 (Low et al., 2016). LILRA1 et LILRA3 présentent une liaison préférentielle avec les formes non-associées à la β 2m de certains allèles HLA, dont ceux du HLA-C possédant le polymorphisme « -35C » (Jones et al., 2011). Ce polymorphisme est associé à une expression accrue de HLA-C et à une apparition retardée du SIDA (Thomas et al., 2009). A l'inverse, LILRA1 et LILRA3 affichent une faible liaison aux allèles présentant le polymorphisme « -35T », mais une forte liaison à l'allèle HLA-C*0702, tous deux associés à une apparition rapide du SIDA (Jones et al., 2011). Ces études suggèrent que des niveaux de liaison de LILRA1 et LILRA3 aux HLA pourraient influencer leur niveau d'activation et contribuer aux effets protecteurs ou préjudiciables relatifs, véhiculés par certains de ces allèles dans l'infection par le VIH-1.

Enfin LILRA4, qui est exprimé uniquement par les pDCs, possède pour ligand le facteur de restriction Tetherin aussi appelé BST2 ou CD317 (W. Cao et al., 2009). Ce facteur de restriction est capable d'inhiber la libération de VIH-1 néosynthétisé en retenant ses virions à la surface des cellules infectées (Neil et al., 2008). Néanmoins, la protéine Vpu du VIH-1 contourne ce mécanisme de restriction en induisant une diminution d'expression de Tetherin (Neil et al., 2008). Vpu déplace également les protéines Tetherin résiduelles en dehors des sites d'assemblage du VIH-1, les laissant ainsi libre de se lier et d'activer LILRA4 à la surface des pDCs lors d'un contact cellule-cellule (Bego et al., 2015). Cette interaction réprime par la suite la production d'IFN-I et d'autres cytokines pro-inflammatoires induites par les voies TLR7/9 des pDCs activées (Bego et al., 2015; W. Cao et al., 2009). Par conséquent, la protéine Vpu du VIH-1 pourrait favoriser en primo-infection la transmission et la dissémination des virions et inhiber les puissantes réponses antivirales des pDCs, en détournant les fonctions de Tetherin et de LILRA4.

III. Immunothérapie et modèle macaque d'infection par le SIV dans la lutte contre le VIH-1

A l'heure actuelle, la persistance de réservoirs viraux latents pour le VIH-1 entrave toute cure potentielle du virus et implique la prise de traitements antirétroviraux à vie chez les personnes ne contrôlant pas naturellement l'infection. Une telle thérapie à vie pose cependant de

nombreuses difficultés, notamment associées à l'adhésion aux schémas thérapeutiques, la possibilité d'émergence de virus résistants, les toxicités cumulatives d'une thérapie à long terme ainsi que des considérations économiques et logistiques. Pour répondre à ces préoccupations, la communauté scientifique a commencé à explorer un certain nombre de nouvelles options thérapeutiques dans le but de parvenir à une suppression virologique durable en l'absence de cART. Cette stratégie dite de « rémission fonctionnelle » vise à améliorer l'immunité de l'hôte contre le VIH-1 afin d'induire un contrôle naturel de l'infection comparable à celui observé chez les LTNPs. Dans cette optique, les anticorps monoclonaux ciblant des points de contrôle de l'immunité semblent être une voie prometteuse pour l'immunothérapie anti-VIH-1. Des études dans des modèles animaux appropriés permettront de déterminer l'innocuité et l'efficacité thérapeutique de ces nouvelles stratégies.

A. Intérêt des anticorps monoclonaux ciblant des points de contrôle immunitaire: parallèles entre immunothérapie anti-VIH-1 et -cancers

La recherche contre le cancer et les stratégies de rémission/guérison du VIH-1 présentent de nombreuses convergences (Paiardini et al., 2020) et les nouvelles stratégies thérapeutiques mises en œuvre pour lutter contre ces maladies impliquent désormais l'utilisation d'anticorps monoclonaux (AcM) ciblant des récepteurs immunomodulateurs (Weiner et al., 2010). En plus d'une affinité et d'une stabilité élevées, les AcM peuvent être criblés pour activer ou bloquer spécifiquement les réponses immunitaires. A cet égard, fort de leurs succès en oncologie, les AcM dirigés contre les points de contrôle immunitaire PD-1 et CTLA-4 sont actuellement étudiés dans le cadre de l'infection par le VIH-1. L'utilisation d'AcM bloquant LILRB1 et B2 semble être une stratégie suscitant également beaucoup d'intérêt pour l'immunothérapie contre les cancers (Gao et al., 2018) et pourrait être étendue à la lutte contre le VIH-1 .

a. Anticorps monoclonaux anti-immune checkpoints dans l'infection VIH-1

Les points de contrôle du système immunitaire ou « immune checkpoints » sont des récepteurs pouvant inhiber les voies de signalisations menant au déclenchement des réponses immunitaires. Parmi ces immune checkpoints, le récepteur à l'antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques (CTLA-4) et le récepteur de mort cellulaire programmée 1 (PD-1) sont des récepteurs inhibiteurs des lymphocytes T essentiels au maintien de la tolérance du soi et au maintien d'un niveau de réponse adapté des cellules immunitaires (Fife & Bluestone, 2008; Haspot et al., 2008). Néanmoins, de nombreux agents pathogènes et cancers favorisent et exploitent les interactions inhibitrices de ces immune checkpoints pour échapper au contrôle

immunitaire des lymphocytes T (E. I. Buchbinder & Desai, 2016; Wykes & Lewin, 2018). Le blocage de ces récepteurs inhibiteurs à l'aide d'AcM s'est d'ailleurs révélé très efficace comme immunothérapie contre certains cancers (Sharma & Allison, 2015).

Dans le cadre de l'infection par le VIH-1, l'observation selon laquelle l'épuisement des lymphocytes T spécifiques du virus s'accompagne d'une expression accrue des récepteurs PD-1 et CTLA-4 a nourri l'hypothèse selon laquelle le ciblage de ces voies immunomodulatrices pourrait également être une approche thérapeutique prometteuse dans la lutte contre ce virus (Kaufmann & Walker, 2009; Porichis & Kaufmann, 2012). Plusieurs études réalisées à l'aide du modèle macaque d'infection par le SIV ont pu établir la preuve de ce concept en apportant des résultats encourageants. Le blocage de PD-1 par des AcM au cours de l'infection par le SIV entraîne l'expansion et l'amélioration des réponses immunitaires cellulaires et humorales contre le virus et est associé à une diminution de la charge virale plasmatique et à une meilleure survie des macaques (Velu et al., 2009). Ce blocage *in vivo* de PD-1 par des AcM induit également une réduction de l'activation immunitaire et une meilleure perméabilité intestinale chez des macaques en phase chronique d'infection par le SIV (Shetty et al., 2012). En accord avec ces résultats, l'association des bénéfices de ce blocage avec l'administration de traitements antirétroviraux permet également une meilleure reconstitution des lymphocytes Th17 des muqueuses et la réduction de la taille du réservoir du SIV. Ceci conduit à un meilleur contrôle du rebond viral après interruption du cART (Mylvaganam et al., 2018). Une étude récente dans ce modèle macaque d'infection SIV⁺ chronique sous cART apporte néanmoins des résultats contradictoires (Bekerman et al., 2019). En effet cette étude indique que le blocage de PD-1 n'entraîne pas le contrôle du rebond viral après l'interruption des traitements antirétroviraux, ni une réduction de la taille du réservoir (Bekerman et al., 2019).

Des études ciblant le récepteur inhibiteur CTLA-4 ont montré que le blocage par des AcM de cet immune checkpoint, lors de l'immunisation de macaques avec une protéine d'enveloppe (Env) du VIH-1, améliore les réponses anticorps anti-Env (Bradley et al., 2020). En revanche, dans cette étude, le blocage de PD-1 chez les macaques n'a pas amélioré les réponses anticorps anti-Env et semble même entraver leur mise en place. Le blocage de CTLA-4 par des AcM chez des macaques SIV⁺ sous cART a été associé à une diminution des niveaux d'ARN viraux dans les ganglions lymphatiques et à une augmentation de la fonction effectrice des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques du SIV (Hryniewicz et al., 2006). Une étude complémentaire dans ce modèle a démontré que des AcM bloquants anti-CTLA-4 et -PD-1 induisent une inversion de latence robuste et réduisent les niveaux totaux de virus intégrés. Néanmoins, le degré de

clairance du réservoir reste insuffisant pour obtenir un contrôle viral après interruption des traitements antirétroviraux (Harper et al., 2020).

Ces résultats sont encourageants, mais suggèrent que de nouvelles études seront nécessaires pour mieux définir le schéma de blocage de ces points de contrôle immunitaire, et le choix des cibles des AcM. Des interventions supplémentaires visant à réduire la taille du réservoir et rétablir la fonction d'un plus grand éventail de cellules immunitaires, notamment celle des CPAs au-delà des seuls lymphocytes T, seront également indispensables pour obtenir une réponse immunitaire innée et adaptative permettant une rémission fonctionnelle durable. A cet égard, le ciblage thérapeutique de LILRB1 et LILRB2 à l'aide d'AcM bloquants pourrait être une stratégie complémentaire prometteuse.

b. Anticorps monoclonaux anti-LILRB1 et LILRB2 dans le cancer

Des parallèles clés entre le VIH-1 et la persistance des cellules cancéreuses influencent le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques contre le VIH-1 basées sur l'immunothérapie antitumorale (Paiardini et al., 2020). Le blocage des immune checkpoints CTLA-4 et PD-1, désormais étudié dans la lutte contre le VIH-1, en est le meilleur exemple (Kaufmann & Walker, 2009; Porichis & Kaufmann, 2012). Dans cette optique, la fonction immunomodulatrice des récepteurs LILRB1 et LILRB2 est également très étudiée. En effet, l'inhibition fonctionnelle des cellules immunitaires, résultant de l'interaction de LILRB1 et LILRB2 avec leurs ligands du HLA-I, participe largement à l'évasion immunitaire dans certaines pathologies (Cai et al., 2019; Kang et al., 2015; J. Zhang et al., 2017), et notamment dans le cancer comme nous l'avons vu dans la partie « Implication de LILRB1 et LILRB2 en cancérologie ». A l'instar du blocage des immune checkpoints CTLA-4 et PD-1 permettant de restaurer la fonction des lymphocytes T (Sharma & Allison, 2015), bloquer les récepteurs inhibiteurs LILRB1 et LILRB2 pourrait permettre de rétablir la fonction de certaines cellules immunitaires, dont les CPAs, lors d'infections ou de cancers (Cai et al., 2019; Chan et al., 2014; Kang et al., 2015; N. L. Li et al., 2013; M. Lichterfeld & Yu, 2012; J. Zhang et al., 2017).

Des anticorps monoclonaux (AcM) anti-LILRB1 ou LILRB2 sont d'ailleurs déjà développés pour des stratégies d'immunothérapies antitumorales (**Figure 12**). En effet, une étude a démontré que le blocage de LILRB1 par des AcM induit une importante phagocytose de lignées de cellules cancéreuses par les macrophages (Barkal et al., 2018). Une étude sur des prélèvements de patients indique que le blocage de LILRB1 par des AcM restaure la lyse, par les cellules NK, des cellules cancéreuses dans la leucémie lymphoblastique et myéloblastique

aigüe (Godal et al., 2010). De même, chez des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique, le blocage de LILRB1 par des AcM rétablit l'activation, la prolifération et une production normale de cytokines par les lymphocytes T. Ce blocage restaure également la lyse de ces cellules leucémiques par les cellules NK, dont l'action est amplifiée en présence de Lénalidomide, un traitement immunomodulateur contre certains cancers (Villa-Álvarez et al., 2017, 2018). Le blocage de LILRB1 par des AcM est également capable de restaurer l'ADCC des cellules NK induite par le Cétuximab, un anticorps dirigé contre le récepteur au facteur de croissance épidermique présent à la surface des cellules du cancer du sein triple négatif (Roberti et al., 2015). La capacité cytotoxique de lymphocytes T $\gamma\delta$ contre des lignées de cellules cancéreuses peut également être rétabli à l'aide d'un AcM bloquant anti-LILRB1 (Lesport et al., 2011). Enfin, une étude récente démontre que LILRB1 et PD-1 sont exprimés par des sous-populations de lymphocytes T CD8⁺ distinctes et que la combinaison de leur blocage par des AcM rétablit l'activité cytotoxique de ces cellules, induit par un anticorps bispécifique, envers une lignée tumorale de mélanome (A. Kim et al., 2019). Le blocage de LILRB1 semble donc représenter une stratégie novatrice pour restaurer ou améliorer la fonction des cellules immunitaires contre les cancers « liquides » et « solides », seule ou en association avec d'autres immunothérapies antitumorales.

Des études récentes montrent que LILRB2 est enrichi dans les tissus de certains types de cancers, dont le cancer du poumon, le cancer du sein, le cancer du foie et le cancer colorectal (Gao et al., 2018). Ces études suggèrent que LILRB2 favorise non seulement la croissance, la prolifération et les métastases tumorales, mais est aussi associé à une capacité réduite des lymphocytes T à infiltrer les tumeurs et à une survie plus faible des patients (Cai et al., 2019; Gao et al., 2018; J. Liu et al., 2014; X. Liu et al., 2015; P. Zhang, Guo, et al., 2015; P. Zhang, Yu, et al., 2015). Les mécanismes moléculaires exacts sous-jacents, responsables du développement et de la progression du cancer, induits par LILRB2 restent cependant encore très mal connus. Néanmoins, une étude récente a pu démontrer que le blocage de LILRB2 à l'aide d'AcM est capable de reprogrammer les macrophages associés aux tumeurs vers un profil pro-inflammatoire permettant une meilleure immunité antitumorale (H.-M. Chen et al., 2018). En effet, cette étude révèle que le blocage de LILRB2 favorise la polarisation des macrophages immatures vers un profil M1 pro-inflammatoire, via l'activation des voies de signalisation NF- κ B/STAT1 et l'inhibition de la voie AKT/STAT6. Ce blocage engendre également chez les macrophages une augmentation, de leur production de TNF- α , et de leur capacité de phagocytose, et améliore drastiquement, en synergie avec un AcM anti-PD-1, les réponses des

lymphocytes Th1. De plus, ces macrophages reprogrammés ont la capacité *in vivo* d'améliorer l'efficacité thérapeutique du traitement antitumoral anti-PD-L1, ce qui permet de réduire la taille des tumeurs, et l'infiltration dans celles-ci de cellules myéloïdes suppressives (MDSC) et de lymphocytes Treg. En conclusion, cette étude suggère que LILRB2 agit comme un point de contrôle immunitaire et pourrait être une nouvelle cible thérapeutique pour reprogrammer les macrophages associés aux tumeurs afin de moduler le microenvironnement tumoral et améliorer l'action de thérapies immunitaires contre le cancer.

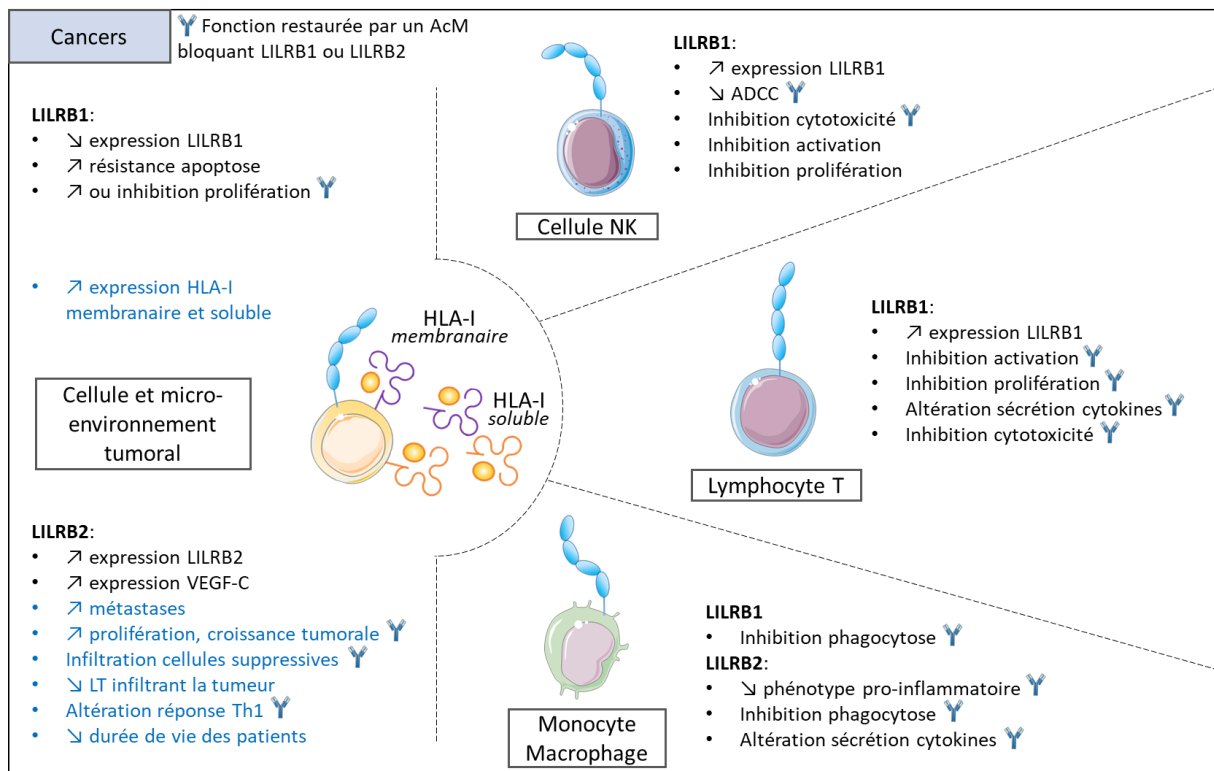


Figure 12: Implication de LILRB1 et LILRB2 dans l'échappement tumorale. L'inhibition ou l'altération de la fonction biologique des cellules immunitaires ou cancéreuses directement médiée par LILRB1 ou LILRB2 est représentée en noir. L'inhibition ou l'altération des réponses immunitaires associée à l'expression de LILRB1 ou LILRB2 dans le microenvironnement tumoral est représentée en bleu. Un anticorps schématisé est utilisé pour indiquer le bénéfice du blocage de LILRB1 ou LILRB2 par des anticorps monoclonaux sur la restauration des fonctions biologiques des cellules immunitaires et cancéreuses.

Des études dans le modèle macaque d'infection par le SIV seront nécessaires pour déterminer les conséquences du blocage de ces récepteurs *in vivo* dans le contexte de l'infection par le VIH-1.

B. Le modèle simien d'infection par le SIV dans l'immunothérapie anti-LILRB1 et LILRB2 contre le VIH-1

Bien que les modèles primate non humain (PNH) soulèvent de nombreux problèmes éthiques et engendre des coûts importants, ils restent néanmoins des modèles animaux clés pour la recherche biomédicale, notamment pour les études sur : les maladies infectieuses, la compréhension des mécanismes immunologiques, ainsi que le développement et l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques. En effet, il n'y a pas de modèle de remplacement permettant de reproduire la complexité multi-échelle du système immunitaire et sa réponse à une infection virale, ce qui en fait des modèles incontournables dans les approches pré-cliniques de prévention et d'immunothérapie.

a. Le modèle simien dans la lutte contre le VIH-1

La pandémie de VIH-1 dans l'espèce humaine résulte de transmissions inter-espèces de souches de virus de l'immunodéficience simienne (SIV) infectant les chimpanzés d'Afrique centrale (Sharp & Hahn, 2011). Chez ces primates, le SIV induit une physiopathologie associée à un SIDA et une mortalité accrue (Keele et al., 2009). A noter que les chimpanzés sont les seuls primates non humains sensibles à l'infection par le VIH-1. Malgré cela, en raison de leur statut en voie d'extinction, ces animaux ne sont plus utilisés en laboratoire pour étudier cette infection. Les hôtes naturels du SIV comme le singe vert d'Afrique et le singe vert mangabey sont capables, indépendamment des niveaux élevés de répllication virale, de vivre normalement avec le virus et ne progressent pas vers le stade SIDA (Chahroudi et al., 2012). En revanche, l'inoculation de certaines souches de SIV à des primates non humains d'Asie, tels que les macaques rhésus (*Macaca mulatta*), les macaques à queue de cochon (*Macaca nemestrina*) et les macaques crabiers ou « cynomolgus » (*Macaca fascicularis*), entraîne une physiopathologie similaire à celle retrouvée chez l'Homme pour le VIH-1. Pour cette raison et pour des raisons physiologiques et techniques, ces macaques sont utilisés comme modèles pour l'étude de la pathogenèse induite par le VIH-1 ainsi que pour les études d'innocuité et d'efficacité de traitements contre ce virus (Policicchio et al., 2016).

b. Intérêt du modèle macaque d'infection par le SIV

Les macaques et les humains sont phylogénétiquement, anatomiquement, physiologiquement et immunologiquement très proches, ce qui leur confère un avantage significatif en tant que modèle de recherche biomédicale par rapport aux rongeurs et autres espèces (Policicchio et al.,

2016). De plus, ils peuvent être infectés par des virus humains ou simiens apparentés pouvant entraîner des pathologies analogues (Estes et al., 2018). Dans le cas du SIV chez le macaque, l'infection survient par des voies et modes de transmission identiques au VIH-1. De plus, le SIV partage de nombreuses caractéristiques physiopathologiques avec le VIH-1 dont : un tropisme pour les lymphocytes T CD4⁺ et leur déplétion progressive, une atteinte sévère des tissus lymphoïdes associée à une activation et une inflammation importante du système immunitaire, l'établissement de réservoirs latents avec la présence de provirus et enfin la progression vers le stade SIDA (Estes et al., 2018). Néanmoins, la rapidité de progression de l'infection par le SIV est dépendante de l'espèce de macaque, de la souche virale inoculée et du fond génétique de chaque singe (Evans & Silvestri, 2013). En effet, contrairement aux macaques à queue de cochon et aux macaques rhésus indien qui présentent une évolution rapide de la maladie, suite à leur infection par le SIV, les macaques rhésus chinois et les macaques cynomolgus ont un profil d'évolution plus lent, d'évolution temporelle proche de celle de l'infection par le VIH-1 chez l'Homme (Policicchio et al., 2016). Le choix de l'espèce de macaque utilisé en laboratoire de recherche sur le VIH-1 dépendra donc de la question scientifique posée.

D'un point de vue méthodologique, le modèle macaque présente une multitude d'avantages. Ce modèle permet un contrôle de divers paramètres cliniques impossibles à contrôler chez l'humain (moment de l'infection, souche, dose et voie d'administration du virus) et permet un certain nombre d'interventions expérimentales (échantillonnage répété de tissus, prélèvements invasifs, approches préventives ou thérapeutiques «risquées» telles que des expériences de déplétion cellulaire, de réactivation du virus en latence ou des interventions basées sur les cellules souches ou la thérapie génique) qui ne peuvent être menées chez l'Homme. Les macaques sont également sensibles aux traitements antirétroviraux et de nombreux réactifs utilisés pour étudier la réponse immunitaire humaine présentent une réaction croisée chez le macaque (Policicchio et al., 2016). Des essais pilotes avec suivi longitudinal pour de nouveaux traitements préventifs, thérapeutiques ou curatifs peuvent donc être réalisés chez le macaque avec interruption et reprise du traitement si nécessaire.

L'ensemble de ces interventions chez le macaque ont fourni et continuent de fournir des informations essentielles pour une meilleure compréhension de la biologie de l'infection au VIH-1. Ces études ont permis de révéler les premiers événements de transmission et de dissémination du virus, notamment à travers les muqueuses, ainsi que les premiers événements immunologiques et virologiques survenant lors de la phase aiguë de l'infection. Ces études ont

également permis une meilleure caractérisation de la pathogenèse due au VIH-1 notamment dans les tissus, et du rôle *in vivo* de protéines virales spécifiques. De plus, le moment de l'établissement des réservoirs viraux avec la caractérisation cellulaire et anatomique des réservoirs actifs et persistants a pu être défini grâce à ces modèles. Les mécanismes de contrôle immunitaire chez les hôtes naturels du SIV, malgré une virémie élevée, ont pu également être en partie révélés, et des modèles de contrôle naturel du SIV chez le macaque permettent d'améliorer notre compréhension des mécanismes de ce contrôle dans l'espoir d'en mimer les effets dans des essais thérapeutiques et/ou par immunothérapie. Enfin les modèles macaques d'infection par le SIV sont devenus une étape préclinique essentielle pour évaluer l'innocuité et l'efficacité des vaccins et des traitements antirétroviraux candidats à la lutte contre le VIH-1 (Estes et al., 2018; Evans & Silvestri, 2013).

c. Intérêt du modèle macaque pour l'étude des LILRs dans l'infection VIH-1

Nous avons établi que les homologues des LILRs chez la souris, les PIRs, sont un modèle d'étude très limité qui ne reflète pas toute la complexité et la diversité des régulations immunitaires pouvant être associées à ces récepteurs chez l'humain. Les nombreux orthologues des LILRs décrits chez le macaque en font un modèle expérimental tout à fait pertinent pour l'étude fonctionnelle des LILRs *in vivo*.

En effet, comme nous l'avons vu auparavant, plusieurs récepteurs activateurs (Mm-LILRA) et inhibiteurs (Mm-LILRB) ont été caractérisés chez le macaque rhésus (Slukvin et al., 2006). De plus, le génome des macaques rhésus et cynomolgus est intégralement séquencé et de nombreux haplotypes du CMH-I ont pu être caractérisés (Osada et al., 2015; Xue et al., 2016). Ceci offrant des informations précieuses pour l'étude de la biologie des interactions LILRs/CMH-I dans ces modèles. A noter que la région des gènes du CMH de macaque cynomolgus (*Macaca fascicularis*-CMH ; Mafa-CMH) est organisée de la même manière que celle de l'Homme, néanmoins elle se distingue de ce dernier par son degré élevé de duplication de gènes CMH de classe I classiques (Shiina & Blancher, 2019). Les équivalents Mafa des loci classiques HLA-A et HLA-B et des loci non classiques HLA-E, HLA-F et HLA-G sont appelés Mafa-A, Mafa-B, Mafa-E, Mafa-F et Mafa-G, respectivement. Mafa-G est considéré comme un pseudogène et les fonctions associées au HLA-G peuvent avoir été reprises par Mafa-AG qui partage des caractéristiques très similaires à celui-ci. À ce jour, aucun orthologue du locus HLA-C n'a encore été identifié chez le macaque cynomolgus ou chez d'autres types de singes de l'Ancien Monde (Shiina & Blancher, 2019).

Enfin le modèle macaque d'infection par le SIV est actuellement le meilleur modèle en laboratoire pour étudier la pathogenèse de l'infection par le VIH-1 et l'efficacité de multiples traitements. Le modèle macaque est donc un modèle de choix pour étudier les LILRs et leur fonction immunomodulatrice dans le cadre de l'infection par le SIV. Notre équipe a d'ailleurs été la première à ouvrir la voie dans ce domaine en démontrant une augmentation d'expression de LILRB2 et du CMH-I à la surface des cDCs lors de la primo-infection par le VIH-1 chez l'Homme et par le SIV chez le macaque cynomolgus (Alaoui et al., 2018). Les futures études visant à caractériser la fonction immunomodulatrice des LILRs dans ce modèle d'infection offriront une preuve de concept de l'influence de ces récepteurs dans la pathogenèse ou le contrôle de l'infection par le VIH-1, comme ceci a pu être montré pour d'autres immune checkpoints tels que PD-1 et CTLA-4 (Harper et al., 2020; Mylvaganam et al., 2018; Velu et al., 2009).

Objectifs

Afin d'acquérir une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires qui pourraient conduire à l'établissement de réservoirs viraux latents et aux dysfonctionnements de la réponse immunitaire, nous avons articulé nos recherches en deux principaux axes.

Notre premier axe s'est focalisé sur la caractérisation par cytométrie de masse des modifications cellulaires pouvant être associées à :

- La persistance du VIH-1 au sein des lymphocytes T CD4⁺
- La dérégulation des sous-populations de cellules myéloïdes au cours de cette infection

Descours et *al.* ont identifié en 2017 le récepteur FcγRIIa, également appelé CD32a, comme marqueur spécifique du réservoir latent compétant du VIH-1 au sein des lymphocytes T CD4⁺ quiescents (Descours et al., 2017). Cependant, des études postérieures ont contesté cette découverte (Grau-Expósito et al., 2017; Wittner et al., 2017), lançant une controverse autour de la spécificité de l'expression de ce récepteur sur les lymphocytes T CD4⁺ infectés de manière latente par le VIH-1.

Dans ce contexte, notre premier objectif a été d'évaluer la pertinence du récepteur CD32a en tant que marqueur spécifique du réservoir latent du VIH-1.

Pour atteindre cet objectif, nous avons étudié la présence, la diversité ainsi que la dynamique des lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺ chez des individus en primo-infection de VIH-1 avant et après un an de cART ainsi que chez des individus VIH⁻. De façon plus détaillée, nous avons étudié si des lymphocytes T CD4⁺ arborant ce marqueur étaient bien présents chez des patients VIH⁺ mais aussi s'ils étaient retrouvés chez des individus séronégatifs. Nous avons également recherché s'il existe une diversité phénotypique au sein des lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺ et si ces cellules sont présentes dès la primo-infection et conservées dans le temps en présence de cART. Ces données permettront ainsi de mieux caractériser phénotypiquement les lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺ et de comprendre s'il existe un lien entre leur présence et la latence du VIH-1.

Les sous-populations de cellules myéloïdes quant à elles jouent un rôle majeur dans l'orchestration des réponses immunitaires contre les pathogènes. Néanmoins, au cours de l'infection par le VIH-1, ces cellules sont directement et indirectement affectées par le virus et présentent de nombreuses dérégulations phénotypiques et fonctionnelles (Bego et al., 2015; Benlahrech et al., 2012; Deeks et al., 2013; Hasegawa et al., 2009; Jinghe Huang et al., 2011).

A cet égard, notre deuxième objectif a consisté à mieux caractériser les modifications cellulaires induites dans les sous-populations de cellules myéloïdes au cours de l'infection par le VIH-1 et qui pourraient contribuer à la progression ou au contrôle de la maladie.

Pour atteindre le dernier objectif de cet axe, nous avons étudié la diversité et la dynamique des cellules myéloïdes chez des patients en primo-infection de VIH-1 puis après une année de cART ainsi que chez des patients contrôleurs du VIH-1 et chez des donneurs VIH⁻. Nous avons ainsi recherché à mieux caractériser les sous-populations de cellules myéloïdes et leur abondance à différents stades de la maladie. Ces résultats participeront à l'identification des sous-populations de cellules immunitaires et des modifications cellulaires et/ou moléculaires pouvant contribuer à la progression ou au contrôle de l'infection par le VIH-1.

La famille des leukocyte immunoglobulin-like receptors (LILRs) comprend des récepteurs inhibiteurs et activateurs retrouvés sur les cellules immunitaires, majoritairement de la lignée myéloïde. Les LILRs jouent un rôle important dans l'équilibre immunologique en modulant les réponses immunitaires innée et adaptative (D. Brown et al., 2004). Néanmoins, dans certaines circonstances et notamment lors d'infections, leurs propriétés immunomodulatrices peuvent être détournées par les pathogènes afin d'échapper à la reconnaissance par le système immunitaire (Anderson & Allen, 2009; Hirayasu & Arase, 2015; Hudson & Allen, 2016; Kang et al., 2015; M. Lichterfeld & Yu, 2012; J. Zhang et al., 2017). A cet égard, l'expression des récepteurs immunomodulateurs de la famille des LILRs actuellement les mieux caractérisés, à la surface des cellules immunitaires, a également été étudiée dans le cadre de nos deux premiers objectifs.

Notre deuxième axe se focalise quant à lui sur les aspects fonctionnels, avec le développement d'outils permettant d'étudier au sein de la famille des LILRs, les récepteurs inhibiteurs LILRB1 et LILRB2 et leur implication dans le dysfonctionnement des cellules immunitaires au cours de l'infection par le VIH-1 ainsi que dans le modèle SIV.

Les récepteurs immunomodulateurs LILRB1 et LILRB2 ont largement été impliqués dans le dysfonctionnement des cellules immunitaires et principalement des cellules présentatrices d'antigènes au cours de l'infection par le VIH-1 (Jinghe Huang et al., 2009, 2010; Mathias Lichterfeld et al., 2007). Notre équipe a également montré une surexpression de LILRB2 et de ses ligands du CMH-I à la surface des cDCs dès la primo-infection par le VIH-1, ainsi que dans le modèle macaque cynomolgus d'infection par le SIV (Alaoui et al., 2018) dont la

physiopathologie de l'infection est comparable à celle du VIH-1 chez l'Homme (Estes et al., 2018; Evans & Silvestri, 2013).

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que le blocage de l'interaction de LILRB2 et LILRB1 avec leurs ligands du CMH-I pourrait améliorer les réponses immunitaires précoces au cours de l'infection par le VIH-1, et conduire à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative plus efficace.

Une validation *in vivo* de cette hypothèse est nécessaire pour attester de l'efficacité de cette potentielle stratégie d'immunothérapie contre le VIH-1. Actuellement, les anticorps monoclonaux (AcM) anti-LILRB1 ou -LILRB2 bloquant disponibles dans le commerce ne sont pas capables de reconnaître ces récepteurs chez les modèles macaques d'infection par le SIV.

Dans cette optique, l'objectif de ce deuxième axe a consisté à générer des AcM bloquants anti-LILRB1 et -LILRB2 afin d'étudier *in vivo* et *ex vivo* l'effet du blocage de ces récepteurs sur les réponses immunitaires dirigées contre le SIV et le VIH-1.

Pour atteindre ce dernier objectif, nous avons établi une stratégie expérimentale pour générer ces AcM murins bloquants, consistant à :

- 1) Cloner et caractériser les différents LILRs retrouvés chez le macaque cynomolgus (mLILRs) afin de produire des protéines de fusion mLILR-Fc et des lignées cellulaires de chaque mLILR, pour la génération et le criblage d'anticorps bloquants spécifiques.
- 2) Générer des AcM murins spécifiquement dirigés contre les récepteurs LILRB1 et/ou LILRB2 retrouvés chez l'Homme et le macaque cynomolgus.
- 3) Vérifier la capacité bloquante des AcM anti-LILRB1 et/ou -LILRB2 chez l'Homme et le macaque cynomolgus dans des modèles d'interaction *in vitro*.
- 4) Analyser la distribution des LILRs à l'aide des AcM bloquants sur les cellules myéloïdes primaires de l'Homme et du macaque cynomolgus.

Cette étude permettra d'obtenir et de caractériser des outils uniques pouvant aider à mieux définir le rôle des récepteurs inhibiteurs LILRB1 et LILRB2 dans les réponses immunitaires et la physiopathologie de l'infection par le SIV/VIH-1. Ces outils pourront également être utilisés dans des modèles macaques précliniques d'infection par le SIV pour déterminer si une stratégie thérapeutique visant à bloquer LILRB1 et/ou LILRB2 pourrait être envisagée pour restituer les réponses immunitaires dirigées contre le SIV et subséquentement contre le VIH-1.

Résultats

Article 1 : Mass Cytometry Analysis Reveals the Landscape and Dynamics of CD32a⁺ CD4⁺ T Cells From Early HIV Infection to Effective cART

Résumé de l'article publié le 4 Juin 2018 dans la revue *Frontiers in Immunology*.

Bien que la thérapie antirétrovirale combinée (cART) soit capable de réduire la réplication du VIH et la progression de la maladie vers le stade SIDA, un réservoir de lymphocytes T CD4⁺ infectés de manière latente persiste et peut rapidement rétablir une virémie élevée après interruption du traitement. Afin d'éliminer ces réservoirs viraux latents, une meilleure caractérisation du phénotype de ces cellules est nécessaire. A cet égard, le récepteur FcγRIIa, également appelé CD32a, a été proposé comme marqueur spécifique de lymphocytes T CD4⁺ infectés par le VIH de manière latente (Descours et al., 2017). Cependant, des études menées par d'autres laboratoires n'ont pas pu confirmer ces données, suscitant une controverse quant à la pertinence de ce récepteur en tant que marqueur caractéristique de la latence du VIH (Grau-Expósito et al., 2017; Wittner et al., 2017).

Au cours de cette étude, nous avons caractérisé par cytométrie de masse la diversité phénotypique des lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺ ainsi que leur dynamique chez des individus en primo-infection de VIH, avant et après un an de cART. Les lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺ de donneurs VIH⁻ ont également été analysés comme contrôle. En conditions physiologiques, le récepteur CD32a est habituellement exprimé par les cellules myéloïdes, suggérant la possible co-expression d'autres marqueurs myéloïdes sur les lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺ suite à l'infection au VIH. De ce fait, nous avons inclus des marqueurs lymphoïdes mais aussi myéloïdes pouvant aider à mieux caractériser le phénotype et l'hétérogénéité de cette population atypique de lymphocytes T CD4⁺. A cet égard, il a été montré que les récepteurs de la famille LILRs régulent directement l'activité des Fc récepteurs (FcRs), dont le CD32a (Baudhuin et al., 2013), et sont associés aux mécanismes de dérégulation des réponses immunitaires induites lors de l'infection par le VIH (Bashirova, Martin-Gayo, et al., 2014; Bego et al., 2015; Jinghe Huang et al., 2010; Mathias Lichterfeld et al., 2007; O'Connor et al., 2007; Vlad et al., 2003). Par conséquent, les récepteurs de la famille LILRs les mieux caractérisés dans la littérature ont été inclus à notre panel de cytométrie de masse pan-leucocytaire.

Les résultats obtenus après analyse non supervisée de nos données confirment la présence de lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺ chez les patients VIH⁺ et montrent également leur présence chez des donneurs VIH⁻. Nos données indiquent également que ces cellules comprennent des sous-populations hétérogènes, présentant une forte expression de molécules HLA-DR, et sont différemment affectées au cours de l'infection par le VIH. En effet, notre analyse révèle que des clusters (groupe de cellules possédant le même phénotype) de lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺ naïfs (N), mémoires centrales (CM) et effecteurs / mémoires (Eff / Mem) coexprimant les récepteurs activateurs LILRA2 et CD64, sont plus abondants chez les personnes séropositives que chez les donneurs séronégatifs pour le VIH. A l'inverse, des clusters de lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺ LILRA2⁻ sont plus abondants chez les donneurs VIH⁻. Enfin, un cluster constitué de lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺ T_{Eff/Mem} activés coexprimant LILRA2, CD57, NKG2C et CD317, est plus abondant chez les individus séropositifs, en particulier en primo-infection, et corrèle positivement avec la charge ADN du VIH. La purification de ce cluster de lymphocytes T CD4⁺ sera nécessaire pour confirmer la présence de provirus compétents pour la réplication et révéler sa contribution en tant que réservoir actif du VIH.

La présence de lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺ chez des individus VIH⁻ dans nos données indiquent que la molécule CD32a, exprimée par les lymphocytes T CD4⁺, ne peut pas être considérée comme un marqueur de latence spécifique du VIH. Néanmoins, nos données montrent que de multiples modifications de l'abondance des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺ se produisent dans la phase précoce de l'infection par le VIH, et certaines sont conservées après un an de cART. Parmi ces modifications, l'augmentation d'abondance de cellules exprimant fortement la molécule HLA-DR et les molécules LILRA2 et CD64, semble refléter un état d'activation important de ces cellules, engendré par l'infection au VIH. En conclusion, notre étude apporte une meilleure compréhension de l'hétérogénéité, de la dynamique, et de l'état d'activation des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺ au cours des différents stades de l'infection par le VIH, qui pourrait s'avérer utile à l'avenir dans les discussions sur les réservoir latents et/ou actifs du VIH.



Mass Cytometry Analysis Reveals the Landscape and Dynamics of CD32a⁺ CD4⁺ T Cells From Early HIV Infection to Effective cART

Sixtine Coindre¹, Nicolas Tchitchek¹, Lamine Alaoui¹, Bruno Vaslin¹, Christine Bourgeois¹, Cecile Goujard², Veronique Avettand-Fenoel³, Camille Lecuroux¹, Pierre Bruhns^{4,5}, Roger Le Grand¹, Anne-Sophie Beignon¹, Olivier Lambotte^{1,2}, Benoit Favier^{1*} and The ANRS CO6 PRIMO Cohort

¹CEA-Université Paris Sud 11-INSERM U1184, Immunology of Viral Infections and Autoimmune Diseases (IMVA), IDMIT Department, IBFJ, DRF, Fontenay-aux-Roses, France, ²Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique, Groupe Hospitalier Universitaire Paris Sud, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France, ³Paris Descartes University, EA 7327, Sorbonne Paris Cité, APHP, Necker Hospital, Virology Department, Paris, France, ⁴Institut Pasteur, Department of Immunology, Unit of Antibodies in Therapy and Pathology, Paris, France, ⁵INSERM, U1222, Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Aurelio Cafaro,
Istituto Superiore di
Sanità, Italy

Reviewed by:

Michael Betts,
University of Pennsylvania,
United States
Paul Urquhart Cameron,
University of Melbourne,
Australia

*Correspondence:

Benoit Favier
benoit.favier@cea.fr

Specialty section:

This article was submitted
to Viral Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 14 March 2018

Accepted: 15 May 2018

Published: 04 June 2018

Citation:

Coindre S, Tchitchek N, Alaoui L, Vaslin B, Bourgeois C, Goujard C, Avettand-Fenoel V, Lecuroux C, Bruhns P, Le Grand R, Beignon A-S, Lambotte O, Favier B and The ANRS CO6 PRIMO Cohort (2018) Mass Cytometry Analysis Reveals the Landscape and Dynamics of CD32a⁺ CD4⁺ T Cells From Early HIV Infection to Effective cART. *Front. Immunol.* 9:1217. doi: 10.3389/fimmu.2018.01217

CD32a has been proposed as a specific marker of latently HIV-infected CD4⁺ T cells. However, CD32a was recently found to be expressed on CD4⁺ T cells of healthy donors, leading to controversy on the relevance of this marker in HIV persistence. Here, we used mass cytometry to characterize the landscape and variation in the abundance of CD32a⁺ CD4⁺ T cells during HIV infection. To this end, we analyzed CD32a⁺ CD4⁺ T cells in primary HIV infection before and after effective combination antiretroviral therapy (cART) and in healthy donors. We found that CD32a⁺ CD4⁺ T cells include heterogeneous subsets that are differentially affected by HIV infection. Our analysis revealed that naive (N), central memory (CM), and effector/memory (Eff/Mem) CD32a⁺ CD4⁺ T-cell clusters that co-express LILRA2- and CD64-activating receptors were more abundant in primary HIV infection and cART stages. Conversely, LILRA2⁻ CD32a⁺ CD4⁺ T-cell clusters of either the T_N, T_{CM}, or T_{Eff/Mem} phenotype were more abundant in healthy individuals. Finally, an activated CD32a⁺ CD4⁺ T_{Eff/Mem} cell cluster co-expressing LILRA2, CD57, and NKG2C was more abundant in all HIV stages, particularly during primary HIV infection. Overall, our data show that multiple abundance modifications of CD32a⁺ CD4⁺ T-cell subsets occur in the early phase of HIV infection, and some of which are conserved after effective cART. Our study brings a better comprehension of the relationship between CD32a expression and CD4⁺ T cells during HIV infection.

Keywords: CD4⁺ T-lymphocytes, CD32a, mass cytometry CyTOF, primary HIV infection, combination antiretroviral therapy

INTRODUCTION

Effective combination antiretroviral therapy (cART) leads to the control of HIV replication and disease progression in HIV-infected patients (1, 2). Yet, a reservoir of latently infected CD4⁺ T cells persists despite effective cART and can rapidly re-establish high viremia following treatment interruption (3–6). Hence, characterization of latently infected CD4⁺ T cells is required for the design of therapeutic strategies to target HIV reservoirs. In this respect, a recent study showed that the Fc receptor

CD32a (also known as FcγRIIa) could be a critical marker for a substantial portion of the latently HIV-infected CD4⁺ T cells that harbor replication-competent proviruses (7). However, CD32a expression was also reported on CD4⁺ T cells displaying HIV replication and on CD4⁺ T cells from healthy donors (8–11), leading to controversy over the relevance of this marker for the characterization of latent HIV reservoirs. Moreover, CD4⁺ T cells include naive, effector, and memory populations that are differentially expanded and infected by HIV, in particular during primary infection (12, 13). Thus, evaluating the heterogeneity of CD32a⁺ CD4⁺ T cells in early HIV infection, before and after effective cART, could be helpful to better characterize the relationship between CD32a expression and HIV infection.

Here, we carried out a pan-leukocyte analysis of CD32a expression by mass cytometry to assess CD32a⁺ CD4⁺ T-cell diversity in primary HIV-infected patients longitudinally collected before and after 12 months of effective cART. We then compared differences in the abundance of the identified CD32a⁺ CD4⁺ T-cell subpopulations among all HIV⁺ stages and under healthy conditions. CD32a is generally found on myeloid cells but also appears to be specifically found on a subpopulation of CD4⁺ T cells associated with HIV persistence (7). Thus, our pan-leukocyte analysis included lymphoid and myeloid markers that could help to better characterize the phenotype and heterogeneity of CD32a⁺ CD4⁺ T cells. In this respect, we explored the expression of inhibitory and activating leukocyte immunoglobulin-like receptors (LILRs) that are distantly related to FcRs (14). LILRs are mainly distributed on myeloid cells, but some members are also found on T-cell subsets, similar to FcRs (15–18). Moreover, LILRs can directly regulate the activity of CD32a and CD64 (19–22) and play an important role in the dysregulation of immune responses against HIV (23–26).

Previous studies analyzed CD32 expression with only a pan-CD32 antibody. We thus also included antibodies that discriminate CD32a from CD32b to unambiguously identify CD32a⁺ CD4⁺ T cells. We also investigated the expression of CD16 and CD64, belonging to the FcR family, within the CD32a⁺ CD4⁺ T-cell population.

Here, we show that primary HIV and cART stages are associated with a higher proportion of CD32a⁺ CD4⁺ T cells, co-expressing LILRA2 and CD64, among naive (T_N), central memory (T_{CM}), and effector/memory (T_{Eff/Mem}) subpopulations. In addition, we found that a subset of activated T_{Eff/Mem} CD32a⁺ LILRA2⁺ CD57⁺ NKG2C⁺ cells was more abundant in all HIV stages and positively correlated with HIV DNA levels.

Altogether, our results unravel the diversity of CD32a⁺ CD4⁺ T cells and the various phenotypic changes that occur during early immune responses against HIV and after effective cART.

RESULTS

Mass Cytometry Analysis Reveals the Diversity of CD32a⁺ CD4⁺ T-Cell Populations Among HIV-Infected Patients and Healthy Donors

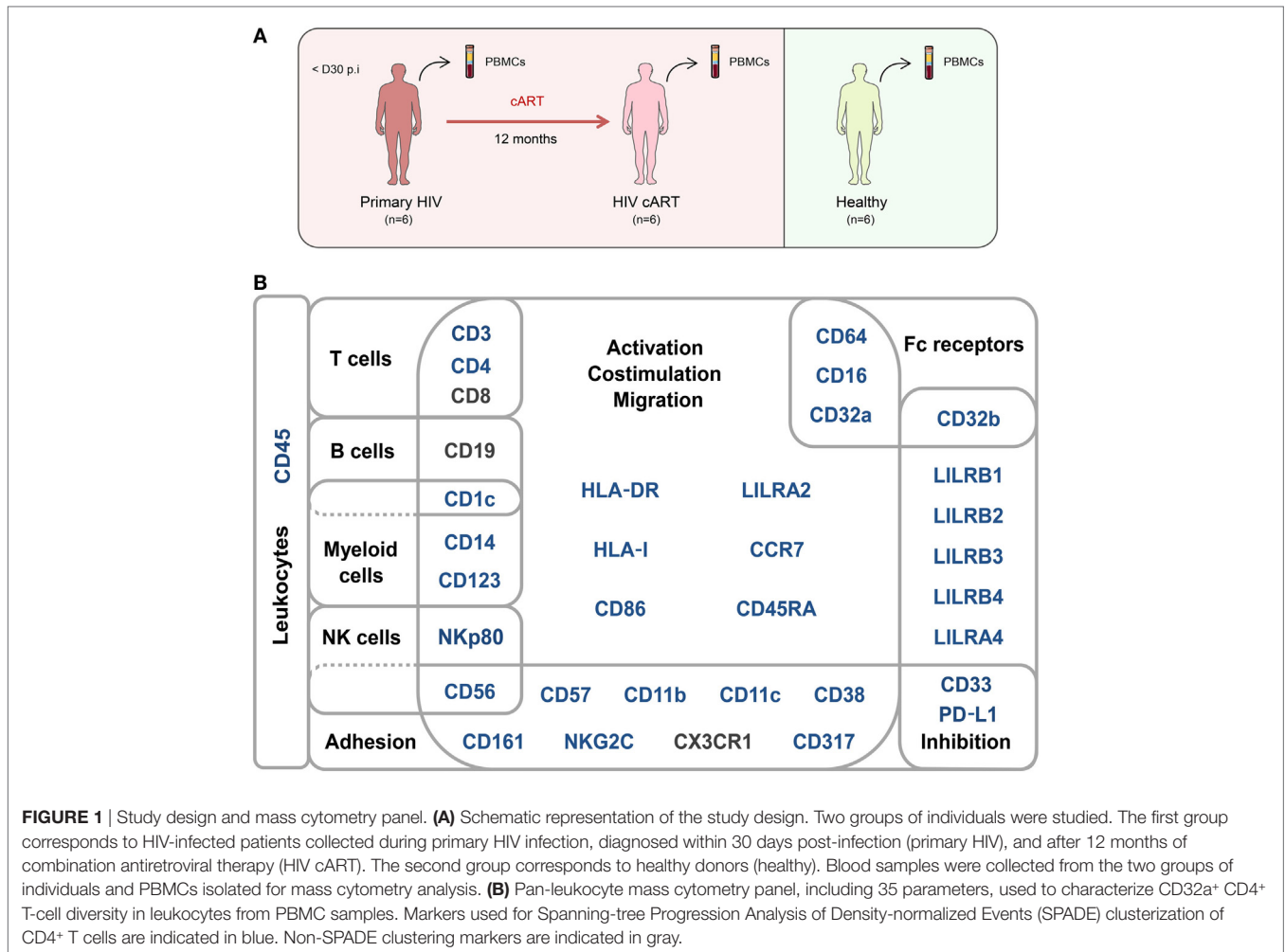
We characterized the heterogeneity of CD32a⁺ CD4⁺ T-cell populations in primary HIV-infected patients, before and after

effective cART, as well as in healthy donors, using a pan-leukocyte mass cytometry panel of 35 markers. For this purpose, a first group of six patients were longitudinally sampled at the time of diagnosis, in the primary phase of HIV infection (primary HIV), and after 12 months of successful cART (HIV cART). Primary HIV infection referred to blood samples collected between 18 and 30 days after HIV infection (Fiebig stage III/IV) with a high-level plasma viral load (number of copies/ml > 200,000) including parameters described by Krastinova et al. (27).

A second group of individuals was comprised of six healthy HIV-negative donors (healthy) (Figure 1A). Clinical characteristics of these groups are shown in Table 1. The pan-leukocyte mass cytometry panel included markers for lymphoid and myeloid cells, migration and adhesion markers, and activating and inhibitory immunoreceptors (Figure 1B). CD32 includes highly homologous isoforms (15). We thus used monoclonal antibodies that specifically recognize either CD32a (clone IV.3) or CD32b (clone 2B6) to avoid misinterpretation of the data (Table S1 in Supplementary Material). The specificity of these antibodies was confirmed by the detection of CD32a, but not CD32b, on monocytes and CD32b on only B cells (Figure S1 in Supplementary Material), in agreement with previous studies (15). Thus, our results unambiguously reflect CD4⁺ T cells expressing CD32a protein on their surface.

We applied a gating strategy to select the whole CD4⁺ T-cell population (CD19⁻, CD3⁺, CD8⁻, and CD4⁺) from total leukocytes (CD45⁺) (Figure S2 in Supplementary Material). We next characterized the simultaneous expression of the markers from our panel on total CD4⁺ T cells by performing a Spanning-tree Progression Analysis of Density-normalized Events (SPADE) (28). The SPADE algorithm aims to identify cell clusters with similar expression of selected markers, regardless of the sample cell origin (29). We benchmarked a set of parameters (as described in section “Materials and Methods”) to optimize the SPADE analysis. We obtained 322 CD4⁺ T-cell clusters from all cell samples, after excluding a few contaminant myeloid cell clusters, and generated a heatmap representing their respective relative marker expression (Figure S3 in Supplementary Material). The range of expression for each marker (5th to 95th percentiles of expression) is represented using a gradient color scale ranging from white (not expressed) to dark red (highly expressed) (Figure S4 in Supplementary Material). Some CD4⁺ T-cell clusters exhibited CD32a at their surface at various levels, as previously reported (7).

HIV latency was proposed to be associated with increased expression of CD32a (7). We thus focused on CD4⁺ T-cell clusters displaying high levels of CD32a (CD32a⁺), indicated on the heatmap in red and dark red (Figures S3 and S4 in Supplementary Material), and generated a second heatmap representing only CD32a⁺ CD4⁺ T-cell clusters (Figure 2A). The total number of cells (from all conditions) associated with each CD32a⁺ CD4⁺ T-cell cluster was quantified (Figure S5 in Supplementary Material). Characterization of these clusters revealed heterogeneous phenotypes within CD32a⁺ CD4⁺ T cells that were associated with naive (T_N: CCR7⁺ CD45RA⁺), central memory (T_{CM}: CCR7⁺ CD45RA⁻), and effector/memory (T_{Eff/Mem}: CCR7⁻ CD45RA⁻) subsets (Figure 2A). Further analysis showed that among CD32a⁺ CD4⁺ T-cell clusters, HIV⁺ patients under cART displayed a significantly higher proportion of T_{CM} than T_N ($p = 0.016$) (Figure S6 in Supplementary Material).



These subsets of CD32a⁺ CD4⁺ T_{CM} and T_N represented an average of 5.25 and 1.01% of HIV cART CD4⁺ T cells, respectively. CD32a was also expressed on CD4⁺ T cells from healthy donors (Figure S6 in Supplementary Material). In healthy donors, the proportion of CD32a⁺ CD4⁺ T cells was significantly higher among T_{CM} than T_N ($p = 0.034$), similar to HIV cART patients, representing an average of 3.37 and 1.20% of CD4⁺ T cells, respectively (Figure S6 in Supplementary Material). The percentages of CD32a⁺ CD4⁺ T_N, T_{CM}, and T_{Eff/Mem} also varied in primary HIV⁺ patients, but the differences were not statistically significant.

These results show that CD32a⁺ CD4⁺ T cells are present in HIV⁺ patients, as well as healthy donors, and are contained within heterogeneous populations showing naive, central memory, or effector/memory phenotypes that may be differentially affected by HIV infection.

Clusters of LILRA2⁺ CD32a⁺ CD4⁺ T Cells Are More Abundant in HIV-Primary Infection and After Effective cART

We determined whether HIV infection was associated with specific CD32a⁺ CD4⁺ T-cell clusters by characterizing the

differentially abundant clusters (DACs) between two conditions, including primary HIV vs. healthy donors, HIV cART vs. healthy donors, and primary HIV vs. HIV cART (Figure 2B). DACs were identified based on their cell abundance relative to that of CD32a⁺ CD4⁺ T cells. DACs showing a significantly ($p < 0.05$) higher cell proportion in each HIV⁺ stage (primary HIV and cART) vs. healthy donors (red arrows) were selected for further analysis.

Five DACs (#5, #258, #136, #86, and #261) were significantly more abundant in HIV⁺ patients in primary infection and after cART than in healthy donors (Figures 3A,B). One, cluster #5, was also significantly ($p = 0.045$) more abundant in primary HIV infection than after cART (Figure 3A). This cluster displayed an activated T_{Eff/Mem} (CCR7⁻ CD45RA⁻ HLA-DR^{mid} CD38⁺) phenotype, expressing the activating immune-receptor LILRA2 and the high-affinity IgG receptor CD64. Cluster #5 was also characterized by the expression of CD57, which is associated with replicative senescence, NKG2C-activating receptor, and the HIV-restriction factor CD317 (also known as BST2 or Tetherin) (Figure 3A).

We also analyzed the phenotype of the four other DACs that showed statistically significant differences in abundance between HIV-infected patients and healthy donors (Figure 3B). Two (#258

TABLE 1 | Summary of patient and subject clinical parameters.

	Primary HIV (n = 6)	→ HIV cART (n = 6)	Healthy (n = 6)
Age	34	35	35
Median (min–max), in years	(24–47)	(25–48)	(25–45)
Gender	M	M	M
Days since HIV-1 diagnosis	28	361	N/A
Median (min–max), in days	(18–29)	(290–372)	
Treatment	None	cART	None
HIV DNA	3.55	2.21	N/A
Median (min–max), in log ₁₀ copies/10 ⁶ PBMCs	(2.90–3.90)	(1.39–2.74)	
HIV RNA load	6.67	1	N/A
Median (min–max), in log ₁₀ copies/ml of plasma	(5.47–7.26)	(1–1.63)	
CD4 ⁺ T-cell count	470	843	856
Median (min–max), in 10 ³ cell/μl of blood	(258–669)	(570–1,247)	(634–1,412)

Twelve Caucasian men were involved in this study to constitute two groups of individuals. These groups are composed of six primary HIV-infected patients before treatment (primary HIV) and after 12 months of combination antiretroviral therapy (HIV cART) and six healthy subjects (healthy). The gender and median patient age, days since HIV-1 diagnosis, total DNA level, RNA viral load, and CD4⁺ T-cell count are indicated for each group.

cART, combination antiretroviral therapy; N/A, not applicable; M, male.

and #136) also displayed a T_{Eff/Mem} phenotype (CCR7⁻ CD45RA⁻), expressing LILRA2, CD64, and CX3CR1 (Figure 3B). However, cluster #258 showed an activated phenotype (HLA-DR⁺ CD38^{mid}), with co-expression of CD57, NKG2C, CD317, CD161, CD33, and CD11c, whereas cluster #136 displayed a resting profile (HLA-DR^{mid} CD38⁻), with medium expression of PD-L1. Finally, cluster #86 showed a resting T_{CM} phenotype (CCR7^{mid} CD45RA⁻ HLA-DR^{mid} CD38⁻), co-expressing LILRA2, CD64, and CX3CR1, and cluster #261 was associated with an activated T_N profile (CCR7⁺ CD45RA^{mid} HLA-DR^{mid} CD38^{mid}), co-expressing immunomodulatory receptors LILRA2, CD64, CX3CR1, LILRB4, CD32b, CD161, CD33, costimulatory/inhibitory molecules CD86 and PD-L1, and HIV-restriction factor CD317.

Our analysis demonstrates that specific LILRA2⁺ CD64⁺ CD32a⁺ CD4⁺ T-cell clusters, characterized by naive and memory T-cell phenotypes, were more abundant in HIV⁺ patients from the early phase of infection. Among these clusters, the activated T_{Eff/Mem} CD32a⁺ LILRA2⁺ CD57⁺ NKG2C⁺ cluster (#5) showed a gradient of abundance which was lowest in healthy samples, higher in those undergoing cART, and highest in those with a primary HIV infection. These data suggest that the increase in the proportion of the activated T_{Eff/Mem} CD32a⁺ LILRA2⁺ CD57⁺ NKG2C⁺ subset occurred early during HIV infection and that it remained elevated, but to a lesser extent, after effective cART.

The Proportion of the LILRA2⁻ CD32a⁺ CD4⁺ T-Cell Subset Is Lower in Primary HIV Infection and cART Stages Than in Healthy Condition

We also investigated whether some clusters of CD32a⁺ CD4⁺ T cells were more abundant in healthy individuals, since a small

portion of T cells from healthy donors were previously found to express CD32 (9–11). We thus focused on DACs that were significantly less abundant in primary HIV and cART patients than in healthy donors (Figures 3C,D).

Six DACs (#241, #162, #312, #243, #188, and #142) were significantly less abundant in all HIV⁺ stages than in healthy donors (Figures 3C,D). Clusters #241 and #162 were also significantly less abundant in primary HIV infection than after cART (Figure 3C). These clusters displayed a resting T_{Eff/Mem} phenotype (CCR7⁻ CD45RA⁻ HLA-DR^{mid} CD38⁻) and highly expressed CD161 (Figure 3C). Moreover, they also showed medium expression of CD64, CX3CR1, and CD33 (high for cluster #241). Cluster #241 also displayed medium expression of CD317, CD32b, and CD11c (Figure 3C).

The four other DACs (#312, #243, #188, and #142) showed no statistical difference in abundance between primary HIV-infected patients before and after effective cART (Figure 3D). Two DACs, clusters #312 and #243, were associated with a resting T_{CM} phenotype (CCR7⁺ CD45RA⁻ HLA-DR^{mid} CD38⁻), with medium expression of CD64, CX3CR1, LILRB4, and CD33 for cluster #243 (Figure 3D). Finally, clusters #188 and #142 displayed an activated (HLA-DR^{mid} CD38⁺) and resting (HLA-DR^{mid} CD38⁻) T_N profile (CCR7⁺ CD45RA^{+/mid}), respectively. They also showed expression of CD64, CX3CR1, and CD33, with cluster #188 co-expressing LILRB4 and PD-L1 and cluster #142 co-expressing CD86, CD161, and CD14.

Our data show that the proportion of CD32a⁺ CD4⁺ T-cell clusters with specific resting memory or resting/activated naive phenotypes in healthy donors are significantly reduced during HIV infection. In contrast to the HIV-associated subsets, these clusters showed low expression of CD64 and no expression of LILRA2. This suggests that LILRA2 expression may be associated with CD32a⁺ CD4⁺ T cells that are preferentially preserved, differentiated, and/or expanded from primary HIV infection to the cART stage. Finally, our data also demonstrate that T_{Eff/Mem} CD32a⁺ LILRA2⁻ CD161⁺ clusters are less represented during primary HIV infection than under cART and healthy conditions, suggesting that early infection induces their depletion or phenotypic modification.

Cell Abundance of the LILRA2⁺ CD32a⁺ CD4⁺ T-Cell Cluster #5 Correlates With HIV DNA Levels

The total amount of HIV DNA in PBMCs has been shown to correlate with the size of HIV reservoir (30). Therefore, we next investigated whether the abundance of CD32a⁺ CD4⁺ T cells was associated with HIV DNA in PBMCs. There was no correlation between HIV DNA levels and the percentage of total CD32a⁺ cells among CD4⁺ T cells (Figure S7A in Supplementary Material), in accordance with previous studies (10, 11). Thus, we further investigated the association of HIV DNA levels with the abundance of cell populations at the cluster level. Correlations were based on the number of cells associated with each cluster relative to the number of cells in the parent population, corresponding, respectively, to CD32a⁺ CD4⁺ T cells or CD4⁺ T cells.

Among the CD32a⁺ CD4⁺ T-cell clusters, 10 significantly (Pearson correlation coefficient > 0.65, *p* < 0.05) correlated with

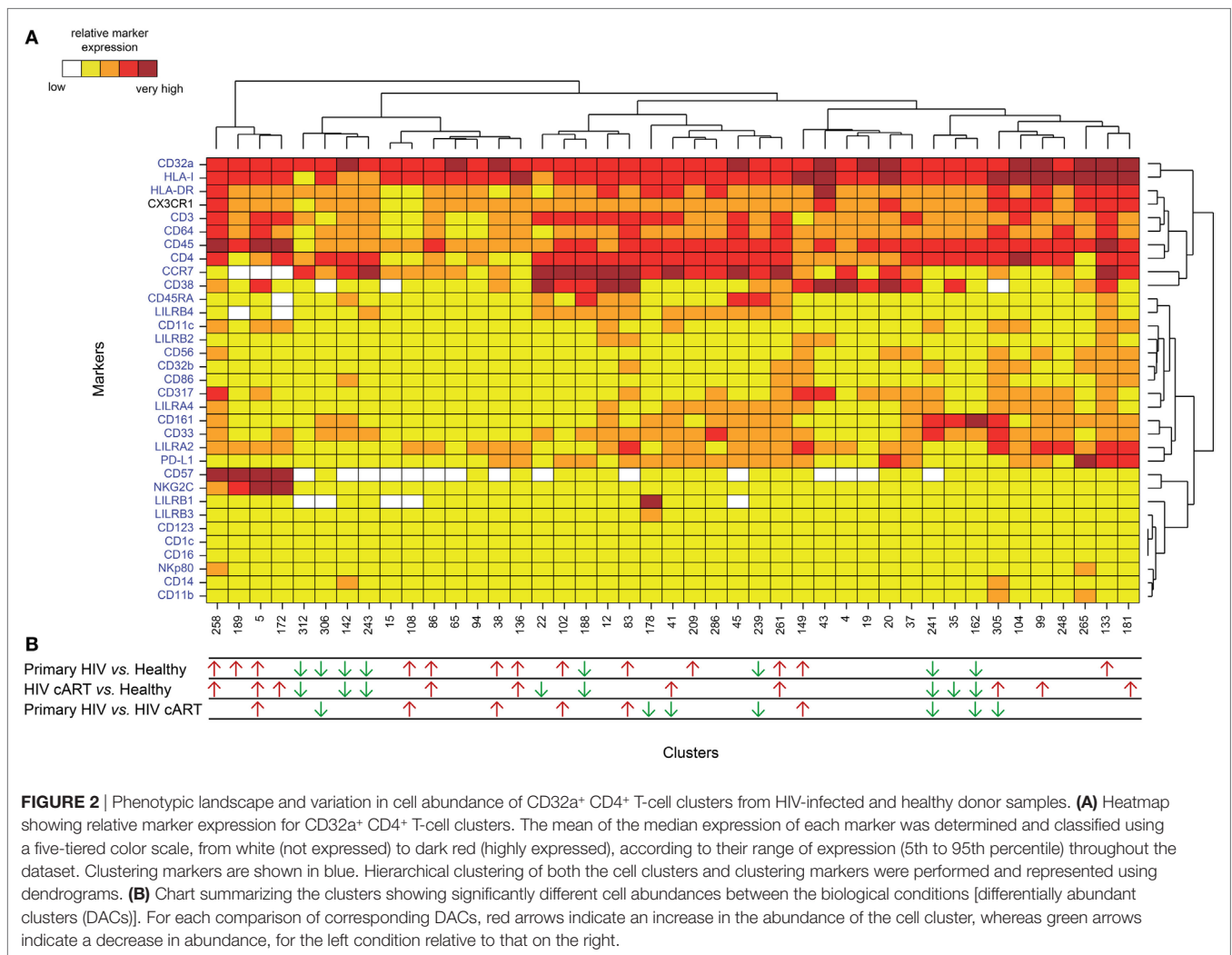


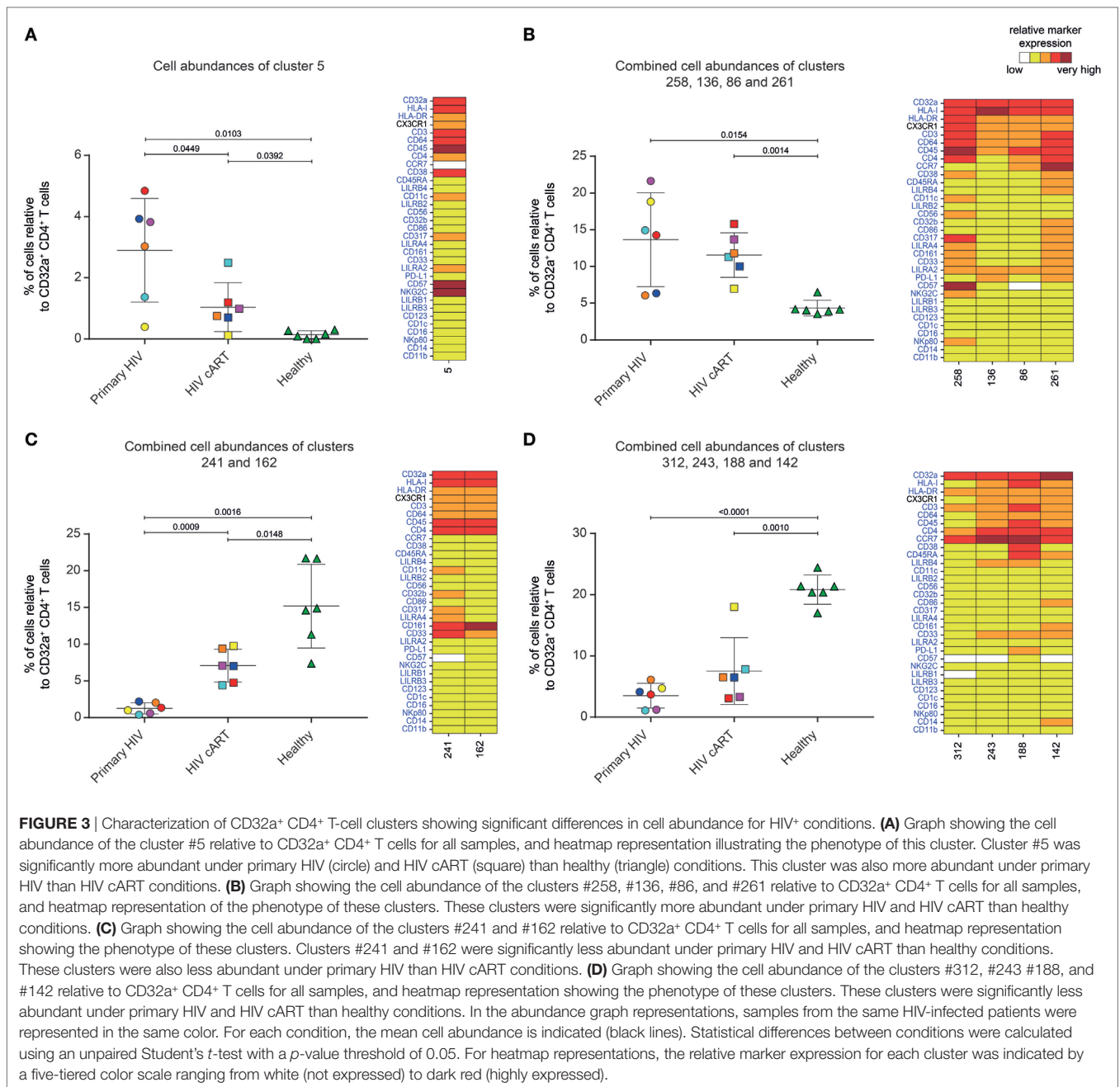
FIGURE 2 | Phenotypic landscape and variation in cell abundance of CD32a⁺ CD4⁺ T-cell clusters from HIV-infected and healthy donor samples. **(A)** Heatmap showing relative marker expression for CD32a⁺ CD4⁺ T-cell clusters. The mean of the median expression of each marker was determined and classified using a five-tiered color scale, from white (not expressed) to dark red (highly expressed), according to their range of expression (5th to 95th percentile) throughout the dataset. Clustering markers are shown in blue. Hierarchical clustering of both the cell clusters and clustering markers were performed and represented using dendrograms. **(B)** Chart summarizing the clusters showing significantly different cell abundances between the biological conditions [differentially abundant clusters (DACs)]. For each comparison of corresponding DACs, red arrows indicate an increase in the abundance of the cell cluster, whereas green arrows indicate a decrease in abundance, for the left condition relative to that on the right.

HIV DNA levels (**Figure 4A**). Six were differentially abundant between HIV⁺ and healthy conditions (**Figure 2B**). Among them, clusters for which the abundance negatively correlated with HIV DNA levels were those previously identified as resting T_{Eff/Mem} #241 and #162, T_{CM} #312 and #243, and T_N #142 clusters. However, these clusters did not negatively correlate with HIV DNA levels among CD4⁺ T-cell clusters (**Figure 4B**). Our analysis revealed only cluster #5 was differentially abundant between HIV⁺ and healthy conditions and positively correlated with HIV DNA levels (Pearson correlation coefficient = 0.690, $p = 0.0015$) (**Figure 4**; Figure S7B in Supplementary Material). This correlation was observed among both CD32a⁺ CD4⁺ and CD4⁺ T-cell clusters (**Figure 4**). Cluster #5 also showed unique significant differences in abundance relative to CD4⁺ T cells between all conditions (Figure S8A in Supplementary Material). This activated T_{Eff/Mem} CD32a⁺ LILRA2⁺ CD57⁺ NKG2C⁺ subset represented an average of 0.37% of primary HIV CD4⁺ T cells vs. only 0.1 and 0.01% under HIV cART and healthy conditions, respectively (Figure S8A in Supplementary Material). We also determined the percentages of cells (relative to CD4⁺ T cells)

associated with the clusters described in **Figure 3** (Figures S8B–D in Supplementary Material).

We further characterized the phenotype of this activated T_{Eff/Mem} CD32a⁺ LILRA2⁺ CD57⁺ NKG2C⁺ subset by quantifying differences in marker expression between this subset and all CD4⁺ T cells by the Kolmogorov–Smirnov distance (KS) (Figure S9 in Supplementary Material). CD57 showed the highest difference between cluster #5 and the whole set of CD4⁺ T cells (KS = 0.9214). The next most distant markers were CCR7 (KS = 0.6434), CD32a (KS = 0.6387), CD45 (KS = 0.5899), NKG2C (KS = 0.5892), CD38 (KS = 0.4817), HLA-I (KS = 0.4619), CD64 (KS = 0.3763), LILRB1 (KS = 0.3130), and LILRA2 (KS = 0.3036). These results are consistent with the phenotypic characterization of cluster #5 displayed in the heatmap representation (**Figure 2A**). Moreover, these data provide further details on the specificity of the markers associated with this cluster that could be helpful for cell sorting.

Overall, our results show that the abundance of the LILRA2⁺ CD32a⁺ CD4⁺ T-cell cluster, displaying an activated T_{Eff/Mem} phenotype and co-expressing CD57, NKG2C, and CD317 positively correlated with HIV DNA levels.



DISCUSSION

A previous study has proposed CD32a as a specific marker of CD4 T latently infected cells (7). However, CD32a was also reported on CD4⁺ T cells showing HIV replication and on CD4⁺ T cells from healthy donors; suggesting a complex relationship between HIV infection and CD32a expression on CD4⁺ T cells (8–11). Here, we aimed to better characterize the heterogeneity and abundance of CD32a⁺ CD4⁺ T cells in various conditions including primary HIV infection, cART, and healthy conditions. Indeed, CD4⁺ T cells include various subsets that are selectively activated during early HIV infection, resulting in changes in

protein expression and clonal expansion. In addition, CD4⁺ T-cell subsets are differentially infected and killed by HIV, thus increasing the complexity of their dynamics during the infection.

High-dimensional analyses are critical for disentangling the numerous cellular and molecular events induced by HIV infection. Our mass cytometry panel included typical and atypical T-cell markers that may be associated with the uncommon expression of CD32a on CD4⁺ T cells during HIV infection. Moreover, all previous studies carried out flow-cytometry analysis using a pan anti-CD32 antibody that binds both CD32a and CD32b receptors, possibly leading to misinterpretation of the data (7, 10). We thus included antibodies that make it possible

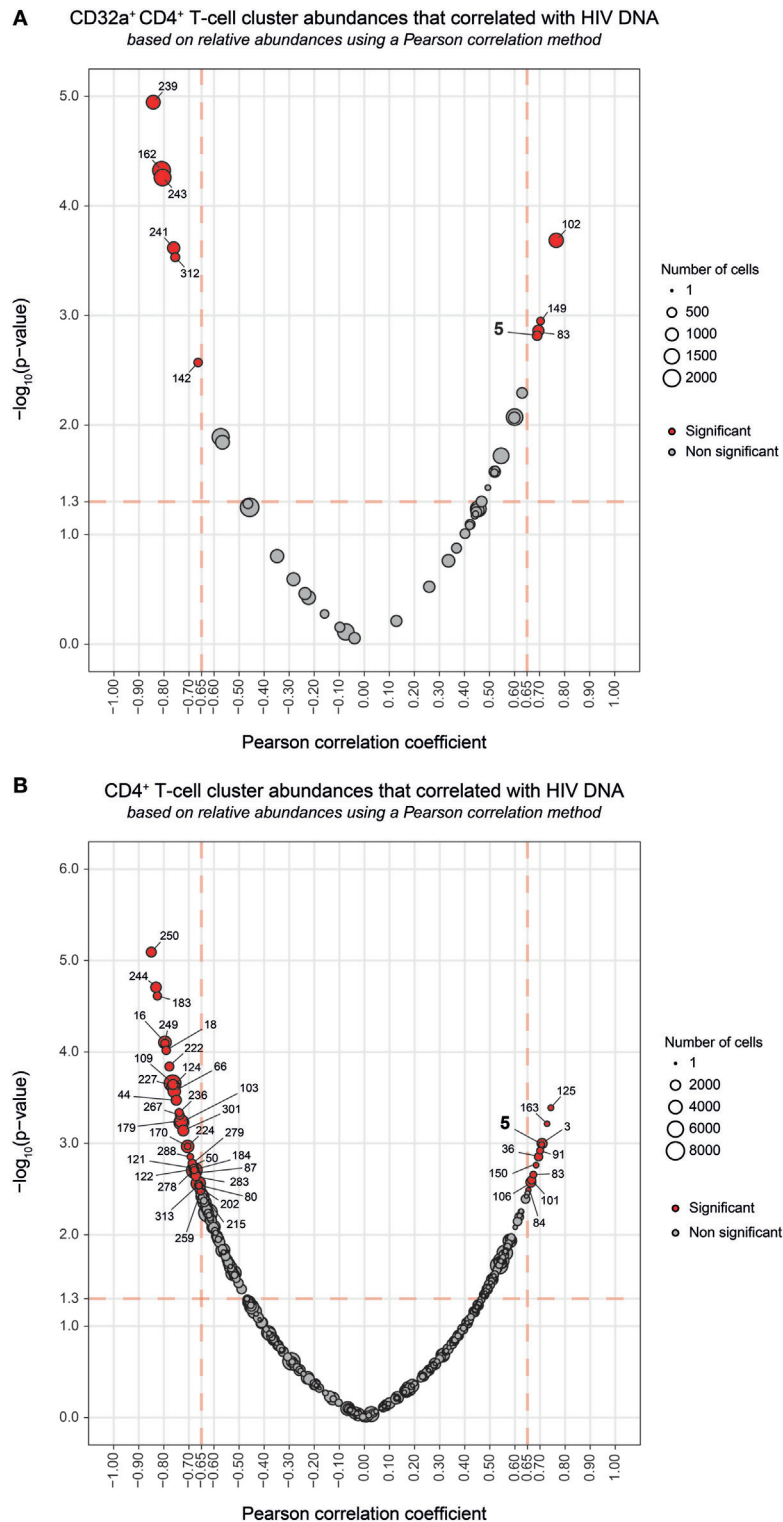


FIGURE 4 | Correlation analyses of CD32a⁺ CD4⁺ and CD4⁺ T-cell cluster abundances with HIV DNA levels. **(A,B)** Correlations were based on the number of cells associated with each cluster relative to the number of cells in the parent population, corresponding to CD32a⁺ CD4⁺ T cells or CD4⁺ T cells, respectively. Clusters having an abundance positively (right) or negatively (left) correlated with total HIV DNA levels are represented in red. The two-dimensional charts represent the association between the cell abundance and total HIV DNA for each cluster using the Pearson correlation coefficient and associated *p*-value. Each dot in the representation corresponds to a cell cluster. Significantly correlated clusters are indicated in red with a Pearson correlation coefficient > 0.65 and a *p*-value < 0.05. The size of the dot is proportional to the number of cells of the whole dataset associated with the cluster. The Pearson correlation coefficient is represented on the X-axis and the associated *p*-value, shown as $-\log_{10}$, on the Y-axis. Cluster #5 is indicated in bold.

to clearly distinguish CD32a from CD32b isoforms (Figure S1 in Supplementary Material). Hence, our data unambiguously reflect CD4⁺ T cells expressing CD32a, but not CD32b, protein on their surface (Figure 2A).

Our study showed that CD32a⁺ CD4⁺ T cells can be found not only in HIV⁺ patients but also in healthy donors and encompass heterogeneous populations. Indeed, we detected CD32a⁺ CD4⁺ T cells from HIV-infected patients and healthy donors within T_{CM}, T_{Eff/Mem}, and T_N subsets. Under cART and healthy conditions, the proportion of CD32a⁺ T_{CM} was significantly higher than CD32a⁺ T_N (Figure S6 in Supplementary Material). These data are in accordance with previous reports showing CD32 expression on small subsets of CD4⁺ or CD8⁺ T cells from healthy donors (9–11). Moreover, we also showed that some CD32a⁺ CD4⁺ T-cell subsets were more abundant under healthy than HIV⁺ conditions (Figures 3C,D). Such subsets of CD32a⁺ CD4⁺ T cells may be more prone to depletion or modification of protein expression during HIV infection, resulting in the negative correlation of their abundance with total HIV-DNA levels observed in our study (Figure 4A).

We analyzed the abundance of CD32a⁺ CD4⁺ T-cell clusters in HIV⁺ patients in the primary-infection phase and after effective cART and compared them with those from healthy donors (Figure 3). CD32a⁺ CD4⁺ T-cell clusters co-expressing LILRA2 and CD64 were highly represented in all HIV⁺ stages, in contrast to healthy conditions. Conversely, the proportion of CD32a⁺ CD4⁺ T-cell clusters with lower CD64 and negative LILRA2 expression was higher under healthy conditions. These data suggest that LILRA2 expression may be associated with CD32a⁺ CD4⁺ T cells that are preserved, differentiated, and/or expand in primary HIV infection and maintained after effective cART. A previous study reported that LILRA2 is expressed by monocytes and neutrophils and recognizes bacterially cleaved immunoglobulin, leading to the activation of signaling pathways and subsequent immune responses (31). Thus, CD64⁺ LILRA2⁺ CD32a⁺ CD4⁺ T-cell populations that increase in proportion during primary HIV infection and cART treatment may be more prone to activation through the engagement of CD32a, CD64, or LILRA2 activating receptors. Given that CD4⁺ T cells can uptake membrane fragments during cell–cell interactions through a process named trogocytosis (32, 33), it is also possible that the expression of uncommon myeloid markers on the surface of CD32a⁺ CD4⁺ T cells could result from intercellular membrane exchanges. Analysis of the distribution of these molecules on CD4⁺ T cells by confocal microscopy but also characterization at mRNA level should be helpful to determine the implication of trogocytosis in the unusual markers found on CD32a⁺ CD4⁺ T cells.

Among LILRA2⁺ CD32a⁺ CD4⁺ T-cell clusters that were more abundant in HIV⁺ stages, only cluster #5 was also more abundant during primary HIV infection than during cART treatment. This cluster showed an Eff/Mem phenotype and displayed high expression of CD38, CD57, NKG2C, and CD317 restriction factor for HIV that retains nascent virions at the cell surface, thus preventing their release (34). Expression of NKG2C was reported on a rare CD4⁺ T-cell population in pathological situations, such as multiple sclerosis or cytomegalovirus (CMV) infection (35, 36). In addition, the expression of CX3CR1 was reported on CMV-specific CD4⁺ T cells in patients showing HIV-associated

atherosclerosis (37). In this regard, CMV serological status was assessed in HIV⁺ samples and demonstrated that patients were already positive for IgG (but not IgM), indicating they were not in the primary stage of CMV infection. In addition, no clinical parameters associated with CMV reactivation were detected during our study, ruling-out the implication that cluster abundance modification was a result of CMV activity.

Previous studies based on classical CD4⁺ T-cell markers could not detect any correlation between the percentage of CD32⁺ CD4⁺ T-cell subsets and the amount of HIV DNA (10, 11). We found a single cluster (#5) that positively correlated with HIV DNA levels, not only among the CD32a⁺ CD4⁺ T-cell clusters but also the CD4⁺ T-cell clusters (Figure 4; Figure S7B in Supplementary Material). These results suggest that not all CD32a⁺ CD4⁺ T cells are associated with HIV DNA, but only specific subsets, including the activated T_{Eff/Mem} CD32a⁺ LILRA2⁺ CD57⁺ NKG2C⁺ subset. The abundance of this subset was significantly higher in HIV⁺ samples than those from healthy donors and also higher in primary HIV infection than after cART. It was previously reported that the total amount of HIV DNA reflects the global HIV reservoir (30). Thus, due to its formation during the early stages of HIV infection and its maintenance under cART, this CD32a⁺ LILRA2⁺ CD57⁺ NKG2C⁺ T_{Eff/Mem} cluster displaying an activated profile may contribute to HIV persistence as an active reservoir. However, our analysis does not directly show the presence of higher levels of HIV DNA in CD4⁺ T cells belonging to this cluster. Moreover, total HIV DNA included integrated and non-integrated viral genomes coding for both competent and defective viruses. Therefore, future studies with purified CD32a⁺ CD4⁺ T cells are required to determine if there is an enrichment with HIV DNA within this cluster and if this DNA supports viral transcription.

Our analysis also revealed that numerous CD32a⁺ CD4⁺ T-cell clusters show expression of HLA-DR. These data are in agreement with a recent study demonstrating that a high portion of CD32⁺ CD4⁺ T cells from HIV-infected patients under cART express HLA-DR (38). In this regard, most of the samples analyzed in our study were collected from HIV⁺ patients under cART, or in early phase of HIV infection (before cART), which is associated with enhanced immune activation and high viral load. Hence, it is likely that the samples acquired from HIV⁺ patients may account for the elevated number of HLA-DR⁺ CD32a⁺ CD4⁺ T-cell clusters found in our analysis. Moreover, concordantly with the study from Abdel-Mohsen et al., our results show that some activated, and not resting, CD32a⁺ CD4⁺ T-cell clusters positively correlated with the level of HIV DNA (38).

In conclusion, our results unravel the landscape and abundance modifications of CD32a⁺ CD4⁺ T cells induced from early HIV infection to effective cART. Overall, this study brings a new view of CD32a⁺ CD4⁺ T cells during HIV infection that could be helpful in the discussions about HIV persistence and reservoirs.

MATERIALS AND METHODS

Study Subjects and Ethics Statements

All 12 subjects gave written informed consent to participate in the study. This study involved patients with primary HIV-1

infection enrolled in the French ANRS CO6 PRIMO cohort, which was approved by the Ethics Committee of Cochin Hospital. Patients were enrolled in the study if HIV infection was estimated to have occurred less than 30 days previously. All patients were antiretroviral naive and were negative for hepatitis B and C viruses. Even though the HIV⁺ patients show previous CMV infection (IgM⁻/IgG⁺), there were no clinical signs of reactivation of CMV since HIV diagnosis. Blood samples were collected at enrollment. Patients were then placed under antiretroviral treatment, and 12 months later, new blood samples were collected. The plasma HIV-RNA load was measured, as well as the number of total HIV-DNA copies per million PBMCs. CD4⁺ T cells were also counted for each sample before and after cART. All primary HIV-infected patients showed a viral load of fewer than 50 copies of viral RNA/ml and had more than 500 CD4⁺ T cells/ μ l of blood once under cART. This study also involved blood samples of healthy subjects obtained from the Etablissement Français du Sang.

Sample Processing and Storage

PBMCs from each sample were isolated by Ficoll density gradient centrifugation. The number of viable PBMCs was determined using an automated blood counter (Vi-Cell/Beckman Coulter). Approximately 10 million PBMCs were put in a cryotube with 90% heat-inactivated FBS (Eurobio) and 10% DMSO (Sigma). All samples were stored at -150°C in cryotubes.

HIV DNA Quantification

Total HIV DNA was quantified in PBMCs by qPCR (Biocentric, Bandol, France), as previously described (39).

Antibodies

Antibodies (listed in Table S1 in Supplementary Material) were either pre-conjugated from the manufacturer (Fluidigm, San Francisco, CA, USA) or conjugated in-house with the appropriate metal isotopes. Between 200 and 400 μg pure mAbs (carrier-protein-free) from various manufacturers were coupled to Lanthanide from the MaxPar Antibody Labeling Kit X8 4Rxn (Fluidigm). Conjugated Abs were adjusted to 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in Ab Stabilizer Solution (Candor, Biosciences, Wangen, Germany), supplemented with 0.01% sodium azide (Santa Cruz Biotechnology), and stored at 4°C . Abs conjugated in-house, as well as those obtained pre-conjugated, were titrated and validated on samples that were processed identically to those used in the study.

Cell Staining

All samples were stained on the same day with the same batch of antibodies and acquired within 1 day to avoid batch effects and instrument signal fluctuations. Cells were thawed, and 200 μl of the suspension containing 5×10^6 PBMCs transferred per well. PBMCs were incubated 20 min at 37°C with 1 μM Rhodium DNA-intercalator (Fluidigm). Cells were then washed twice with staining buffer (BD Biosciences) and stained with the primary surface antibody mix in a total volume of 60 μl staining buffer. Cells were incubated for 1 h at 4°C and washed twice. The secondary surface antibody mix was added to the cells in a total volume of 50 μl staining buffer and incubated

for 15 min at 4°C . After two washes, cells were resuspended in 200 μl 1.6% PFA (EMS 15710) in PBS (Invitrogen) and incubated 20 min at 4°C . Cells were then washed twice in permeabilization buffer (eBioscience) and incubated 30 min at 4°C in 200 μl permeabilization buffer with 1 μM Iridium DNA-intercalator (Fluidigm). After two washes, PBMCs were incubated at 4°C overnight in 200 μl 1.6% PFA with 0.1 μM Iridium DNA-intercalator. For acquisition, cells were washed once with staining buffer, once with PBS, and twice with ddH₂O and filtered through a cell strainer cap of a 5-ml polystyrene round-bottom tube (BD Biosciences). Fifty microliters of normalization beads (Fluidigm) were added to each sample. Then, samples were acquired using a mass cytometer (CyTOF; Fluidigm) following the standard procedure recommended by the manufacturer. An average of $207,233 \pm 17,141$ events was acquired per sample.

Data Normalization

Raw cytometry profiles generated by CyTOF were normalized with the MatLab Compiler software normalizer (40), using the signal from the normalization beads, as recommended by the software developers.

Manual Gating of CD45⁺ CD4⁺ T Cells

Normalized events were gated to exclude doublets and triplets from the analysis by selecting cells with only one Iridium level. Then, beads added for normalization and dead cells were removed by selecting cells negative for Cerium (Ce140) and Rhodium, respectively. Finally, leukocytes were selected based on the positive expression of CD45. CD4⁺ T cells were then selected based on the expression of CD3, CD19, CD4, and CD8 (Figure S2 in Supplementary Material). After this gating strategy, an average of $28,305 \pm 3,375$ cells remained per sample.

Automatic Identification of Cell Clusters

The automatic identification of cell clusters was performed using SPADE with the publicly available R package. We observed large differences in the number of manually gated CD4⁺ T cells in each sample, ranging from 6,864 to 53,599 cells. We avoided over-representation of cell populations present in samples with a high number of cells by first randomly selecting 6,864 cells for each sample. This number corresponded to the sample with the lowest number of cells. These uniformly down-sampled events were up-sampled at the end of the SPADE analysis to better ascertain the phenotype of identified clusters. The SPADE heatmap was generated using 32 clustering markers (shown in blue **Figure 1B**). CD8 and CD19 were discarded from the SPADE analysis as we used them to pre-select CD4⁺ T cells and CX3CR1 was not included in the set of clustering markers due to high heterogeneity of expression among samples. SPADE was parametrized to identify 350 cell clusters using a down-sampling parameter of 40%. These parameters were found to be the most efficient to obtain clusters with uniform phenotypes with a sufficient number of associated cells by SPADEVizR (29). Uniform clusters were defined as those with unimodal density expression (Hartigan's dip test) and a low range of expression (IQR < 2) for all clustering markers.

Phenotypic Characterization of Identified Cell Clusters

The phenotypic categorization of the 350 cell clusters was performed using SPADEVizR (29), based on the average median expression of each marker for all individuals. Marker expression was classified into five relative expression categories. The categories were defined based on the range of expression (5th to 95th percentile) of each marker relative to that of CD4⁺ T cells. The marker intensity ranges were then divided into five uniform categories representing negative, low, medium, high, and very high marker expression and represented using a color scale ranging from white to dark red on the heatmaps. Hierarchical clustering was computed based on the Euclidian distance, using the complete linkage method.

Clusters displaying a myeloid phenotype were identified among the 350 cell clusters and removed from the SPADE analysis, leaving only CD4⁺ T-cell clusters. In addition, clusters with less than 40 cells were also removed from the analysis, as their phenotypes could not be assessed accurately. Thus, 322 CD4⁺ T-cell clusters remained from the 350 SPADE clusters. Finally, CD4⁺ T-cell clusters displaying high or very high expression of CD32a (named CD32a⁺) were selected to perform all analyses.

Detailed phenotypic characterization of cluster five relative to other CD4⁺ T-cell clusters was performed using CytoCompare (41), based on the KS, using a threshold of 0.30.

Identification of DACs and Correlating Clusters

Differentially abundant clusters were identified using SPADEVizR (29), based on the percentage of cells in the clusters relative to total CD32a⁺ CD4⁺ T cells by unpaired Student's *t*-tests with a fold-change threshold of 2 and a *p*-value threshold of 0.05. Correlated clusters (CCs) were identified based on the percentage of cells in clusters relative to either CD32a⁺ CD4⁺ or CD4⁺ T cells that correlated with total HIV DNA levels. CCs were also identified using SPADEVizR and based on the Pearson correlation coefficient with a threshold of 0.65 and a *p*-value < 0.05.

Data Availability

Normalized cytometry profiles are available on the FlowRepository database through accession number FR-FCM-ZYGJ.

ETHICS STATEMENT

All 12 subjects gave written informed consent to participate in the study. This study involved patients with primary HIV-1 infection enrolled in the French ANRS CO6 PRIMO cohort, which was approved by the Ethics Committee of Cochin Hospital.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: SC, A-SB, OL, RG, and BF. Methodology: SC, NT, LA, A-SB, OL, RG, and BF. Validation: SC, NT, LA, BV, CB, CG, VA-F, CL, PB, RG, A-SB, OL, and BF. Formal analysis: SC, NT, LA, VA-F, CB, CG, BV, A-SB, OL, RG, and BF. Investigation: SC, LA, NT, and BF. Resources: CG, VA-F, CL, PB, and A-SB.

Writing—original draft: SC, NT, and BF. Writing—review and editing: SC, NT, BV, CB, CG, VA-F, PB, RG, A-SB, OL, and BF. Supervision: RG, A-SB, OL, and BF.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the ANRS (French National Agency for AIDS research) CO6 PRIMO cohort for helpful collaboration and all the medical professionals involved in blood sampling at the Hôpital Kremlin-Bicêtre. We also thank Bruno Iannascoli (Institut Pasteur) for the *in vitro* production of anti-CD32b antibodies. This work was supported by French government “Programme d'Investissements d'Avenir” (PIA) under Grant ANR-11-INBS-0008 that fund the Infectious Disease Models and Innovative Therapies (IDMIT, Fontenay-aux-Roses, France) infrastructure and PIA grant ANR-10-EQPX-02-01 that funds the FlowCyTech facility.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01217/full#supplementary-material>.

FIGURE S1 | Characterization of CD32a and CD32b antibody specificity by mass cytometry. Representative analysis of metal-conjugated CD32a-Dy161 (upper panels) and CD32b-Sm149 (lower panels) antibody staining of monocytes, B cells, and CD4⁺ T cells performed on PBMCs from one healthy donor (out of six) using FlowJo software.

FIGURE S2 | Gating strategy used to identify CD4⁺ T cells. “Singlets” were identified using cell length vs. Ir191-DNA intercalator and calibration beads were excluded (cells no beads). Living leukocytes were identified by selecting Rhodium (Rh103)Di-negative cells and then CD45⁺ cells. Finally, CD4⁺ T cells were identified by gating on CD3⁺ CD19⁻ and then CD4⁺ CD8⁻ cells.

FIGURE S3 | Phenotypic landscape of CD4⁺ T-cell Spanning-tree Progression Analysis of Density-normalized Events (SPADE) clusters. A heatmap showing relative marker expression for SPADE clusters was generated. The mean of the median expression of each marker was determined and classified in a five-tiered color scale, from white (not expressed) to dark red (highly expressed), according to their range of expression (5th to 95th percentile) throughout the dataset. Clustering markers are shown in blue. Hierarchical clustering of both the cell clusters and clustering markers were performed and are represented by dendrograms.

FIGURE S4 | Relative range of marker expression of Spanning-tree Progression Analysis of Density-normalized Events clusters. Graph showing the relative range of marker expression of clusters obtained after manual gating of CD4⁺ T cells. The range of expression for each marker (5th to 95th percentiles of expression throughout the dataset) are represented using a five-tiered color scale ranging from white (not expressed) to dark red (highly expressed). Clustering markers are shown in blue.

FIGURE S5 | Cell number in each CD32a⁺ CD4⁺ T-cell cluster. This representation shows the number of cells associated with each CD32a⁺ CD4⁺ T-cell cluster, regardless of sample cell origin. Cluster names are indicated on the X-axis and the corresponding number of cells on the Y-axis. The size of the dots is proportional to the number of cells in the cluster.

FIGURE S6 | Percentages of CD32a⁺ CD4⁺ T_N, T_{CM}, and T_{Eff/Mem} subsets among CD4⁺ T cells from HIV-infected patients and healthy donors. This representation shows the percentage of naive (T_N), central memory (T_{CM}), and effector/memory (T_{Eff/Mem}) CD4⁺ T cells among CD32a⁺ CD4⁺ T cells for primary HIV-infected patients before (primary HIV, red circles) and after 12 months of combination antiretroviral treatment (HIV cART, blue squares) and that of healthy donors (healthy, green triangles).

FIGURE S7 | Correlation analysis of total CD32a⁺ CD4⁺ T-cell cluster and cluster #5 cell abundances with HIV DNA levels. **(A)** Correlation analysis of total CD32a⁺ CD4⁺ T-cell cluster cell abundances with total HIV DNA levels. The HIV DNA load (log₁₀ copies/10⁶ PBMCs) for each sample are indicated on the X-axis, and the associated percentage of cells relative to CD4⁺ T cells for CD32a⁺ CD4⁺ T-cell clusters on the Y-axis. The Pearson correlation coefficient was equal to 0.4329 ($p = 0.0727$). **(B)** Correlation analysis between cluster #5 cell abundance and HIV DNA levels. For each sample, the HIV DNA load (log₁₀ copies/10⁶ PBMCs) is indicated on the X-axis, and associated percentage of cells relative to CD32a⁺ CD4⁺ T cells for cluster #5 on the Y-axis. The Pearson correlation coefficient was equal to 0.6902 ($p = 0.0015$).

FIGURE S8 | Percentages of cells associated with clusters #5, #258, #136, #86, #261, #241, #162, #312, #243, #188, and #142 among CD4⁺ T cells in HIV-infected patients and healthy donors. **(A–D)** Graphs showing the cell abundance relative to that of CD4⁺ T cells for clusters previously shown to be differentially abundant between HIV-infected patients (primary HIV and HIV cART) and healthy donors (healthy) among CD32a⁺ CD4⁺ T cells. **(A,B)** Clusters #5, #258, #136, #86, and #261 were significantly more abundant in Primary HIV (circle) and HIV cART (square) than Healthy (triangle) samples among CD32a⁺ CD4⁺ T cells. Cluster #5 was also more abundant in primary HIV than in HIV

cART samples among CD32a⁺ CD4⁺ T cells. **(C,D)** Clusters #241, #162, #312, #243, #188, and #142 were significantly less abundant in primary HIV (circle) and HIV cART (square) than in healthy (triangle) samples among CD32a⁺ CD4⁺ T cells. Clusters #241 and #162 were also less abundant in primary HIV than in HIV cART samples among CD32a⁺ CD4⁺ T cells. Samples from the same HIV-infected patients are shown in the same color. For each condition, the mean cell abundance is indicated (black lines). Statistical differences between conditions were calculated using an unpaired Student's *t*-test with a *p*-value threshold of 0.05.

FIGURE S9 | Marker expression densities showing the phenotypic specificity of cluster #5 relative to whole CD4⁺ T-cell clusters. The expression densities of all clustering markers and CX3CR1 are shown for cluster #5 and whole CD4⁺ T-cell clusters. The marker expression densities for cluster #5 are shown in blue whereas the marker expression densities for all CD4⁺ T-cell clusters are shown in gray. The differences between marker expression densities were quantified using the Kolmogorov–Smirnov distances (KS).

TABLE S1 | Overview of the mass cytometry panel. The metal, antigen, clone, isotype, and supplier are indicated for each antibody. Non-clustering markers are indicated by a star.

REFERENCES

- Murphy EL, Collier AC, Kalish LA, Assmann SF, Para MF, Flanagan TP, et al. Highly active antiretroviral therapy decreases mortality and morbidity in patients with advanced HIV disease. *Ann Intern Med* (2001) 135:17–26. doi:10.7326/0003-4819-135-1-200107030-00005
- Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* (1998) 338:853–60. doi:10.1056/NEJM199803263381301
- Rothenberger MK, Keele BF, Wietrefre SW, Fletcher CV, Beilman GJ, Chipman JG, et al. Large number of rebounding/founder HIV variants emerge from multifocal infection in lymphatic tissues after treatment interruption. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2015) 112:E1126–34. doi:10.1073/pnas.1414926112
- Fischer M, Hafner R, Schneider C, Trkola A, Joos B, Joller H, et al. HIV RNA in plasma rebounds within days during structured treatment interruptions. *AIDS* (2003) 17:195–9. doi:10.1097/00002030-200301240-00009
- Chun TW, Finzi D, Margolick J, Chadwick K, Schwartz D, Siliciano RF. In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat Med* (1995) 1:1284–90. doi:10.1038/nm1295-1284
- Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, Taylor H, et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* (1997) 387:183–8. doi:10.1038/387183a0
- Descours B, Petitjean G, López-Zaragoza J-L, Bruel T, Raffel R, Psomas C, et al. CD32a is a marker of a CD4 T-cell HIV reservoir harbouring replication-competent proviruses. *Nature* (2017) 543:564–7. doi:10.1038/nature21710
- Grau-Expósito J, Serra-Peinado C, Miguel L, Navarro J, Curran A, Burgos J, et al. A novel single-cell FISH-flow assay identifies effector memory CD4⁺ T cells as a major niche for HIV-1 transcription in HIV-infected patients. *MBio* (2017) 8:e00876–17. doi:10.1128/mBio.00876-17
- Roederer M, Quaye L, Mangino M, Beddall MH, Mahnke Y, Chattopadhyay P, et al. The genetic architecture of the human immune system: a bioresource for autoimmunity and disease pathogenesis. *Cell* (2015) 161:387–403. doi:10.1016/j.cell.2015.02.046
- Martin GE, Pace M, Thornhill JP, Phetsouphanh C, Meyerowitz J, Gossez M, et al. CD32-expressing CD4 T cells are phenotypically diverse and can contain proviral HIV DNA. *Front Immunol* (2018) 9:928. doi:10.3389/fimmu.2018.00928
- Wittner M, Dunay GA, Kummer S, Bockhorn M, Hüfner A, Schmiedel S, et al. Cd32 expression of different memory T cell subpopulations in the blood and lymph nodal tissue of HIV patients and healthy controls correlates with immune activation. *J Acquir Immune Defic Syndr* (2017) 77(4):345–9. doi:10.1097/QAI.0000000000001622
- Chomont N, El-Far M, Ancuta B, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, et al. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med* (2009) 15:893–900. doi:10.1038/nm.1972
- Corneau A, Cosma A, Even S, Katlama C, Le Grand R, Frchet V, et al. Comprehensive mass cytometry analysis of cell cycle, activation, and coinhibitory receptors expression in CD4 T cells from healthy and HIV-infected individuals. *Cytometry B Clin Cytom* (2017) 92:21–32. doi:10.1002/cyto.b.21502
- Akula S, Mohammadamin S, Hellman L. Fc receptors for immunoglobulins and their appearance during vertebrate evolution. *PLoS One* (2014) 9:e96903. doi:10.1371/journal.pone.0096903
- Bruhns P, Jönsson F. Mouse and human FcR effector functions. *Immunol Rev* (2015) 268:25–51. doi:10.1111/imr.12350
- Anfossi N, Doisne J-M, Peyrat M-A, Ugolini S, Bonnaud O, Bossy D, et al. Coordinated expression of Ig-like inhibitory MHC class I receptors and acquisition of cytotoxic function in human CD8⁺ T cells. *J Immunol* (2004) 173:7223–9. doi:10.4049/jimmunol.173.12.7223
- Lombardelli L, Aguerre-Girr M, Logiodice F, Kullolli O, Casart Y, Polgar B, et al. HLA-G5 induces IL-4 secretion critical for successful pregnancy through differential expression of ILT2 receptor on decidual CD4⁺ T cells and macrophages. *J Immunol* (2013) 191:3651–62. doi:10.4049/jimmunol.1300567
- Lesport E, Baudhuin J, Sousa S, LeMaout J, Zamborlini A, Rouas-Freiss N, et al. Inhibition of human Vγ9Vδ2 T-cell antitumoral activity through HLA-G: implications for immunotherapy of cancer. *Cell Mol Life Sci* (2011) 68:3385–99. doi:10.1007/s00018-011-0632-7
- Baudhuin J, Migraine J, Faivre V, Loumagne L, Lukaszewicz A-C, Payen D, et al. Exocytosis acts as a modulator of the ILT4-mediated inhibition of neutrophil functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013) 110:17957–62. doi:10.1073/pnas.1221535110
- Colonna M, Samaridis J, Cella M, Angman L, Allen RL, O'Callaghan CA, et al. Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules. *J Immunol* (1998) 160:3096–100.
- Fanger NA, Cosman D, Peterson L, Braddy SC, Maliszewski CR, Borges L. The MHC class I binding proteins LIR-1 and LIR-2 inhibit Fc receptor-mediated signaling in monocytes. *Eur J Immunol* (1998) 28:3423–34. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199811)28:11<3423::AID-IMMU3423>3.0.CO;2-2
- Favier B. Regulation of neutrophil functions through inhibitory receptors: an emerging paradigm in health and disease. *Immunol Rev* (2016) 273:140–55. doi:10.1111/imr.12457
- Bashirova AA, Martin-Gayo E, Jones DC, Qi Y, Apps R, Gao X, et al. LILRB2 interaction with HLA class I correlates with control of HIV-1 infection. *PLoS Genet* (2014) 10:e1004196. doi:10.1371/journal.pgen.1004196
- Huang J, Goedert JJ, Sundberg EJ, Cung TDH, Burke PS, Martin MP, et al. HLA-B*35-Px-mediated acceleration of HIV-1 infection by increased inhibitory immunoregulatory impulses. *J Exp Med* (2009) 206:2959–66. doi:10.1084/jem.20091386
- Huang J, Burke PS, Cung TDH, Pereyra F, Toth I, Walker BD, et al. Leukocyte immunoglobulin-like receptors maintain unique antigen-presenting properties of circulating myeloid dendritic cells in HIV-1-infected elite controllers. *J Virol* (2010) 84:9463–71. doi:10.1128/JVI.101009-10

26. Alaoui L, Palomino G, Zurawski S, Zurawski G, Coindre S, Dereuddre-Bosquet N, et al. Early SIV and HIV infection promotes the LILRB2/MHC-I inhibitory axis in cDCs. *Cell Mol Life Sci* (2017) 75:1871–87. doi:10.1007/s00018-017-2712-9
27. Krastinova E, Lecuroux C, Leroy C, Seng R, Cabie A, Rami A, et al. High soluble CD14 levels at primary HIV-1 infection predict more rapid disease progression. *J Infect Dis* (2015) 212:909–13. doi:10.1093/infdis/jiv145
28. Qiu P, Simonds EF, Bendall SC, Gibbs KD, Bruggner RV, Linderman MD, et al. Extracting a cellular hierarchy from high-dimensional cytometry data with SPADE. *Nat Biotechnol* (2011) 29:886–91. doi:10.1038/nbt.1991
29. Gautreau G, Pejoski D, Le Grand R, Cosma A, Beignon A-S, Tchitchek N. SPADEVizR: an R package for visualization, analysis and integration of SPADE results. *Bioinformatics* (2016) 33:779–81. doi:10.1093/bioinformatics/btw708
30. Avettand-Fènoël V, Hocqueloux L, Ghosn J, Cheret A, Frange P, Melard A, et al. Total HIV-1 DNA, a marker of viral reservoir dynamics with clinical implications. *Clin Microbiol Rev* (2016) 29:859–80. doi:10.1128/CMR.00015-16
31. Hirayasu K, Saito F, Suenaga T, Shida K, Arase N, Oikawa K, et al. Microbially cleaved immunoglobulins are sensed by the innate immune receptor LILRA2. *Nat Microbiol* (2016) 1:16054. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.54
32. Zhou G, Ding Z-C, Fu J, Levitsky HI. Presentation of acquired peptide-MHC class II ligands by CD4⁺ regulatory T cells or helper cells differentially regulates antigen-specific CD4⁺ T cell response. *J Immunol* (2011) 186:2148–55. doi:10.4049/jimmunol.1002917
33. Joly E, Hudrisier D. What is trogocytosis and what is its purpose? *Nat Immunol* (2003) 4:815–815. doi:10.1038/ni0903-815
34. Neil SJD, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* (2008) 451:425–30. doi:10.1038/nature06553
35. Zaguia F, Saikali P, Ludwin S, Newcombe J, Beauseigle D, McCrea E, et al. Cytotoxic NKG2C⁺ CD4 T cells target oligodendrocytes in multiple sclerosis. *J Immunol* (2013) 190:2510–8. doi:10.4049/jimmunol.1202725
36. Guma M, Angulo A, Vilches C, Gómez-Lozano N, Malats N, López-Botet M. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* (2004) 104:3664–71. doi:10.1182/blood-2004-05-2058
37. Sacre K, Hunt PW, Hsue PY, Maidji E, Martin JN, Deeks SG, et al. A role for cytomegalovirus-specific CD4⁺CX3CR1⁺ T cells and cytomegalovirus-induced T-cell immunopathology in HIV-associated atherosclerosis. *AIDS* (2012) 26:805–14. doi:10.1097/QAD.0b013e328351f780
38. Abdel-Mohsen M, Kuri-Cervantes L, Grau-Exposito J, Spivak AM, Nell RA, Tomescu C, et al. CD32 is expressed on cells with transcriptionally active HIV but does not enrich for HIV DNA in resting T cells. *Sci Transl Med* (2018) 10:eaar6759. doi:10.1126/scitranslmed.aar6759
39. Avettand-Fènoël V, Chaix M-L, Blanche S, Burgard M, Floch C, Toure K, et al. LTR real-time PCR for HIV-1 DNA quantitation in blood cells for early diagnosis in infants born to seropositive mothers treated in HAART area (ANRS CO 01). *J Med Virol* (2009) 81:217–23. doi:10.1002/jmv.21390
40. Finck R, Simonds EF, Jager A, Krishnaswamy S, Sachs K, Fantl W, et al. Normalization of mass cytometry data with bead standards. *Cytometry A* (2013) 83:483–94. doi:10.1002/cyto.a.22271
41. Platon L, Pejoski D, Gautreau G, Targat B, Le Grand R, Beignon A-S, et al. A computational approach for phenotypic comparisons of cell populations in high-dimensional cytometry data. *Methods* (2018) 132:66–75. doi:10.1016/j.ymeth.2017.09.005

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Coindre, Tchitchek, Alaoui, Vaslin, Bourgeois, Goujard, Avettand-Fènoël, Lecuroux, Bruhns, Le Grand, Beignon, Lambotte, Favier and The ANRS CO6 PRIMO Cohort. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Article 2 : Mass Cytometry Analysis Reveals Complex Cell-State Modifications of Blood Myeloid Cells During HIV Infection

Résumé de l'article publié le 22 Novembre 2019 dans la revue *Frontiers in Immunology*.

Les cellules dendritiques (DCs) jouent un rôle majeur dans l'orchestration des réponses immunitaires précoces contre les pathogènes. Cependant, au cours de l'infection par le VIH, ces cellules sont phénotypiquement et fonctionnellement dérégulées. En effet, les DCs classiques (cDCs) présentent une maturation altérée avec un défaut d'expression des molécules de costimulation et une capacité diminuée à présenter l'antigène et à produire des cytokines (Jinghe Huang et al., 2011, 2012; Miller & Bhardwaj, 2013). Les DCs plasmacytoïdes (pDCs) quant à elles, ont une capacité réduite à produire des IFN de type I, cytokines clés pour la lutte antivirale (Bego et al., 2015). Ces cellules sont alors incapables d'induire une réponse immunitaire antivirale efficace contre le VIH, contribuant probablement à faire pencher la balance vers la persistance virale. Enfin, la suractivation des monocytes participe aux événements inflammatoires associés à la persistance virale (Deeks et al., 2013; Sandler & Douek, 2012). Ces nombreux événements inflammatoires mais aussi immunorégulateurs, rendent difficiles la caractérisation, par des approches d'analyses classiques, des modifications cellulaires qui affectent les cellules myéloïdes au cours de l'infection par le VIH.

Dans le but d'une meilleure compréhension de la dynamique et des modifications phénotypiques des cellules myéloïdes survenant au cours de l'infection par le VIH, nous avons analysé par cytométrie de masse des échantillons de sang de patients en primo-infection collectés longitudinalement avant et après un an de thérapie antirétrovirale combinée (cART). Des échantillons de sang de patients qui contrôlent naturellement l'infection par le VIH en absence de traitement (contrôleurs du VIH) ainsi que de donneurs séronégatifs pour le VIH ont également été inclus. Des études indiquent que les récepteurs immunomodulateurs de la famille des LILRs sont impliqués dans les dérégulations des cellules myéloïdes au cours de l'infection au VIH (Bashirova, Martin-Gayo, et al., 2014; Bego et al., 2015; M. Lichterfeld & Yu, 2012). A cet égard, l'expression des LILRs les mieux caractérisés dans la littérature a été analysée à la surface des différentes sous-populations de cellules myéloïdes identifiées.

Nos données indiquent qu'un taux plasmatique élevé d'ARN du VIH est associé à une perte dans le sang de sous-populations de cDCs et de pDCs présentant une forte expression des

récepteurs immunomodulateurs LILRB2 et LILRA4, respectivement. À l'inverse, des populations spécifiques de monocytes coexprimant la molécule HLA-I, les récepteurs immunomodulateurs CD64, LILRA2 et LILRB4, et le facteur de restriction CD317 ont une abondance qui corrèle positivement avec la charge d'ARN virale. Ces sous-populations de monocytes sont retrouvées en plus grande abondance chez les patients en primo-infection de VIH. En revanche, les sous-populations de monocytes n'exprimant pas ces marqueurs et les sous-populations de cDCs LILRB2⁺ et de pDCs LILRA4⁺ sont significativement moins abondantes en primo-infection en comparaison des mêmes individus sous cART, aux contrôleurs du VIH et aux individus séronégatifs. Enfin, notre analyse a mis en évidence une sous-population particulière de cDCs CD1c⁺, exprimant le récepteur inhibiteur CD32b, retrouvée en plus grande abondance dans le sang des patients contrôleurs du VIH.

Des études complémentaires seront nécessaires pour mieux caractériser la fonction, dans le contexte de l'infection par le VIH, des sous-populations de cellules myéloïdes mises en évidence dans cette étude et en particulier l'implication de la sous-population de cDCs CD1c⁺ CD32b⁺ dans les mécanismes conduisant au contrôle naturel de la réplication virale chez les patients contrôleurs du VIH. Il sera également nécessaire de déterminer *in vivo* si les différents LILRs exprimés à la surface des cellules myéloïdes, et notamment LILRB2, jouent un rôle important dans la physiopathologie de l'infection par le VIH.

Dans son ensemble, cette étude dévoile la diversité et les multiples changements phénotypiques induits dans les sous-populations de DCs et de monocytes dans différentes conditions d'infection par le VIH. Ces résultats pourront être utiles pour fournir une meilleure compréhension des mécanismes de régulations et de dérégulations des cellules myéloïdes pouvant être impliqués dans la progression ou le contrôle de l'infection par le VIH.



Mass Cytometry Analysis Reveals Complex Cell-State Modifications of Blood Myeloid Cells During HIV Infection

Sixtine Coindre¹, Nicolas Tchitchek¹, Lamine Alaoui¹, Bruno Vaslin¹, Christine Bourgeois¹, Cecile Goujard^{2,3}, Camille Lecuroux¹, Pierre Bruhns⁴, Roger Le Grand¹, Anne-Sophie Beignon¹, Olivier Lambotte^{1,2} and Benoit Favier^{1*}

¹CEA-Université Paris Sud-INSERM U1184, IDMIT Department, IBFJ, DRF, Fontenay-aux-Roses, France, ²Service de médecine interne et d'immunologie clinique, Hôpital Bicêtre, APHP, Le Kremlin Bicêtre, France, ³INSERM U1018-Université Paris Sud, CESP (Centre for Research in Epidemiology and Population Health), Le Kremlin Bicêtre, France, ⁴Unit of Antibodies in Therapy and Pathology, Institut Pasteur, UMR1222 INSERM, Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Helen Marie McGuire,
University of Sydney, Australia

Reviewed by:

Zdenek Hel,
University of Alabama at Birmingham,
United States

Nicolas Bertho,
INRA Biologie, Épidémiologie et
Analyse de Risque en santé animale
(BIOEPAR), France

*Correspondence:

Benoit Favier
benoit.favier@cea.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Viral Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 24 April 2019

Accepted: 30 October 2019

Published: 22 November 2019

Citation:

Coindre S, Tchitchek N, Alaoui L, Vaslin B, Bourgeois C, Goujard C, Lecuroux C, Bruhns P, Le Grand R, Beignon A-S, Lambotte O and Favier B (2019) Mass Cytometry Analysis Reveals Complex Cell-State Modifications of Blood Myeloid Cells During HIV Infection. *Front. Immunol.* 10:2677. doi: 10.3389/fimmu.2019.02677

Dendritic cells (DC), which are involved in orchestrating early immune responses against pathogens, are dysregulated in their function by HIV infection. This dysregulation likely contributes to tip the balance toward viral persistence. Different DC subpopulations, including classical (cDCs) and plasmacytoid (pDCs) dendritic cells, are subjected to concomitant inflammatory and immunoregulatory events during HIV infection, which hampers the precise characterization of their regulation through classical approaches. Here, we carried out mass cytometry analysis of blood samples from early HIV-infected patients that were longitudinally collected before and after 1 year of effective combination antiretroviral therapy (cART). Blood samples from HIV controller patients who naturally control the infection were also included. Our data revealed that plasma HIV RNA level was positively associated with a loss of cDC and pDC subpopulations that display high expression of LILR immunomodulatory receptors. Conversely, specific monocyte populations co-expressing high levels of HLA-I, 3 immunomodulatory receptors, CD64, LILRA2, and LILRB4, and the restriction factor CD317 (also known as BST2/Tetherin), were more abundant in early HIV-infection. Finally, our analysis revealed that the blood of HIV controller patients contained in a higher abundance a particular subtype of CD1c⁺ cDCs, characterized by elevated co-expression of CD32b inhibitory receptor and HLA-DR antigen-presentation molecules. Overall, this study unravels the modifications induced in DC and monocyte subpopulations in different HIV⁺ conditions, and provides a better comprehension of the immune regulation/dysregulation mechanisms induced during this viral infection.

Keywords: LILRB1 (ILT2), LILRB2 (ILT4), LILRA4 (ILT7), CD32 (FcγRII), CD38, immune checkpoints, primary HIV infection, elite controllers

INTRODUCTION

HIV infection is characterized by the dysregulation of immune responses leading to viral persistence and disease progression (1–3). During the last few decades, most studies of HIV pathogenesis have focused on T-cell immune responses. Nevertheless, dendritic cells (DCs) including, classical (cDCs) and plasmacytoid (pDCs) cells, play a pivotal role in the early defenses

against viruses by bridging innate and adaptive immune responses (4, 5). After viral sensing, cDCs rapidly mature and migrate toward secondary lymphoid organs to stimulate T-cell responses. Several studies indicate that in HIV or SIV infections, cDCs are prone to apoptosis and demonstrate attenuated capacities of antigen presentation and cytokine production leading to inefficient T-cell proliferation (1, 6–8). *Ex vivo* analysis of cDCs from HIV-infected patients illustrates phenotypic changes induced early during infection and that are associated with cDC dysregulation (9, 10). Further studies in rhesus macaques identify dysregulation of cDCs induced in early SIV infection as a predictive marker of disease progression (11). These studies suggest a critical role for cDCs in the regulation of early immune responses, where deficiencies in functions tip the balance of disease outcomes toward viral persistence.

Because pDCs show unique capacities to regulate immune responses and viral replication through massive production of type I interferon (IFN), their role in HIV and SIV infection has also been investigated. pDCs from chronically HIV-infected patients show dysregulated immunophenotypic attributes (12). *In vitro* experiments indicate that HIV attenuates the production of type I-IFNs mediated by pDCs (13). Moreover, during early SIV infection, pDCs rapidly move toward lymph nodes, are subjected to apoptosis and renewal, and only a small fraction of these cells produce type-I-IFNs (14, 15). These data suggest that SIV infection induces heterogeneous functional capacities among pDCs.

Massive monocyte turnover is induced during SIV and HIV infection and has been directly linked to disease progression (3, 14). In addition, microbial translocation induces overactivation of monocytes, which in turn participate in the inflammatory events associated with viral persistence (3, 15). Finally, the production of soluble CD14 and CD163, which reflects monocyte/macrophage activation, has been associated with HIV mortality in primary and chronic infection (3, 15–17).

Even though these studies indicate that DC and monocyte subpopulations are dysregulated in HIV infection, a precise view of their dysregulation mechanisms at the molecular level is difficult to decipher through classical approaches. In this respect, HIV infection induces concomitant inflammatory and immunoregulatory events, which can differentially influence cell maturation/activation phenotype within the same populations due to proximity and/or exposure to different stimuli (virus and host mediators). Phenotypic heterogeneity among subpopulations may be further enhanced by perturbation of hematopoiesis and egress of less differentiated DCs from bone marrow to replenish dying cells as has been explored in SIV infection (18, 19).

In this study, we carried out a mass cytometry analysis to unravel the heterogeneity and dynamics of myeloid cell subsets occurring from the acute phase of HIV infection to the control of viral replication through successful combination antiretroviral therapy (cART). For this purpose, we collected samples from primary HIV-infected patients longitudinally, prior to and after 1 year of effective cART. Samples from elite controllers, who naturally control HIV replication in the absence of treatment, were also included as well as control samples from healthy

donors. Interestingly, myeloid cells from elite controllers were previously shown to display enhanced functions and a specific expression profile of Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptors (LILRs), a family of receptors that play important roles in the regulation of myeloid cell maturation and functions (20–22). In this regard, LILRs could represent key markers that account for DC-associated regulation/dysregulation mechanisms (23). Therefore, markers for the most well-characterized LILRs were included in our mass cytometry panel.

Our data reveal an association between a high level of HIV RNA and a loss in the blood of cDC and pDC clusters that highly expressed specific members of LILR family. In contrast, early HIV infection was positively associated with clusters of monocytes displaying high expression of HLA-I ligands, CD64, LILRA2, LILRB4 immunoregulatory receptors and restriction factor CD317 (also known as BST2 or tetherin), a ligand of LILRA4. Finally, a subtype of cDCs defined by high expression of CD32b and HLA-DR was more abundant in elite controllers than in other conditions. Altogether, our results provide a unique view of the diversity and various phenotypic changes induced in DCs and monocytes during early HIV infection, before and after effective cART, but also in patients that naturally control HIV infection. Overall, this study reveals new insights on the mechanisms driving the dysregulation of early myeloid immune responses, which may account for inefficient adaptive immune responses and viral persistence.

RESULTS

Phenotypical Characterization of Dendritic Cell and Monocyte Populations Among Patient Samples

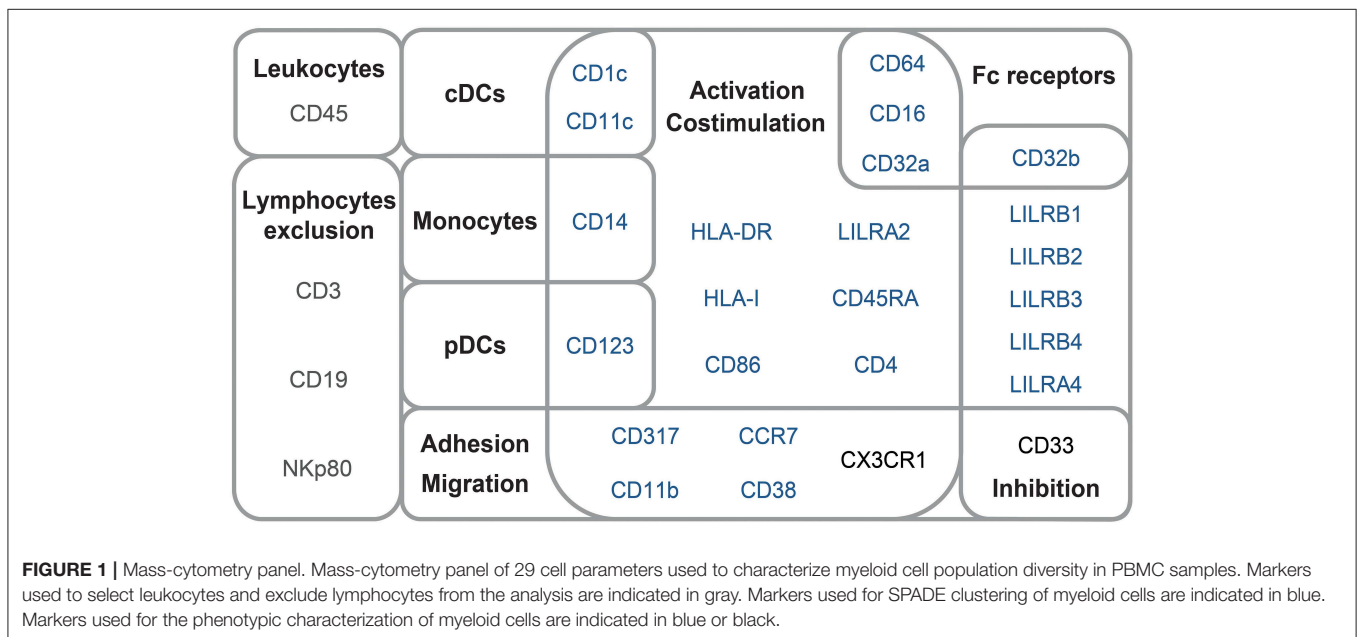
To characterize the phenotypic diversity of DC and monocyte subsets in HIV primary and controlled infections, we developed a mass-cytometry panel of 29 markers mainly dedicated to myeloid cells (**Table S1**). We applied this panel to PBMCs from three groups of individuals. The first group included six patients who were longitudinally sampled during the primary phase of HIV infection, as previously described (24), before (primary HIV) and after 1 year of combination antiretroviral therapy (HIV cART). The second group was composed of six HIV-infected elite controller patients (HIV controllers) that naturally control viral replication. Finally, the third group encompassed six healthy subjects (Healthy). Clinical characteristics of these groups are shown in **Table 1**. These groups allow us to question the changes in the dynamics, diversification, and regulatory events among DCs and monocytes during both primary infection and potential normalization on cART, and in HIV controllers.

The mass cytometry panel was designed to detect lineage, migration and adhesion markers, as well as activation and inhibitory immunoreceptors known to play an important role in myeloid cell functions and maturation (**Figure 1**). After the acquisition of all samples by mass-cytometry, we applied a first step of manual gating strategy to exclude lymphocyte subsets, followed by the positive selection of cell populations expressing HLA-DR (**Figure S1**) to select DCs and other myeloid

TABLE 1 | Summary of patient and subject clinical parameters.

	Primary HIV (n = 6)	HIV cART (n = 6)	HIV controllers (n = 6)	Healthy (n = 6)
Age	34	35	39	35
median (min-max), in years	(24–47)	(25–48)	(25–49)	(25–45)
Gender	M	M	M	M
Days since HIV-1 diagnosis	28	361	1,825	N/A
median (min-max), in days	(18–29)	(290–372)	(1,825–7,300)	
Treatment	Naive	cART	Naive	Naive
RNA HIV load at diagnosis	6.67	1	1.54	N/A
median (min-max), in log ₁₀ copies/ml of plasma	(5.47–7.26)	(1–1.63)	(1.43–1.69)	
CD4 T-cell count	470	843	827	856
median (min-max), in 10 ³ cells/μl of blood	(258–669)	(570–1,247)	(652–1,180)	(634–1,412)

Eighteen Caucasian men were involved in this study to constitute four groups of conditions. These groups are composed of six primary HIV-infected patients before treatment (primary HIV) and after 1 year of combination antiretroviral therapy (HIV cART), six elite controllers (HIV controllers), and six healthy subjects (Healthy). The gender and median patient age, days since HIV-1 diagnosis, RNA viral load, and CD4⁺ T-cell count are indicated for each group. cART, combination antiretroviral therapy; N/A, not applicable; M, male.



cells. We next characterized the simultaneous expression of markers from our panel on these myeloid cells. For this purpose, we used the Spanning-tree Progression Analysis of Density-normalized Events (SPADE) clustering algorithm to identify myeloid cell clusters having similar expressions for selected markers regardless of their sample cell origin (25, 26). A categorical heatmap was generated using hierarchical clustering to visualize more easily the respective relative marker expression of each myeloid cell cluster identified (Figure 2A). The overall phenotype distribution of all clusters was visualized in Figure S2. For each cluster, the correlation with plasma RNA viral load and its variation in abundance across patient groups was also analyzed (Figures 2B,C).

Based on the cell cluster dendrogram, 12 families of cell clusters were defined (Figure 2A). A tSNE representation generated to represent the similarities between cell cluster phenotypes confirmed the segregation of cell cluster families defined by the heatmap dendrogram (Figure S3). Seven cluster families exhibited a monocyte phenotype (HLA-DR⁺, CD14⁺) and 4 cluster families exhibited a cDC phenotype (CD14⁻, CD11c⁺, HLADR⁺). Among the 4 cluster families with a cDC phenotype, one family highly expressed CD123, CD86, and CD16. Finally, a family of cell clusters corresponding to the phenotype of pDC (CD14⁻, CD11c^{low}, CD123⁺, CD4⁺, HLADR⁺) was defined. A total of 76 cell clusters were associated with the monocyte families, whereas cDC and pDC families

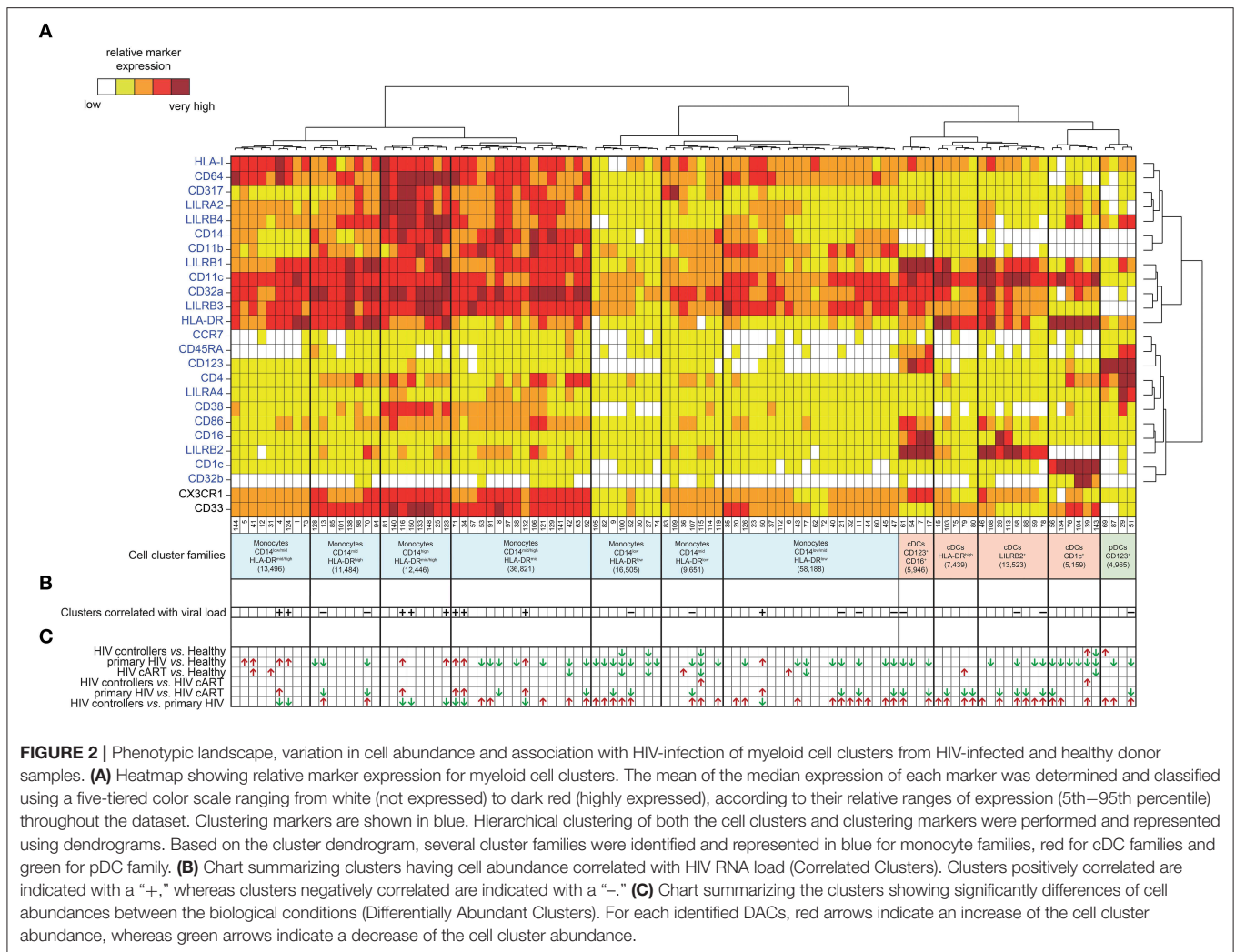


FIGURE 2 | Phenotypic landscape, variation in cell abundance and association with HIV-infection of myeloid cell clusters from HIV-infected and healthy donor samples. **(A)** Heatmap showing relative marker expression for myeloid cell clusters. The mean of the median expression of each marker was determined and classified using a five-tiered color scale ranging from white (not expressed) to dark red (highly expressed), according to their relative ranges of expression (5th–95th percentile) throughout the dataset. Clustering markers are shown in blue. Hierarchical clustering of both the cell clusters and clustering markers were performed and represented using dendrograms. Based on the cluster dendrogram, several cluster families were identified and represented in blue for monocyte families, red for cDC families and green for pDC family. **(B)** Chart summarizing clusters having cell abundance correlated with HIV RNA load (Correlated Clusters). Clusters positively correlated are indicated with a “+,” whereas clusters negatively correlated are indicated with a “-.” **(C)** Chart summarizing the clusters showing significant differences of cell abundances between the biological conditions (Differentially Abundant Clusters). For each identified DACs, red arrows indicate an increase of the cell cluster abundance, whereas green arrows indicate a decrease of the cell cluster abundance.

consisted of 23 and 4 cell clusters, respectively. Cell abundance of each cluster was represented in **Figure 3A**.

These results indicate that monocytes and DCs in the dataset include heterogeneous and discrete cell subpopulations carrying a specific combination of markers that may reflect a divergence in functions or differentiation that could be associated with HIV infection.

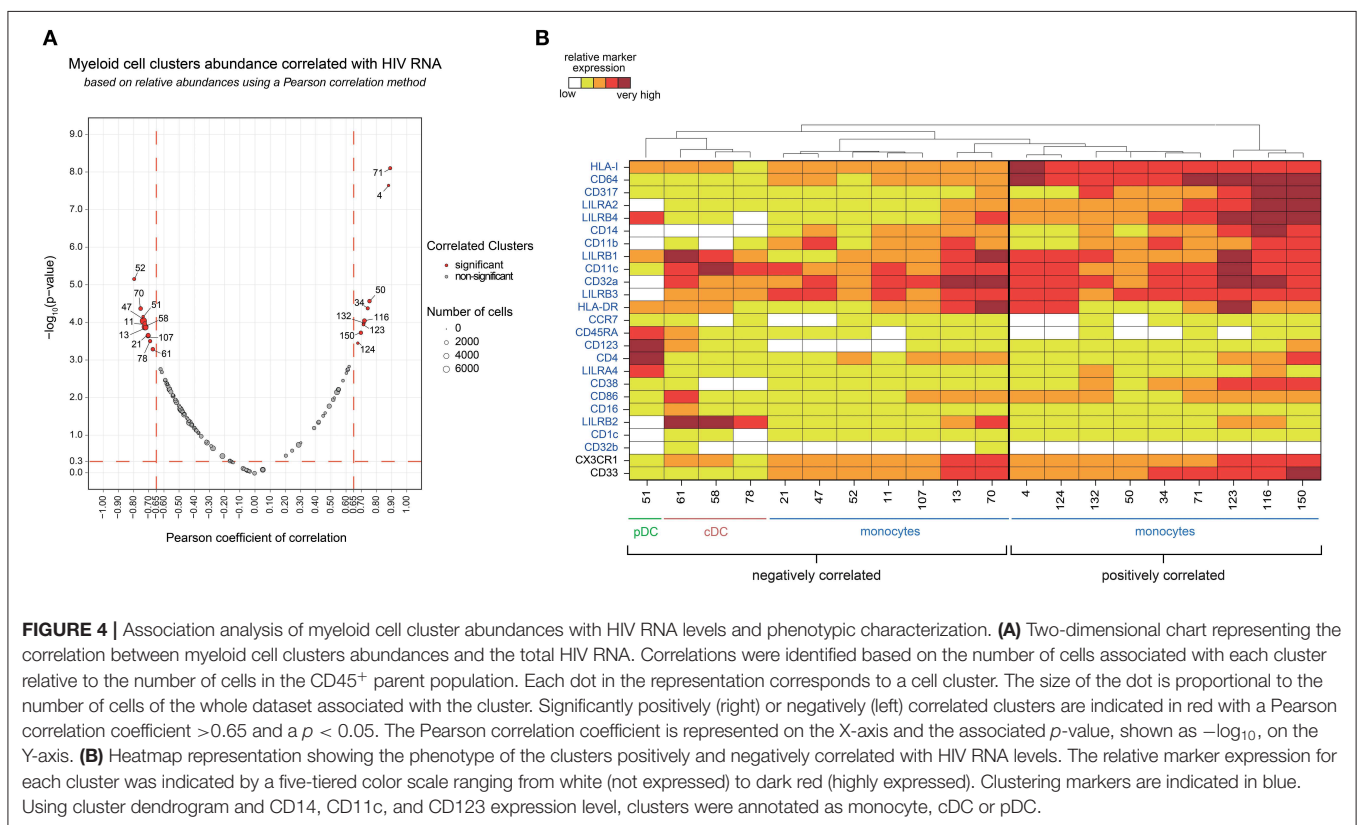
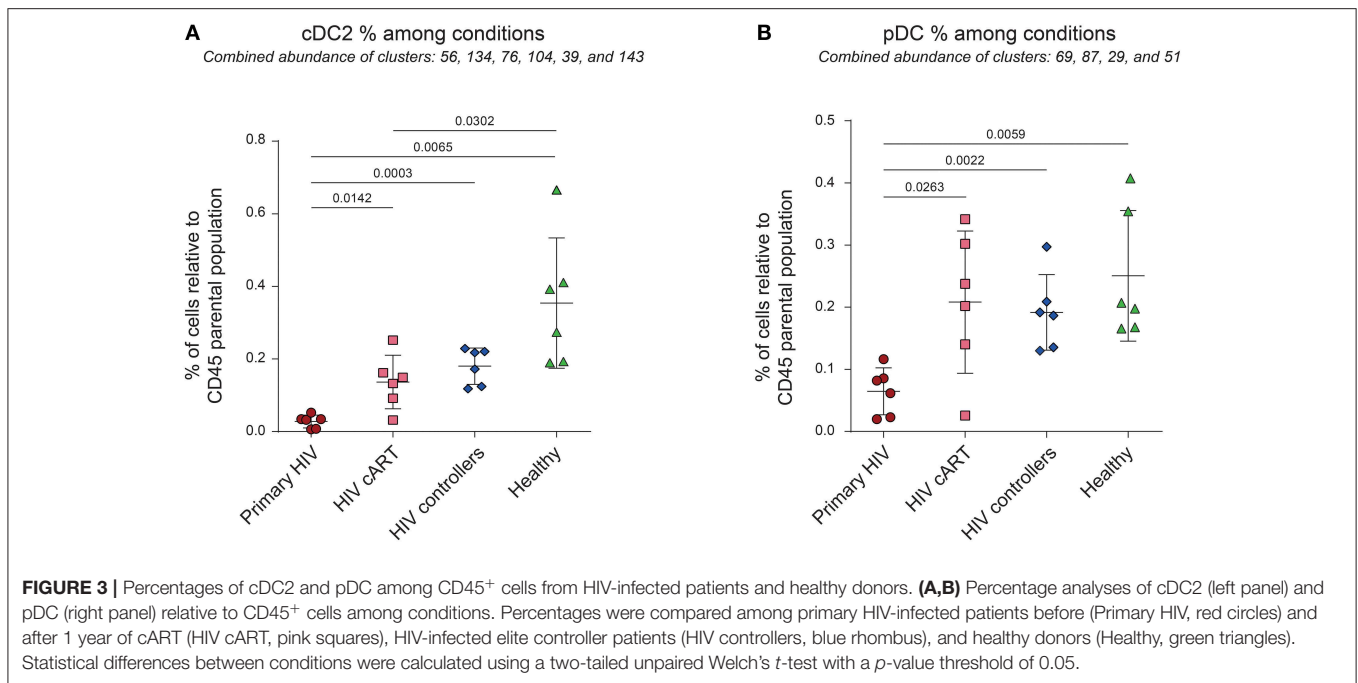
Primary HIV-Infection Induces a Significant Loss of Peripheral cDC2 and pDCs

Previous reports show the loss of DC subpopulations during early HIV and SIV infection (10, 11). To assess this process in our dataset, we first analyzed the variations of cell cluster abundances for the cDC2 (CD1c⁺ cDC) and pDC families among the different conditions. The percentage of cells in each condition relative to the number of cells in the CD45⁺ parent population were compared (**Figure 3**). We observed significant decreases of the percentages of cDC2 (80% of decline, $p = 0.0142$) and pDC (69% of decline, $p = 0.00263$) in the blood of primary HIV-infected patients compared to the same patients 1 year after effective cART. These significant decreases were also observed for

primary HIV-infected patients in comparison to HIV controllers (85% of cDC2 decline, $p = 0.0003$ and 66% of pDC decline, $p = 0.0022$) and to healthy donors (92% of cDC2 decline, $p = 0.0065$ and 74% of pDC decline, $p = 0.0059$). Interestingly, our results also demonstrated significantly higher percentages of cDC2 ($p = 0.0302$) in the healthy group than in the HIV cART-treated group (**Figure 3A**). No significant difference was observed between these two groups for pDCs (**Figure 3B**). Concordantly with previous studies, our dataset demonstrates that primary HIV-infection induces a profound decline of peripheral cDC2s and pDCs abundance that seems to be partially recovered under cART, but to a lesser extent for cDC2s.

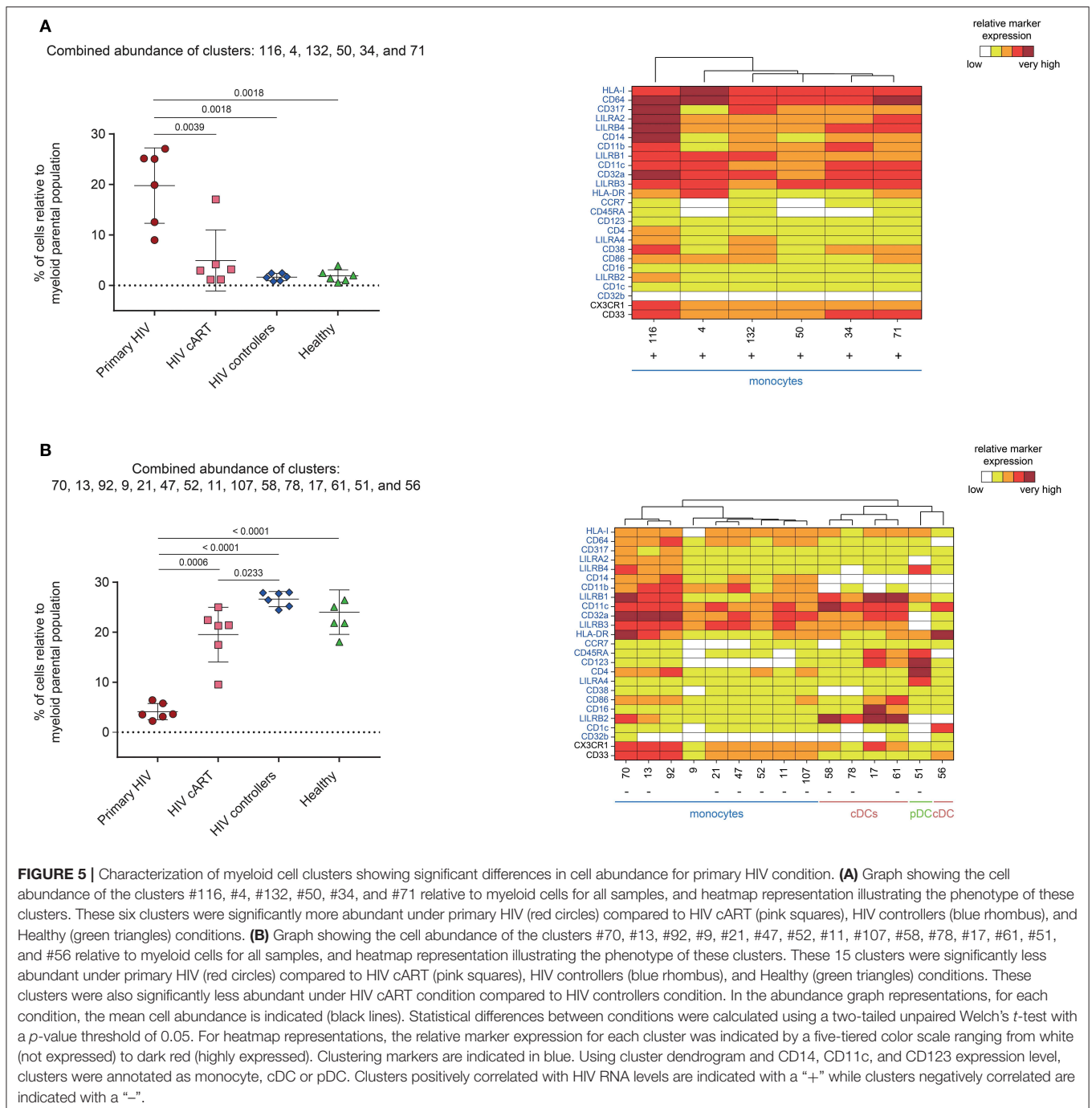
Elevated Plasma HIV Load Is Associated With Modifications in the Abundance of Specific Dendritic Cell and Monocyte Subpopulations

We next investigated if the abundance of specific myeloid cell subsets was associated with HIV RNA levels across HIV⁺ and healthy samples.



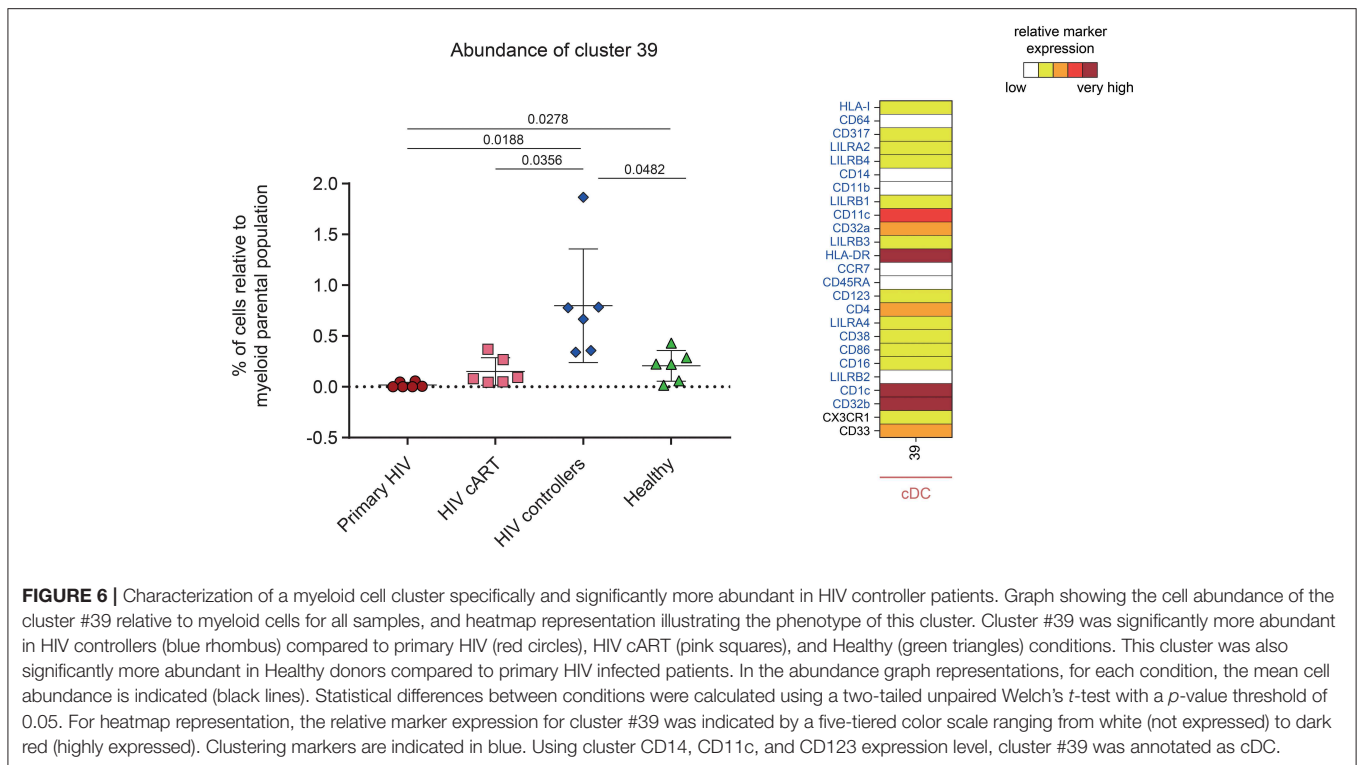
We found 20 clusters significantly correlated (CCs) with plasma viral load (**Figure 4A**). These clusters were split into two groups based on the positive or negative correlation of their cell abundance with HIV RNA load (**Figure 4B**). On the one hand, nine clusters that were positively correlated

with viral load were exclusively monocyte populations. On the other hand, eleven clusters that negatively correlated with viral load included monocyte and DC populations. The monocyte clusters that positively correlated with viral load were mainly characterized by strong expression of CD64 and HLA-I. These



clusters also displayed high expression of HIV restriction factor CD317, and the immunomodulatory receptors LILRA2 and LILRB4. It is important to note that among them, only some clusters, displayed a medium or high-level expression of CD38 (a transmembrane glycoprotein involved in myeloid cell adhesion, activation, and metabolism). Among the dendritic cell clusters that negatively correlated with the viral load, pDC cluster #51 ($R = -0.65$) demonstrated a strong expression of LILRA4 and LILRB4. Furthermore, cDC clusters #61 ($R = -0.59$), #58 ($R =$

-0.66), and #78 ($R = -0.60$) expressed high levels of LILRB2 inhibitory receptor. Meanwhile, the seven monocyte clusters that negatively correlated with viral load expressed moderated levels of HLA-I, CD64, CD317, LILRA2, LILRB4, and CD38, in contrast to the other monocyte clusters that were positively correlated with HIV RNA. Interestingly, the negatively correlated monocyte clusters #13 and #70 displayed a medium and high expression of LILRB2, respectively, with high coexpression of CX3CR1 and CD33.



Our data show that an increase in HIV viral load was associated with the specific loss of discrete DC populations in blood. These populations included pDC clusters that were characterized by high expression of LILRA4 and LILRB4, but also cDCs highly expressing LILRB2. Conversely, specific subsets of monocytes strongly expressing HLA-I, CD64, CD317, LILRA2, LILRB4, and for some of them, CD38, seemed to be enriched when viral load increased.

Primary HIV-Infected Patients and HIV Controllers Display Differentially Abundant Clusters

We then aimed to identify myeloid cell clusters undergoing contraction or expansion within the different patient groups. These clusters were named Differentially Abundant Clusters (DACs) and were summarized in **Figure 2C**. We first identified clusters having different cell abundances between healthy and each HIV⁺ conditions (**Figures S5A–C**). We found that DACs were mainly enriched in healthy condition. This may indicate expression level modification of surface markers or a loss in the blood of specific myeloid cell subsets in HIV-infected patients even under cART or natural control, compared to healthy donors. We then identified clusters with differences in cell abundances for the comparisons between all HIV⁺ groups (**Figures S5D–F**). The comparison between HIV controllers and primary HIV samples displayed the greatest number of DACs, with 43 out of 52 being more abundant in samples from HIV controllers (**Figure S5F**). Conversely, the comparison between samples from HIV controllers and HIV-infected patients once

under cART displayed the lowest number of DACs, with only 2 DACs more abundant in HIV controllers (**Figure S5D**). These changes may indicate important differences in myeloid cell dynamics between primary HIV⁺ and HIV-controller patients, whereas the myeloid cell dynamics between cART treated HIV⁺ and HIV-controller patients is more similar.

We next analyzed the phenotype and abundance of all DACs that were significantly more abundant in primary HIV⁺ patients when compared to the other conditions (HIV cART, HIV controllers, and Healthy; **Figure 5A**). We found that six DACs, clusters #116, #4, #132, #50, #34, and #71, were more abundant in primary HIV⁺ samples and displayed monocyte phenotypes. Interestingly, these six clusters were positively correlated with plasma viral load (**Figure 4**). These results confirmed that individuals in the primary HIV infection state had a higher abundance of monocytes that strongly expressed HLA-I, CD64, CD317, LILRA2, and LILRB4, with some subpopulations also expressing mid- to high- levels of CD38.

We then focused on DACs that were less abundant in primary HIV⁺ patients than in all other conditions (**Figure 5B**). These clusters included: monocyte clusters #70, #13, #21, #47, #52, #11, and #107; cDC clusters #58, #78, and #61; and pDC cluster #51. These 11 clusters were previously identified as negatively correlated with viral load. The four remaining DACs less abundant in primary HIV⁺ samples displayed monocyte phenotypes (clusters #92 and #9), and cDC phenotypes (clusters #17, and #56). Furthermore, cDC clusters #58, #78, #17, and #61 strongly expressed LILRB2 immunoreceptor, with clusters #17 and #61 also expressing CD123, CD86, and CD16. Cluster #56 did not express LILRB2, but strongly expressed CD1c. The pDC

cluster #51, which was also found correlated with HIV RNA in **Figure 4**, strongly expressed LILRA4 and LILRB4. It is interesting to note that all the DACs that were less abundant in primary HIV condition had a weaker expression of HLA-I, CD64, CD317, LILRA2, and LILRB4 compared to clusters more abundant in the same condition (**Figure 5A**). In addition, none of these DACs expressed a medium or high-level of CD38.

One DAC was shown to be more abundant in HIV controllers compared to other HIV⁺ and healthy conditions (**Figure 6**). This DAC, cluster #39, displayed a CD1c⁺ cDC phenotype strongly expressing inhibitory receptor CD32b (low-affinity receptor for IgG also known as FcγRIIB) and HLA-DR. Furthermore, this cluster expressed moderate levels of CD32a (activatory counterpart of CD32b), CD4 and CD33. Using a Kolmogorov–Smirnov distance (KS) test to quantify the differences in marker expression between this cluster and all CD1c⁺ cDC subsets (**Figure S6**), we identified CD32b as the marker with the highest difference (KS = 0.7672). In addition, when we quantified the differences in marker expression between this cluster and the other CD32b⁺ CD1c⁺ cDC clusters (**Figure S7**), CD32b was the second most distant marker (KS = 0.5021). Thus, high CD32b expression was specific to this CD1c⁺ cDC subset found enriched in the blood of HIV controllers.

Altogether, we found that a modification in the balance of monocyte and DC subpopulations is induced from the early stages of HIV infection. Monocytes with a strong expression of HLA-I, CD64, CD317, LILRA2, LILRB4, and CD38 were most prominent in primary HIV⁺ patients when compared to cART, HIV controllers and healthy donors. In addition, primary HIV⁺ patients had significantly fewer pDCs that expressed high levels of LILRA4 and LILRB4. Moreover, they had considerably less LILRB2^{hi} cDCs. Finally, we discovered a unique CD1c⁺ CD32b^{hi} HLA-DR^{hi} cDC cluster that was specifically enriched in HIV elite controllers.

DISCUSSION

DCs and monocytes play an important role in the initiation of immune responses against HIV. However, the study of their regulation and dynamics during early HIV infection is hindered by late disease diagnosis. Moreover, early immune responses against HIV induce complex concomitant inflammatory and immunoregulatory events that can be difficult to decipher through classical approaches. In this regard, we carried out a mass cytometry analysis to characterize phenotypic heterogeneity among myeloid cell subpopulations under various conditions of HIV infection.

Our high dimensional analysis illustrates that specific DC and monocyte subpopulations found in peripheral blood are differentially affected by HIV infection. After mapping the different phenotypes of DC and monocyte subsets from PBMC samples, we highlighted a global loss of cDC2s and pDCs under primary HIV-infection in the blood. No DC clusters were enriched during primary infection, suggesting that this decrease could result from cell death rather than phenotypic changes (7, 10, 11). However, it is also well-established that cDCs and pDCs

rapidly migrate toward peripheral lymph nodes after HIV or SIV infection to elicit adaptive immune response (27, 28). Therefore, the loss of DC subsets observed in primary HIV infection might result from various physiological mechanisms.

We also investigated the abundance variation of myeloid cell clusters among the different conditions and determined their association with HIV RNA level. We found that specific monocyte clusters were enriched in primary HIV-infected patients and/or positively correlated with the plasma viral load. These subpopulations of monocytes expressed high levels of HLA-I and CD64. In the context of viral infection, HLA-I molecules present peptides derived from intracellular viral proteins to CD8⁺ T lymphocytes to activate their cytolytic activity (29). CD64 is a high-affinity Fc receptor for IgG, which allows for immune complex internalization driving cross-presentation of viral epitopes on HLA-I (30). Thus, it seems consistent that monocytes positively correlated with the viral load exhibit strong co-expression of HLA-I and CD64. Increased HLA-I and CD64 expressions by monocytes were previously reported in acute and chronic HIV-infection, respectively (8, 31). However, our data demonstrate further the strong expression of CD317, LILRA2, and LILRB4 for these subsets, and for some subclusters, a medium or high-level expression of CD38. In agreement with our data, the HIV-restriction factor CD317 was previously shown to be up-regulated at the surface of monocytes and CD4⁺ T-cells during acute HIV/SIV infection (32, 33). The activating immune-receptor LILRA2 is expressed by monocytes and neutrophils and recognizes bacterially cleaved immunoglobulin, leading to the activation of signaling pathways and subsequent immune responses (34). However, LILRA2 can selectively modulate LPS-mediated cytokine production by monocytes, and could inhibit CD64-dependent phagocytosis (35). Finally, increased expression of LILRB4 was shown to induce tolerogenic monocytes and cDCs (8, 36–38). Previous studies have also demonstrated that LILRB4 interaction with CD64 is a potent inhibitor of monocyte activation, and CD64-mediated clathrin-dependent endocytosis and phagocytosis (39, 40). Thus, expression of these molecules could explain the dysregulated ability of phagocytosis and cytokine production observed in monocytes from HIV⁺ patients (41). The up-regulation of inhibitory receptors on immune cells could also constitute a retro control mechanism to dampen chronic inflammation.

Conversely, monocyte clusters that were negatively correlated with viral load, and/or less abundant in primary HIV-infected patients, did not exhibit high level expression of HLA-I, CD64, CD317, LILRA2, LILRB4, and CD38. Therefore, these monocyte subpopulations seemed to be specifically differentiated and/or contracted under primary HIV infection. Our mass cytometry panel included CD16 marker to detect inflammatory monocytes. However, we only detected few clusters of CD16^{hi} cDCs and no CD16^{hi} monocyte clusters. The attenuation of CD16 staining on monocytes could result from the freezing procedure of PBMCs that was shown to modify staining of some FcRs on specific cell subsets (42).

Among the DC populations characterized in our study, the clusters of cDCs that highly expressed LILRB2, and a cluster

of pDCs that highly expressed LILRA4 and LILRB4, were also less abundant in primary HIV-infected patients. The majority of these clusters were also negatively correlated with plasma viral load. Functional studies indicate that cDCs and pDCs show dysregulated functions in early and chronic HIV/SIV infections. cDCs have an impaired maturation with reduced capacity for antigen presentation and cytokine production, whereas pDCs have reduced capacities to produce type-I IFNs (1, 9, 13, 43–45). In this respect, HIV infection enhances LILRB2/HLA-I and LILRA4/CD317 axes leading to the dysregulation of cDC and pDC functions, respectively (8, 9, 13, 46–49). Moreover, it has been reported that the strength of the LILRB2/HLA-I interaction is enhanced by HLA-I presentation of HIV-derived peptides, or genetic variation of HLA-I haplotypes, and correlates with the level of cDC dysregulation in HIV-infected patients (46, 47). Previous studies showed that LILRB2 was up-regulated on cDCs from blood in the acute phase of HIV and SIV infection (9, 10). LILRB2 expression was even higher in cDCs from peripheral lymph nodes than those from peripheral blood during early SIV infection (10). Therefore, in our study, the loss of LILRB2^{hi} cDC and LILRA4^{hi} pDC clusters observed in the blood from primary HIV infected patients could correspond in part to the migration of these subpopulations toward secondary lymphoid organs. Consequently, inhibitory impulses induced by the LILRB2/HLA-I and LILRA4/CD317 axes on cDCs and pDCs that have migrated into secondary lymphoid organs during primary HIV infection may enhance their dysfunctions and impaired the establishment of an effective adaptive immune response.

We also found that HIV controllers had an enrichment of a CD1c⁺ CD32b^{hi} HLA-DR^{hi} cDC cluster. These data are concordant with the recent discovery of a new CD1c^{hi}, CD32b^{hi} cDC subset, using a single-cell RNA sequencing approach (50). This cDC subset was a potent stimulator of naive T-cell proliferation, and was more likely to secrete high levels of CCL19, IL-8, IL-10, and IL-12b (50). However, further studies will be necessary to better characterize the function of this DC subset in the context of HIV infection, in particular its implication in the mechanisms leading to the natural control of viral replication in elite controller patients. Since natural control of HIV infection can occur through various mechanisms, it will be important to also characterize the abundance of CD1c⁺ CD32b^{hi} HLA-DR^{hi} cDCs in additional elite controller patients, to assess whether this feature is shared by all elite controllers.

New populations of cDCs, called pre-DCs, were recently identified in the peripheral blood from healthy donors (51). These populations can differentiate into cDC1 or cDC2 subsets *in vitro* and were proposed to be cDC precursors. However, the relationship between pre-DCs and HIV infection is still unknown. Therefore, future mass cytometry studies including additional dendritic cell markers such as CD141, CD2, Siglec-6, and Axl will be helpful to better understand the dynamics and regulation of cDC1 and pre-DC subsets during HIV infection.

In conclusion, our results unravel the diversity and various phenotypic changes induced in cDCs, pDCs, and monocytes during early stage, anti-retroviral treatment control, and naturally controlled HIV infections. These results should be

helpful when trying to better understand the cellular and molecular basis of the events driving the regulation/dysregulation of myeloid immune responses involved in the progression or control of HIV infection.

MATERIALS AND METHODS

Study Subjects and Ethics Statements

This study involved six patients with primary HIV-1 infection estimated, as previously described (17), to have been infected <30 days before inclusion. These patients were enrolled from the French ANRS CO6 PRIMO cohort and has approval by the Ethics Committee of Cochin Hospital. Blood samples were collected from patients at enrolment, who were antiretroviral naïve and negative for hepatitis B and C viruses. The six primary HIV-infected patients were then placed under cART, and blood samples were collected after 1 year. As previously described for these individuals (24), after 1 year of cART viral load was undetectable and CD4⁺ T cell count was restored (CD4⁺ T cells > 500/μl of blood). This study also involved blood samples of six HIV controller patients from the French ANRS CO21 CODEX. This cohort was approved by the ethics review committee of Ile de France VII. HIV controllers were defined as patients infected by HIV-1 for at least 5 years, who never received cART and whose last five consecutive plasma HIV RNA values were <400 copies/ml. Finally, blood samples of six healthy subjects were obtained from the Etablissement Français du Sang (EFS). All subjects gave written informed consent to participate in the study.

Sample Processing and Storage

As previously described (24), peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll density gradient centrifugation, and $\sim 1 \times 10^7$ PBMCs per sample were cryopreserved at -150°C .

Antibody Labeling and Cell Staining

To avoid batch variation effects, all samples were stained with the same batch of antibodies and on the same day. All samples were acquired in 1 day to avoid instrument signal fluctuation. Antibodies (listed in **Table S1**) were either pre-conjugated from the manufacturer (Fluidigm, San Francisco, CA) or conjugated in-house with the appropriate metal isotopes as previously described (24). Cells were thawed and 5.10^6 PBMCs were transferred per well. As previously described (24), PBMCs were incubated with Rhodium DNA-intercalator (Fluidigm), first stained with the primary surface antibody mix for 1 h, and then stained with the secondary surface antibody mix for 15 min. Next, samples were resuspended in 1.6% PFA and incubated 20 min. Cells were finally incubated 30 min in permeabilization buffer with 1 μM Iridium DNA-intercalator before a 4°C overnight incubation in 1.6% PFA with 0.1 μM Iridium DNA intercalator. For acquisition, cells were washed and filtered through a cell strainer cap of a 5-ml polystyrene round-bottom tube (BD Biosciences). Normalization beads (Fluidigm) were added to each sample. Then, samples were acquired using a mass cytometer (CyTOF-I; Fluidigm) and following the standard procedure recommended by the manufacturer. An average of $200,264 \pm 13,472$ events was acquired per sample.

Data Normalization

Raw cytometry profiles generated by CyTOF-I were normalized using normalization beads and MatLab Compiler normalizer software (52).

Manual Gating of CD45⁺ Myeloid Cells

Normalized events were gated using the Cytobank analysis platform. First, cells with only one Iridium level were selected to exclude cell doublets from the analysis. Second, normalization beads and dead cells were removed by selecting cells negative for Cerium (Ce140) and Rhodium, respectively. Thirdly, leukocytes were selected based on the positive expression of CD45. Myeloid cells were then selected based on the absence of CD3, CD19, and NKp80, and expression of HLA-DR (**Figure S1**).

Automatic Identification of Cell Clusters

SPADE algorithm was used to perform automatic identification of cell clusters (25). We observed large differences in the number of manually gated myeloid cells in each sample, ranging from 2,255 to 35,658 cells. Consequently, we first down-sampled 2,255 cells from each sample to avoid over-representation of samples with high number of cells. These uniformly down-sampled events were up-sampled at the end of the SPADE analysis. The SPADE clusters were generated using the entire and singular dataset (24 samples from 18 individuals, including 6 during primary infection and 1 year later after effective cART). Cells having similar expression of the 23 selected clustering markers (shown in blue in **Figure 1**) were grouped into clusters, regardless of donor origin. Moreover, SPADE was configured to identify 150 cell clusters (down-sampling of 40%). These parameters were defined to obtain the highest number of clusters with uniform phenotypes (26). The SPADE heatmap was generated with the SPADE clusters using the 23 clustering markers. CD45, CD3, CD19, and NKp80 were discarded from the SPADE analysis as we used them to pre-select cells of interest. Both CX3CR1 and CD33 markers were not included in the set of clustering markers due to their high heterogeneity of expression among samples. However, CX3CR1 and CD33 were added to the 23 clustering markers on heatmaps for the phenotypic characterization of myeloid cells.

Phenotypic Characterization of Identified Cell Clusters

We used the SPADEVizR R-package to perform the phenotypic categorization of the 150 cell clusters (26). Expression level of each marker was classified into five categories, which were defined based on the range of expression (5th–95th percentile) relative to the myeloid population gate across all samples. The five uniform categories represent negative, low, medium, high, and very high levels of marker expression. The categories of expression were displayed using a color scale, which ranged from white to dark red. The dendrogram, represented in the heatmap, was constructed using Euclidian distance and the complete linkage method.

There were 36 clusters that displayed a lymphoid phenotype (based on the negative expression of CD33, CD123, CD14, and LILRB3), which were identified among the total 150 cell clusters and were removed from the SPADE analysis to leave only myeloid cell clusters. Additionally, 11 myeloid cell clusters with <350 cells

associated were removed from the analysis, as their phenotypes cannot be assessed accurately. Thus, 103 myeloid cell clusters were remaining from the 150 SPADE clusters.

Families of cell clusters were determined using hierarchical clustering, represented by a dendrogram on the top of the marker categorical heatmap. Thanks to this clustering method, cell clusters with similar marker expression profiles were grouped together in the heatmap. The dendrogram was cut so that the different cluster families with homogeneous expression profiles were separated. This resulted in 12 different cluster families. These cluster families were also represented in a tSNE representation. The tSNE representation was generated using the original 23 clustering markers and Barnes-Hut t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (53), based on a perplexity parameter of 3. Distances between cell cluster phenotypes were calculated based on the Manhattan distance.

Identification of Differentially Abundant Clusters and Correlating Clusters

We used the SPADEVizR R-package to identify differentially abundant clusters (DACs), and correlated clusters (CCs) (26). DACs identification was based on the percentage of cells in the clusters, relative to total myeloid cells by unpaired Student *t*-tests (absolute fold-change > 2 and *p* < 0.05). CCs identification was based on the percentage of cells in clusters relative to the total myeloid cells that correlated with HIV RNA levels (absolute Pearson correlation coefficient > 0.65 and *p* < 0.05).

Quantification of Cluster #39 Phenotypic Specificity

Detailed phenotypic characterization of cluster #39 relative to CD1c⁺ cDC and CD32b⁺ CD1c⁺ cDC clusters was performed using CytoCompare R-package (54), based on the Kolmogorov-Smirnov distance, using a threshold of 0.30.

Statistical Analysis of Cluster Abundances Among Conditions

A two-tailed unpaired Welch's *t*-test, with a *p*-value threshold of 0.05, was used to compare the percentages of cDC2 and pDC among CD45⁺ cells and the differences in cluster cell abundance between each biological condition. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The normalized cytometry profiles were deposited on the FlowRepository database and are accessible via the accession number FR-FCM-ZYGJ.

ETHICS STATEMENT

This study and the associated protocol were approved by the Ethics Committee of Cochin Hospital and ethics review committee of Ile de France VII. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SC, A-SB, OL, RL, and BF: conceptualization. SC, NT, LA, A-SB, OL, and BF: methodology. SC, NT, LA, BV, CB, CG, CL, PB, RL, A-SB, OL, and BF: validation. SC, NT, BV, A-SB, OL, and BF: formal analysis and writing—review and editing. SC, NT, and BF: investigation. CG, CL, PB, and A-SB: resources. SC, NT, and BF: writing—original draft. BF: supervision.

FUNDING

This work was supported by French government Programme d'Investissements d'Avenir (PIA) under Grant ANR-11-INBS-0008 that fund the Infectious Disease Models and Innovative Therapies (IDMIT, Fontenay-aux-Roses, France) infrastructure and PIA grant ANR-10-EQPX-02-01 that funds the FlowCyTech facility. NT held a fellowship from the ANRS (France Recherche Nord&Sud Sida-HIV Hépatites).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the ANRS (French National Agency for AIDS research) CO6 PRIMO and CO21 CODEX cohort for helpful collaboration and all the medical professionals involved in blood sampling at the Hôpital Kremlin-Bicêtre. We also thank Bruno Iannascoli (Institut Pasteur) for the *in vitro* production of anti-CD32b antibodies and Oscar Haigh and Jean-Louis Palgen for critical reading of the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02677/full#supplementary-material>

Figure S1 | Myeloid gating strategy. “Singlets” were identified using cell length vs. Ir191-DNA intercalator and calibration beads signal was excluded (cells no beads). Living leukocytes were identified by selecting Rhodium (Rh103)Di-negative cells, and then CD45⁺ cells. Finally, myeloid cells were identified by gating on CD3⁻, CD19⁻, and then NKp80⁻ HLA-DR⁺ cells.

Figure S2 | Categorization of marker expressions. Marker expression ranges were used to characterize the phenotypes of identified SPADE clusters. Ranges of marker expression were obtained after manual gating of myeloid cells and are presented as arcsine transformed Mean Signal Intensity (MSI) signals. The range

of expression for each marker was defined based on the 5th–95th percentiles of expression throughout the dataset, and were divided into five categories represented using a five-tiered color scale ranging from white (not expressed) to dark red (highly expressed). For each expressed marker of a particular cluster, the average of the median marker expression level was used to determine the expression category of that marker. Combined marker ranges define the phenotype of each cluster. Clustering markers are shown in blue.

Figure S3 | tSNE representation showing the phenotypical similarities between cell clusters identified by SPADE. Each dot corresponds to a cell cluster and the dots are positioned in a 2-dimensional space that best represents the phenotypical proximity between cell clusters. Cell clusters have been colored based on their associated cell cluster family, blue for monocyte families, red for cDC families and green for pDC family.

Figure S4 | Cell number in each myeloid SPADE cluster. This representation shows the number of cells associated with each myeloid cell cluster, regardless of sample cell origin. Cluster names are indicated on the X-axis and the corresponding number of cells on the Y-axis. The size of the dots is proportional to the number of cells in the cluster. Cell clusters are ordered based on the dendrogram represented in **Figure 2**.

Figure S5 | Identification of differentially abundant clusters for each biological condition comparison. **(A–C)** Volcano plot representations showing Differentially Abundant Clusters (DACs) in HIV controllers, primary HIV and HIV cART samples compared to Healthy samples. **(D–F)** Volcano plot representations showing DACs in HIV controllers and primary HIV samples compared to HIV cART samples and HIV controllers compared to primary HIV samples. Each dot in the representation corresponds to a cell cluster and is proportional in size to the number of cell associated. Log₂ fold-changes are indicated in the X-axis, and the associated *p*-values, shown as $-\log_{10}$, are indicated in the Y-axis. DACs were identified using a paired Student *t*-test with a *p*-value threshold of 0.05 and a fold-change cutoff of 2. Red dots correspond to significantly abundant clusters.

Figure S6 | Marker expression densities showing the phenotypic specificity of cluster #39 relative to CD1c⁺ cDC clusters. The expression densities of all clustering markers, as well as CD33 and CX3CR1 are shown for cluster #39 and CD1c⁺ cDC clusters. The marker expression densities for cluster #39 are shown in blue whereas the marker expression densities for all CD1c⁺ cDC clusters are shown in gray. The differences between marker expression densities were quantified using the Kolmogorov–Smirnov distances (KS) using the entire and singular dataset.

Figure S7 | Marker expression densities showing the phenotypic specificity of cluster #39 relative to CD32b⁺ CD1c⁺ cDC clusters. The expression densities of all clustering markers, CD33 and CX3CR1 are shown for cluster #39 and CD32b⁺ CD1c⁺ cDC clusters. The marker expression densities for cluster #39 are shown in blue whereas the marker expression densities for all CD32b⁺ CD1c⁺ cDC clusters are shown in gray. The differences between marker expression densities were quantified using the Kolmogorov–Smirnov distances (KS) using the entire and singular dataset.

Table S1 | Overview of the mass cytometry panel. The metal, antigen, clone, isotype, and supplier are indicated for each antibody. *Not used for cell clustering.

REFERENCES

- Miller E, Bhardwaj N. Dendritic cell dysregulation during HIV-1 infection. *Immunol Rev.* (2013) 254:170–89. doi: 10.1111/imr.12082
- Boasso A, Shearer GM, Chougnet C. Immune dysregulation in human immunodeficiency virus infection: know it, fix it, prevent it? *J Intern Med.* (2009) 265:78. doi: 10.1111/j.1365-2796.2008.02043.x
- Deeks SG, Tracy R, Douek DC. Systemic effects of inflammation on health during chronic HIV infection. *Immunity.* (2013) 39:633–45. doi: 10.1016/j.immuni.2013.10.001
- Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol.* (2012) 30:1–22. doi: 10.1146/annurev-immunol-100311-102839
- Reizis B. Plasmacytoid dendritic cells: development, regulation, and function. *Immunity.* (2019) 50:37–50. doi: 10.1016/j.immuni.2018.12.027
- Wonderlich ER, Wu WC, Normolle DP, Barratt-Boyes SM. Macrophages and myeloid dendritic cells lose T cell-stimulating function in simian immunodeficiency virus infection associated with diminished IL-12 and IFN- α production. *J Immunol.* (2015) 195:3284–92. doi: 10.4049/jimmunol.1500683
- Laforge M, Campillo-Gimenez L, Monceaux V, Cumont MC, Hurtrel B, Corbeil J, et al. HIV/SIV infection primes monocytes and dendritic cells for apoptosis. *PLoS Pathog.* (2011) 7:e1002087. doi: 10.1371/journal.ppat.1002087
- Huang J, Al-Mozaini M, Rogich J, Carrington ME, Seiss K, Pereyra F, et al. Systemic inhibition of myeloid dendritic cells by circulating

- HLA class I molecules in HIV-1 infection. *Retrovirology*. (2012) 9:11. doi: 10.1186/1742-4690-9-11
9. Huang J, Yang Y, Al-Mozaini M, Burke PS, Beamon J, Carrington ME, et al. Dendritic cell dysfunction during primary HIV-1 infection. *J Infect Dis*. (2011) 204:1557–62. doi: 10.1093/infdis/jir616
 10. Alaoui L, Palomino G, Zurawski S, Zurawski G, Coindre S, Dereuddre-Bosquet N, et al. Early SIV and HIV infection promotes the LILRB2/MHC-I inhibitory axis in cDCs. *Cell Mol Life Sci*. (2018) 75:1871–87. doi: 10.1007/s00018-017-2712-9
 11. Wijewardana V, Soloff AC, Liu X, Brown KN, Barratt-Boyes SM. Early myeloid dendritic cell dysregulation is predictive of disease progression in simian immunodeficiency virus infection. *PLoS Pathog*. (2010) 6:e1001235. doi: 10.1371/journal.ppat.1001235
 12. Benlahrech A, Yasmin A, Westrop SJ, Coleman A, Herasimtschuk A, Page E, et al. Dysregulated immunophenotypic attributes of plasmacytoid but not myeloid dendritic cells in HIV-1 infected individuals in the absence of highly active anti-retroviral therapy. *Clin Exp Immunol*. (2012) 170:212–21. doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04647.x
 13. Bego MG, Côté É, Aschman N, Mercier J, Weissenhorn W, Cohen ÉA. Vpu exploits the cross-talk between BST2 and the ILT7 receptor to suppress anti-HIV-1 responses by plasmacytoid dendritic cells. *PLoS Pathog*. (2015) 11:e1005024. doi: 10.1371/journal.ppat.1005024
 14. Hasegawa A, Liu H, Ling B, Borda JT, Alvarez X, Sugimoto C, et al. The level of monocyte turnover predicts disease progression in the macaque model of AIDS. *Blood*. (2009) 114:2917–25. doi: 10.1182/blood-2009-02-204263
 15. Sandler NG, Douek DC. Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities. *Nat Rev Microbiol*. (2012) 10:655–66. doi: 10.1038/nrmicro2848
 16. Sandler NG, Wand H, Roque A, Law M, Nason MC, Nixon DE, et al. Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *J Infect Dis*. (2011) 203:780–90. doi: 10.1093/infdis/jiq118
 17. Krastinova E, Lecuroux C, Leroy C, Seng R, Cabie A, Rami A, et al. High soluble CD14 levels at primary HIV-1 infection predict more rapid disease progression. *J Infect Dis*. (2015) 212:909–13. doi: 10.1093/infdis/jiv145
 18. Prost S, Le Dantec M, Augé S, Le Grand R, Derdouch S, Auregan G, et al. Human and simian immunodeficiency viruses deregulate early hematopoiesis through a Nef/PPARGamma/STAT5 signaling pathway in macaques. *J Clin Invest*. (2008) 118:1765–75. doi: 10.1172/JCI33037
 19. Bruel T, Dupuy S, Démoulin T, Rogez-Kreuz C, Dutrieux J, Corneau A, et al. Plasmacytoid Dendritic cell dynamics tune interferon- α production in SIV-infected cynomolgus macaques. *PLoS Pathog*. (2014) 10:e1003915. doi: 10.1371/journal.ppat.1003915
 20. Favier B. Regulation of neutrophil functions through inhibitory receptors: an emerging paradigm in health and disease. *Immunol Rev*. (2016) 273:140–55. doi: 10.1111/immr.12457
 21. Baudhuin J, Migraine J, Faivre V, Loumagne L, Lukaszewicz AC, Payen D, et al. Exocytosis acts as a modulator of the ILT4-mediated inhibition of neutrophil functions. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2013) 110:17957–62. doi: 10.1073/pnas.1221535110
 22. Lichterfeld M, Yu XG. The emerging role of leukocyte immunoglobulin-like receptors (LILRs) in HIV-1 infection. *J Leukoc Biol*. (2012) 91:27–33. doi: 10.1189/jlb.0811442
 23. Huang J, Burke PS, Cung TD, Pereyra F, Toth I, Walker BD, et al. Leukocyte immunoglobulin-like receptors maintain unique antigen-presenting properties of circulating myeloid dendritic cells in HIV-1-infected elite controllers. *J Virol*. (2010) 84:9463–71. doi: 10.1128/JVI.01009-10
 24. Coindre S, Tchitchek N, Alaoui L, Vaslin B, Bourgeois C, Goujard C, et al. Mass cytometry analysis reveals the landscape and dynamics of CD32a⁺ CD4⁺ T cells from early HIV infection to effective cART. *Front Immunol*. (2018) 9:1217. doi: 10.3389/fimmu.2018.01217
 25. Qiu P, Simonds EF, Bendall SC, Gibbs KD, Bruggner RV, Linderman MD, et al. Extracting a cellular hierarchy from high-dimensional cytometry data with SPADE. *Nat Biotechnol*. (2011) 29:886–91. doi: 10.1038/nbt.1991
 26. Gautreau G, Pejowski D, Le Grand R, Cosma A, Beignon AS, Tchitchek N. SPADEVizR: an R package for visualization, analysis and integration of SPADE results. *Bioinformatics*. (2016) 33:btw708. doi: 10.1093/bioinformatics/btw708
 27. Smed-Sørensen A, Loré K. Dendritic cells at the interface of innate and adaptive immunity to HIV-1. *Curr Opin HIV AIDS*. (2011) 6:405–10. doi: 10.1097/COH.0b013e328349b06b
 28. Malleret B, Manéglier B, Karlsson I, Lebon P, Nascimbene M, Perié L, et al. Primary infection with simian immunodeficiency virus: plasmacytoid dendritic cell homing to lymph nodes, type I interferon, and immune suppression. *Blood*. (2008) 112:4598–608. doi: 10.1182/blood-2008-06-162651
 29. Krensky AM. The HLA system, antigen processing and presentation. *Kidney Int Suppl*. (1997) 58:S2–7.
 30. Guillemins M, Bruhns P, Saey Y, Hammad H, Lambrecht BN. The function of Fc γ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat Rev Immunol*. (2014) 14:94–108. doi: 10.1038/nri3582
 31. Dugast AS, Tonelli A, Berger CT, Ackerman ME, Sciaranghella G, Liu Q, et al. Decreased Fc-receptor expression on innate immune cells is associated with impaired antibody mediated cellular phagocytic activity in chronically HIV 1 infected individuals. *Virology*. (2012) 415:160–7. doi: 10.1016/j.virol.2011.03.012
 32. Homann S, Smith D, Little S, Richman D, Guatelli J. Upregulation of BST-2/Tetherin by HIV infection *in vivo*. *J Virol*. (2011) 85:10659–68. doi: 10.1128/JVI.05524-11
 33. Mussil B, Javed A, Töpfer K, Saueremann U, Sopper S. Increased BST2 expression during simian immunodeficiency virus infection is not a determinant of disease progression in rhesus monkeys. *Retrovirology*. (2015) 12:92. doi: 10.1186/s12977-015-0219-8
 34. Hirayasu K, Saito F, Suenaga T, Shida K, Arase N, Oikawa K, et al. Microbially cleaved immunoglobulins are sensed by the innate immune receptor LILRA2. *Nat Microbiol*. (2016) 1:16054. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.54
 35. Lu HK, Mitchell A, Endoh Y, Hampartoumian T, Huynh O, Borges L, et al. LILRA2 selectively modulates LPS-mediated cytokine production and inhibits phagocytosis by monocytes. *PLoS ONE*. (2012) 7:e33478. doi: 10.1371/journal.pone.0033478
 36. Anderson KJ, Allen RL. Regulation of T-cell immunity by leukocyte immunoglobulin-like receptors: innate immune receptors for self on antigen-presenting cells. *Immunology*. (2009) 127:8–17. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03097.x
 37. Chang CC, Ciobotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, Piazza F, et al. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol*. (2002) 3:237–43. doi: 10.1038/ni760
 38. Brenk M, Scheler M, Koch S, Neumann J, Takikawa O, Häcker G, et al. Tryptophan deprivation induces inhibitory receptors ILT3 and ILT4 on dendritic cells favoring the induction of human CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ T regulatory cells. *J Immunol*. (2009) 183:145–54. doi: 10.4049/jimmunol.0803277
 39. Lu HK, Rentero C, Rafferty MJ, Borges L, Bryant K, Tedla N. Leukocyte Ig-like receptor B4 (LILRB4) is a potent inhibitor of Fc γ RI-mediated monocyte activation via dephosphorylation of multiple kinases. *J Biol Chem*. (2009) 284:34839–48. doi: 10.1074/jbc.M109.035683
 40. Park M, Rafferty MJ, Thomas PS, Geczy CL, Bryant K, Tedla N. Leukocyte immunoglobulin-like receptor B4 regulates key signalling molecules involved in Fc γ RI-mediated clathrin-dependent endocytosis and phagocytosis. *Sci Rep*. (2016) 6:35085. doi: 10.1038/srep35085
 41. Espíndola MS, Soares LS, Galvão-Lima LJ, Zambuzi FA, Cacemiro MC, Brauer VS, et al. Epigenetic alterations are associated with monocyte immune dysfunctions in HIV-1 infection. *Sci Rep*. (2018) 8:5505. doi: 10.1038/s41598-018-23841-1
 42. Wittner M, Dunay GA, Kummer S, Bockhorn M, Hüfner A, Schmiedel S, et al. Cd32 expression of different memory T cell subpopulations in the blood and lymph nodal tissue of HIV patients and healthy controls correlates with immune activation. *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr*. (2017) 77:345–9. doi: 10.1097/QAI.0000000000001622
 43. Martin-Gayo E, Buzon MJ, Ouyang Z, Hickman T, Cronin J, Pimenova D, et al. Potent cell-intrinsic immune responses in dendritic cells facilitate HIV-1-specific T cell immunity in HIV-1 elite controllers. *PLoS Pathog*. (2015) 11:e1004930. doi: 10.1371/journal.ppat.1004930
 44. Wijewardana V, Bouwer AL, Brown KN, Liu X, Barratt-Boyes SM. Accumulation of functionally immature myeloid dendritic cells in lymph nodes of rhesus macaques with acute pathogenic simian immunodeficiency virus infection. *Immunology*. (2014) 143:146–54. doi: 10.1111/imm.12295

45. Sabado RL, O'Brien M, Subedi A, Qin L, Hu N, Taylor E, et al. Evidence of dysregulation of dendritic cells in primary HIV infection. *Blood*. (2010) 116:3839–52. doi: 10.1182/blood-2010-03-273763
46. Bashirova AA, Martin-Gayo E, Jones DC, Qi Y, Apps R, Gao X, et al. LILRB2 interaction with HLA class I correlates with control of HIV-1 infection. *PLoS Genet*. (2014) 10:e1004196. doi: 10.1371/journal.pgen.1004196
47. Huang J, Goedert JJ, Sundberg EJ, Cung TD, Burke PS, Martin MP, et al. HLA-B*35-Px-mediated acceleration of HIV-1 infection by increased inhibitory immunoregulatory impulses. *J Exp Med*. (2009) 206:2959–66. doi: 10.1084/jem.20091386
48. Lichterfeld M, Kavanagh DG, Williams KL, Moza B, Mui SK, Miura T, et al. A viral CTL escape mutation leading to immunoglobulin-like transcript 4-mediated functional inhibition of myelomonocytic cells. *J Exp Med*. (2007) 204:2813–24. doi: 10.1084/jem.20061865
49. Cao W, Bover L, Cho M, Wen X, Hanabuchi S, Bao M, et al. Regulation of TLR7/9 responses in plasmacytoid dendritic cells by BST2 and ILT7 receptor interaction. *J Exp Med*. (2009) 206:1603–14. doi: 10.1084/jem.20090547
50. Villani AC, Satija R, Reynolds G, Sarkizova S, Shekhar K, Fletcher J, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science*. (2017) 356:eaah4573. doi: 10.1126/science.aah4573
51. See P, Dutertre CA, Chen J, Günther P, McGovern N, Irac SE, et al. Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science*. (2017) 356:eaag3009. doi: 10.1126/science.aag3009
52. Finck R, Simonds EF, Jager A, Krishnaswamy S, Sachs K, Fantl W, et al. Normalization of mass cytometry data with bead standards. *Cytom Part A*. (2013) 83A:483–94. doi: 10.1002/cyto.a.22271
53. van der Maaten L, Hinton G. Visualizing data using t-SNE. *J Mach Learn Res*. (2008) 9:2579–605.
54. Platon L, Pejoski D, Gautreau G, Targat B, Le Grand R, Beignon AS, et al. A computational approach for phenotypic comparisons of cell populations in high-dimensional cytometry data. *Methods*. (2018) 132:66–75. doi: 10.1016/j.ymeth.2017.09.005

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Coindre, Tchitchek, Alaoui, Vaslin, Bourgeois, Goujard, Lecuroux, Bruhns, Le Grand, Beignon, Lambotte and Favier. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Article 3 : Development of novel immune checkpoint inhibitors that work across human and cynomolgus macaque: application for preclinical studies in SIV model

Résumé des données préliminaires de l'article non publié.

LILRB1 et LILRB2 sont des molécules immuno-inhibitrices qui jouent un rôle central dans l'homéostasie du système immunitaire en régulant le niveau d'activation des leucocytes. Cependant, dans le contexte de l'infection par le VIH, l'expression de ces récepteurs inhibiteurs et leur liaison au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I), ont été associés à un phénotype particulier et/ou à un profond dysfonctionnement des cellules immunitaires (Anfossi et al., 2004; Jinghe Huang et al., 2010, 2011, 2012; O'Connor et al., 2007; Vlad et al., 2003). Des études réalisées à partir de cohorte de patients infectés par le VIH montrent notamment que les individus ayant des allèles CMH-I arborant un niveau élevé d'interaction avec LILRB2 présentent des cellules dendritiques phénotypiquement et fonctionnellement dérégulées et une progression accélérée de la maladie (Bashirova, Martin-Gayo, et al., 2014; Jinghe Huang et al., 2009). Le blocage de l'interaction entre LILRB1 et/ou LILRB2 et leurs ligands CMH-I pourrait donc constituer une stratégie thérapeutique efficace pour restaurer ou améliorer les réponses immunitaires de l'hôte contre le VIH.

Les études précliniques chez les modèles animaux de maladies humaines sont une étape essentielle pour l'évaluation de l'efficacité et de l'innocuité des nouveaux candidats thérapeutiques. A cet égard, les macaques sont des modèles de choix pour étudier les LILRs et leur fonction immuno-modulatrice dans le contexte de l'infection par le SIV (Evans & Silvestri, 2013; Slukvin et al., 2006). Cependant, les anticorps bloquants actuellement disponibles dans le commerce ne sont pas capables d'interagir avec LILRB1 ou LILRB2 chez les primates non-humains.

Pour pallier ce manque de réactivité croisée, nous avons développé dans cette étude, des anticorps monoclonaux (AcM) anti-LILRB1 et/ou -LILRB2, capables de bloquer ces récepteurs inhibiteurs à la fois chez l'Homme et le macaque.

Pour cela, nous avons d'abord caractérisé les membres de la famille LILR chez le macaque cynomolgus (mLILR). Puis, en utilisant ces séquences mLILRs, nous avons développé et trouvé deux AcM de souris capables de reconnaître LILRB1 et/ou LILRB2 et de bloquer leur

interaction avec le CMH-I classique chez l'humain et le macaque. Nos résultats indiquent que l'AcM bloquant anti-LILRB2 est également capable de bloquer l'interaction de LILRB2 avec la chaîne lourde de l'antigène des leucocytes humains G non classique (HLA-G) associée ou non à la bêta-2-microglobuline. Enfin nos données montrent une distribution comparable de nos anticorps sur les cellules myéloïdes chez l'humain et le macaque cynomolgus.

Dans l'ensemble, ces données mettent en évidence des candidats inédits pour les études précliniques d'immunothérapies visant de nouveaux points de contrôle immunitaire impliqués dans l'échappement du VIH aux réponses immunitaires.

Des études fonctionnelles *in vitro* seront réalisées afin de valider la capacité de ces anticorps à améliorer les réponses immunitaires dans un contexte d'infection par le SIV/VIH. Par la suite, des tests d'innocuité d'une version chimérique (parties constantes d'IgG1 de macaque) de nos AcM bloquants sera validée dans une étude de pharmacocinétique-pharmacodynamique chez le macaque cynomolgus. A l'aide de ces résultats, nous pourrions nous placer dans des conditions optimales pour l'évaluation de l'efficacité de ces anticorps à améliorer ou restaurer les réponses immunitaires dans le modèle macaque d'infection par le SIV. Dans un second temps, nous étudierons l'effet de ces anticorps sur des macaques infectés par le SIV sous antirétroviraux.

Par la suite, ces AcM bloquants pourraient ouvrir la voie à des études précliniques dans ce modèle de primate non-humain contre d'autres maladies infectieuses qui dérèglent les réponses immunitaires au travers de la fonction immuno-inhibitrice de LILRB1 et/ou de LILRB2. Au-delà des maladies infectieuses, ces anticorps bloquant des récepteurs inhibiteurs de l'immunité pourraient également trouver des applications en immunothérapie des cancers. Au final, ces études offriront une meilleure compréhension des mécanismes de régulation immunitaire médiés par ces récepteurs *in vivo*, permettant un transfert de cette potentielle immunothérapie vers des études cliniques.

Development of novel immune checkpoint inhibitors that work across human and cynomolgus macaque: application for preclinical studies in SIV model

Sixtine Coindre¹, Anne Wijkhuisen², Anita Bouget², Sandy Zurawski³, Gerard Zurawski³, Lamine Alaoui¹, Melis Dilara Arslanhan¹, Laurent Abi-Rached⁴, Roger Le Grand¹, Olivier Lambotte^{1,5}, Stephanie Simon², Benoit Favier¹

¹CEA-Université Paris Sud-INSERM U1184, IDMIT Department, IBJF, DRF, Fontenay-aux-Roses, France

²CEA, Université Paris Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, 91191 Gif-sur-Yvette, France

³Baylor Institute for Immunology Research, Dallas, TX, USA.

⁴Aix-Marseille Univ, IRD, MEPHI, IHU Méditerranée Infection, CNRS, Marseille, France.

⁵Service de médecine interne et d'immunologie clinique, Hôpital Bicêtre, APHP, Le Kremlin Bicêtre, France.

#Corresponding author: Dr. Benoit Favier; 18, route du Panorama; 92265 Fontenay-aux-Roses; France; Phone: +33146548027; Fax: +33146547726; E-mail: benoit.favier@cea.fr

Running title: Novel immune checkpoint inhibitors for SIV preclinical studies.

Key words: LILRB1, LILRB2, immune checkpoint inhibitors, monoclonal antibodies, HIV, SIV, cynomolgus macaques.

Abstract

The immune inhibitory receptors LILRB1 and LILRB2 which recognize MHC-I ligands, are proposed to play an important role in the deregulation of immune responses in HIV or SIV infection. Yet, there are no available blocking molecules to study *in vivo* the impact of LILRB1 or LILRB2/MHC-I interactions in preclinical models of SIV infection. In this study, we aimed to generate blocking monoclonal antibodies (mAbs) against LILRB1 and/or LILRB2 that work across cynomolgus macaque and human. For this purpose, we first characterized LILR family in cynomolgus macaque and showed that their inhibitory receptors LILRB1 and LILRB2 bind to Mafa-MHC-I allele 063. Then, by using cynomolgus macaque LILR proteins, we developed two mAbs able to recognize LILRB1 and/or LILRB2 and to block *in vitro* their interaction with classical MHC-I ligands in both species. Moreover, we showed that the anti-LILRB2 mAb is also able to block the interaction of human LILRB2 with the non-classical HLA-G heavy chain associated, or not, with beta-2-microglobulin. Finally, we revealed identical mAbs distribution profile on myeloid cell subsets between cynomolgus macaques and humans. These blocking mAbs could pave the way for preclinical studies in macaque model of SIV infection and help to reveal the *in vivo* involvement of LILRB1 and LILRB2 in the pathophysiology of SIV/HIV infection. Overall, these studies will provide a better knowledge of immune regulatory mechanisms mediated by LILRB1 and LILRB2 *in vivo*, allowing a potential transfer of this immunotherapy to clinical studies.

Introduction

Activating and inhibitory receptors play a crucial role in immunological homeostasis. However, under certain circumstances, and particularly during infections, their immunomodulatory properties can be hijacked for immune evasion. Among the immune-inhibitory receptors, the leukocyte immunoglobulin-like receptor B1 (LILRB1; alternatively CD85j, ILT2, or LIR-1) and B2 (LILRB2; alternatively CD85d, ILT4, or LIR-2), have been extensively involved in the control and the pathogenesis of some infections and other human diseases (Chen et al., 2018; Hudson & Allen, 2016; Kang et al., 2015; M. Lichterfeld & Yu, 2012; J. Zhang et al., 2017). In the context of HIV infection, particular expression of LILR inhibitory receptors, mainly on myelomonocytic cells, and increase of binding strength to their human leukocyte antigen class I (HLA-I) ligands have been associated with immune cells deregulation (M. Lichterfeld & Yu, 2012).

In HIV-1 infected patients, increased expression of LILRB1 on NK cells is associated with their decreased cytotoxic activity (O'Connor et al., 2007). Whereas increased expression of LILRB2 on myeloid cells is associated with a decreased antigen presenting ability of monocytes (Vlad et al., 2003), and profound DCs dysfunctions (Jinghe Huang et al., 2011). Among DCs, classical DCs (cDCs) are professional antigen presenting cells (APCs) whose functions is critical for generating, maintaining and fine-tuning adaptive immune responses. Ex vivo studies indicate that HIV-1 infection increases of level of soluble MHC-I in plasma that can bind to LILRB2 impairing cDC functions including: 1) maturation capacity, noticed by a decrease in costimulatory molecules expression, 2) antigen-presenting function to T cells, and 3) ability to produce cytokines under stimulation. Ultimately, these dysfunctions result in cDCs inability to activate and induce T lymphocyte proliferation (Jinghe Huang et al., 2010, 2011, 2012). The direct role of LILRB2 in these dysfunctions was demonstrated by *in vitro* use of small interfering RNAs-mediated knockdown of LILRB2 surface expression in cDCs. Indeed, this LILRB2 knockdown was able to restore cDCs functional antigen-presenting properties resulting in proper T-cell activation (Bashirova et al., 2014; J. Huang et al., 2010; Jinghe Huang et al., 2010). Additional *in vitro* experiments show that the increase of LILRB2-HLA-I interaction strength by HIV peptide or HLA-I haplotype is positively correlated with the level of cDC dysfunction and disease progression (Bashirova et al., 2014; Jinghe Huang et al., 2009). Overall, these studies indicate that LILRB1 and LILRB2 may represent efficient targets to improve immune responses against HIV.

Macaque models of SIV infection have become an essential preclinical step for the assessment of efficacy and safety of new drug therapy candidates against HIV-1, including vaccines, immune checkpoint inhibitors and antiretroviral therapy (Estes et al., 2018; Evans & Silvestri, 2013; Mylvaganam et al., 2018; Shetty et al., 2012; Velu et al., 2009). The multigene LILR family comprises primate-specific receptors in terms of sequence homology (Slukvin et al., 2006). Therefore, non-human primate models, which include cynomolgus macaque, are models of choice for studying the impact of LILRs and their immunomodulatory function in the context of SIV infection. In this regard, our team previously demonstrated a strong and simultaneous increase of LILRB2 and MHC-I expression on the surface cDCs during the acute phase of HIV-1 and SIV infection in humans and cynomolgus macaques, respectively (Alaoui et al., 2018). In this context, SIV infection in macaques represents a unique model for preclinical studies to validate LILRs as therapeutic targets in HIV infection. Yet, none of the antibodies against human LILRB1 or LILRB2 that are commercially available interact with LILRB1 or LILRB2 in macaques.

In this study, we developed monoclonal antibodies (mAbs) against LILRB1 and/or LILRB2 that are able to block *in vitro* their interaction with MHC-I ligands in humans and cynomolgus macaque. For this purpose, we first characterized members from the LILR family in the cynomolgus macaque (mLILRs) in order to generate recombinant macaque LILRB1- and LILRB2-Fc fusion proteins. Then, these fusion proteins were used to develop two mAbs able to recognize LILRB1 and/or LILRB2 and to block their interaction with classical MHC-I in human and macaque. Our data show that the anti-LILRB2 blocking mAb is also able to block LILRB2 interaction with the non-classical HLA-G heavy chain associated or not with the beta-2-microglobulin subunit. Once the safety of a version of our blocking mAbs will be validated in a pharmacokinetic-pharmacodynamic study, their efficacy in boosting immune responses in the macaque model of SIV infection will be evaluated.

Results

Characterization of cynomolgus macaque LILRs and generation of blocking anti-LILRB1 and LILRB2 mAbs

The cDNA corresponding to cynomolgus macaque LILRs (mLILRs) were cloned from PBMCs. By comparing cDNA LILR sequences from human and cynomolgus macaque, we could identify five activating mLILRA (mLILRA1-A5), corresponding to the human LILRA1-A5, and four inhibitory mLILRB (mLILRB1-B4), corresponding to the human LILRB1-B4 (**Supplemental Figure 1**). Due to their broad predominance in the genome of the sequenced cynomolgus macaques, mLILRB1 allele 2 (mLILRB1.2) and mLILRB2 allele 1 (mLILRB2.1) were used to immunized mice to develop anti-mLILRB1 and anti-mLILRB2 monoclonal antibodies (mAbs). Hybridoma culture supernatants were screened for antibody production, specificity for mLILRB1.2 and mLILRB2.1, cross-reactivity for hLILRB1 and hLILRB2 and blocking capacity. At the end of the different screening stages, two hybridomas from the mLILRB1.2 immunization were selected to obtain the B1.2.1 and B1.2.2 blocking mAbs. The graphical representation and the sequences of these two mAbs' variable domains are depicted in **Supplemental Figure 2**.

B1.2.1 and B1.2.2 mAbs cross-react with both human and cynomolgus macaque LILRs

Because members of the LILR family share a high degree of homology, we tested the B1.2.1 and B1.2.2 mAbs for their potential cross-reactivity on each human and cynomolgus macaque LILRs (**Figure 1**). Using human soluble LILR-Fc fusion proteins we showed that B1.2.1 interacts with both hLILRB1 and hLILRB2 whereas B1.2.2 interacts with hLILRB1 and weakly with hLILRB2 (**Figure 1A**). Our results also showed that both B1.2.1 and B1.2.2 mAbs cross-react with hLILRA1 and hLILRA3. The interactions of B1.2.1 and B1.2.2 mAbs with hLILRB1 and hLILRB2 inhibitory receptors expressed on transduced CHO cell lines were confirmed by flow cytometry analysis (**Figure 1B**). To assess the cross reactivity of the B1.2.1 and B1.2.2 mAbs with cynomolgus macaque LILRs, we generated cell lines expressing each mLILR. Our results show that both B1.2.1 and B1.2.2 mAbs cross-react with the two mLILRB1 alleles and with allele 3 of mLILRA1 (**Figure 1C**). Moreover, B1.2.1 mAb only interacts with mLILRB2 allele 2, whereas B1.2.2 mAb interacts with the two mLILRB2 alleles. Binding affinity of B1.2.1 and B1.2.2 mAbs with human and macaque LILR-Fc fusion proteins were determined

using biolayer interferometry (**Table 1**). The equilibrium dissociation constant (K_D) affinities were calculated in the range of $1.3 \cdot 10^{-9} - 8.7 \cdot 10^{-10}$ M for hLILRs-Fc and $2.9 \cdot 10^{-9} - 3.9 \cdot 10^{-12}$ M for mLILRs-Fc. Since the mAbs K_D for hLILRB1 were approximately 3,000-fold stronger than endogenous HLA ligand binding ($K_D = 2 - 45 \cdot 10^{-6}$ M; (Shiroishi et al., 2003)), these affinities should be sufficiently strong to allow sturdy and durable interactions *in vivo*.

B1.2.1 and B1.2.2 mAbs block LILRB1 and LILRB2 interactions with classical and non-classical MHC-I ligands

LILRB1 and LILRB2 exhibit various profiles of interactions and affinity levels with membrane and soluble ligands (Burshtyn & Morcos, 2016). Among these ligands, LILRB1 and LILRB2 can bind to all of the classical human leukocyte antigen class I (HLA-I) molecules (HLA-A, -B and -C) and some of the non-classical HLA-I (HLA-G and -F) (Jones et al., 2011; Lepin et al., 2000; Navarro et al., 1999; Shiroishi, Kuroki, Rasubala, et al., 2006). In order to investigate the blocking capacity of purified B1.2.1 and B1.2.2 mAbs on human LILR/MHC-I interactions, we first used HLA-I pentamers harboring HIV peptides and displaying high level of interaction with hLILRB1 and hLILRB2 expressed on cell lines (**Figure 2A**). We found that B1.2.1 mAb was able to block the interaction of HLA-I pentamer with hLILRB2 but not with hLILRB1. Conversely, B1.2.2 mAb completely blocked the interaction of HLA-I pentamers with hLILRB1 and had no effect on hLILRB2. To confirm the blocking capacity of the mAbs, we employed another interaction system using hLILRB1-Fc and hLILRB2-Fc soluble fusion proteins and M8-cell line expressing the non-classical HLA-G1 molecule (**Figure 2B**), a ligand preferentially recognized by these two LILRs (Shiroishi, Kuroki, Rasubala, et al., 2006; Wang et al., 2019). Our data indicated that B1.2.1 mAb partially blocked hLILRB2-Fc interaction with HLA-G1 whereas B1.2.2 mAb completely blocked hLILRB1-Fc/HLA-G1 interaction. For both interaction system, the lack of blocking activity from B1.2.2 on hLILRB2 results from its poor capacity to bind this receptor. To determine the blocking capacity of the purified monoclonal antibodies on mLILRB1 or mLILRB2/MHC-I interactions in cynomolgus macaque, we first set up a binding assay between a cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*; Mafa) allele A1*063 MHC-I tetramer harboring a SIV peptide and the receptor mLILRB1.2 or mLILRB2.1 expressed on cell lines (**Figure 2C**). Thank to this approach, we could demonstrate that both B1.2.1 and B1.2.2 mAbs blocked Mafa-A1*063-MHC-I interaction with mLILRB1.2 cell line. B1.2.2 mAb also partially blocked the interaction of Mafa-A1*063-MHC-I tetramer with mLILRB2.1 cell line. Collectively, these results indicate that B1.2.1 is a blocking mAb

for human LILRB2 and cynomolgus macaque LILRB1.2 whereas B1.2.2 is a blocking mAb for human LILRB1 and cynomolgus macaque LILRB1.2 and to a lesser extent for mLILRB2.1. These results although highlight that cynomolgus macaque LILRB1 allele 2 share structural proximity with both human LILRB1 and LILRB2.

B1.2.1 mAb blocks the interaction of human LILRB2 with HLA-G free heavy chain molecule.

HLA class I molecules are composed of a heavy chain including three domains ($\alpha 1$ - $\alpha 3$) non-covalently associated with beta-2-microglobulin (B2M) subunit. Structural studies previously showed that LILRB1 and LILRB2 interact via their D1 domain with the $\alpha 3$ domain of HLA-class I heavy chain while their D1 and D2 domains interact with the B2M subunit (Shiroishi, Kuroki, Rasubala, et al., 2006; Wang et al., 2019; Willcox et al., 2003). LILRB2 has a greater interacting interface with the $\alpha 3$ domain, while LILRB1 strongly depends on the interaction with B2M to form a stable complex. Consequently, LILRB2 can interact with the HLA-I heavy chain associated or not with B2M whereas LILRB1 binds exclusively with the HLA-I complexes associated with B2M (Jones et al., 2011; Shiroishi, Kuroki, Rasubala, et al., 2006). Because LILRB2 is able to interact with the B2M-free HLA class I heavy chain (FHC), we investigated if the selected antibodies were able to block this interaction. For this purpose, HLA-G1 FHC expressing cells were generated by removing B2M molecules from the surface of M8-HLA-G1 cells with an acid treatment. The efficiency of this treatment to induce FHCs on M8-HLA-G1 cells was verified using an antibody recognizing specifically MHC-I molecules dissociated from B2M (MHC-I FHC). As shown in Figure 3A, after acid treatment all M8-HLA-G1 cells were expressing high level of FHCs. Concordantly with previous study (Shiroishi, Kuroki, Ose, et al., 2006), LILRB2-Fc was still interacting with M8-HLA-G1 FHC despite the absence of B2M (Figure 3B). Moreover, B1.2.1 mAb completely blocked the interaction of hLILRB2-Fc with HLA-G1 FHC. In agreement with its poor binding to hLILRB2, no blocking activity was observed for B1.2.2 mAb (**Figure 3B**). These data show that B1.2.1 blocks LILRB2 interaction with MHC-I molecules that are associated or not with B2M, strongly suggesting that this mAb could block a wide range of interactions between LILRB2 and its MHC-I ligands.

B1.2.1 and B1.2.2 monoclonal antibodies display similar distribution on human and macaque myeloid cells.

LILRB1 and LILRB2 are mainly found on immune subsets from the myeloid lineage (van der Touw et al., 2017). Therefore, we evaluated and then compared binding and distribution of the mAbs on human and macaque monocyte and dendritic cell subsets by flow cytometry analysis (**Figure 4A**). Stainings of PBMCs with fluorescent B1.2.1 and B1.2.2 mAbs showed similar distribution among myeloid cell sub-populations with a high expression of LILRB1 and LILRB2 on each human monocyte subsets (classical, intermediate and non-classical monocytes) and lower expression on human cDC2 and pDC subsets (**Figure 4B**). Interestingly, fluorescence intensity resulting from staining of myeloid cells with B1.2.1 mAb was higher than with B1.2.2 mAb. This difference could result from the absence of hLILRB2 recognition by B1.2.2 compared to B1.2.1 (**Figure 1A-B**). Since peripheral blood cDC1s usually do not express LILRB1 or LILRB2 in resting conditions (Colletti et al., 2016), we use this cell subset as negative control of B1.2.1 and B1.2.2 staining. In agreement with these data, none of the mAbs stained cDC1s. Staining of cynomolgus macaque PBMCs with B1.2.1 and B1.2.2 mAbs showed similar cell subset distributions to that observed in human (**Figure 4C**). Unlike human monocytes and DCs, incubation with B1.2.2 mAb lead to higher fluorescence intensity on macaque myeloid cells than B1.2.1 mAb. This difference could result from the broader recognition range of B1.2.2 mAb on macaque LILRs (**Figure 1C**).

Discussion

Expression and binding of LILRB1 and LILRB2 to their MHC-I ligands has been associated with particular phenotype and/or functional deregulation of immune cells, in patients infected by HIV-1 (Anfossi et al., 2004; J. Huang et al., 2010; Jinghe Huang et al., 2010, 2011, 2012; O'Connor et al., 2007; Vlad et al., 2003). Moreover, the strength of LILRB2/HLA-I interaction was proposed to drive HIV-1 disease progression (Bashirova et al., 2014; Jinghe Huang et al., 2009). Therefore, LILRB1 and LILRB2 seem to be critical immunoregulatory receptors that could be targeted to improve immune responses in HIV infection. LILR members were previously characterized in rhesus macaque (Slukvin et al., 2006), and macaque models of SIV infection are widely used to study the physio-pathological events of the disease which is very close from HIV infection in human (Estes et al., 2018; Evans & Silvestri, 2013; Mylvaganam et al., 2018; Shetty et al., 2012; Velu et al., 2009). In this context, blocking of LILRB1 and/or LILRB2 in the macaque models of SIV infection appears to be highly relevant to determine the impact of this treatment on immune responses against SIV/HIV. However, the commercially available blocking mAbs, generated against human LILRB1 and/or LILRB2, do not cross-react with LILRB inhibitory receptors expressed in macaques, hampering preclinical studies in this model.

In the present study, we focused on the development of blocking anti-LILRB1 and/or -LILRB2 antibodies that work across humans and cynomolgus macaques to provide unique tools to assess the role of these receptors in preclinical models of SIV/HIV infection as well as to study their impact in other human diseases. For this purpose, we characterized and cloned cDNA corresponding to LILR members in the cynomolgus macaque. We identified among this macaque specie, five mLILRA (mLILRA1-A5), corresponding to the human LILRA1-A5, and four mLILRB (mLILRB1-B4), corresponding to the human LILRB1-B4. The cDNA sequence corresponding to macaque LILRA6 and LILRB5 are currently under characterization.

To overcome a lack of mAb cross-reactivity in macaque, we produced soluble mLILRB1 and mLILRB2 proteins to generate antibodies selected for their capacity to block macaque and human LILRB1 and/or LILRB2 interaction with MHC-I *in vitro*. At the end of the screening, B1.2.1 and B1.2.2 mAbs were the best candidates. We first demonstrated that these mAbs exhibit different interaction profile for LILRB1 and/or LILRB2, in human and cynomolgus macaque. Then, using *in vitro* interaction assays of LILRB1 and LILRB2 with soluble or membrane-bound MHC-I ligands, we showed the purified mAbs also display distinct blocking

features. Indeed, B1.2.1 mAb blocks hLILRB2 and mLILRB1 allele 2, whereas B1.2.2 mAb blocks hLILRB1, mLILRB1 allele 2 and partially mLILRB2 allele 1. The blocking activity of both mAbs on mLILRB1 allele 1, and mLILRB2 allele 2 could not be assessed because of the lack of adequate MHC-I interaction assay with these receptors. Screening of interactions between mLILRB1 allele 1 or mLILRB2 allele 2 with various Mafa-MHC-I haplotypes should be helpful to setup *in vitro* interaction assay and determine if the mAbs blocking feature is conserved among the different allele of mLILRB1 and mLILRB2 members. Moreover, despite a strong binding with hLILRB1, the B1.2.1 mAb was not able to block this receptor *in vitro*. Data from an epitope mapping by crystallography of the mAbs and sequences alignment in human and macaque will be helpful to find if there are conserved amino acids sequences among LILRs that can predict binding or blocking capacity of these mAbs in both species.

To our knowledge there are currently no other mAb able to block interactions of LILRB1 and/or LILRB2 with classical MHC-I ligands in both human and cynomolgus macaque. These mAbs were also shown to block the interaction of hLILRB1 and hLILRB2 with the non-classical HLA-G ligand. Moreover, we showed that B1.2.1 mAb also blocks hLILRB2 interaction with HLA-G1 B2M-free heavy chain. According to Shiroishi and *al.*, LILRB1 and LILRB2 binding to HLA-G presents three- to four-fold higher affinity when compared to classical MHC-I molecules (Shiroishi et al., 2003). These data suggest that HLA-G interaction with these receptors may play a dominant role in the regulation of immune cell activation. Thus, it would be interesting first, to assess if an interaction between a macaque functional equivalent of HLA-G, Mafa-AG, and mLILRB1 or mLILRB2 occur, and second, to investigate if the mAbs capacity to block this interaction is conserved in cynomolgus macaque.

Generation of a cross-reactive mAb in human and macaque directed against a receptor within a multigene family, entails a significant risk of binding with different members of this family in both species. In this regard, we found that both B1.2.1 and B1.2.2 mAbs also cross-react with hLILRA1 and hLILRA3 and with mLILRA1 allele 3. Cross-reactivity of the mAbs for hLILRA1 and hLILRA3 is not surprising since these receptors share high homology with LILRB1 and LILRB2 extracellular domains and are phylogenetically closely related to these inhibitory receptors (Volz et al., 2001). LILRA3 is a soluble receptor; therefore, it would be interesting to generate a mLILRA3-Fc fusion protein to verify if mAbs interaction for LILRA3 is conserved between human and cynomolgus macaque. hLILRA1 and hLILRA3 display binding preference for FHC forms of specific HLA-I alleles, most of which belonging to the HLA-C locus (Allen et al., 2001; Jones et al., 2011; Z. Zhang et al., 2015). These two receptors

are also able to interact with HLA-I associated with B2M but with a lower affinity compared to hLILRB1 and hLILRB2 (Allen et al., 2001; Ryu et al., 2011). During our experiments, we could not detect any binding of hLILRA1 and hLILRA3 with HLA-G1 (data not shown). Other experiments will be necessary to find ligands that strongly bind to these receptors and to investigate the B1.2.1 and B1.2.2 mAbs blocking capacity on these interactions.

In our study, we were limited to few human (A*2402, B*0801 and HLA-G1) and macaque (A1*063) MHC-I alleles and peptides (HIV-1 Nef or Gag and SIV Gag) for interaction and blocking tests. However, previous studies indicate that the strength of the LILRB2/MHC-I interaction can be mediated by variations in the sequence of the HIV-Gag antigenic peptides presented by MHC-I (Mathias Lichterfeld et al., 2007), as well as, genetic polymorphisms of MHC-I haplotypes (Bashirova et al., 2014; Jinghe Huang et al., 2009; Jones et al., 2011). In this context, it would be interesting to study variation of affinities of LILRB1 and LILRB2 with a wider range of MHC-I ligands bearing a broader range of peptides, including different HIV/SIV peptides as well as other viruses and self-peptides. To answer this question, we have started to generate Mafa-MHC-I LCL 721.221 cell lines that will be used to present chosen 8-10 amino acid peptides using TAPBPR soluble protein (Tudor Ilca et al., 2018). These cell lines will be used to characterize macaque LILRs interactions with their MHC-I ligands and to validate the broad blocking capacity of the B1.2.1 and B1.2.2 mAbs.

We previously described similar LILRB2 distribution on human and cynomolgus macaque immune cell subsets (Alaoui et al., 2018). No expression profile of LILRB1 on macaque immune cells have been reported as no commercially available mAb is able to cross-react with this receptor in this specie. The mAbs produced here are unique since they are able to recognize hLILRB1 and to cross-react with both identified mLILRB1 alleles. LILRB1 and LILRB2 are mainly found on immune cell subsets from the human myeloid lineage (van der Touw et al., 2017), we thus investigated the binding of the mAbs on human and macaque cynomolgus myeloid cells. Our results revealed identical B1.2.1 and B1.2.2 mAbs distribution profile between these two species with a high expression of both receptors on classical, intermediate and non-classical monocytes and a lower expression on cDC2 and pDC subsets. Despite LILRB1 expression on B cells and on a subset of NK cells and CD8 T cells (Lamar et al., 2010), no mAbs binding was detected on these cell subsets for human and macaque. This lack of recognition could be due to an isoform of the LILRB1 receptor specific to lymphoid cells not recognized by the B1.2.1 and B1.2.2 monoclonal antibodies. Thus, it will be necessary to test these interactions in a broader range of individuals.

Although mAbs were produced using a cynomolgus macaque LILR protein, the mAbs fluorescence intensity was higher on human myeloid cells. This might reflect higher expression of LILRB1 and LILRB2 molecules at immune cell surface in human. Slight differences after cell stainings were also observed between B1.2.1 and B1.2.2 mAbs. Indeed, for human myeloid cells, the fluorescence intensity with B1.2.1 mAb was higher than with B1.2.2 mAb. Conversely, for macaque myeloid cells, the fluorescence intensity with B1.2.1 mAb was lower than with B1.2.2 mAb. These differences could result from the broader recognition of LILRB1 and LILRB2 by B1.2.1 in human and by B1.2.2 in macaque. Whether B1.2.1 and B1.2.2 mAbs can cross-react with other non-human primate species including rhesus monkey (*Macaca mulatta*), african green monkey (*Chlorocebus aethiops*) and olive baboon (*Papio Anubis*) remain to be determined. Such experiments could pave the way toward the use of these antibodies to assess the expression level or the distribution of LILRs but also the impact of blocking LILRB1 and/or LILRB2 on immune responses in these preclinical models of human pathologies.

In summary, we have produced mAbs against LILRB1 and/or LILRB2 able to recognize and block these receptors in human and cynomolgus macaque. The similar mAbs cross-reactivity, cell distribution and blocking capacity in these two species, offer a wide range of possibilities for preclinical studies in macaque models of human diseases.

Before *in vivo* studies, it is necessary to investigate *in vitro* the functional property of the anti-LILRB1 and anti-LILRB2 mAbs on human and macaque immune responses. For this purpose, it would be interesting to assess whether blocking LILRB1 and/or LILRB2 inhibitory function, with our mAbs in both species, would enhance maturation, cytokine production and antigen-presenting capacity of DCs. Subsequently, we could assess if this strategy can improve the generation of effector CD8⁺ T cells by autologous DCs from patients or macaques in acute HIV/SIV infection. Since, B1.2.2 mAb is able to block both LILRB1 and LILRB2 in macaque, but not in human, the use of bispecific antibody or a combination of antigen-binding fragment or single-chain fragment variable from the two mAbs could circumvent this lack of cross blocking in human.

Once the *in vitro* function of mAbs is well characterized, the first essential step for *in vivo* studies is to assess the safety of the blocking mAbs in a pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) study. To avoid the development of anti-drug antibodies (ADA), a macaque immunoglobulin G1 (IgG1, κ) chimeric version of our blocking mAbs will be generated by molecular biology. After the PK/PD study, the chimeric B1.2.1 or B1.2.2 mAb will be tested in

the macaque model of SIV infection. Since HIV and SIV infection promote a transient coordinated up-regulation of LILRB2 and MHC-I on cDCs and monocytes/macrophages in acute phase of the infection (Alaoui et al., 2018), macaques will be treated in primary infection to block exacerbated LILRB2/MHC-I interactions occurring during early immune responses. Therapeutic benefit of antiretroviral therapy (ART) combined with anti-PD-1, another immune checkpoint blocker, during chronic SIV infection have already been proved (Mylvaganam et al., 2018). In addition, blocking engagement of LILRB1 and LILRB2 with MHC-I would allow the CD8- α chain of T lymphocytes to interact with the latter, leading to an increase in polyfunctional CD8 T cell responses (Banchereau et al., 2012). Therefore, treatment of chronically SIV-infected macaques with the anti-LILRB1/B2 mAbs combined with ART will also be examined as therapeutic strategy to enhance antiviral immunity and reduce the viral reservoir.

Finally, these blocking mAbs could also be used in other preclinical models of human diseases since it was shown that LILRB1 and/or LILRB2 play an important role in the attenuation of immune responses induced by DENV and CMV infections (Chan et al., 2014; Li et al., 2013; Nimmerjahn & Lux, 2014; Prod'homme et al., 2007), but also by tumors (Barkal et al., 2018; Chen et al., 2018; Kang et al., 2015; Lin & Yan, 2015). Altogether, these studies will provide a better knowledge of immune regulatory mechanisms mediated by these receptors *in vivo*, allowing potentially rapid transfer of this immunotherapy from preclinical to clinical studies.

Materials and Methods

Animals

Cynomolgus macaques were housed in the facilities of the Infectious Disease Models and Innovative Therapies (IDMIT) Center, part of the “Commissariat à l’Energie Atomique et aux Energies Alternatives” (CEA, Fontenay-aux-Roses, France). Non-human primates (NHP) were used in accordance with French national regulations, under the supervision of national veterinary inspectors (CEA Permit Number D 92-032-02). The CEA complies with the Standards for Human Care and Use of Laboratory Animals, of the Office for Laboratory Animal Welfare (OLAW, USA) under OLAW Assurance number #A5826-01. The use of NHP at the CEA is in conformity with the recommendations of European Directive (2010/63, recommendation No. 9). The animals were used under the supervision of the veterinarians in charge of the animal facility. These studies were approved and accredited by the ethics committee “Comité d’Ethique en Expérimentation Animale du CEA”.

Biozzi mice were bred at the animal care unit of the CEA (Gif sur Yvette, France). All experiments were performed in compliance with French and European regulations on the care of laboratory animals (European Community Directive 86/609, French Law 2001-486, 6 June 2001) and with the agreements of the Ethics Committee of the Commissariat à l’Energie Atomique (CEtEA ‘Comité d’Ethique en Expérimentation Animale’ n° 44) no. 12-026 and 15-055 delivered to S. S. by the French Veterinary Services and CEA agreement D-91-272-106 from the Veterinary Inspection Department of Essonne (France).

Cynomolgus macaque LILR sequencing and cloning

For cynomolgus macaque LILRs (mLILRs) sequencing, PBMCs from one SIV⁻ and one SIV⁺ cynomolgus macaques were isolated and CD14⁺ cells were sorted using monocytes miltenyi microbeads kit and then stimulated with LPS for 4 h à 37°C 5% CO₂. Total RNAs from CD14⁺ cells were extracted by RNeasy mini kit (Qiagen). After mRNA isolation and reverse transcription, cDNA were sequenced using a next-generation sequencing approach (MiSeq, Illumina). mLILRs full-length sequences from cDNA sequencing were reconstructed in silico using rhesus macaque LILRs references and various softwares including Bowtie, GAP4 and Geneious version 8.1.4 (Biomatters Ltd.). Multiple mLILRs genes were identified and specific sets of primers (Eurofins Genomics) targeting the different mLILR cDNAs were designed. For

mLILRs cloning, total RNA was extracted from freshly purified PBMCs of 5 cynomolgus macaques using RNeasy Mini Kit (Qiagen). The RNA was reversely transcribed into cDNA using SuperScript VILO (Invitrogen). Amplification of mLILRs was done using the specific synthesized primers (Eurofins Genomics) and the Platinum PCR SuperMix (Invitrogen). The parameters for PCR were 95°C for 4 min followed by 40 cycles at 94°C for 30 sec, 58°C for 30 sec, 72°C for 2 min and finally at 72°C for 10 min. PCR products were cloned into TOPO TA vector (TOPO TA cloning KIT, Invitrogen) and then transformed in TOP10 competent bacteria. Sequencing of cDNAs was carried-out by Eurofins Genomics. The sequencing results were analyzed with Geneious version 8.1.4 (Biomatters Ltd.) software.

Cell lines production

As no commercially available antibody is able to recognize the different members of the mLILRs family, a flag (DYKDDDDK) sequence was added to the N-terminal part of the full-length mLILRs-encoding cDNAs. Signal peptide of mLILRs was removed and replaced by a new signal peptide (MSALLILALVGAAVA) to ensure efficient surface expression of the receptors. The modified mLILRs cDNA sequences were synthesized and subcloned into the lentiviral vector pLenti-GIII-CMV-GFP-2A-Puro (ABM Inc.) by ProteoGenix (Schiltigheim, France). Plasmid constructions were amplified through STL2 competent bacteria (Invitrogen) transformation and purified using NucleoBond™ Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel). For generation of the different mLILR cell lines, mLILRs cDNA-encoding plasmids were co-transfected with pLenti-P2A packaging and pLenti-P2B envelope lentiviral plasmids (ABM Inc.) into HEK293T cells using TransIT®-293 (Mirus, EuroMedex), according to the manufacturer's instructions. Transfection efficiency was evaluated by the level of GFP expressed by HEK293T transfected cells. Stably transfected cells were selected with Puromycin 4µg/ml (Gibco) for one week and maintained in complete medium (DMEM (Gibco), 10% FBS (Eurobio), 1% Penicillin-Streptomycin-Neomycin (PSN) antibiotic mixture (Gibco). Receptor expression on the surface of each HEK293T-mLILR cell line produced was confirmed by flow cytometry using an anti-DYKDDDDK antibody (clone REA213, Miltenyi Biotec). Cell lines highly co-expressing mLILRs and GFP were sorted using the Becton Dickinson (BD) FACSAria I cell sorter and maintained in complete medium. M8 HLA-G1 cell line was produced by transfecting M8 melanoma cells with pcDNA3.1 vector containing HLA-G1 cDNA by electroporation. CHO cell lines expressing either human LILRB1 or LILRB2 were kindly donated by Donald Shaffer (Jounce Therapeutics Inc., Cambridge, USA).

Cynomolgus macaque LILR-Fc fusion proteins production

The mLILR-Fc fusion proteins were produced and purified in collaboration with the team of Gerard and Sandy Zurawski (Baylor Research Institute, Dallas, USA). The cDNAs encoding the extracellular domain of the different mLILRs were fused to a hIgG1-Fc by molecular biology for the generation of mLILR-Fc fusion proteins expressing the Fc region (CH2 and CH3 domains) of the human IgG1 heavy chain and the hinge region. The plasmid constructions were transfected into HEK293T cells to produce the mLILR-Fc soluble proteins with optimal glycosylation. Each mLILR-Fc fusion protein secreted into the culture supernatants was harvested and purified by affinity chromatography.

B1.2.1 and B1.2.2 monoclonal antibody production

Monoclonal antibodies (mAbs) were raised in *Biozzi* mice by immunizing with mLILRB1.2-Fc or mLILRB2.1-Fc (30 µg per injection) fusion protein. Mice eliciting the highest anti-mLILRB1.2-Fc or mLILRB2.1-Fc antibody response were given an intravenous boost injection 3 days before being sacrificed for splenic B cell fusion, according to Köhler and Milstein (Köhler & Milstein, 1975). Hybridoma culture supernatants were screened for antibody production, specificity for mLILRB1.2 and mLILRB2.1, cross-reactivity for hLILRB1 and hLILRB2 and blocking capacity, by either enzyme immunoassay, or either flow cytometry, or either both methods. Selected hybridomas were subsequently cloned by limiting dilution. Monoclonal antibodies were produced in hybridoma supernatants and further purified using ÄKTA™ protein purifier (Cytiva). Purification efficiency of mAbs was assessed by SDS-PAGE in reducing and non-reducing conditions using an Agilent 2100 Bioanalyser. Endotoxin levels in purified mAbs were determined by Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol.

Immunoenzymatic screening of anti-LILRB1 and -LILRB2 hybridoma supernatants on mLILR-Fc

Enzyme immunoassays (EIA) were performed by transferring 50 µl of diluted hybridoma culture supernatants into 96-well, flat-bottom microplates (MaxiSorp™ immunoplate, Nunc) coated with goat anti-mouse immunoglobulin antibody (Jackson ImmunoResearch), and incubated overnight at 4 °C. After washes, biotinylated mLILRB1.2-Fc or mLILRB2.1-Fc fusion proteins

(50 ng/ml) were added (100 µl per well) and plates were reacted for 1 h at room temperature (RT). Plates were washed and reacted for 30 min at RT with 100 µl per well of 1 EU/ml of acetylcholinesterase (AChE)-labeled streptavidin produced in house. After several washes, AChE activity was revealed by Ellman's colorimetric method (Grassi et al., 1989) by measuring absorbances at 414 nm after 1 h. All reagents were diluted in EIA buffer (0.1 M phosphate buffer [pH 7.4] containing 0.15 M NaCl, 0.1% BSA, and 0.01% sodium azide). Plates coated with proteins were saturated in EIA buffer (18 h at 4°C) and washed with washing buffer (0.1 M potassium phosphate [pH 7.4] containing 0.05% Tween 20).

Flow cytometry screening of anti-LILRB1 and -LILRB2 hybridoma supernatants and purified mAbs on mLILR and hLILR cell lines

Flow cytometry screenings were performed using $0.2 \cdot 10^6$ cells of each HEK293T mLILRs cell lines, CHO hLILRB1 or hLILRB2 cell lines, placed into 96-well, cell culture-treated, U-shaped-bottom microplate (Falcon™, Thermo Fisher Scientific) and stained with LIVE/DEAD viability dye (Invitrogen) for 15 min at RT to exclude dead cells. After a wash with DPBS 1X (Gibco), cells were incubated with 50 µl of hybridoma supernatants or 10 µg/ml of purified mAbs for 15 min at RT in qs 100 µl DPBS 1X to assess antibodies specificity and cross-reactivity. Cells were washed and incubated for 15 min at RT with an affini-pure secondary goat anti-mouse or -human IgG (H+L) antibody conjugated to the Alexa Fluor (AF)647 dye (Jackson ImmunoResearch) in qs 100 µl DPBS 1X. Finally, cells were washed and fixed with BD CellFIX 1X and acquired on BD LSR Fortessa cytometer. Purified mouse IgG1 κ isotype control from Becton Dickinson and purified IgG1 mAb produced in house were used as IgG isotype control.

Immunoenzymatic screening of B1.2.1 and B1.2.2 mAbs on hLILR-Fc

Enzyme immunoassays (EIA) were performed by transferring 5 µg/ml of hLILR-Fc, purchased from R&D Systems, into 96-well, flat-bottom microplates (MaxiSorp™ immunoplate, Nunc) coated with goat anti-human immunoglobulin antibody (Jackson ImmunoResearch), and incubated overnight at 4 °C. After washes, plates were saturated with EIA buffer for 3 h at RT. Plates were washed and several diluted concentration of 10 µg/ml monoclonal antibodies (10, 3.3, 1.1, 0.37, 0.12, 0.041 and 0.014 µg/ml) at a volume of 100 µl per well were added for 2 h

incubation at RT. After washes, plates were reacted for 1 h at RT with 100 μ l per well of 2 EU/ml of acetylcholinesterase (AChE)-labeled goat anti-mouse antibody produced in house, then washed again. AChE activity was revealed by Ellman's colorimetric method by measuring absorbances at 414 nm after 1 h and 40 min.

Affinity determination of B1.2.1 and B1.2.2 mAbs

The affinities of B1.2.1 and B1.2.2 mAbs for the different human and macaque LILRs-Fc fusion proteins were determined by Bio-layer Interferometry using the ForteBio system (Pall Laboratory). B1.2.1 and B1.2.2 mAbs prepared at 10 μ g/ml in EIA buffer + 0.02% Tween 20 (Sigma-Aldrich) were dispensed in 96-well microplate at a volume of 200 μ l per well. The same concentration occupied 8 vertical wells. In another wells, LILR-Fc fusion proteins were each dispensed at 8 titrated concentrations. A glycine (Sigma-Aldrich, pH [1.4]) regeneration solution and EIA buffer + 0.02% Tween 20 for baseline stabilization and neutralization was also prepared. The plate was agitated at 1000 rpm over the entire course of the experiment. Prior to the binding measurements, the anti-mouse Fc (AMC) sensors tips were hydrated in EIA buffer + 0.02% tween 20. The sensor tips were then transferred to the EIA buffer + 0.02% Tween 20 for the baseline, after mAb – containing wells for 300 sec loading step. After baseline step in EIA buffer + 0.02% Tween 20 for 60 sec, the binding kinetics were measured by dipping the mAb-coated sensors into the wells containing LILR-Fc fusion protein at varying concentrations. The binding interactions were monitoring over 900 sec associated period and followed by a 900 sec dissociation period in the wells containing EIA buffer +0.02 % Tween 20. The AMC sensors tips were regenerated with wells containing glycine [pH1.4] and neutralized in the EIA buffer + 0.02% tween 20 between each binding cycle. The equilibrium dissociation constant (K_D) was calculated using the ratio between the dissociation rate constant (k_{off}) and the association rate constant (k_{on}), obtained with global Langmuir 1:1 fit (Octet Data Analysis software, vHT.10).

Blocking tests

Blocking tests of soluble hLILRB1/B2-Fc fusion proteins interaction with M8 HLA-G1 cell line were performed by co-incubating 5 μ g/ml of fusion proteins with either 50 μ l of hybridoma supernatants or either 10 μ g/ml of purified B1.2.1 or B1.2.2 mAbs for 20 min at RT in qs 100

μl DPBS 1X. M8 HLA-G1 cells ($0,2 \cdot 10^6$) were placed into 96-well, cell culture-treated, U-shaped-bottom microplate and stained with LIVE/DEAD viability dye. After a wash, cells were incubated with mixes of fusion proteins with mAbs for 20 min at RT. Cells were washed to remove the unbound fusion proteins and incubated for 15 min at RT with an affinity-purified secondary goat anti-human IgG (H+L) antibody conjugated to the AF647 dye (Jackson ImmunoResearch) at a volume of qs 100 μl DPBS 1X per well. Cells were finally washed and fixed with BD CellFIX 1X and acquired on BD LSR Fortessa cytometer.

Same protocol was performed for the blocking test of hLILRBB2-Fc fusion protein interaction with HLA-G1 free heavy chains (FHCs) induced by acid treatments of M8 HLA-G1 cells. Acid treatment consisted to a preincubation step of $8 \cdot 10^6$ M8 HLA-G1 cells with 1 ml of HCl Glycine (300mM) buffer (pH=3) with BSA 1% for 2 min at RT. After two washes with 50 ml FBS stain buffer (BD), $0,4 \cdot 10^6$ M8 HLA-G1 treated cells were placed into 96-well, cell culture-treated, U-shaped-bottom microplate for blocking tests. Complete dissociation of the beta-2-microglobulin from the HLA-G1 heavy chain was confirmed by staining the cells with monoclonal antibody (clone A4-APC, eBioscience) that specifically recognize HLA-I free heavy chains. Purified isotype control IgG1 mAb produced in house was used as IgG isotype control.

For blocking tests between membrane bound LILRs and soluble MHC-I ligands, CHO hLILRB1 cell line interaction with human MHC-I A*2402 HIV-1 Nef 134-143 (RYPLTFGWY) pentamer (ProImmune), CHO hLILRB2 cell line interaction with human MHC-I B*0801 HIV-1 Gag 259-267 (GEIYKRWII) pentamer (ProImmune), and mLILRB1.2 or mLILRB2.1 cell line interactions with cynomolgus macaque Mafa-A1*063 SIV gag GW9 (GPRKPIKCW) - APC tetramer (MBL International), were used. $2 \cdot 10^5$ cells from each cell lines expressing human or cynomolgus macaque LILRs were placed into 96-well, cell culture-treated, U-shaped-bottom microplate and stained with LIVE/DEAD viability dye. After a wash, cells were incubated with either 50 μl of hybridoma supernatants or either 10 $\mu\text{g/ml}$ of B1.2.1 or B1.2.2 purified mAbs in qs 100 μl DPBS 1X for 15 min at RT. Cells were washed to remove the unbound antibodies and then incubated for 30 min at RT with pentamers or APC-conjugated tetramers in a total volume of qs 100 μl DPBS 1X per well. After a wash, cells incubated with pentamers were stained with a secondary Pro5 Fluorotag antibody conjugated to APC (ProImmune) in qs 100 μl DPBS 1X. Cells were finally washed and fixed with BD CellFIX 1X and acquired on BD LSR Fortessa cytometer. Purified IgG1 B1.2 mAb produced in house and displaying no blocking capacity was used as IgG isotype control.

B1.2.1 and B1.2.2 mAbs distribution on PBMCs

Human and cynomolgus macaque PBMCs previously purified by Ficoll gradient and frozen in FBS 10% dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich) were thawed in RPMI (Gibco), 10% FBS, 1% PSN. $2 \cdot 10^6$ cells were placed into 5mL round bottom polystyrene fACS tubes (Falcon™, Thermo Fisher Scientific) and stained with LIVE/DEAD viability dye. After a wash, cells were incubated for 15 min RT with chicken anti-CADM1 (clone 3E1, MBL Life Science). Cells were washed and stained for 30 min at 4°C with an antibody mix containing either AF647-conjugated B1.2.1 mAb, either AF647-conjugated B1.2.2 mAb or either AF647-conjugated mouse IgG1 κ isotype control (Becton Dickinson). Cells were finally washed and fixed with BD CellFIX 1X and acquired on BD LSR Fortessa cytometer.

Antibody mixes for human and cynomolgus macaque PBMCs staining contained anti-CD14-BV711 (clone M5E2), anti-CD11c-BV650 (clone 3.9) and anti-CD1c-APC-Cy7 (clone L161) from BioLegend. Anti-CD3-V450 (clone SP34-2), anti-CD20-V450 (L27), anti-CD123-PerCP-Cy5.5 (clone 7G3) and anti-HLA-DR-PE-Cy7 (clone L243) from Becton Dickinson. Anti-CD16-PE/Dazzle 594 (clone 3G8) from Sony Biotechnology. But also, donkey anti-chicken-PE from Jackson ImmunoResearch and anti-CD45-V500 (clone HI30 for human or clone D058-1283 for macaque PBMCs staining) from Becton Dickinson.

Conflicts of Interest

The authors state no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank Marc Plaisance (CEA, DSV, iBiTec-S LERI) for production of the anti-LILRB1 and anti-LILRB2 antibodies. This study was supported by grants from CEA (Bottom-up and DRF impulsion), Labex Lermite and Idex Paris Saclay.

References

- Alaoui, L., Palomino, G., Zurawski, S., Zurawski, G., Coindre, S., Dereuddre-Bosquet, N., Lecuroux, C., Goujard, C., Vaslin, B., Bourgeois, C., Roques, P., Le Grand, R., Lambotte, O., & Favier, B. (2018). Early SIV and HIV infection promotes the LILRB2/MHC-I inhibitory axis in cDCs. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(10), 1871–1887. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2712-9>
- Allen, R. L., Raine, T., Haude, A., Trowsdale, J., & Wilson, M. J. (2001). Cutting Edge: Leukocyte Receptor Complex-Encoded Immunomodulatory Receptors Show Differing Specificity for Alternative HLA-B27 Structures. *The Journal of Immunology*, 167(10), 5543–5547. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.10.5543>
- Anfossi, N., Doisne, J.-M., Peyrat, M.-A., Ugolini, S., Bonnaud, O., Bossy, D., Pitard, V., Merville, P., Moreau, J.-F., Delfraissy, J.-F., Dechanet-Merville, J., Bonneville, M., Venet, A., & Vivier, E. (2004). Coordinated expression of Ig-like inhibitory MHC class I receptors and acquisition of cytotoxic function in human CD8+ T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(12), 7223–7229.
- Banchereau, J., Zurawski, S., Thompson-Snipes, L., Blanck, J.-P., Clayton, S., Munk, A., Cao, Y., Wang, Z., Khandelwal, S., Hu, J., McCoy, W. H., Palucka, K. A., Reiter, Y., Fremont, D. H., Zurawski, G., Colonna, M., Shaw, A. S., & Klechevsky, E. (2012). Immunoglobulin-like transcript receptors on human dermal CD14+ dendritic cells act as a CD8-antagonist to control cytotoxic T cell priming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(46), 18885–18890. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205785109>
- Barkal, A. A., Weiskopf, K., Kao, K. S., Gordon, S. R., Rosental, B., Yiu, Y. Y., George, B. M., Markovic, M., Ring, N. G., Tsai, J. M., McKenna, K. M., Ho, P. Y., Cheng, R. Z., Chen, J. Y., Barkal, L. J., Ring, A. M., Weissman, I. L., & Maute, R. L. (2018). Engagement of MHC class I by the inhibitory receptor LILRB1 suppresses macrophages and is a target of cancer immunotherapy. *Nature Immunology*, 19(1), 76–84. <https://doi.org/10.1038/s41590-017-0004-z>
- Bashirova, A. A., Martin-Gayo, E., Jones, D. C., Qi, Y., Apps, R., Gao, X., Burke, P. S., Taylor, C. J., Rogich, J., Wolinsky, S., Bream, J. H., Duggal, P., Hussain, S., Martinson, J., Weintrob, A., Kirk, G. D., Fellay, J., Buchbinder, S. P., Goedert, J. J., ... Yu, X. G. (2014). LILRB2 Interaction with HLA Class I Correlates with Control of HIV-1 Infection. *PLoS Genetics*, 10(3), e1004196. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004196>
- Burshtyn, D. N., & Morcos, C. (2016). The Expanding Spectrum of Ligands for Leukocyte Ig-like Receptors. *The Journal of Immunology*, 196(3), 947–955. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501937>
- Chan, K. R., Ong, E. Z., Tan, H. C., Zhang, S. L.-X., Zhang, Q., Tang, K. F., Kaliaperumal, N., Lim, A. P. C., Hibberd, M. L., Chan, S. H., Connolly, J. E., Krishnan, M. N., Lok, S. M., Hanson, B. J., Lin, C.-N., & Ooi, E. E. (2014). Leukocyte immunoglobulin-like receptor B1 is critical for antibody-dependent dengue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(7), 2722–2727. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317454111>
- Chen, H.-M., van der Touw, W., Wang, Y. S., Kang, K., Mai, S., Zhang, J., Alsina-Beauchamp, D., Duty, J. A., Mungamuri, S. K., Zhang, B., Moran, T., Flavell, R., Aaronson, S., Hu,

- H.-M., Arase, H., Ramanathan, S., Flores, R., Pan, P.-Y., & Chen, S.-H. (2018). Blocking immunoinhibitory receptor LILRB2 reprograms tumor-associated myeloid cells and promotes antitumor immunity. *The Journal of Clinical Investigation*, *128*(12), 5647–5662. <https://doi.org/10.1172/JCI97570>
- Colletti, N. J., Liu, H., Gower, A. C., Alekseyev, Y. O., Arendt, C. W., & Shaw, M. H. (2016). TLR3 signaling promotes the induction of unique human BDCA-3 dendritic cell populations. *Frontiers in Immunology*, *7*(MAR), 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00088>
- Estes, J. D., Wong, S. W., & Brenchley, J. M. (2018). Nonhuman primate models of human viral infections. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 18, Issue 6, pp. 390–404). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0005-7>
- Evans, D. T., & Silvestri, G. (2013). Nonhuman primate models in AIDS research. In *Current Opinion in HIV and AIDS* (Vol. 8, Issue 4, pp. 255–261). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e328361cee8>
- Grassi, J., Frobert, Y., Pradelles, P., Chercuitte, F., Gruaz, D., Dayer, J. M., & Poubelle, P. E. (1989). Production of monoclonal antibodies against interleukin-1 α and -1 β . Development of two enzyme immunometric assays (EIA) using acetylcholinesterase and their application to biological media. *Journal of Immunological Methods*, *123*(2), 193–210. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(89\)90223-8](https://doi.org/10.1016/0022-1759(89)90223-8)
- Huang, J., Burke, P. S., Cung, T. D. H., Pereyra, F., Toth, I., Walker, B. D., Borges, L., Lichterfeld, M., & Yu, X. G. (2010). Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptors Maintain Unique Antigen-Presenting Properties of Circulating Myeloid Dendritic Cells in HIV-1-Infected Elite Controllers. *Journal of Virology*, *84*(18), 9463–9471. <https://doi.org/10.1128/JVI.01009-10>
- Huang, Jinghe, Al-Mozaini, M., Rogich, J., Carrington, M. F., Seiss, K., Pereyra, F., Lichterfeld, M., & Yu, X. G. (2012). Systemic inhibition of myeloid dendritic cells by circulating HLA class I molecules in HIV-1 infection. *Retrovirology*, *9*(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-9-11>
- Huang, Jinghe, Burke, P., Yang, Y., Seiss, K., Beamon, J., Cung, T., Toth, I., Pereyra, F., Lichterfeld, M., & Yu, X. G. (2010). Soluble HLA-G inhibits myeloid dendritic cell function in HIV-1 infection by interacting with leukocyte immunoglobulin-like receptor B2. *Journal of Virology*, *84*(20), 10784–10791. <https://doi.org/10.1128/JVI.01292-10>
- Huang, Jinghe, Goedert, J. J., Sundberg, E. J., Cung, T. D. H., Burke, P. S., Martin, M. P., Preiss, L., Lifson, J., Lichterfeld, M., Carrington, M., & Yu, X. G. (2009). HLA-B*35-Px-mediated acceleration of HIV-1 infection by increased inhibitory immunoregulatory impulses. *The Journal of Experimental Medicine*, *206*(13), 2959–2966. <https://doi.org/10.1084/jem.20091386>
- Huang, Jinghe, Yang, Y., Al-Mozaini, M., Burke, P. S., Beamon, J., Carrington, M. F., Seiss, K., Rychert, J., Rosenberg, E. S., Lichterfeld, M., & Yu, X. G. (2011). Dendritic Cell Dysfunction During Primary HIV-1 Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, *204*(10), 1557–1562. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir616>
- Hudson, L. E., & Allen, R. L. (2016). Leukocyte Ig-like receptors - A Model for MHC Class I Disease Associations. *Frontiers in Immunology*, *7*(JUL). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00281>

- Jones, D. C., Kosmoliaptsis, V., Apps, R., Lapaque, N., Smith, I., Kono, A., Chang, C., Boyle, L. H., Taylor, C. J., Trowsdale, J., & Allen, R. L. (2011). HLA class I allelic sequence and conformation regulate leukocyte Ig-like receptor binding. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *186*(5), 2990–2997. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003078>
- Kang, X., Kim, J., Deng, M., John, S., Chen, H., Wu, G., Phan, H., & Zhang, C. C. (2015). Inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors: immune checkpoint proteins and tumor sustaining factors. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *4101*(February). <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1121324>
- Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, *256*(5517), 495–497. <https://doi.org/10.1038/256495a0>
- Lamar, D. L., Weyand, C. M., & Goronzy, J. J. (2010). Promoter choice and translational repression determine cell type-specific cell surface density of the inhibitory receptor CD85j expressed on different hematopoietic lineages. *Blood*, *115*(16), 3278–3286. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-243493>
- Lepin, E. J., Bastin, J. M., Allan, D. S., Roncador, G., Braud, V. M., Mason, D. Y., van der Merwe, P. A., McMichael, A. J., Bell, J. I., Powis, S. H., & O’Callaghan, C. A. (2000). Functional characterization of HLA-F and binding of HLA-F tetramers to ILT2 and ILT4 receptors. *European Journal of Immunology*, *30*(12), 3552–3561. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200012\)30:12<3552::AID-IMMU3552>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200012)30:12<3552::AID-IMMU3552>3.0.CO;2-L)
- Li, N. L., Fu, L., Uchtenhagen, H., Achour, A., & Burshtyn, D. N. (2013). Cis association of leukocyte Ig-like receptor 1 with MHC class I modulates accessibility to antibodies and HCMV UL18. *European Journal of Immunology*, *43*(4), 1042–1052. <https://doi.org/10.1002/eji.201242607>
- Lichterfeld, M., & Yu, X. G. (2012). The emerging role of leukocyte immunoglobulin-like receptors (LILRs) in HIV-1 infection. *Journal of Leukocyte Biology*, *91*(1), 27–33. <https://doi.org/10.1189/jlb.0811442>
- Lichterfeld, Mathias, Kavanagh, D. G., Williams, K. L., Moza, B., Mui, S. K., Miura, T., Sivamurthy, R., Allgaier, R., Pereyra, F., Trocha, A., Feeney, M., Gandhi, R. T., Rosenberg, E. S., Altfeld, M., Allen, T. M., Allen, R., Walker, B. D., Sundberg, E. J., & Yu, X. G. (2007). A viral CTL escape mutation leading to immunoglobulin-like transcript 4-mediated functional inhibition of myelomonocytic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *204*(12), 2813–2824. <https://doi.org/10.1084/jem.20061865>
- Lin, A., & Yan, W. H. (2015). Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in cancers: Roles in immune evasion, metastasis and target for therapy. In *Molecular Medicine* (Vol. 21, Issue 1, pp. 782–791). University of Michigan. <https://doi.org/10.2119/molmed.2015.00083>
- Mylvaganam, G. H., Chea, L. S., Tharp, G. K., Hicks, S., Velu, V., Iyer, S. S., Deleage, C., Estes, J. D., Bosinger, S. E., Freeman, G. J., Ahmed, R., & Amara, R. R. (2018). Combination anti-PD-1 and antiretroviral therapy provides therapeutic benefit against SIV. *JCI Insight*, *3*(18). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.122940>
- Navarro, F., Llano, M., Bellón, T., Colonna, M., Geraghty, D. E., & López-Botet, M. (1999). The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells. *European Journal of Immunology*, *29*(1), 277–283. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199901\)29:01<277::AID-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199901)29:01<277::AID-)

IMMU277>3.0.CO;2-4

- Nimmerjahn, F., & Lux, A. (2014). LILR-B1 blocks activating FcγR signaling to allow antibody dependent enhancement of dengue virus infection. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 111, Issue 7, pp. 2404–2405). <https://doi.org/10.1073/pnas.1324286111>
- O'Connor, G. M., Holmes, A., Mulcahy, F., & Gardiner, C. M. (2007). Natural Killer cells from long-term non-progressor HIV patients are characterized by altered phenotype and function. *Clinical Immunology*, *124*(3), 277–283. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2007.05.016>
- Prod'homme, V., Griffin, C., Aicheler, R. J., Wang, E. C. Y., McSharry, B. P., Rickards, C. R., Stanton, R. J., Borysiewicz, L. K., López-Botet, M., Wilkinson, G. W. G., & Tomasec, P. (2007). The Human Cytomegalovirus MHC Class I Homolog UL18 Inhibits LIR-1 + but Activates LIR-1 – NK Cells . *The Journal of Immunology*, *178*(7), 4473–4481. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4473>
- Ryu, M., Chen, Y., Qi, J., Liu, J., Fan, Z., Nam, G., Shi, Y., Cheng, H., & Gao, G. F. (2011). LILRA3 Binds Both Classical and Non-Classical HLA Class I Molecules but with Reduced Affinities Compared to LILRB1/LILRB2: Structural Evidence. *PLoS ONE*, *6*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019245>
- Shetty, R. D., Velu, V., Titanji, K., Bosinger, S. E., Freeman, G. J., Silvestri, G., & Amara, R. R. (2012). PD-1 blockade during chronic SIV infection reduces hyperimmune activation and microbial translocation in rhesus macaques. *Journal of Clinical Investigation*, *122*(5), 1712–1716. <https://doi.org/10.1172/JCI60612>
- Shiroishi, M., Kuroki, K., Ose, T., Rasubala, L., Shiratori, I., Arase, H., Tsumoto, K., Kumagai, I., Kohda, D., & Maenaka, K. (2006). Efficient leukocyte Ig-like receptor signaling and crystal structure of disulfide-linked HLA-G dimer. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(15), 10439–10447. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512305200>
- Shiroishi, M., Kuroki, K., Rasubala, L., Tsumoto, K., Kumagai, I., Kurimoto, E., Kato, K., Kohda, D., & Maenaka, K. (2006). Structural basis for recognition of the nonclassical MHC molecule HLA-G by the leukocyte Ig-like receptor B2 (LILRB2/LIR2/ILT4/CD85d). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(44), 16412–16417. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605228103>
- Shiroishi, M., Tsumoto, K., Amano, K., Shirakihara, Y., Colonna, M., Braud, V. M., Allan, D. S. J., Makadzange, A., Rowland-Jones, S., Willcox, B., Jones, E. Y., van der Merwe, P. A., Kumagai, I., & Maenaka, K. (2003). Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(15), 8856–8861. <https://doi.org/10.1073/pnas.1431057100>
- Slukvin, I. I., Grendell, R. L., Rao, D. S., Hughes, A. L., & Golos, T. G. (2006). Cloning of rhesus monkey LILRs. *Tissue Antigens*, *67*(4), 331–337. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2006.00579.x>
- Tudor Ilca, F., Neerinx, A., Wills, M. R., De La Roche, M., & Boyle, L. H. (2018). Utilizing TAPBPR to promote exogenous peptide loading onto cell surface MHC I molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(40),

- E9353–E9361. <https://doi.org/10.1073/pnas.1809465115>
- van der Touw, W., Chen, H. M., Pan, P. Y., & Chen, S. H. (2017). LILRB receptor-mediated regulation of myeloid cell maturation and function. In *Cancer Immunology, Immunotherapy* (Vol. 66, Issue 8, pp. 1079–1087). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00262-017-2023-x>
- Velu, V., Titanji, K., Zhu, B., Husain, S., Pladevega, A., Lai, L., Vanderford, T. H., Chennareddi, L., Silvestri, G., Freeman, G. J., Ahmed, R., & Amara, R. R. (2009). Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature*, *458*(7235), 206–210. <https://doi.org/10.1038/nature07662>
- Vlad, G., Piazza, F., Colovai, A., Cortesini, R., Della Pietra, F., Suciufoca, N., & Manavalan, J. S. (2003). Interleukin-10 induces the upregulation of the inhibitory receptor ILT4 in monocytes from HIV positive individuals. *Human Immunology*, *64*(5), 483–489. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12691698>
- Volz, A., Wende, H., Laun, K., & Ziegler, A. (2001). Genesis of the ILT/LIR/MIR clusters within the human leukocyte receptor complex. In *Immunological Reviews* (Vol. 181, pp. 39–51). <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2001.1810103.x>
- Wang, Q., Song, H., Cheng, H., Qi, J., Nam, G., Tan, S., Wang, J., Fang, M., Shi, Y., Tian, Z., Cao, X., An, Z., Yan, J., & Gao, G. F. (2019). Structures of the four Ig-like domain LILRB2 and the four-domain LILRB1 and HLA-G1 complex. *Cellular and Molecular Immunology*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0258-5>
- Willcox, B. E., Thomas, L. M., & Bjorkman, P. J. (2003). Crystal structure of HLA-A2 bound to LIR-1, a host and viral major histocompatibility complex receptor. *Nature Immunology*, *4*(9), 913–919. <https://doi.org/10.1038/ni961>
- Zhang, J., Mai, S., Chen, H.-M., Kang, K., Li, X. C., Chen, S.-H., & Pan, P.-Y. (2017). Leukocyte immunoglobulin-like receptors in human diseases: an overview of their distribution, function, and potential application for immunotherapies. *Journal of Leukocyte Biology*, *102*(2), 351–360. <https://doi.org/10.1189/jlb.5mr1216-534r>
- Zhang, Z., Hatano, H., Shaw, J., Nordkamp, M. O., Jiang, G., Li, D., & Kollnberger, S. (2015). The leukocyte immunoglobulin-like receptor family member LILRB5 binds to HLA-class I heavy chains. *PLoS ONE*, *10*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129063>

Figure Legends

Figure 1 : Recognition of LILR from human and cynomolgus macaque origins by B1.2.1 and B1.2.2 monoclonal antibodies (mAb). (A) Recombinant human LILR-Fc fusion proteins recognition by B1.2.1 and B1.2.2 mAb using enzyme immunoassays (EIA). Recombinant human LILR-Fc fusion proteins were indirectly immobilized on the assay plate. Concentrations of B1.2.1 and B1.2.2 mAb ranging from 0.01 ug/ml to 10 ug/ml were tested. Acetylcholinesterase (AChE)-labeled goat anti-mouse secondary antibody was used to detect receptors recognition by B1.2.1 and B1.2.2 mAbs. (B) Recognition of human LILRB1 and LILRB2, expressed on stably transduced CHO cells, by B1.2.1 and B1.2.2 mAbs using flow cytometry analysis. (C) Binding of B1.2.1 and B1.2.2 mAb with different mLILRs expressed on HEK293T cells using flow cytometry analysis. Binding of mAbs to human or macaque LILRs expressed by cell lines was detected using staining with a fluorescent-labeled goat anti-mouse IgG secondary antibody. Gray shaded histograms represent stainings with mouse IgG isotype control. Dark red and light red lines represent B1.2.1 and B1.2.2 mAbs binding to LILRs, respectively.

Figure 2 : B1.2.1 and B1.2.2 mAbs block LILRB1 and LILRB2 interactions with classical and non-classical MHC-I ligands from human and cynomolgus macaque. B1.2.1 and B1.2.2 mAbs were co-incubated with cell lines expressing either human or macaque LILRB1 or LILRB2 or co-incubated with recombinant human LILRB1-Fc or LILRB2-Fc fusion protein. Their capacity to block the interaction between human or macaque LILRs with their MHC-I ligands was evaluated by flow cytometry analysis. (A) Inhibition of human LILRB1 and LILRB2 (expressed on CHO cells) interaction with human MHC-I A*2402 HIV-1 Nef 134-143 (RYPLTFGWY) pentamer (upper panel) and human MHC-I B*0801 HIV-1 Gag 259-267 (GEIYKRWII) pentamer (lower panel). (B) Inhibition of human LILRB1-Fc or LILRB2-Fc interaction with HLA-G1 expressed by M8 melanoma cells. Blocking capacity of B1.2.1 and B1.2.2 mAbs was evaluated using Alexa Fluor 647-labeled goat anti-human IgG secondary antibody. (C) Inhibition of cynomolgus macaque LILRB1.2 and LILRB2.1 (expressed on HEK293T cells) interactions with cynomolgus macaque APC labeled-Mafa-A1*063 SIV gag GW9 (GPRKPIKCW) tetramers. HEK293T cells expressing cynomolgus macaque LILRB4 were used as negative control to confirm the specificity of the Mafa-A1*063 SIV gag GW9 tetramer interaction. The gray shaded histograms represent LILRB1 or LILRB2 binding to Mafa-A1*063 SIV gag GW9 tetramer. Dark red and light red lines represent binding of

mLILRB1 or mLILRB2 to Mafa-A1*063 SIV gag GW9 after pre-incubation with B1.2.1 or B1.2.2 mAbs, respectively. Black lines represent binding of mLILRB1 or mLILRB2 to Mafa-A1*063 SIV gag GW9 after pre-incubation with a mouse IgG isotype control.

Figure 3 : B1.2.1 mAb blocks the interaction of human LILRB2 with non-classical HLA-I free heavy chain. HLA-G1 stably transduced M8 cells were incubated in PBS1X (upper panel) or in acid solution (pH=3.5) (lower panel) to obtain MHC-I free heavy chains (FHC). The data depicted is representative of one out of 3 independent experiments. **(A)** The complete dissociation of the beta-2-microglobulin from the HLA-G1 heavy chain was verified by staining the cells with a monoclonal antibody (clone A4) recognizing only MHC-I free heavy chain on the cells. **(B)** B1.2.1 and B1.2.2 mAbs were co-incubated with recombinant human LILRB2-Fc fusion protein. Their capacity to block the interaction of LILRB1 or -B2-Fc fusion proteins with native HLA-G1 or HLA-G1 FHC was evaluated by flow cytometry using a goat anti-human IgG antibody labeled with Alexa Fluor 647. Data are representative of three independent experiments. Gray shaded histograms represent LILRB2-Fc fusion protein binding to M8-HLA-G1 cells (upper panel) or M8-HLA-G1 FHC cells (lower panel). Dark red and light red lines represent LILRB2-Fc fusion protein binding after pre-incubation with B1.2.1 or B1.2.2 mAbs, respectively. Black lines represent LILRB2-Fc binding after pre-incubation with a mouse IgG isotype control.

Figure 4 : Analysis of B1.2.1 and B1.2.2 mAbs binding to myeloid cell subsets from human and cynomolgus macaque blood . Subsets of monocytes (classical, intermediate and non-classical monocytes) and of dendritic cells (cDC1s, cDC2s and pDCs) were characterized by specific surface markers. Recognition of each cell subset by B1.2.1 and B1.2.2 Alexa Fluor 647 conjugated mAbs was assessed by flow cytometry assay on human and macaque PBMCs. The data depicted is representative of 3 human and 3 macaque individuals. **(A)** Myeloid subset gating strategy used on human and macaque PBMCs. The data depicted was generated from a macaque sample. **(B)** Staining of human monocyte and dendritic cell subsets with Alexa Fluor 647-B1.2.1 or B1.2.2 monoclonal antibodies. **(C)** Alexa Fluor 647-B1.2.1 or B1.2.2 mAbs distribution on cynomolgus macaque monocyte and dendritic cell subsets. Gray shaded histograms represent the mouse IgG isotype control binding to the cells. Dark red and light red lines represent B1.2.1 and B1.2.2 mAb binding to the cells, respectively.

Table

	Human				Cynomolgus macaque				
	hLILRA1	hLILRA3	hLILRB1	hLILRB2	mLILRA1.3	mLILRB1.1	mLILRB1.2	mLILRB2.1	mLILRB2.2
B1.2.1 KD (M)	7.3E-10	1.3E-9	5.3E-10	1.4E-10	ND	3.9E-12	1.4E-11	NB	2.9E-9
B1.2.2 KD (M)	3.7E-10	3.2E-9	8.7E-10	NB	ND	3.6E-9	1.2E-10	4.8E-10	7.1E-11

Table 1 : Affinity measurements of **B1.2.1** or **B1.2.2** monoclonal antibodies for human and cynomolgus macaque **LILR-Fc**. The equilibrium dissociation constant (K_D) of mLILR-Fc and hLILR-Fc with immobilized B1.2.1 and B1.2.2 mAbs were defined by biolayer interferometry. The K_D values are expressed in molar units (M). NB, no binding observed; ND, not determined.

Supplementary Figure Legends

Supplementary Figure 1 : Schematic representation of structure of the LILRs from cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) and their closely related human counterparts. mLILRs cloning was performed with total RNA from freshly purified PBMCs of 5 cynomolgus macaques using specific primers designed in house. Sequencing of cDNAs was carried-out by Eurofins Genomics and the sequencing results were analyzed with Geneious version 8.1.4 (Biomatters Ltd.) software. Sequence homologies between cynomolgus macaque and human were calculated by comparing corresponding full-length LILR molecules. The mLILR sequences not used to produce corresponding mLILR cell lines are shown in transparency.

Supplementary Figure 2 : Graphical representation of variable domains of B1.2.1 and B1.2.2 monoclonal antibodies using IMGT labelling. Figure 1 A represents the amino acid sequence of B1.2.1 mouse monoclonal antibody whereas figure 1 B represents the amino acid sequence of B1.2.2 mAb. For both antibody, the consensus amino acid sequence from each variable domain was obtained from at least 5 different cDNA sequences then converted into amino acid sequences. The Complementarity Determining Regions (CDRs) are highlighted in blue bold as determined by the IMGT numbering system (Lefranc, M.-P. *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 27, 209-212 (1999)). Red, orange and purple circles defines the 3 CDRs of the heavy chain variable domain (VH) and blue, light green and dark green circles defines the 3 CDRs of the light chain variable domain (VL). Squares are key residues at the start and end of the CDRs. Blue shaded circles are hydrophobic (non-polar) residues at sites that are hydrophobic in the majority of antibodies. Yellow shaded circles are proline residues. Red amino acids in the framework are structurally conserved amino acids.

Figure 1

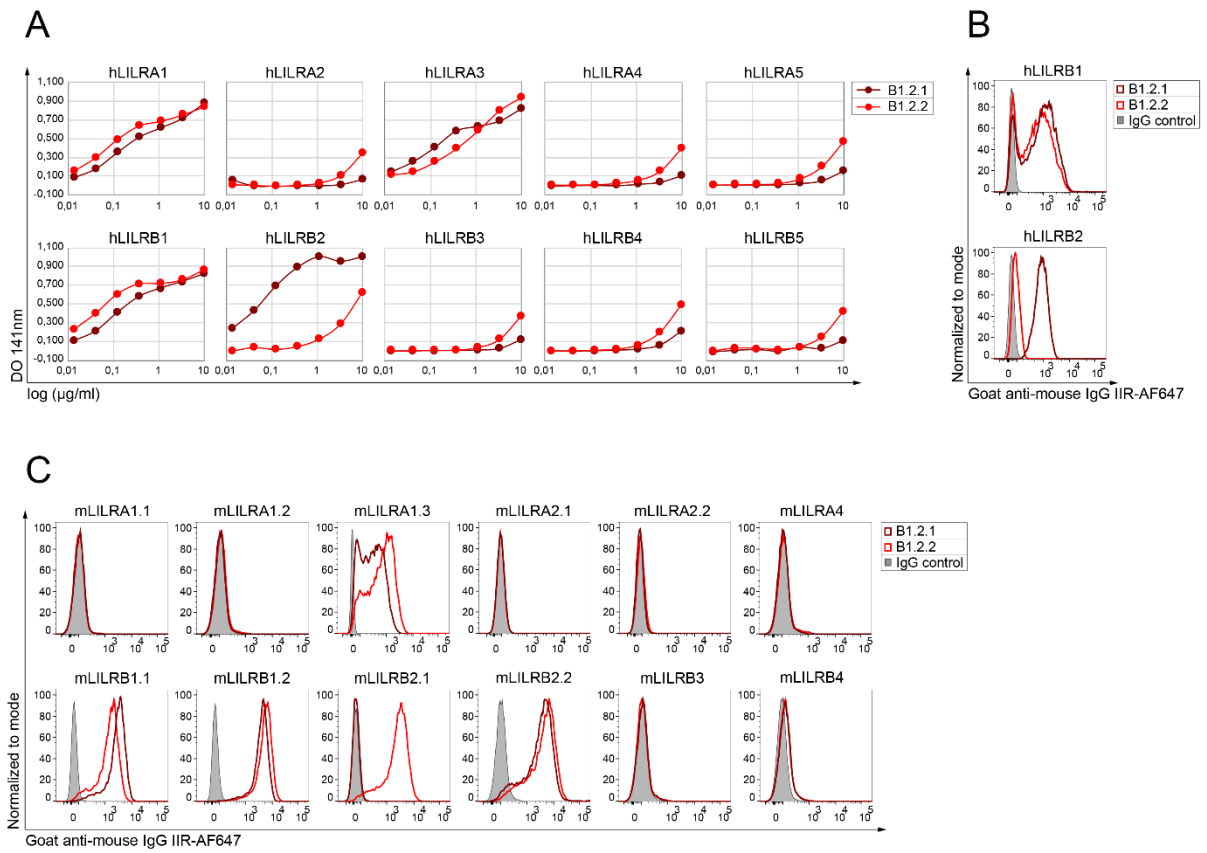


Figure 2

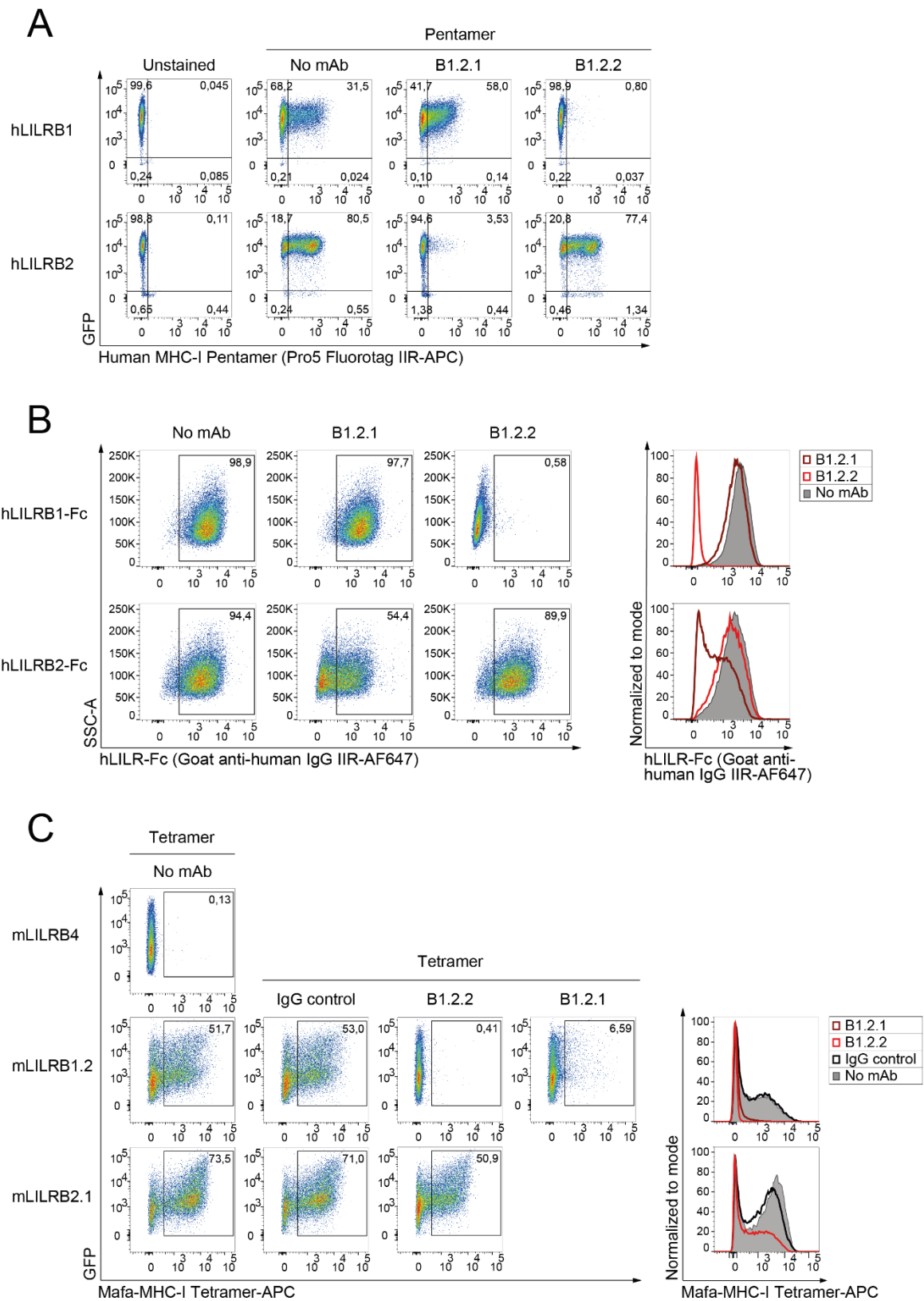
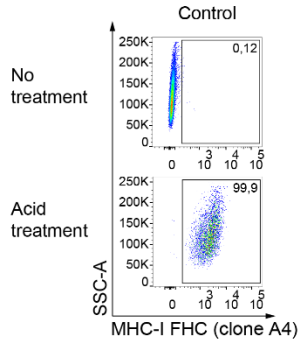


Figure 3

A



B

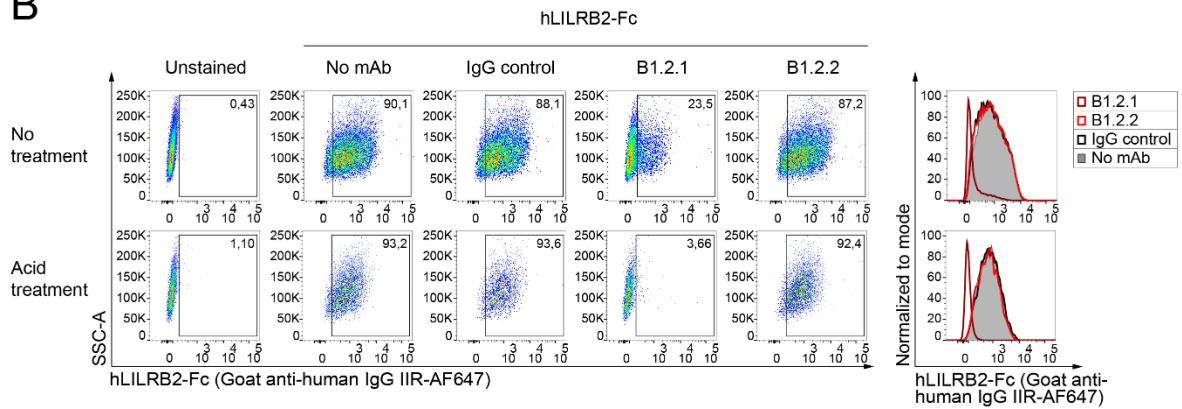
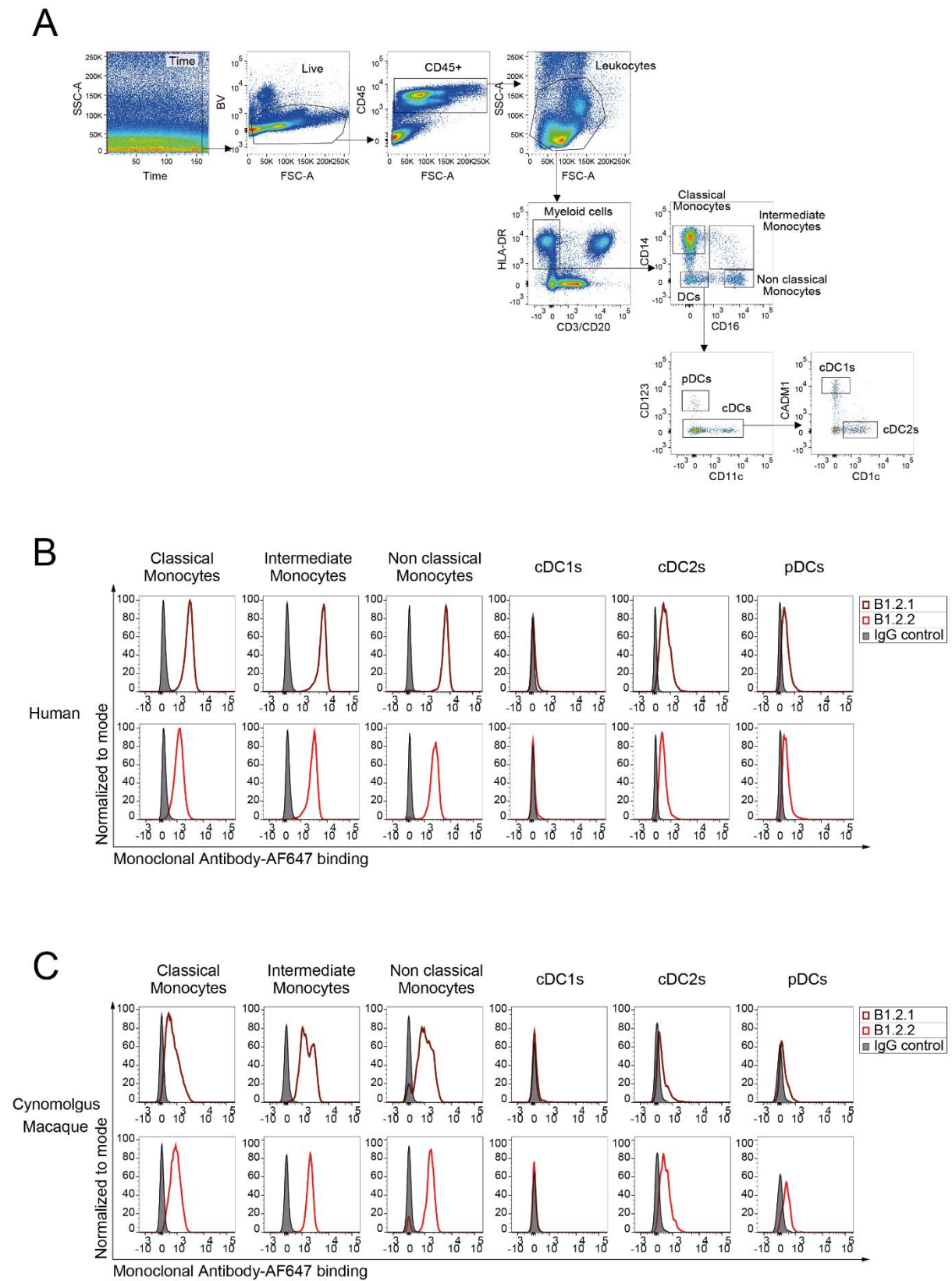
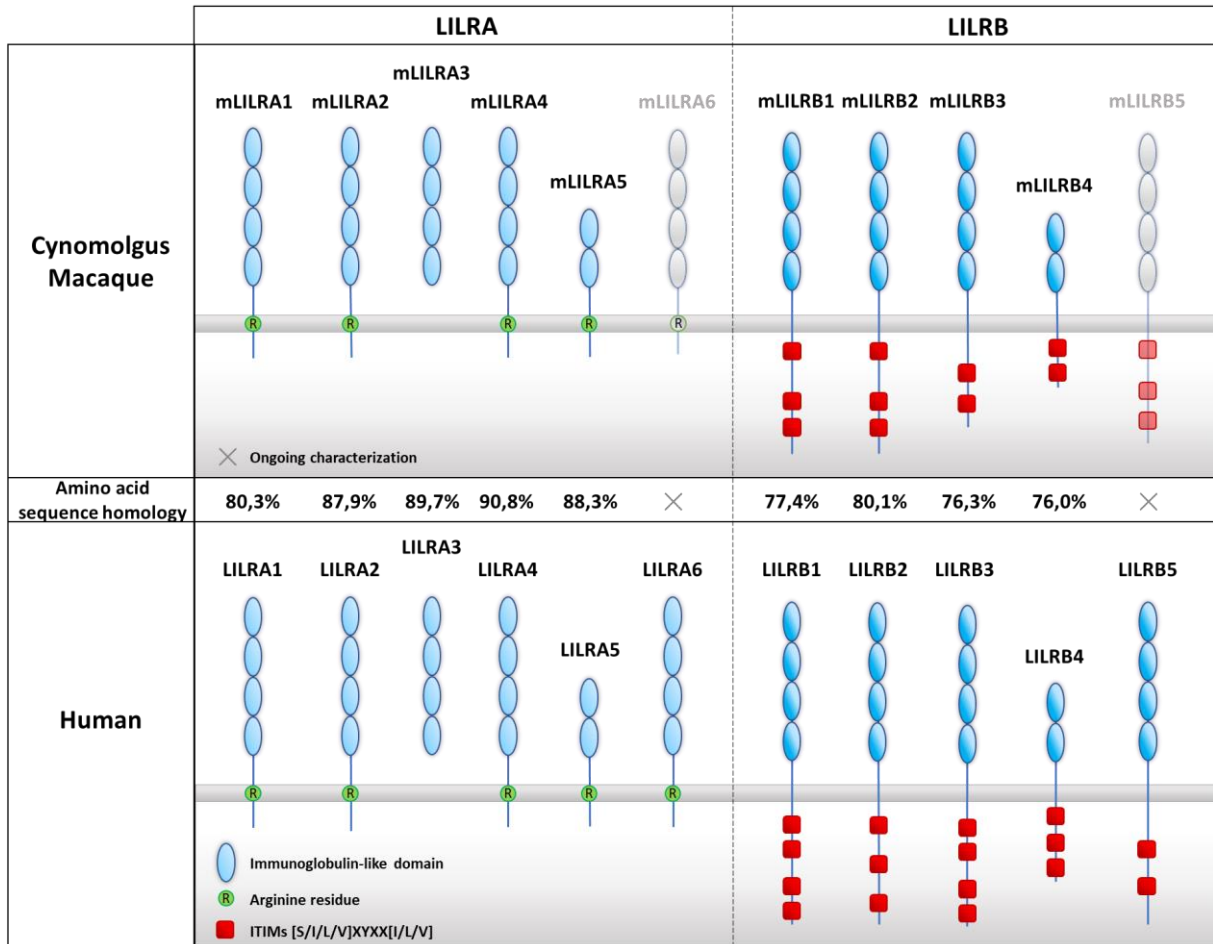


Figure 4



Supplementary Figure 1



Brevet : Anticorps monoclonaux anti-LILRs et leurs applications

Brevet déposé auprès de l'Institut National de la Propriété Industrielle (INPI)

Inventeurs : Sixtine Coindre¹, Anne Wijkhuisen², Roger Le Grand¹, Olivier Lambotte^{1,3}, Stéphanie Simon² and Benoit Favier¹

¹CEA-Université Paris Saclay-INSERM U1184, Département IDMIT, IBJF, DRF, Fontenay-aux-Roses, France

²CEA, Université Paris Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, 91191 Gif-sur-Yvette, France

³Service de médecine interne et d'immunologie clinique, Hôpital Bicêtre, APHP, Le Kremlin Bicêtre, France.

Submission number	1000499419
Application number	EP20306197.3
File No. to be used for priority declarations	EP20306197
Date of receipt	12 October 2020
Applicant	Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives
Title	Anti-LILRB antibodies and uses thereof
Field of the disclosure	The present disclosure concerns the field of antagonizing the suppressor effects of LILRB1 and LILRB2 receptors, especially for therapeutic purpose.

Discussion, Conclusions & Perspectives

I. CD32a : Marqueur spécifique de latence ou reflet de l'activation de sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ au cours de l'infection par le VIH ?

L'infection par le VIH reste à ce jour une maladie incurable en raison de la persistance à long terme de cellules réservoirs infectées de manière latente dans le sang et dans les tissus (Chun et al., 2015). De nombreuses recherches visent à identifier des marqueurs permettant de cibler et d'éliminer spécifiquement ces cellules et ainsi parvenir à une guérison totale du VIH. A cet égard, Descours et al. ont identifié la molécule CD32a, un FcγR, comme marqueur spécifique de réservoir latent compétant au sein des lymphocytes T CD4⁺ quiescents (Descours et al., 2017). Cependant, des études cette même année ont démontré l'expression du CD32 à la surface de lymphocytes T CD4⁺ activés d'individus séronégatifs et de patients VIH⁺ (Wittner et al., 2017). Ces derniers arborant une réplication active du VIH (Grau-Expósito et al., 2017). Ces résultats ont alors induit des incertitudes quant à la pertinence du CD32a en tant que marqueur spécifique du réservoir latent du VIH.

Il existe 3 isoformes décrites de CD32 (a,b et c) qui présentent des structures, une distribution cellulaire et des fonctions bien distinctes (Bruhns & Jönsson, 2015). Contrairement aux précédents travaux réalisés sur ce sujet à l'aide d'un anticorps pan-CD32 (Abdel-Mohsen et al., 2018; Descours et al., 2017; Grau-Expósito et al., 2017; G. Martin et al., 2017; Wittner et al., 2017), notre étude de cytométrie de masse inclut des anticorps capables de dissocier sans ambiguïté l'expression de l'isoforme activatrice CD32a, de l'isoforme inhibitrice CD32b du récepteur à la surface des lymphocytes T CD4⁺. Nous avons ainsi exclu toutes possibilités de mauvaises interprétations de nos données relatives à l'expression de ces marqueurs sur des lymphocytes T au cours de l'infection par le VIH. Nous avons alors montré que des lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺ sont retrouvées non seulement chez les patients VIH⁺ mais aussi chez les donneurs VIH⁻. Ces données confirment les résultats obtenus par d'autres équipes à l'aide d'un anticorps pan-CD32 (Abdel-Mohsen et al., 2018; Bertagnolli et al., 2018; G. Martin et al., 2017; Osuna et al., 2018; Wittner et al., 2017) indiquant que le CD32/CD32a n'est pas un marqueur spécifique de latence du VIH.

Nos résultats indiquent que les lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺ des patients VIH⁺ et des donneurs VIH⁻ comportent des sous-populations hétérogènes présentant un phénotype central mémoire

Discussion, Conclusions & Perspectives

(T_{CM}), effecteur mémoire (T_{Eff/Mem}) ou naïf (T_N). La majorité de ces cellules affichent une expression élevée de HLA-DR, un marqueur connu d'activation des lymphocytes T (Reddy et al., 2004; Tincati et al., 2012; Wakiguchi et al., 2015). Ces données sont en accord avec les études démontrant une forte proportion de lymphocytes T CD4⁺ CD32⁺ exprimant le HLA-DR chez des patients en primo-infection de VIH (G. Martin et al., 2017) ou sous cART (Abdel-Mohsen et al., 2018; Badia et al., 2018; Darcis et al., 2020; Grau-Expósito et al., 2017; G. Martin et al., 2017; Noto et al., 2018; Osuna et al., 2018). L'importante activation immunitaire associée à l'infection par le VIH, et plus particulièrement à la primo-infection, peut expliquer le nombre élevé de sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺ HLA-DR⁺ retrouvés dans notre étude.

L'analyse de l'abondance et de la dynamique des lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺ a révélé que certaines sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺ LILRA2⁻ sont plus abondantes chez les individus VIH⁻ comparées aux VIH⁺. Comme beaucoup de lymphocytes T CD4⁺, ces cellules pourraient être sujettes à une déplétion plus importante ou à une modification de leur phénotype induit directement ou indirectement par l'infection au VIH. Ceci expliquerait la corrélation négative de leur abondance avec les niveaux totaux d'ADN du VIH observés dans notre étude. A l'inverse, des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺, coexprimant fortement les marqueurs d'activation LILRA2 et CD64, sont plus représentées chez les patients VIH⁺. Ces cellules semblent enrichies dès la primo-infection et leur abondance, bien qu'ayant diminué après un an de cART, reste supérieure à celle observée chez des donneurs VIH⁻. Cet enrichissement de lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺ LILRA2⁺ CD64⁺ pourrait être dû à leur expansion clonale et/ou résulter de la différenciation de lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺, induit par l'infection au VIH. L'activation exacerbée de ces cellules, via l'engagement de leurs récepteurs activateurs CD32a, CD64 ou LILRA2 pourrait contribuer à la pathogenèse de l'infection en augmentant l'inflammation et en offrant de nouvelles cibles pour le virus. L'analyse du profil de cytokines pro-inflammatoires de ces cellules en présence du VIH ainsi que leur perméabilité à l'infection et la présence de provirus compétent pour la réplication sera nécessaire pour confirmer ces hypothèses.

Parmi les lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺ LILRA2⁺ CD64⁺ fortement représentés chez les individus VIH⁺, une sous-population est également beaucoup plus abondante en primo-infection comparée à 1 an sous cART et présente un phénotype de cellule T_{Eff/Mem} activée avec une expression élevée des récepteurs CD38, CD57, NKG2C et CD317. L'augmentation d'expression de ces molécules a déjà été montré dans des contextes infectieux, mais jamais à la

Discussion, Conclusions & Perspectives

surface de lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺ (Guma et al., 2004; Neil et al., 2008; Sacre et al., 2012). Bien qu'aucune étude n'ait pu détecter de corrélation entre le pourcentage de lymphocytes T CD4⁺ CD32⁺ totaux et la quantité d'ADN totale du VIH (G. Martin et al., 2017; Wittner et al., 2017), l'abondance de cette sous-population si particulière corrèle positivement avec les niveaux d'ADN du VIH. Il a déjà été rapporté que la quantité totale d'ADN du VIH dans des cellules reflète la taille du réservoir global du VIH (Avettand-Fènoël et al., 2016). Ainsi, cette sous-population de lymphocytes CD4⁺ CD32a⁺ T_{Eff/Mem} activés pourrait contribuer à la persistance du VIH en tant que réservoir actif. Cependant, notre analyse ne montre pas la présence directe d'ADN ou d'ARN du VIH au sein de ces cellules. De plus, l'ADN total du VIH comprend des génomes viraux intégrés et non intégrés codant pour des virus compétents et défectueux. De futures analyses avec des cellules T CD4⁺ CD32a⁺ purifiées seront nécessaires pour déterminer s'il y a un enrichissement en ADN du VIH en particulier dans cette sous-population et si cet ADN prend en charge la transcription virale. Des études ayant suivi cette stratégie n'ont observé qu'un faible enrichissement de l'ADN du VIH dans des lymphocytes T CD4⁺ CD32⁺ chez certains individus VIH⁺ (Badia et al., 2018; G. Martin et al., 2017). D'autres équipes en revanche, n'ont pas démontré d'enrichissement de l'ADN total du VIH ou de provirus capables de réplication dans ces cellules (Bertagnolli et al., 2018; Osuna et al., 2018; Pérez et al., 2018). D'autres encore ont démontré la présence de provirus transcriptionnellement actif dans le sang et les tissus de patients VIH⁺ (Abdel-Mohsen et al., 2018; Grau-Expósito et al., 2017; Noto et al., 2018; Vasquez et al., 2019). La divergence de ces résultats résident probablement dans la difficulté technique à obtenir une population suffisamment pure de lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺ (Darcis et al., 2019). Dans cette optique, Darcis *et al.* ont démontré à l'aide de plusieurs étapes de purification que des lymphocytes T CD4⁺ CD32⁺ présentent un enrichissement important en ADN, et non en ARN, du VIH capable de se réactiver (Darcis et al., 2020), confirmant les résultats de Descours *et al.* (Descours et al., 2017).

Enfin, des travaux ont montré que les lymphocytes T CD4⁺ peuvent échanger des fragments de membrane lors des interactions cellule-cellule par le biais d'un processus appelé trogocytose (Joly & Hudrisier, 2003; G. Zhou et al., 2011). Il est possible que l'expression des récepteurs activateurs CD64 ou LILRA2, habituellement retrouvés à la surface des populations de cellules myéloïdes, puissent être acquis par les lymphocytes T CD4⁺ lors de ce processus. L'analyse de la distribution de ces molécules sur les lymphocytes T CD4⁺ par microscopie confocale ainsi qu'une caractérisation au niveau transcriptomique devrait être utile pour déterminer

Discussion, Conclusions & Perspectives

l'implication de la trogocytose dans l'expression des marqueurs inhabituels trouvés sur les lymphocytes T CD4⁺. Dû à ce phénomène d'échanges membranaires intercellulaires, il est possible que nous ayons exclus de notre analyse, lors de la sélection manuelle des lymphocytes T CD4⁺, des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺ ayant acquis l'un des marqueurs d'exclusion de notre panel. Une analyse de nos données sur l'ensemble des leucocytes CD45⁺ pourrait permettre de contourner ce possible phénomène et ainsi détecter l'intégralité des sous-populations composant les lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺. Ceci pourrait également permettre de déterminer si l'expression du CD32b est également retrouvée sur les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺. D'avantage de marqueurs associés aux sous-populations de lymphocyte T CD4⁺ tels que CD27 et CD28, ou associés à l'infection de ces cellules par le VIH tels que CCR5, CXCR4, et PD1 pourraient permettre de définir de façon plus précise les mécanismes cellulaires et moléculaires touchant les lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺ au cours de cette infection.

Pour conclure, la controverse associée à ces différentes études souligne une fois encore la complexité des recherches sur les réservoirs latents du VIH et la difficulté à obtenir un consensus quant à l'existence de marqueurs fiables de persistance du VIH. De nouvelles données, comme celles que nous apportons concernant l'hétérogénéité, les modifications d'abondances et l'état d'activation des lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺ à différents stades de l'infection par le VIH, pourront être utiles à l'avenir dans les discussions sur ce réservoir latent et sur les réservoirs actifs du VIH.

II. Analyse en cytométrie de masse de la diversité des cellules myéloïdes et de leur dynamique au cours de l'infection par le VIH.

Les lymphocytes T ne sont pas les seules cellules du système immunitaire à présenter un intérêt dans la lutte contre le VIH. En effet les sous-populations de cellules myéloïdes ont un fort pouvoir antiviral et jouent un rôle majeur dans l'orchestration des réponses immunitaires contre les pathogènes. Néanmoins, au cours de l'infection par le VIH, ces cellules présentent de nombreuses dérégulations qui affectent sévèrement leurs fonctions effectrices, contribuant à la progression de la maladie (Bego et al., 2015; Benlahrech et al., 2012; Deeks et al., 2013; Hasegawa et al., 2009; Jinghe Huang et al., 2011). Les récepteurs immunomodulateurs de la

Discussion, Conclusions & Perspectives

famille des LILRs semblent particulièrement impliqués dans les dérégulations des cellules myéloïdes au cours de l'infection (Bashirova, Martin-Gayo, et al., 2014; Bego et al., 2015; M. Lichterfeld & Yu, 2012). Dans cette optique, notre seconde étude de cytométrie de masse a permis une meilleure caractérisation des modifications cellulaires survenant au sein des sous-populations de cellules myéloïdes et l'analyse des LILRs exprimés à leur surface, de la primo-infection à la mise sous cART ainsi que lors du contrôle naturel de l'infection par le VIH. Notre étude a souligné dans un premier temps l'importante diversité existant au sein de ces sous-populations et les conséquences de l'infection sur la dynamique de ces cellules myéloïdes. Nous avons ainsi mis en évidence la perte globale dans le sang de cDC2s et de pDCs au cours de la primo-infection. Aucun enrichissement de sous-populations de DCs n'a pu être observé au cours de cette phase, ce qui suggère que cette perte pourrait être due à leur mort (Laforge et al., 2011; Wijewardana et al., 2010) et/ou à leur migration dans les ganglions lymphatiques (Malleret et al., 2008; Smed-Sørensen & Loré, 2011).

Nous avons également montré que des sous-populations de monocytes coexprimant les marqueurs HLA-I, CD64, CD317, LILRA2 et LILRB4 sont enrichies chez les patients infectés par le VIH et/ou corrélaient positivement avec la charge ARN du VIH. La molécule CD64 est un récepteur Fc de haute affinité pour les IgG, qui permet l'internalisation de complexes immuns conduisant à une présentation croisée des épitopes viraux via le HLA-I (Guilliams et al., 2014). La molécule CD317, aussi connu sous le nom de BST2/Tetherin, est un facteur de restriction capable d'empêcher la libération des virions néo synthétisés par les cellules infectées par le VIH-1 (Neil et al., 2008). L'augmentation de l'expression des marqueurs HLA-I, CD64 et CD317 par les monocytes a déjà été signalée de façon indépendante dans l'infection par le VIH (Dugast et al., 2011; Homann et al., 2011; Jinghe Huang et al., 2012). Le récepteur immunitaire activateur LILRA2 et inhibiteur LILRB4, sont quant à eux capables de moduler l'activation des monocytes et d'inhiber leur capacité de phagocytose dépendante du CD64 (Hirayasu et al., 2016; Hao K. Lu et al., 2012; Hao Kim Lu et al., 2009; Park et al., 2016). L'expression de ces récepteurs LILRs pourrait expliquer le dysfonctionnement de phagocytose et de production de cytokines observée chez les monocytes de patients VIH⁺ (Espíndola et al., 2018). De plus, une étude a montré que l'activation de LILRA2 inhibe la différenciation des monocytes en cellules dendritiques et par conséquent entrave l'induction d'une réponse lymphocytaire T efficace (D. J. Lee et al., 2007). L'augmentation d'expression de récepteurs inhibiteurs sur les cellules immunitaires pourrait également constituer un mécanisme de rétrocontrôle pour atténuer l'inflammation chronique. A noter qu'une forte expression du HLA-I, de CD64 et de LILRA2

Discussion, Conclusions & Perspectives

a également été constatée dans notre précédente étude, à la surface des lymphocytes T CD4⁺ CD32a⁺ de patients infectés par le VIH (Coindre et al., 2018). De futures études seront nécessaires pour mieux comprendre le rôle du récepteur activateur LILRA2 dans la régulation fonctionnelle des cellules immunitaires au cours de l'infection par le VIH. Parallèlement, les sous-populations de monocytes n'exprimant pas la combinaison de marqueurs HLA-I, CD64, CD317, LILRA2 et LILRB4 sont moins abondantes chez les patients en primo-infection de VIH et corrèlent négativement avec la charge virale plasmatique. Ces monocytes pourraient être activés par l'infection et enrichir les différentes sous-populations de monocytes plus abondantes au cours de cette phase ou bien migrer dans les tissus et se différencier en cellules dendritiques ou en macrophages.

Parmi les sous-populations de DCs caractérisées dans notre étude, certaines cDCs qui expriment fortement le récepteur inhibiteur LILRB2 et une sous-population de pDCs coexprimant les récepteurs immuno-modulateurs LILRA4 et LILRB4, ont été retrouvés en faible abondance chez les patients en primo-infection de VIH. La majorité de ces sous-populations de DCs sont également négativement corrélées avec la charge ARN du VIH. Des études ont montré que LILRB2 est surexprimé par les cDCs du sang dans la phase aiguë de l'infection par le VIH et le SIV et de façon encore plus importante par les cDCs des ganglions lymphatiques (Alaoui et al., 2018; Jinghe Huang et al., 2011). D'après l'étude d'Alaoui et *al.* réalisée chez le macaque cynomolgus, la perte dans le sang de sous-populations de cDCs LILRB2⁺ et de pDCs LILRA4⁺ en primo-infection pourrait correspondre à leur possible migration dans les organes lymphoïdes secondaires. Des études fonctionnelles ont démontré que l'interaction de LILRB2/HLA-I et LILRA4/CD317, conduit respectivement à la dérégulation des fonctions des cDCs et des pDCs (Bashirova, Martin-Gayo, et al., 2014; Bego et al., 2015; W. Cao et al., 2009; Jinghe Huang et al., 2009, 2011, 2012; Mathias Lichterfeld et al., 2007). Des études ont également révélé que des peptides dérivés du VIH présentés par le HLA-I ainsi que certaines variations génétiques des haplotypes de HLA-I, augmentent l'interaction de LILRB2 avec le HLA-I et corrèlent avec le niveau de dysfonctionnement des cDCs chez des patients VIH⁺ (Bashirova, Martin-Gayo, et al., 2014; Jinghe Huang et al., 2009). Par conséquent, l'inhibition médiée par les axes LILRB2/HLA-I et LILRA4/CD317, sur les cDCs et les pDCs qui ont migré dans les ganglions lymphatiques en primo-infection de VIH, peut contribuer fortement aux dysfonctionnements de ces cellules et ainsi nuire à l'établissement d'une réponse immunitaire adaptative efficace contre le VIH. Des études *in vivo* dans un modèle préclinique d'infection par le SIV seront

Discussion, Conclusions & Perspectives

nécessaires pour déterminer si ces récepteurs immunomodulateurs jouent un rôle important dans la physiopathologie de l'infection par le SIV/VIH.

Lors de cette étude, nous avons également mis en évidence une sous-population particulière de cDCs CD1c⁺ CD32b⁺ enrichie dans le sang des patients contrôleurs du VIH-1. Ces données concordent avec la récente découverte par séquençage d'ARN sur cellule unique d'une sous-population de cDCs caractérisée par l'expression élevée de CD1c et de CD32b (Villani et al., 2017). D'après Villani et al., ces cDCs seraient de puissants stimulateurs de lymphocytes T naïfs et sont plus susceptibles de sécréter des niveaux élevés de CCL19, d'IL-8, d'IL-10 et d'IL-12b (Villani et al., 2017). Des études complémentaires seront nécessaires pour déterminer si cette sous-population de cDCs est retrouvée en forte proportion chez l'ensemble des contrôleurs du VIH-1. Ces études permettront également la caractérisation fonctionnelle de ces cellules afin de déterminer leur potentiel rôle dans les mécanismes conduisant au contrôle naturel de la réplication virale chez ces patients.

Enfin, de récentes études ont identifié ce qui semble être des précurseurs de cDCs, dans la moelle osseuse mais aussi au niveau du sang périphérique. Parmi ces précurseurs, on retrouve les « pré-DCs » capables de se différencier *in vitro* en cDC1 ou cDC2 (See et al., 2017) et qui sont préférentiellement infectées par le VIH via l'expression du récepteur Siglec-1 (Ruffin et al., 2019). Plus récemment, il a été mis en évidence une sous-population de cellules dendritiques appelées « cDC3s » qui seraient des précurseurs immédiats de cDCs inflammatoires coexprimant des marqueurs retrouvés sur les monocytes et les cDC2s (Bourdely et al., 2020). Ainsi, les cellules myéloïdes, et notamment les cDCs, semblent être des populations très hétérogènes dont la diversité pourrait être davantage amplifiée dans le cadre d'une infection. Un panel plus exhaustif composé de marqueurs pour ces sous-populations de cellules (tels que CD141, CD2, Siglec-6, Axl, FcεRI, CD5, CD88 et CD163) sera nécessaire pour mieux comprendre, leur dynamique et leur régulation au cours de l'infection par le VIH.

Dans son ensemble, bien que notre panel ne permette pas une étude exhaustive de toutes les sous-populations de cellules myéloïdes, nos résultats dévoilent néanmoins la diversité et les multiples changements phénotypiques induits dans certaines sous-populations de cDCs, de pDCs et de monocytes à différents stades et sous différentes conditions de l'infection au VIH. Ces résultats seront utiles pour mieux comprendre les événements cellulaires et moléculaires

Discussion, Conclusions & Perspectives

entraînant la régulation et la dérégulation des réponses immunitaires myéloïdes impliquées dans la progression ou le contrôle de l'infection par le VIH.

III. Anticorps monoclonaux anti-LILRB1 et -LILRB2 de macaque : Des outils uniques pour l'étude préclinique des nouveaux inhibiteurs de point de contrôle immunitaire dans l'infection par le SIV/VIH.

La cytométrie de masse est un outil puissant qui permet une caractérisation détaillée des modifications phénotypiques et de la dynamique des cellules immunitaires lors d'évènements physiopathologiques. Néanmoins cette technique se révèle limitée pour étudier les dérégulations fonctionnelles des cellules immunitaires et comprendre l'implication des récepteurs exprimés et modulés à leur surface dans ces dérégulations. Il est alors nécessaire de passer à des approches expérimentales ciblant plus particulièrement la fonction de ces récepteurs et ainsi déterminer leur potentiel lien avec la physiopathologie de certaines affections.

A cet égard, les récepteurs activateurs et inhibiteurs présent à la surface des cellules immunitaires jouent un rôle central dans l'homéostasie immunologique. Cependant, dans certaines circonstances, et en particulier lors d'infections, leurs propriétés immuno-modulatrices peuvent être détournées par des agents pathogènes pour échapper au système immunitaire.

Parmi ces molécules immuno-régulatrices, LILRB1 (aussi nommé: CD85j, ILT2 ou LIR-1) et LILRB2 (aussi nommé: CD85d, ILT4 ou LIR-2) ont largement été impliqués dans le contrôle et la pathogenèse de l'infection par le VIH-1 (M. Lichterfeld & Yu, 2012). En effet, l'expression et la liaison de LILRB1 et LILRB2 à leurs ligands HLA-I ont été associées à un phénotype particulier et/ou à une dérégulation fonctionnelle des cellules immunitaires chez des patients vivants avec le VIH-1 (Anfossi et al., 2004; J. Huang et al., 2010; Jinghe Huang et al., 2010, 2011, 2012; O'Connor et al., 2007; Vlad et al., 2003). Des études supplémentaires indiquent qu'un niveau élevé d'interaction entre LILRB2 et les HLA-I corrèle positivement avec le dysfonctionnement des cDCs et la progression de la maladie (Bashirova, Martin-Gayo, et al., 2014; Jinghe Huang et al., 2009). Dans l'ensemble, ces études suggèrent que LILRB1 et LILRB2 sont des points de contrôle immunitaire cruciaux qui pourraient constituer des cibles

Discussion, Conclusions & Perspectives

thérapeutiques de choix pour améliorer les réponses immunitaires contre le VIH. Pour valider cette hypothèse, des études fonctionnelles ciblant ces récepteurs *in vivo* dans des modèles précliniques d'étude du VIH sont nécessaires.

Les membres de la familles des LILRs ont été caractérisés chez le macaque rhesus (Slukvin et al., 2006) et les modèles macaques d'infection par le SIV présentent une physiopathologie proche de celle de l'infection par le VIH-1 chez l'Homme (Estes et al., 2018; Evans & Silvestri, 2013; Mylvaganam et al., 2018; Shetty et al., 2012; Velu et al., 2009). Dans ce contexte, le modèle macaque d'infection par le SIV semble pertinent pour déterminer les conséquences du blocage de LILRB1 et/ou LILRB2 sur les réponses immunitaires contre le SIV/VIH. Cependant, à ce jour, les anticorps monoclonaux (AcM) bloquants anti-LILRB1 et -LILRB2 humain disponibles dans le commerce ne présentent pas de réactivité croisée chez les différentes espèces de macaques.

Dans cette étude, nous avons développé des AcM capables de bloquer les interactions de LILRB1 et/ou LILRB2 avec le CMH-I chez l'Homme et le macaque, fournissant ainsi des outils uniques pour évaluer le rôle de ces récepteurs inhibiteurs dans des modèles précliniques d'infection par le SIV.

Afin d'obtenir cette réactivité croisée, nous avons tout d'abord caractérisé et cloné l'ADNc correspondant aux différents membres de la famille des LILRs retrouvée chez le macaque cynomolgus. Ce modèle macaque d'infection par le SIV est couramment utilisé au sein de notre laboratoire car il présente une physiopathologie proche de l'infection par le VIH-1 chez l'Homme avec l'obtention de maladie à progression plus ou moins lente ou contrôlée (naturellement ou par des traitements antirétroviraux). De par leur origine, notre population de macaque cynomolgus est génétiquement homogène avec la plupart des Mafa-CMH-I caractérisés, ce qui la rend plus adaptée pour étudier les interactions mLILRs/Mafa-CMH-I et leurs effets sur la physiopathologie de l'infection par le SIV/VIH. Nous avons identifié parmi cette espèce de macaque, cinq mLILRA (mLILRA1-A5), correspondant aux LILRA1-A5 humain, et quatre mLILRB (mLILRB1-B4), correspondant aux LILRB1-B4 humain. Les équivalents macaque de LILRA6 et LILRB5 sont actuellement en cours de caractérisation. Ces récepteurs présentent une structure comparable à celle des LILRs humains (Hirayasu & Arase, 2018), avec deux ou quatre domaines immunoglobulines extracellulaires, des mLILRA caractérisés par un court domaine intracytoplasmique, des mLILRB définis par un long domaine intracytoplasmique portant des ITIMs, et un mLILRA soluble.

Discussion, Conclusions & Perspectives

A l'aide des séquences mLILRs, nous avons produit des protéines mLILRB1 et mLILRB2 solubles pour générer et sélectionner des AcM capables de reconnaître LILRB1 et/ou LILRB2 et de bloquer leur interaction avec le CMH-I chez l'Homme et le macaque. À la fin des différents criblages, les AcM B1.2.1 et B1.2.2 se sont révélés être les meilleurs candidats en terme de réactivité croisée, de spécificité d'interaction et de capacité bloquante.

Au cours de notre étude, nous avons d'abord démontré que ces AcM présentent un profil d'interaction et des niveaux d'affinités différentes pour LILRB1 et LILRB2, chez l'Homme et le macaque cynomolgus. Puis, en utilisant des tests d'interaction *in vitro* de LILRB1 et LILRB2 avec des ligands CMH-I solubles ou liés à la membrane, nous avons montré que les AcM purifiés présentent également des caractéristiques de blocage distinctes. En effet, l'AcM B1.2.1 bloque hLILRB2 et l'allèle 2 de mLILRB1, tandis que l'AcM B1.2.2 bloque hLILRB1, l'allèle 2 de mLILRB1 et partiellement l'allèle 1 de mLILRB2. La capacité bloquante des deux AcM sur les autres allèles de mLILRB1 et mLILRB2 n'a pas pu être évaluée en raison de l'absence de tests d'interactions CMH-I adéquats avec ces récepteurs. Trouver un système d'interaction fiable sera utile pour déterminer si la fonction bloquante de ces AcM est conservée parmi les différents allèles d'un même membre LILR.

Malgré une forte liaison avec hLILRB1, l'AcM B1.2.1 n'a pas été capable de bloquer ce récepteur *in vitro*. Ainsi, la séquence reconnue par cet anticorps, présente dans hLILRB1 et hLILRB2, est différemment impliquée dans l'interaction de ces récepteurs avec le CMH-I. Une étude de cristallographie est actuellement en cours afin de caractériser les acides aminés impliqués dans les interactions des anticorps B1.2.1 et B1.2.2 avec les protéines LILRB1 et LILRB2 humaines et macaques cynomolgus. Les données de la cartographie des épitopes et l'alignement des séquences chez l'Homme et le macaque seront utiles pour trouver s'il existe des séquences d'acides aminés conservées parmi les LILRs qui peuvent prédire la capacité de liaison ou de blocage de nos AcM dans les deux espèces.

À notre connaissance, ces anticorps monoclonaux sont les seuls à bloquer les interactions de LILRB1 et/ou LILRB2 avec les ligands classiques du CMH-I chez le macaque et l'Homme. En plus de ligands HLA-I classiques, nous avons montré que ces deux AcM bloquent aussi l'interaction de hLILRB1 et hLILRB2 avec le ligand HLA-G non-classique qui est retrouvé en abondance dans le plasma des patients VIH⁺ montrant une progression de la maladie (Jinghe Huang et al., 2010). L'anticorps B1.2.1 est également capable de bloquer l'interaction de hLILRB2 avec la chaîne lourde de HLA-G1 non associée à la bêta-2 microglobuline (B2M). D'après Shiroishi et al., la liaison de LILRB1 et LILRB2 à la molécule HLA-G présente une

Discussion, Conclusions & Perspectives

affinité trois à quatre fois supérieure à celle des molécules classiques du CMH-I (Shiroishi et al., 2003). Ces niveaux d'affinité suggèrent un rôle dominant de l'interaction de LILRB1 et de LILRB2 avec la molécule HLA-G dans la régulation de l'activation des cellules immunitaires. Il serait alors intéressant d'évaluer dans un premier temps si une interaction entre l'équivalent fonctionnel macaque de HLA-G, le Mafa-AG, et mLILRB1 ou mLILRB2 se produit, et dans un second temps, d'étudier si la capacité des AcM à bloquer cette interaction est conservée chez le macaque cynomolgus.

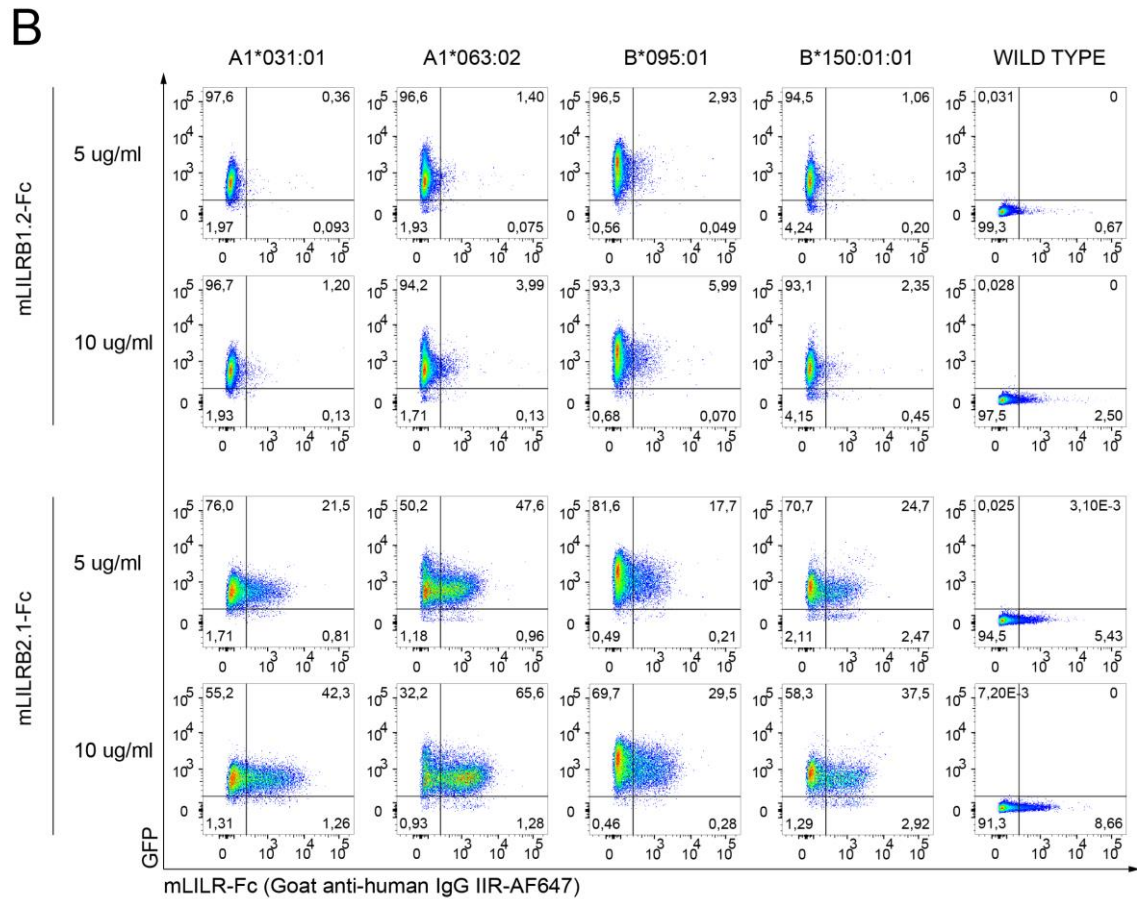
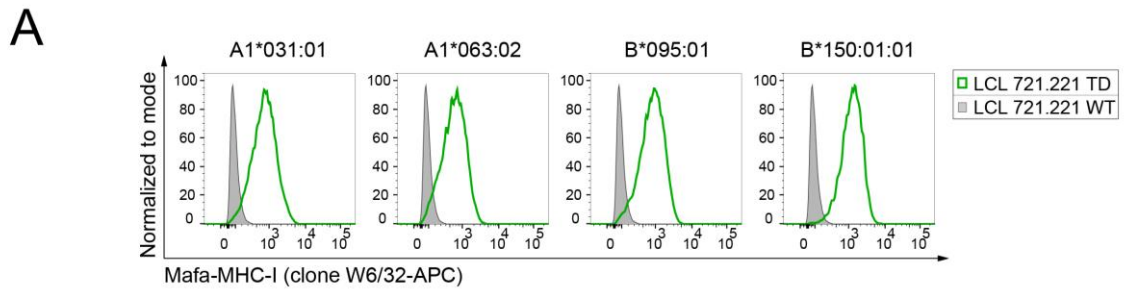
La production d'anticorps monoclonaux à réactivité croisée chez l'Homme et le macaque, dirigé contre un récepteur au sein d'une famille multigénique comportant de nombreuses homologies de séquences, entraîne un risque important de liaison des AcM à différents membres de cette famille chez les deux espèces. À cet égard, nous avons constaté que les anticorps B1.2.1 et B1.2.2 réagissent également de manière croisée avec hLILRA1 et hLILRA3 et avec l'allèle 3 de mLILRA1. La réactivité croisée des AcM pour hLILRA1 et hLILRA3 n'est pas surprenante puisque ces récepteurs partagent de fortes homologies avec les domaines extracellulaires de LILRB1 et LILRB2 et sont phylogénétiquement étroitement liés à ces récepteurs inhibiteurs (Volz et al., 2001). LILRA3 est un récepteur soluble; par conséquent, nous n'avons pas produit de lignée cellulaire mLILRA3. Cependant, il serait intéressant de générer une protéine de fusion mLILRA3-Fc pour vérifier si l'interaction des AcM pour LILRA3 est conservée entre l'Homme et le macaque cynomolgus. hLILRA1 et hLILRA3 affichent une préférence de liaison pour les formes non associées à la B2M de certains allèles de HLA-I, dont la plupart appartiennent au locus HLA-C (Allen et al., 2001; Jones et al., 2011; Z. Zhang et al., 2015). Ces deux récepteurs sont également capables d'interagir avec des molécules HLA-I associées à la B2M mais avec une affinité plus faible que hLILRB1 et hLILRB2 (Allen et al., 2001; Ryu et al., 2011). Au cours de nos expériences, nous n'avons détecté aucune liaison de hLILRA1 et hLILRA3 avec HLA-G1 (données non présentées). D'autres expériences seront nécessaires pour trouver des ligands qui se lient fortement à ces récepteurs et pour étudier la capacité de blocage des anticorps B1.2.1 et B1.2.2 sur ces interactions.

Dans notre étude, nous étions limités en allèles de CMH-I humains (A*2402, B*0801 et HLA-G1) et macaques (A1*063), et en peptides (VIH-1 Nef ou Gag et SIV Gag) à utiliser pour les tests d'interactions et de blocage. Des études indiquent que la force d'interaction entre LILRB2 et le CMH-I peut être modulée par des variations dans la séquence des peptides antigéniques VIH-Gag présentés (Mathias Lichterfeld et al., 2007), ainsi que par le polymorphisme génétique

Discussion, Conclusions & Perspectives

des haplotypes de CMH-I (Bashirova, Martin-Gayo, et al., 2014; Jinghe Huang et al., 2009; Jones et al., 2011). A cet égard, il serait intéressant d'étudier les variations des interactions et des affinités de LILRB1 et LILRB2 avec une gamme plus large de CMH-I portant divers peptides, comprenant des peptides du VIH/SIV, des peptides d'autres pathogènes et des peptides du soi. Pour répondre à cette demande, et en raison de la gamme restreinte de tétramères Mafa-CMH-I disponible dans le commerce, nous avons commencé à générer des lignées cellulaires de CMH-I de macaque cynomolgus (Mafa-CMH-I) à partir de LCL 721.221, naturellement déficiente pour la chaîne lourde du CMH-I (**Annexe 1A**). Nous avons par la suite testé l'interaction de ces lignées avec les protéines de fusion mLILRB1.2-Fc et mLILRB2.1-Fc (**Annexe 1B**). Nos résultats préliminaires indiquent que mLILRB2.1 est capable d'interagir avec les quatre allèles Mafa-CMH-I exprimés par les lignées cellulaires. En revanche, mLILRB1.2 ne semble interagir que très faiblement avec certains de ces allèles dont A1*063. Néanmoins, notre étude a montré que mLILRB1.2 est capable de présenter une interaction plus importante avec un tétramère de Mafa-A1*063 portant un peptide gag. Ce niveau d'interaction pourrait résulter de la conformation du tétramère ou bien du peptide porté par les Mafa-CMH-I. Pour vérifier cette dernière hypothèse, la protéine TAPBPR pourra être utilisée pour charger des peptides de 8 à 10 acides aminés de notre choix au sein des Mafa-CMH-I exprimés par les LCL 721.221 (Tudor Ilca et al., 2018). Une autre possibilité reste la production de lignée Mafa-CMH-I à partir de LCL 721.221 TAP1 « knock-out », dont le gène TAP1 a été invalidé génétiquement à l'aide de la technologie CRISPR/CAS9. L'efficacité de cette lignée à exprimer différents allèles HLA-I et à charger des peptides exogènes, a déjà été démontrée dans des études visant à caractériser des interactions HLA-I/peptides avec des récepteurs de cellules NK (Chapel et al., 2017; Ziegler et al., 2018). Enfin, nous nous sommes interrogés sur le peu d'interactions obtenues entre nos lignées LILRs macaque et le tétramère Mafa-A1*063. Il s'avère que la chaîne lourde du CMH-I de macaque de ce tétramère est associée à une B2M d'origine humaine. Or, Barkal et al. ont identifié dans leur étude des acides aminés au sein de la B2M humaine critiques pour l'interaction de hLILRB1 avec le HLA-A2 (Barkal et al., 2018). Parmi les acides aminés présent dans cette zone d'interaction, trois diffèrent entre la B2M humaine et la B2M du macaque cynomolgus (**Annexe 1C**). Afin de déterminer si ces acides aminés ont bel et bien une influence sur la liaison de certains LILRs de macaque avec leurs ligands Mafa-MHC-I, il sera nécessaire de transduire les lignées Mafa-MHC-I avec une B2M de macaque cynomolgus et de tester à nouveaux ces interactions.

Discussion, Conclusions & Perspectives



C

LILRB1 contacts according to Barkal et al.

	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114
<i>Homo sapiens</i> B2M	N	H	V	T	L	S	Q	P	K	I	V	K
<i>Macaca fascicularis</i> B2M	N	H	V	T	L	S	G	P	R	T	V	K

Annexe 1 : Production de lignées cellulaires CMH-I de macaque cynomolgus (Mafa-CMH-I) et analyse de leur interaction avec des mLILRs. (A) Génération de lignées cellulaires Mafa-CMH-I. Des cellules LCL 721.221 ont été transduites de manière stable avec des particules lentivirales contenant un ADN plasmidique codant pour le gène rapporteur GFP et pour différents allèles de Mafa-CMH-I. L'expression, dans une bonne conformation, des Mafa-CMH-I a été évaluée à la surface des cellules LCL 721.221 parentales (histogrammes grisés) et des cellules LCL 721.221 Mafa-CMH-I (lignes vertes) par cytométrie de flux et en utilisant l'anticorps anti-CMH-I fluorescent (clone W6/32). TD, transduite; WT, "wild type" cellules parentales. (B) Analyse de l'interaction de mLILRB1.2 et mLILRB2.1 avec différents Mafa-CMH-I. La liaison de 5 ou 10 ug/ml de protéines de fusion mLILRB1.2-Fc ou

Discussion, Conclusions & Perspectives

mLILRB2.1-Fc à des lignées cellulaires stable de Mafa-CMH-I, a été évaluée par cytométrie en flux en utilisant un anticorps secondaire anti- IgG humain couplé en Alexa Fluor 647. (C) Comparaison des acides aminés de la B2M humaine et macaque cynomolgus, impliqués dans la liaison à LILRB1. La séquence codante en acides aminés de la B2M humaine (GenBank: AB021288.1) et de la B2M du macaque cynomolgus (GenBank: AF485817.1) ont été alignées à l'aide du logiciel Geneious version 8.1.4 (Biomatters Ltd.). Les acides aminés impliqués dans l'interaction B2M/LILRB1 humain ont été définis par l'étude de cristallographie de Barkal et *al.* et sont indiqués en bleu. Les différences d'acides aminés entre la B2M de l'Homme et du macaque cynomolgus sont indiquées en rouge.

Ces lignées cellulaires seront des outils précieux pour caractériser les interactions des LILRs macaques avec divers allèles de CMH-I, dont le Mafa-AG, et pour étudier le spectre de blocage des anticorps B1.2.1 et B1.2.2 parmi ces interactions. Pour les LILR humains, une approche Luminex, avec des billes recouvertes par différent allèles HLA-I, pourra être utilisée pour caractériser l'interaction de LILRB1 et LILRB2 avec plus de 90 allèles de HLA-I (Jones et al., 2011) et par la suite déterminer si nos AcM bloquent également ces interactions.

Après avoir analysé la liaison des anticorps B1.2.1 et B1.2.2 à des lignées cellulaires transduites pour exprimer des LILRs, nous avons étudié le profil de liaison de ces anticorps, et par conséquent la distribution de LILRB1 et LILRB2, sur les cellules myéloïdes du sang chez l'Homme et le macaque cynomolgus. Notre équipe a précédemment décrit une distribution similaire de LILRB2 sur les sous-populations de cellules immunitaires de ces deux espèces (Alaoui et al., 2018). En revanche, aucun profil d'expression de LILRB1 sur les cellules immunitaires de macaques n'a été rapporté, car aucun AcM disponible dans le commerce n'est capable de réagir de manière croisée avec ce récepteur dans cette espèce. Les AcM produits ici sont uniques car ils sont capables de reconnaître hLILRB1 ainsi que les deux allèles mLILRB1 identifiés chez le macaque cynomolgus. Nos résultats ont révélé un profil de liaison des anticorps B1.2.1 et B1.2.2 identique entre les cellules myéloïdes de l'Homme et du macaque cynomolgus, avec une expression élevée des récepteurs LILRB1 et LILRB2 sur les monocytes classiques, intermédiaires et non classiques, et une expression plus faible sur les sous-populations de cellules dendritiques cDC2 et pDC.

Bien que les AcM B1.2.1 et B1.2.2 aient été produits en utilisant une protéine LILR de macaque, nous avons observé un niveau de liaison plus important des anticorps, visible par une intensité de fluorescence plus élevée, sur les cellules humaines. Ceci pourrait refléter une expression plus importante des molécules LILRB1 et LILRB2 à la surface des cellules immunitaires chez l'Homme par rapport au macaque. Les anticorps B1.2.1 et B1.2.2 ont également présenté des niveaux de marquage différents sur les cellules immunitaires des deux espèces. En effet, pour les cellules myéloïdes humaines, l'intensité de fluorescence avec l'anticorps B1.2.1 est plus

Discussion, Conclusions & Perspectives

élevée qu'avec B1.2.2. Inversement, pour les cellules myéloïdes macaques, l'intensité de fluorescence avec l'anticorps B1.2.1 est inférieure à B1.2.2. Ces différences pourraient résulter de la reconnaissance plus large de LILRB1 et LILRB2 par B1.2.1 chez l'Homme et par B1.2.2 chez le macaque. Enfin, il serait intéressant de déterminer si les AcM B1.2.1 et B1.2.2 peuvent réagir de manière croisée avec d'autres espèces de primates non humains, notamment le singe rhésus (*Macaca mulatta*), le singe vert d'Afrique (*Chlorocebus aethiops*) et le babouin olive (*Papio Anubis*). De telles réactivités croisées pourraient ouvrir la voie à l'utilisation de ces anticorps pour évaluer la distribution des LILRs ou les conséquences du blocage de LILRB1 et/ou de LILRB2 sur les réponses immunitaires dans ces modèles précliniques de pathologies humaines.

La réactivité croisée, la distribution cellulaire et la capacité bloquante de ces AcM anti-LILRB1 et/ou -LILRB2, similaires chez l'Homme et le macaques cynomolgus, offrent un large éventail de possibilités d'études précliniques dans des modèles macaques de pathologies humaines.

Avant toutes études *in vivo*, il est nécessaire d'étudier *in vitro* la propriété fonctionnelle des AcM anti-LILRB1 et anti-LILRB2 sur les réponses immunitaires humaines et macaques. À cette fin, il sera intéressant d'évaluer si le blocage de LILRB1 et LILRB2 avec nos AcM, est capable d'améliorer dans les deux espèces la maturation, la production de cytokines et la capacité de présentation d'antigène des cDCs. Par la suite, nous pourrons évaluer si cette stratégie peut augmenter la génération et la prolifération de cellules T CD8⁺ effecteurs par des cDCs autologues de patients ou de macaques en infection aiguë de VIH/SIV. Étant donné que l'anticorps B1.2.2 est capable de bloquer à la fois LILRB1 et LILRB2 chez le macaque mais pas chez l'Homme, l'utilisation d'un anticorps bispécifique ou d'une association de fragments de liaison à l'antigène (Fab) ou de fragments variables à chaîne unique (scFv) à partir de B1.2.1 et B1.2.2, pourra contourner ce manque de blocage croisé chez l'humain. Il sera néanmoins nécessaire de vérifier si ces Fab et ces scFv conservent une capacité bloquante comparable à celle des AcM.

Une fois que la fonction *in vitro* des AcM est bien caractérisée, la première étape essentielle pour les études précliniques est d'évaluer l'innocuité des AcM bloquants dans une étude de pharmacocinétique (PK)/pharmacodynamique (PD). Afin d'éviter le développement d'anticorps anti-anticorps traitement, une version chimérique d'immunoglobuline macaque G1 (IgG1, κ) de nos anticorps sera générée par biologie moléculaire. La mutation LALA (L234A/L235A) sera intégrée dans la partie Fc des anticorps chimériques afin d'inhiber leur

Discussion, Conclusions & Perspectives

attachement aux récepteurs Fc et diminuer leur liaison au complément (Bruhns & Jönsson, 2015; Saunders, 2019; Shields et al., 2001).

Après l'étude de PK/PD, l'anticorps chimérique B1.2.1 ou B1.2.2 sera testé dans le modèle macaque d'infection par le SIV. Étant donné que l'infection par le VIH et le SIV favorisent une augmentation transitoire et coordonnée de LILRB2 et du CMH-I sur les cDCs et les monocytes/macrophages en phase aiguë de l'infection (Alaoui et al., 2018), les macaques seront traités en primo-infection pour bloquer l'interaction exacerbée entre ces protéines au cours des premières réponses immunitaires. Par la suite, des stratégies thérapeutiques combinées en phase chronique pourraient également être envisagées. A ce titre, le bénéfice thérapeutique de la thérapie antirétrovirale combinée (cART) associée à un anti-PD-1, un autre bloqueur de point de contrôle immunitaire, au cours d'une infection chronique par le SIV a déjà été prouvé (Mylvaganam et al., 2018). De plus, bloquer l'engagement de LILRB1 et LILRB2 avec le CMH-I, permettrait à la chaîne α du CD8 des lymphocytes T d'interagir avec ce dernier et ainsi d'augmenter les réponses T CD8 polyfonctionnelles (Banchereau et al., 2012). Par conséquent, le traitement des macaques infectés de façon chronique par le SIV avec les AcM anti-LILRB1 et -LILRB2 combinés à une cART, sera également examiné comme stratégie thérapeutique potentielle pour renforcer l'immunité antivirale et réduire le réservoir viral.

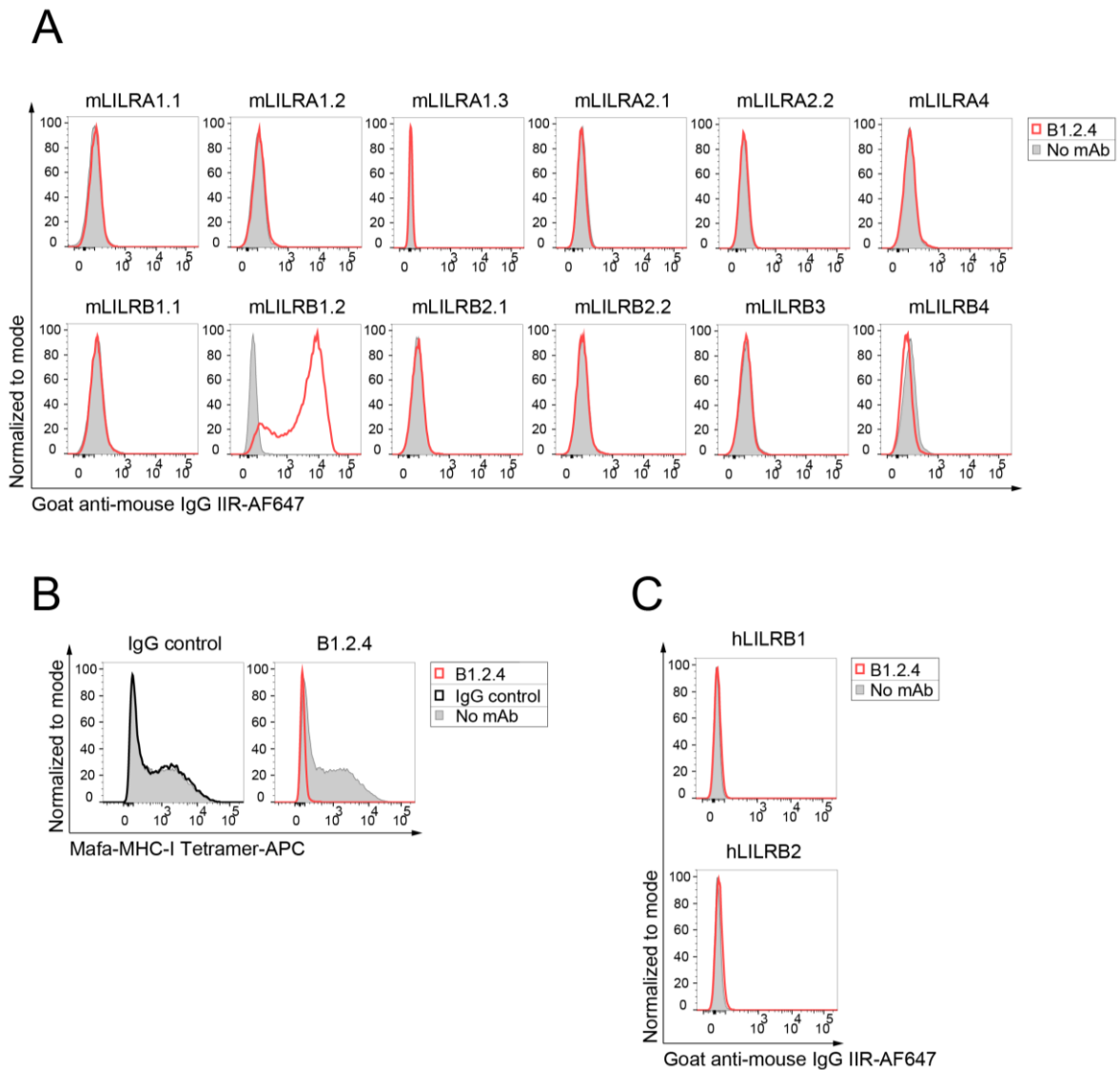
Ces AcM bloquants pourraient également ouvrir la voie à des études précliniques contre d'autres agents pathogènes qui échappent aux réponses immunitaires en détournant la fonction immuno-inhibitrice de LILRB1 ou LILRB2, tel que le CMV (N. L. Li et al., 2013; Prod'homme et al., 2007), le DENV (Chan et al., 2014; Nimmerjahn & Lux, 2014; Ong et al., 2017), ou *P. falciparum* (Kalmbach et al., 2006; Saito et al., 2017), et pouvant être étudiés dans des modèles macaques de pathologies humaines (Estes et al., 2018).

Une immunothérapie à l'aide de nos anticorps bloquants pourrait également être appliquée pour d'autres pathologies tel que le cancer. A noter que les recherches et études précliniques en cancérologie sont pour le moment majoritairement restreintes à l'*in vitro* et aux modèles murins par manque de modèles macaques de cancers fiables et reproductibles (Cekanova & Rathore, 2014; Ishigaki et al., 2018; Kaspereit et al., 2007). Des études ont d'ores et déjà démontré le bénéfice d'une immunothérapie antitumorale à l'aide d'anticorps bloquant LILRB1 dans le cadre de la leucémie lymphoblastique et myéloblastique aiguë (Godal et al., 2010), de la leucémie lymphoïde chronique (Villa-Álvarez et al., 2017, 2018), et du cancer du sein triple négatif (Roberti et al., 2015). D'autres études indiquent que le blocage de LILRB1 par des AcM permet de rétablir l'activité antitumorale de cellules immunitaires envers des lignées de cellules

Discussion, Conclusions & Perspectives

cancéreuses, seul (Barkal et al., 2018; Lesport et al., 2011), ou en combinaison avec un anti-PD-1 (A. Kim et al., 2019). Pour LILRB2, une étude récente a démontré que son blocage à l'aide d'AcM est capable de reprogrammer les macrophages associés aux tumeurs vers un profil M1 pro-inflammatoire (H.-M. Chen et al., 2018). Ces macrophages reprogrammés sont capables d'améliorer l'immunité antitumorale et d'augmenter l'efficacité thérapeutique du traitement antitumoral anti-PD-L1 (H.-M. Chen et al., 2018). Dans l'ensemble, ces études suggèrent que le blocage de LILRB1 et/ou de LILRB2 représente une stratégie novatrice pour restaurer ou améliorer la fonction des cellules immunitaires contre certains cancers, seul ou en association avec d'autres immunothérapies antitumorales.

Lors des différentes étapes de criblage des AcM produits, nous avons identifié un AcM nommé B1.2.4 capable de reconnaître spécifiquement l'allèle mLILRB1.2 et de bloquer son interaction avec le CMH-I (**Annexe 2A-B**). Cet anticorps n'a en revanche montré aucune réactivité croisée pour LILRB1 et LILRB2 humain (**Annexe 2C**). L'AcM B1.2.4 pourrait être utilisé comme outils pour caractériser la présence et la fréquence de l'allèle mLILRB1.2 au sein des populations de macaques cynomolgus et sa distribution sur leurs cellules immunitaires. L'AcM B1.2.4 pourrait également servir d'outil de diagnostic pour suivre spécifiquement la modulation d'expression de mLILRB1.2 sur les cellules immunitaires dans des modèles macaques de maladies humaines. Enfin, à l'instar des AcM bloquant B1.2.1 et B1.2.2, la capacité bloquante de l'AcM B1.2.4 pourra être exploitée pour déterminer les conséquences du blocage de mLILRB1.2 sur la physiopathologie d'infections dans lesquelles une modulation d'expression de LILRB1 et/ou de LILRB2 a été observée et associée à leur pathogenèse.

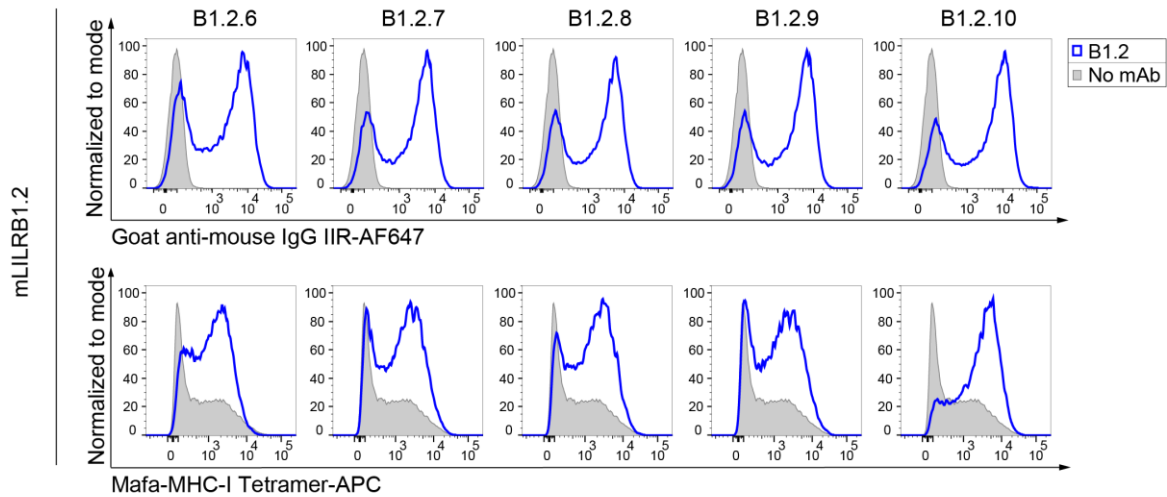


Annexe 2: L'anticorps monoclonal B1.2.4 reconnaît et bloque spécifiquement l'allèle 2 de LILRB1 du macaque cynomolgus. (A) Analyse par cytométrie de flux de la spécificité de l'anticorps B1.2.4 pour mLILRB1.2. La liaison de l'anticorps a été criblée sur chaque récepteur mLILR exprimé de manière stable par des cellules HEK293T. (B) Analyse par cytométrie de flux de la capacité bloquante de l'anticorps B1.2.4. L'anticorps monoclonal B1.2.4 a été pré-incubé avec la lignée mLILRB1.2 de cellules HEK293T, et sa capacité à bloquer l'interaction de ce récepteur avec un tétramère de CMH-I de macaque cynomolgus (Mafa-A1*063) présentant le peptide gag GW9 (GPRKPIKCW) du SIV a été étudiée. (C) Analyse par cytométrie de flux de la réactivité croisée de l'anticorps B1.2.4 pour les récepteurs LILRB1 et LILRB2 humains stablement exprimés, par transduction, par des cellules CHO. La liaison de l'anticorps monoclonal B1.2.4 aux LILRs de macaque cynomolgus et humains a été détectée en utilisant un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé en Alexa Fluor 647. La liaison du tétramère Mafa-A1*063 SIV gag GW9 à mLILRB1.2 est directement détectée via son couplage à une Allophycocyanine. Les histogrammes grisés représentent les marquages avec uniquement l'anticorps ou avec seulement le tétramère Mafa-A1*063 SIV gag GW9. Les lignes rouges représentent soit l'anticorps monoclonal B1.2.4 se liant aux lignées cellulaires LILRs, soit le tétramère se liant à la lignée cellulaire mLILRB1.2 après leur préincubation avec l'anticorps monoclonal B1.2.4. La ligne noire représente quant à elle la liaison du tétramère à la lignée mLILRB1.2 après leur préincubation avec un anticorps monoclonal contrôle de l'isotype IgG de souris.

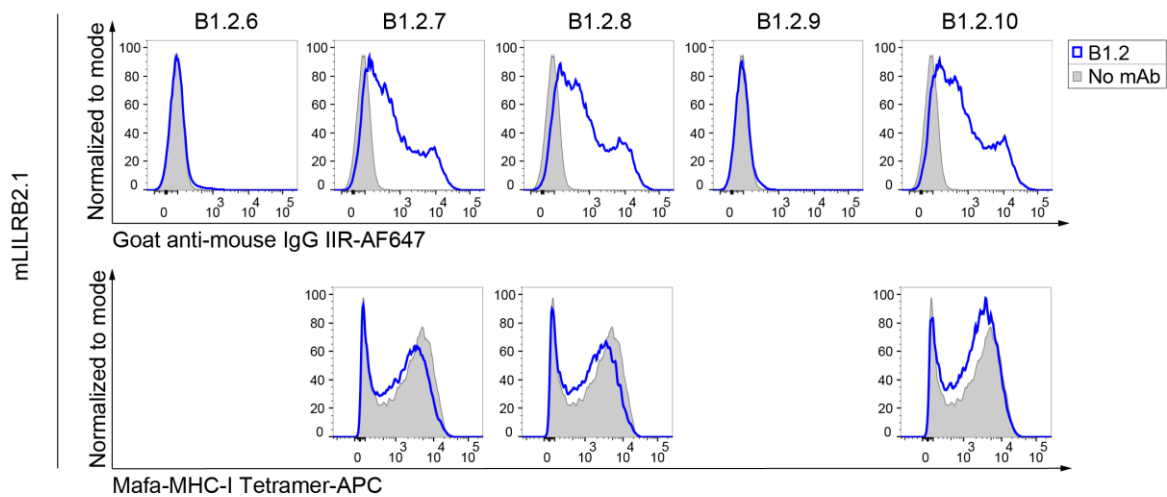
Discussion, Conclusions & Perspectives

Pour finir, ces différentes étapes de criblage nous ont également permis d'identifier des AcM capables de lier mLILRB1.2 (**Annexe 3A, haut**) et d'augmenter de façon significative son interaction avec le CMH-I (**Annexe 3A, bas**). De par leur liaison, ces anticorps induiraient un changement de conformation du récepteur mLILRB1.2, permettant de rendre plus accessible les acides aminés impliqués dans sa liaison au CMH-I. L'effet allostérique induit par un anticorps sur une interaction protéine/protéine a déjà été décrit (Roguin & Retegui, 2003). Néanmoins, une étude par cristallographie permettrait de mettre évidence ce phénomène dans le cadre de l'interaction AcM B1.2/mLILRB1.2/Mafa-CMH-I. La forte interaction entre ces récepteurs LILRB inhibiteurs et leurs ligands devrait conduire à une inhibition soutenue des voies de signalisations activatrices dans la cellule (Van der Touw et al., 2017). Dans un contexte de transplantation d'organes, des études ont montré que l'immuno-modulation médiée par LILRB1, LILRB2 mais aussi LILRB4, permet d'induire une meilleure tolérance des greffons par les cellules immunitaires (C. C. Chang et al., 2002; Manavalan et al., 2003; Abderrahim Naji et al., 2007). Dans le cas des maladies auto-immunes, le rôle exact de LILRB1 et LILRB2 dans la physiopathologie de ces maladies n'est toujours pas bien caractérisé. Néanmoins, un défaut d'expression ou de fonction de ces récepteurs a pu être associée à certaines de ces affections (Bergamini et al., 2014; Blas et al., 2016; Doníz-Padilla et al., 2011; A. Monsiváis-Urenda et al., 2007; Adriana Monsiváis-Urenda et al., 2013; Salvarani et al., 2012). Enfin, une étude a montré que les premières heures après un choc septique sont caractérisées par une diminution des niveaux d'ARNm de LILRB2 suivi par leurs augmentations significatives dans les trois jours suivant le sepsis (Venet et al., 2017). L'intensité de cette diminution dans les premières heures du choc septique a été associée à un risque accru de décès. Les auteurs suggèrent qu'une interaction appropriée entre LILRB2 et son ligand permettrait une régulation adaptée et efficace du processus inflammatoire. A cet égard, nos anticorps stimulants pourraient avoir une application thérapeutique dont le but serait de promouvoir la tolérance du système immunitaire dans les greffes et freiner les réponses immunitaires exacerbées dans certaines maladies. A noter que ces AcM activateurs présentent une réactivité croisée pour d'autres membres de la famille des LILRs chez le macaque, tel que mLILRB2.1 (**Annexe 3B, haut**).

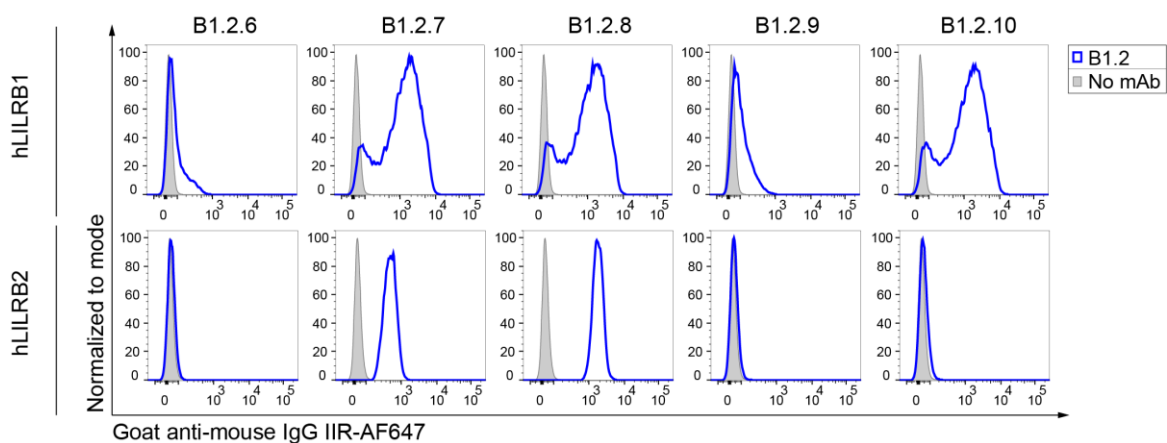
A



B



C



Annexe 3: Certains anticorps monoclonaux B1.2 reconnaissent l'allèle 2 de LILRB1 du macaque cynomolgus et améliorent sa liaison au CMH-I. (A) Analyse par cytométrie de flux de la capacité de différents anticorps monoclonaux B1.2 à se lier au récepteur mLILRB1.2 et à améliorer son interaction avec un tétramère de CMH-I de macaque. (B) Analyse par cytométrie de flux de la capacité de différents anticorps monoclonaux B1.2 à se lier au récepteur mLILRB2.1 et à améliorer son interaction avec un tétramère de CMH-I de macaque. Des cellules HEK293T transduites pour exprimer de façon stable (A)

Discussion, Conclusions & Perspectives

le récepteur mLILRB1.2 ou (B) le récepteur mLILRB2.1 à leur surface ont été utilisées pour cribler la liaison des anticorps à ces récepteurs (panneaux supérieurs). Les anticorps monoclonaux B1.2 ont été pré-incubés avec la lignée (A) mLILRB1.2 ou (B) mLILRB2.1, et leur capacité à bloquer l'interaction de ces récepteurs avec un tétramère de CMH-I de macaque cynomolgus (Mafa-A1*063) présentant le peptide gag GW9 (GPRKPIKCW) du SIV a été étudiée (panneaux inférieurs). (C) Analyse par cytométrie de flux de la réactivité croisée des anticorps monoclonaux B1.2 pour les récepteurs LILRB1 et LILRB2 humains stablement exprimés, par transduction, par des cellules CHO. La liaison des anticorps monoclonaux B1.2 aux LILRs de macaque cynomolgus et humains a été détectée en utilisant un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé en Alexa Fluor 647. La liaison du tétramère Mafa-A1*063 SIV gag GW9 aux récepteurs mLILRB1.2 et mLILR2.1 est directement détectée via son couplage à une Allophycocyanine. Les histogrammes grisés représentent les marquages avec uniquement l'anticorps ou avec seulement le tétramère Mafa-A1*063 SIV gag GW9. Les lignes bleues représentent soit les anticorps monoclonaux B1.2 se liant aux lignées cellulaires LILRs, soit le tétramère se liant aux lignées cellulaires mLILRs après leur pré-incubation avec les anticorps monoclonaux B1.2.

Bien qu'aucun effet de ces AcM n'a pu être détecté pour mLILRB2.1 (**Annexe 3B, bas**), des études complémentaires impliquant les autres membres mLILRs devront être réalisées. De même, certains de ces AcM présentent une interaction pour LILRB2 et/ou LILRB1 humain (**Annexe 3C**). Il sera donc nécessaire de déterminer si ces AcM : 1) interagissent avec d'autres membres LILRs humain, 2) ont la capacité d'augmenter l'interaction des récepteurs avec leurs ligands, et 3) ont une influence sur la physiopathologie de certaines maladies humaines dans des modèles macaques d'études précliniques.

En conclusion, notre étude présente une gamme d'anticorps monoclonaux ciblant la fonction immuno-modulatrice de LILRB1 et LILRB2 chez le macaque cynomolgus et chez l'Homme. La caractérisation phénotypique et fonctionnelle de ces récepteurs à l'aide de nos anticorps au cours de pathologies, fournira une meilleure connaissance de la biologie des LILRs dans ces deux espèces, ainsi qu'une meilleure compréhension des mécanismes de régulation immunitaire médiés par ces récepteurs *in vivo*. Enfin, notre étude offre de puissants outils pour une potentielle application thérapeutique et/ou de diagnostic dans des modèles macaques cynomolgus de pathologies humaines. *In fine*, ces études précliniques chez le macaque pourraient permettre un transfert rapide de cette immunothérapie à l'aide d'anti-LILRB1 et -LILRB2 vers des études cliniques chez l'Homme.

Bibliographie

- Abdel-Mohsen, M., Kuri-Cervantes, L., Grau-Exposito, J., Spivak, A. M., Nell, R. A., Tomescu, C., Vadrevu, S. K., Giron, L. B., Serra-Peinado, C., Genescà, M., Castellví, J., Wu, G., Del Rio Estrada, P. M., González-Navarro, M., Lynn, K., King, C. T., Vemula, S., Cox, K., Wan, Y., ... Montaner, L. J. (2018). CD32 is expressed on cells with transcriptionally active HIV but does not enrich for HIV DNA in resting T cells. *Science Translational Medicine*, *10*(437), eaar6759. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aar6759>
- Ahmad, A. N., Ahmad, S. N., & Ahmad, N. (2017). HIV Infection and Bone Abnormalities. *The Open Orthopaedics Journal*, *11*(1), 777–784. <https://doi.org/10.2174/1874325001711010777>
- Ahmed, Z., Kawamura, T., Shimada, S., & Piguet, V. (2015). The role of human dendritic cells in HIV-1 infection. In *Journal of Investigative Dermatology* (Vol. 135, Issue 5, pp. 1225–1233). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.490>
- Al-Harti, L., Joseph, J., & Nath, A. (2018). Astrocytes as an HIV CNS reservoir: highlights and reflections of an NIMH-sponsored symposium. In *Journal of NeuroVirology* (Vol. 24, Issue 6, pp. 665–669). Springer. <https://doi.org/10.1007/s13365-018-0691-8>
- Alaoui, L., Palomino, G., Zurawski, S., Zurawski, G., Coindre, S., Dereuddre-Bosquet, N., Lecuroux, C., Goujard, C., Vaslin, B., Bourgeois, C., Roques, P., Le Grand, R., Lambotte, O., & Favier, B. (2018). Early SIV and HIV infection promotes the LILRB2/MHC-I inhibitory axis in cDCs. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *75*(10), 1871–1887. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2712-9>
- Allen, R. L., Raine, T., Haude, A., Trowsdale, J., & Wilson, M. J. (2001). Cutting Edge: Leukocyte Receptor Complex-Encoded Immunomodulatory Receptors Show Differing Specificity for Alternative HLA-B27 Structures. *The Journal of Immunology*, *167*(10), 5543–5547. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.10.5543>
- Alter, G., Kavanagh, D., Rihn, S., Luteijn, R., Brooks, D., Oldstone, M., Van Lunzen, J., & Altfeld, M. (2010). IL-10 induces aberrant deletion of dendritic cells by natural killer cells in the context of HIV infection. *Journal of Clinical Investigation*, *120*(6), 1905–1913. <https://doi.org/10.1172/JCI40913>
- Alter, G., Teigen, N., Davis, B. T., Addo, M. M., Suscovich, T. J., Waring, M. T., Streeck, H., Johnston, M. N., Staller, K. D., Tauheed Zaman, M., Yu, X. G., Lichtenfeld, M., Basgoz, N., Rosenberg, E. S., & Altfeld, M. (2005). Sequential deregulation of NK cell subset distribution and function starting in acute HIV-1 infection. *Blood*, *106*(10), 3366–3369. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1100>
- Ananworanich, J., Chomont, N., Eller, L. A., Kroon, E., Tovanabutra, S., Bose, M., Nau, M., Fletcher, J. L. K., Tipsuk, S., Vandergeeten, C., O’Connell, R. J., Pinyakorn, S., Michael, N., Phanuphak, N., Robb, M. L., & RV217 and RV254/SEARCH010 study groups. (2016). HIV DNA Set Point is Rapidly Established in Acute HIV Infection and Dramatically Reduced by Early ART. *EBioMedicine*, *11*, 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.07.024>
- Ananworanich, J., Dubé, K., & Chomont, N. (2015). How does the timing of antiretroviral therapy initiation in acute infection affect HIV reservoirs? In *Current Opinion in HIV and AIDS* (Vol. 10, Issue 1, pp. 18–28). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000122>
- Anderson, K. J., & Allen, R. L. (2009). Regulation of T-cell immunity by leucocyte

- immunoglobulin-like receptors: Innate immune receptors for self on antigen-presenting cells. *Immunology*, 127(1), 8–17. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03097.x>
- Andersson, J., Boasso, A., Nilsson, J., Zhang, R., Shire, N. J., Lindback, S., Shearer, G. M., & Chougnnet, C. A. (2005). Cutting Edge: The Prevalence of Regulatory T Cells in Lymphoid Tissue Is Correlated with Viral Load in HIV-Infected Patients. *The Journal of Immunology*, 174(6), 3143–3147. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.6.3143>
- Andersson, J., Kinloch, S., Sönnnerborg, A., Nilsson, J., Fehniger, T. E., Spetz, A., Behbahani, H., Goh, L., McDade, H., Gazzard, B., Stellbrink, H., Cooper, D., & Perrin, L. (2002). Low Levels of Perforin Expression in CD8 + T Lymphocyte Granules in Lymphoid Tissue during Acute Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection . *The Journal of Infectious Diseases*, 185(9), 1355–1358. <https://doi.org/10.1086/340124>
- Anfossi, N., Doisne, J.-M., Peyrat, M.-A., Ugolini, S., Bonnaud, O., Bossy, D., Pitard, V., Merville, P., Moreau, J.-F., Delfraissy, J.-F., Dechanet-Merville, J., Bonneville, M., Venet, A., & Vivier, E. (2004). Coordinated expression of Ig-like inhibitory MHC class I receptors and acquisition of cytotoxic function in human CD8+ T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(12), 7223–7229.
- Angin, M., Volant, S., Passaes, C., Lecuroux, C., Monceaux, V., Dillies, M. A., Valle-Casuso, J. C., Pancino, G., Vaslin, B., Le Grand, R., Weiss, L., Goujard, C., Meyer, L., Boufassa, F., Müller-Trutwin, M., Lambotte, O., & Sáez-Ciri3n, A. (2019). Metabolic plasticity of HIV-specific CD8+ T cells is associated with enhanced antiviral potential and natural control of HIV-1 infection. *Nature Metabolism*, 1(7), 704–716. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0081-4>
- Appay, V., & Sauce, D. (2008). Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: Causes and consequences. In *Journal of Pathology* (Vol. 214, Issue 2, pp. 231–241). <https://doi.org/10.1002/path.2276>
- Appay, Victor, Almeida, J. R., Sauce, D., Autran, B., & Papagno, L. (2007). Accelerated immune senescence and HIV-1 infection. In *Experimental Gerontology* (Vol. 42, Issue 5 SPEC. ISS., pp. 432–437). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.12.003>
- Appay, Victor, Nixon, D. F., Donahoe, S. M., Gillespie, G. M. A., Dong, T., King, A., Ogg, G. S., Spiegel, H. M. L., Conlon, C., Spina, C. A., Havlir, D. V., Richman, D. D., Waters, A., Easterbrook, P., McMichael, A. J., & Rowland-Jones, S. L. (2000). HIV-specific CD8+ T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *Journal of Experimental Medicine*, 192(1), 63–75. <https://doi.org/10.1084/jem.192.1.63>
- Appay, Victor, & Rowland-Jones, S. L. (2002). Premature ageing of the immune system: the cause of AIDS? *Trends in Immunology*, 23(12), 580–585. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(02\)02338-4](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(02)02338-4)
- Arias, J. F., Heyer, L. N., Von Bredow, B., Weisgrau, K. L., Moldt, B., Burton, D. R., Rakasz, E. G., & Evans, D. T. (2014). Tetherin antagonism by Vpu protects HIV-infected cells from antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(17), 6425–6430. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321507111>
- Arnold, V., Cummings, J. S., Moreno-Nieves, U. Y., Didier, C., Gilbert, A., Barré-Sinoussi, F., & Scott-Algara, D. (2013). S100A9 protein is a novel ligand for the CD85j receptor and its interaction is implicated in the control of HIV-1 replication by NK cells. *Retrovirology*,

10(1), 122. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-122>

- Atwal, J. K., Pinkston-Gosse, J., Syken, J., Stawicki, S., Wu, Y., Shatz, C., & Tessier-Lavigne, M. (2008). PirB is a functional receptor for myelin inhibitors of axonal regeneration. *Science*, 322(5903), 967–970. <https://doi.org/10.1126/science.1161151>
- Autran, B., Carcelain, G., Li, T. S., Blanc, C., Mathez, D., Tubiana, R., Katlama, C., Debré, P., & Leibowitch, J. (1997). Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science*, 277(5322), 112–116. <https://doi.org/10.1126/science.277.5322.112>
- Avettand-Fènoël, V., Hocqueloux, L., Ghosn, J., Cheret, A., Frange, P., Melard, A., Viard, J.-P., & Rouzioux, C. (2016). Total HIV-1 DNA, a Marker of Viral Reservoir Dynamics with Clinical Implications. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(4), 859–880. <https://doi.org/10.1128/CMR.00015-16>
- Ayala-Nunez, N. V., Hoornweg, T. E., Van De Pol, D. P. I., Sjollem, K. A., Flipse, J., Van Der Schaar, H. M., & Smit, J. M. (2016). How antibodies alter the cell entry pathway of dengue virus particles in macrophages. *Scientific Reports*, 6(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep28768>
- Azevedo-Pereira, J. M., & Santos-Costa, Q. (2016). HIV interaction with human host: HIV-2 As a model of a less virulent infection. In *AIDS Reviews* (Vol. 18, Issue 1, pp. 44–53). Publicaciones Permanyer.
- Babiker, A., Darby, S., De Angelis, D., Ewart, D., Porter, K., Beral, V., Darbyshire, J., Day, N., & Gill, N. (2000). Time from HIV-1 seroconversion to AIDS and death before widespread use of highly-active antiretroviral therapy: a collaborative re-analysis. *Lancet*, 355(9210), 1131–1137. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02061-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02061-4)
- Badia, R., Ballana, E., Castellví, M., García-Vidal, E., Pujantell, M., Clotet, B., Prado, J. G., Puig, J., Martínez, M. A., Riveira-Muñoz, E., & Esté, J. A. (2018). CD32 expression is associated to T-cell activation and is not a marker of the HIV-1 reservoir. *Nature Communications*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05157-w>
- Badia, R., Pujantell, M., Riveira-Muñoz, E., Puig, T., Torres-Torronteras, J., Martí, R., Clotet, B., Ampudia, R. M., Vives-Pi, M., Esté, J. A., & Ballana, E. (2016). The G1/S Specific Cyclin D2 Is a Regulator of HIV-1 Restriction in Non-proliferating Cells. *PLOS Pathogens*, 12(8), e1005829. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005829>
- Balagopal, A., Ray, S. C., De Oca, R. M., Sutcliffe, C. G., Vivekanandan, P., Higgins, Y., Mehta, S. H., Moore, R. D., Sulkowski, M. S., Thomas, D. L., & Torbenson, M. S. (2009). Kupffer cells are depleted with HIV immunodeficiency and partially recovered with antiretroviral immune reconstitution. *AIDS*, 23(18), 2397–2404. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283324344>
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.-J., Pulendran, B., & Palucka, K. (2000). Immunobiology of Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology*, 18(1), 767–811. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.767>
- Banchereau, J., Zurawski, S., Thompson-Snipes, L., Blanck, J.-P., Clayton, S., Munk, A., Cao, Y., Wang, Z., Khandelwal, S., Hu, J., McCoy, W. H., Palucka, K. A., Reiter, Y., Fremont, D. H., Zurawski, G., Colonna, M., Shaw, A. S., & Klechevsky, E. (2012). Immunoglobulin-like transcript receptors on human dermal CD14+ dendritic cells act as a CD8-antagonist to control cytotoxic T cell priming. *Proceedings of the National Academy*

- of Sciences of the United States of America*, 109(46), 18885–18890. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205785109>
- Bandera, A., Colella, E., Clerici, M., Rizzardini, G., & Gori, A. (2018). The contribution of immune activation and accelerated aging in multiple myeloma occurring in HIV-infected population. *AIDS*, 32(18), 2841–2846. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000002015>
- Barkal, A. A., Weiskopf, K., Kao, K. S., Gordon, S. R., Rosental, B., Yiu, Y. Y., George, B. M., Markovic, M., Ring, N. G., Tsai, J. M., McKenna, K. M., Ho, P. Y., Cheng, R. Z., Chen, J. Y., Barkal, L. J., Ring, A. M., Weissman, I. L., & Maute, R. L. (2018). Engagement of MHC class I by the inhibitory receptor LILRB1 suppresses macrophages and is a target of cancer immunotherapy. *Nature Immunology*, 19(1), 76–84. <https://doi.org/10.1038/s41590-017-0004-z>
- Barker, E., Mackewicz, C. E., Reyes-Terán, G., Sato, A., Stranford, S. A., Fujimura, S. H., Christopherson, C., Chang, S. Y., & Levy, J. A. (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(9), 3105–3114. https://doi.org/10.1182/blood.v92.9.3105.421k46_3105_3114
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-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(4599), 868–871. <https://doi.org/10.1126/science.6189183>
- Barron, M. A., Blyveis, N., Palmer, B. E., MaWhinney, S., & Wilson, C. C. (2003). Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus 1-infected individuals. *Journal of Infectious Diseases*, 187(1), 26–37. <https://doi.org/10.1086/345957>
- Barrow, A. D., & Trowsdale, J. (2008). The extended human leukocyte receptor complex: diverse ways of modulating immune responses. *Immunological Reviews*, 224(1), 98–123. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00653.x>
- Barton, K., Winckelmann, A., & Palmer, S. (2016). HIV-1 Reservoirs During Suppressive Therapy. In *Trends in Microbiology* (Vol. 24, Issue 5, pp. 345–355). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.01.006>
- Bashirova, A. A., Apps, R., Vince, N., Mochalova, Y., Yu, X. G., & Carrington, M. (2014). Diversity of the human LILRB3/A6 locus encoding a myeloid inhibitory and activating receptor pair. *Immunogenetics*, 66(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00251-013-0730-9>
- Bashirova, A. A., Martin-Gayo, E., Jones, D. C., Qi, Y., Apps, R., Gao, X., Burke, P. S., Taylor, C. J., Rogich, J., Wolinsky, S., Bream, J. H., Duggal, P., Hussain, S., Martinson, J., Weintrob, A., Kirk, G. D., Fellay, J., Buchbinder, S. P., Goedert, J. J., ... Yu, X. G. (2014). LILRB2 Interaction with HLA Class I Correlates with Control of HIV-1 Infection. *PLoS Genetics*, 10(3), e1004196. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004196>
- Battegay, M., Nüesch, R., Hirschel, B., & Kaufmann, G. R. (2006). Immunological recovery and antiretroviral therapy in HIV-1 infection. In *Lancet Infectious Diseases* (Vol. 6, Issue 5, pp. 280–287). [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70463-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70463-7)
- Baudhuin, J., Migraine, J., Faivre, V., Loumagne, L., Lukaszewicz, A.-C., Payen, D., & Favier,

- B. (2013). Exocytosis acts as a modulator of the ILT4-mediated inhibition of neutrophil functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(44), 17957–17962. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221535110>
- Baxter, A. E., Russell, R. A., Duncan, C. J. A., Moore, M. D., Willberg, C. B., Pablos, J. L., Finzi, A., Kaufmann, D. E., Ochsenbauer, C., Kappes, J. C., Groot, F., & Sattentau, Q. J. (2014). Macrophage infection via selective capture of HIV-1-infected CD4+ T cells. *Cell Host and Microbe*, *16*(6), 711–721. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.10.010>
- Bego, M. G., Côté, É., Aschman, N., Mercier, J., Weissenhorn, W., & Cohen, É. A. (2015). Vpu Exploits the Cross-Talk between BST2 and the ILT7 Receptor to Suppress Anti-HIV-1 Responses by Plasmacytoid Dendritic Cells. *PLOS Pathogens*, *11*(7), e1005024. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005024>
- Bekerman, E., Hesselgesser, J., Carr, B., Nagel, M., Hung, M., Wang, A., Stapleton, L., Von Gegerfelt, A., Elyard, H. A., Lifson, J. D., & Geleziunas, R. (2019). PD-1 blockade and TLR7 activation lack therapeutic benefit in chronic simian immunodeficiency virus-infected macaques on antiretroviral therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *63*(11). <https://doi.org/10.1128/AAC.01163-19>
- Benlahrech, A., Yasmin, A., Westrop, S. J., Coleman, A., Herasimtschuk, A., Page, E., Kelleher, P., Gotch, F., Imami, N., & Patterson, S. (2012). Dysregulated immunophenotypic attributes of plasmacytoid but not myeloid dendritic cells in HIV-1 infected individuals in the absence of highly active anti-retroviral therapy. *Clinical and Experimental Immunology*, *170*(2), 212–221. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2012.04647.x>
- Berg, L., Riise, G. C., Cosman, D., Bergström, T., Olofsson, S., Kärre, K., & Carbone, E. (2003). LIR-1 expression on lymphocytes, and cytomegalovirus disease in lung-transplant recipients. *Lancet*, *361*(9363), 1099–1101. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12855-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12855-3)
- Bergamini, A., Chimenti, M. S., Baffari, E., Guarino, M. D., Gigliucci, G., Perricone, C., & Perricone, R. (2014). Downregulation of immunoglobulin-like transcript-4 (ILT4) in patients with psoriatic arthritis. *PLoS ONE*, *9*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092018>
- Berger, E. A., Doms, R. W., Fenyo, E. M., Korber, B. T. M., Littman, D. R., Moore, J. P., Sattentau, Q. J., Schuitemaker, H., Sodroski, J., & Weiss, R. A. (1998). A new classification for HIV-1 [6]. In *Nature* (Vol. 391, Issue 6664, p. 240). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/34571>
- Bermejo, M., Martín-Serrano, J., Oberlin, E., Pedraza, M. A., Serrano, A., Santiago, B., Caruz, A., Loetscher, P., Baggiolini, M., Arenzana-Seisdedos, F., & Alcamí, J. (1998). Activation of blood T lymphocytes down-regulates CXCR4 expression and interferes with propagation of X4 HIV strains. *European Journal of Immunology*, *28*(10), 3192–3204. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199810\)28:10<3192::AID-IMMU3192>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199810)28:10<3192::AID-IMMU3192>3.0.CO;2-E)
- Bertagnolli, L. N., White, J. A., Simonetti, F. R., Beg, S. A., Lai, J., Tomescu, C., Murray, A. J., Antar, A. A. R., Zhang, H., Margolick, J. B., Hoh, R., Deeks, S. G., Tebas, P., Montaner, L. J., Siliciano, R. F., Laird, G. M., & Siliciano, J. D. (2018). The role of CD32 during HIV-1 infection. *Nature*, *561*(7723), E17–E19. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0494-3>

- Betts, M R, Ambrozak, D. R., Douek, D. C., Bonhoeffer, S., Brenchley, J. M., Casazza, J. P., Koup, R. A., & Picker, L. J. (2001). Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection. *Journal of Virology*, 75(24), 11983–11991. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.24.11983-11991.2001>
- Betts, Michael R., Nason, M. C., West, S. M., De Rosa, S. C., Migueles, S. A., Abraham, J., Lederman, M. M., Benito, J. M., Goepfert, P. A., Connors, M., Roederer, M., & Koup, R. A. (2006). HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood*, 107(12), 4781–4789. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-12-4818>
- Biberfeld, P., Ost, A., Porwit, A., Sandstedt, B., Pallesen, G., Böttiger, B., Morfelt-Månsson, L., & Biberfeld, G. (1987). Histopathology and immunohistology of HTLV-III/LAV related lymphadenopathy and AIDS. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica. Section A, Pathology*, 95(1), 47–65. https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1987.tb00009_95a.x
- Birx, D. L., Redfield, R. R., Tencer, K., Fowler, A., Burke, D. S., & Tosato, G. (1990). Induction of interleukin-6 during human immunodeficiency virus infection. *Blood*, 76(11), 2303–2310. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2257304>
- Blanpain, C., Libert, F., Vassart, G., & Parmentier, M. (2002). CCR5 and HIV infection. In *Receptors and Channels* (Vol. 8, Issue 1, pp. 19–31). <https://doi.org/10.1080/10606820212135>
- Blas, P. del C. G., Villaseñor-Talavera, Y. S., Cruz-González, D. de J., Baranda, L., Doníz-Padilla, L., Abud-Mendoza, C., González-Amaro, R., & Monsiváis-Urenda, A. E. (2016). Analysis of the Expression and Function of Immunoglobulin-Like Transcript 4 (ILT4, LILRB2) in Dendritic Cells from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Immunology Research*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4163094>
- Bleul, C. C., Wu, L., Hoxie, J. A., Springer, T. A., & Mackay, C. R. (1997). The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(5), 1925–1930. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.5.1925>
- Bonaparte, M. I., & Barker, E. (2003). Inability of natural killer cells to destroy autologous HIV-infected T lymphocytes. *AIDS*, 17(4), 487–494. <https://doi.org/10.1097/00002030-200303070-00003>
- Borges, L., Hsu, M. L., Fanger, N., Kubin, M., & Cosman, D. (1997). A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 159(11), 5192–5196. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9548455>
- Bosinger, S. E., Sodora, D. L., & Silvestri, G. (2011). Generalized immune activation and innate immune responses in simian immunodeficiency virus infection. In *Current Opinion in HIV and AIDS* (Vol. 6, Issue 5, pp. 411–418). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e3283499cf6>
- Boufassa, F., Saez-Cirion, A., Lechenadec, J., Zucman, D., Avettand-Fenoel, V., Venet, A., Rouzioux, C., Delfraissy, J. F., Lambotte, O., & Meyer, L. (2011). CD4 dynamics over a 15 year-period among HIV controllers enrolled in the ANRS French Observatory. *PLoS ONE*, 6(4), e18726. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018726>

- Bourdely, P., Anselmi, G., Vaivode, K., Ramos, R. N., Missolo-Koussou, Y., Hidalgo, S., Tosselo, J., Nuñez, N., Richer, W., Vincent-Salomon, A., Saxena, A., Wood, K., Lladser, A., Piaggio, E., Helft, J., & Guernonprez, P. (2020). Transcriptional and Functional Analysis of CD1c+ Human Dendritic Cells Identifies a CD163+ Subset Priming CD8+CD103+ T Cells. *Immunity*, *0*(0). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.002>
- Bracq, L., Xie, M., Benichou, S., & Bouchet, J. (2018). Mechanisms for cell-to-cell transmission of HIV-1. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Issue FEB, p. 260). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00260>
- Bradley, T., Kuraoka, M., Yeh, C.-H., Tian, M., Chen, H., Cain, D. W., Chen, X., Cheng, C., Ellebedy, A. H., Parks, R., Barr, M., Sutherland, L. L., Scarce, R. M., Bowman, C. M., Bouton-Verville, H., Santra, S., Wiehe, K., Lewis, M. G., Ogbe, A., ... Haynes, B. F. (2020). Immune checkpoint modulation enhances HIV-1 antibody induction. *Nature Communications*, *11*(1), 948. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14670-w>
- Brenchley, J. M., Paiardini, M., Knox, K. S., Asher, A. I., Cervasi, B., Asher, T. E., Scheinberg, P., Price, D. A., Hage, C. A., Kholi, L. M., Khoruts, A., Frank, I., Else, J., Schacker, T., Silvestri, G., & Douek, D. C. (2008). Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood*, *112*(7), 2826–2835. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-159301>
- Brenchley, Jason M., Karandikar, N. J., Betts, M. R., Ambrozak, D. R., Hill, B. J., Crotty, L. E., Casazza, J. P., Kuruppu, J., Migueles, S. A., Connors, M., Roederer, M., Douek, D. C., & Koup, R. A. (2003). Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood*, *101*(7), 2711–2720. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-07-2103>
- Brenchley, Jason M., Price, D. A., Schacker, T. W., Asher, T. E., Silvestri, G., Rao, S., Kazzaz, Z., Bornstein, E., Lambotte, O., Altmann, D., Blazar, B. R., Rodriguez, B., Teixeira-Johnson, L., Landay, A., Martin, J. N., Hecht, F. M., Picker, L. J., Lederman, M. M., Deeks, S. G., & Douek, D. C. (2006). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature Medicine*, *12*(12), 1365–1371. <https://doi.org/10.1038/nm1511>
- Brenchley, Jason M., Schacker, T. W., Ruff, L. E., Price, D. A., Taylor, J. H., Beilman, G. J., Nguyen, P. L., Khoruts, A., Larson, M., Haase, A. T., & Douek, D. C. (2004). CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *Journal of Experimental Medicine*, *200*(6), 749–759. <https://doi.org/10.1084/jem.20040874>
- Brettle, R. P. (1997). Bacterial infections in HIV: The extent and nature of the problem. In *International Journal of STD and AIDS* (Vol. 8, Issue 1, pp. 5–15). <https://doi.org/10.1258/0956462971918698>
- Brown, D. P., Jones, D. C., Anderson, K. J., Lapaque, N., Buerki, R. A., Trowsdale, J., & Allen, R. L. (2009). The inhibitory receptor LILRB4 (ILT3) modulates antigen presenting cell phenotype and, along with LILRB2 (ILT4), is upregulated in response to Salmonella infection. *BMC Immunology*, *10*, 56. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-10-56>
- Brown, D., Trowsdale, J., & Allen, R. (2004). The LILR family: modulators of innate and adaptive immune pathways in health and disease. *Tissue Antigens*, *64*(3), 215–225. <https://doi.org/10.1111/j.0001-2815.2004.00290.x>

- Brown, K. N., Trichel, A., & Barratt-Boyes, S. M. (2007). Parallel Loss of Myeloid and Plasmacytoid Dendritic Cells from Blood and Lymphoid Tissue in Simian AIDS. *The Journal of Immunology*, *178*(11), 6958–6967. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.11.6958>
- Brown, K. N., Wijewardana, V., Liu, X., & Barratt-Boyes, S. M. (2009). Rapid influx and death of plasmacytoid dendritic cells in lymph nodes mediate depletion in acute simian immunodeficiency virus infection. *PLoS Pathogens*, *5*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000413>
- Bruel, T., Dupuy, S., Démoulin, T., Rogez-Kreuz, C., Dutrieux, J., Corneau, A., Cosma, A., Cheyner, R., Dereuddre-Bosquet, N., Grand, R. Le, & Vaslin, B. (2014). Plasmacytoid Dendritic Cell Dynamics Tune Interferon-Alpha Production in SIV-Infected Cynomolgus Macaques. *PLoS Pathogens*, *10*(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1003915>
- Bruhns, P., & Jönsson, F. (2015). Mouse and human FcR effector functions. *Immunological Reviews*, *268*(1), 25–51. <https://doi.org/10.1111/imr.12350>
- Bruner, K. M., Murray, A. J., Pollack, R. A., Soliman, M. G., Laskey, S. B., Capoferri, A. A., Lai, J., Strain, M. C., Lada, S. M., Hoh, R., Ho, Y. C., Richman, D. D., Deeks, S. G., Siliciano, J. D., & Siliciano, R. F. (2016). Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection. *Nature Medicine*, *22*(9), 1043–1049. <https://doi.org/10.1038/nm.4156>
- Brunsgaard, H., Pedersen, M., & Pedersen, B. K. (2001). Aging and proinflammatory cytokines. In *Current Opinion in Hematology* (Vol. 8, Issue 3, pp. 131–136). <https://doi.org/10.1097/00062752-200105000-00001>
- Buccigrossi, V., Laudiero, G., Nicastro, E., Miele, E., Esposito, F., & Guarino, A. (2011). The HIV-1 transactivator factor (Tat) induces enterocyte apoptosis through a Redox-Mediated mechanism. *PLoS ONE*, *6*(12), e29436. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029436>
- Buchbinder, E. I., & Desai, A. (2016). CTLA-4 and PD-1 Pathways. *American Journal of Clinical Oncology*, *39*(1), 98–106. <https://doi.org/10.1097/COC.0000000000000239>
- Buchbinder, S. P., Katz, M. H., Hessel, N. A., O'Malley, P. M., & Holmberg, S. D. (1994). Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS*, *8*(8), 1123–1128. <https://doi.org/10.1097/00002030-199408000-00014>
- Burshtyn, D. N., & Morcos, C. (2016). The Expanding Spectrum of Ligands for Leukocyte Ig-like Receptors. *The Journal of Immunology*, *196*(3), 947–955. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501937>
- Buzon, M. J., Martin-Gayo, E., Pereyra, F., Ouyang, Z., Sun, H., Li, J. Z., Piovoso, M., Shaw, A., Dalmau, J., Zangger, N., Martinez-Picado, J., Zurakowski, R., Yu, X. G., Telenti, A., Walker, B. D., Rosenberg, E. S., & Lichtenfeld, M. (2014). Long-Term Antiretroviral Treatment Initiated at Primary HIV-1 Infection Affects the Size, Composition, and Decay Kinetics of the Reservoir of HIV-1-Infected CD4 T Cells. *Journal of Virology*, *88*(17), 10056–10065. <https://doi.org/10.1128/jvi.01046-14>
- Cadena-Mota, S., Monsiváis-Urenda, A., Salgado-Bustamante, M., Monjarás-Ávila, C., Bernal-Silva, S., Aranda-Romo, S., & Noyola, D. E. (2018). Effect of cytomegalovirus infection and leukocyte immunoglobulin like receptor B1 polymorphisms on receptor expression in peripheral blood mononuclear cells. *Microbiology and Immunology*, *62*(12), 755–762. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12661>

- Cai, Z., Wang, L., Han, Y., Gao, W., Wei, X., Gong, R., Zhu, M., Sun, Y., & Yu, S. (2019). Immunoglobulin-like transcript 4 and human leukocyte antigen-G interaction promotes the progression of human colorectal cancer. *International Journal of Oncology*, 54(6), 1943–1954. <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4761>
- Cameron, P. U., Saleh, S., Sallmann, G., Solomon, A., Wightman, F., Evans, V. A., Boucher, G., Haddad, E. K., Sekaly, R. P., Harman, A. N., Anderson, J. L., Jones, K. L., Mak, J., Cunningham, A. L., Jaworowski, A., & Lewin, S. R. (2010). Establishment of HIV-1 latency in resting CD4+ T cells depends on chemokine-induced changes in the actin cytoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(39), 16934–16939. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002894107>
- Campbell-Yesufu, O. T., & Gandhi, R. T. (2011). Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 52(6), 780–787. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq248>
- Canani, R. B., Cirillo, P., Mallardo, G., Buccigrossi, V., Secondo, A., Annunziato, L., Bruzzese, E., Albano, F., Selvaggi, F., & Guarino, A. (2003). Effects of HIV-1 Tat protein on ion secretion and on cell proliferation in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, 124(2), 368–376. <https://doi.org/10.1053/gast.2003.50056>
- Canaud, G., Dejucq-Rainsford, N., Avettand-Fenoël, V., Viard, J. P., Anglicheau, D., Bienaimé, F., Muorah, M., Galmiche, L., Gribouval, O., Noël, L. H., Satie, A. P., Martinez, F., Sberro-Soussan, R., Scemla, A., Gubler, M. C., Friedlander, G., Antignac, C., Timsit, M. O., Muda, A. O., ... Legendre, C. (2014). The kidney as a reservoir for HIV-1 after renal transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(2), 407–419. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013050564>
- Canavez, F., Young, N. T., Guethlein, L. A., Rajalingam, R., Khakoo, S. I., Shum, B. P., & Parham, P. (2001). Comparison of Chimpanzee and Human Leukocyte Ig-Like Receptor Genes Reveals Framework and Rapidly Evolving Genes. *The Journal of Immunology*, 167(10), 5786–5794. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.10.5786>
- Canque, B., Bakri, Y., Camus, S., Yagello, M., Benjouad, A., & Gluckman, J. C. (1999). The susceptibility to X4 and R5 human immunodeficiency virus-1 strains of dendritic cells derived in vitro from CD34+ hematopoietic progenitor cells is primarily determined by their maturation stage. *Blood*, 93(11), 3866–3875. https://doi.org/10.1182/blood.v93.11.3866.411k43_3866_3875
- Cao, W., Bover, L., Cho, M., Wen, X., Hanabuchi, S., Bao, M., Rosen, D. B., Wang, Y.-H., Shaw, J. L., Du, Q., Li, C., Arai, N., Yao, Z., Lanier, L. L., & Liu, Y.-J. (2009). Regulation of TLR7/9 responses in plasmacytoid dendritic cells by BST2 and ILT7 receptor interaction. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(7), 1603–1614. <https://doi.org/10.1084/jem.20090547>
- Cao, Y., Qin, L., Zhang, L., Safrit, J., & Ho, D. D. (1995). Virologic and Immunologic Characterization of Long-Term Survivors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *New England Journal of Medicine*, 332(4), 201–208. <https://doi.org/10.1056/NEJM199501263320401>
- Carr, A., & Cooper, D. A. (2000). Adverse effects of antiretroviral therapy. *Lancet*, 356(9239), 1423–1430. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02854-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02854-3)
- Carr, A., Samaras, K., Thorisdottir, A., Kaufmann, G. R., Chisholm, D. J., & Cooper, D. A.

- (1999). Diagnosis, prediction, and natural course of HIV-1 protease-inhibitor-associated lipodystrophy, hyperlipidaemia, and diabetes mellitus: A cohort study. *Lancet*, 353(9170), 2093–2099. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)08468-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)08468-2)
- Carter, C. C., Onafuwa-Nuga, A., McNamara, L. A., Riddell, J., Bixby, D., Savona, M. R., & Collins, K. L. (2010). HIV-1 infects multipotent progenitor cells causing cell death and establishing latent cellular reservoirs. *Nature Medicine*, 16(4), 446–451. <https://doi.org/10.1038/nm.2109>
- Cavrois, M., Neidleman, J., Kreisberg, J. F., & Greene, W. C. (2007). In vitro derived dendritic cells trans-infect CD4 T cells primarily with surface-bound HIV-1 virions. *PLoS Pathogens*, 3(1), 0038–0045. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030004>
- Cekanova, M., & Rathore, K. (2014). Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: Utility and limitations. In *Drug Design, Development and Therapy* (Vol. 8, pp. 1911–1922). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S49584>
- Chahroudi, A., Bosinger, S. E., Vanderford, T. H., Paiardini, M., & Silvestri, G. (2012). Natural SIV hosts: Showing AIDS the door. In *Science* (Vol. 335, Issue 6073, pp. 1188–1193). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.1217550>
- Chamroonkul, N., & Bansal, M. B. (2019). HIV and the liver. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 16, Issue 1, p. 1). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0085-7>
- Chan, K. R., Ong, E. Z., Tan, H. C., Zhang, S. L.-X., Zhang, Q., Tang, K. F., Kaliaperumal, N., Lim, A. P. C., Hibberd, M. L., Chan, S. H., Connolly, J. E., Krishnan, M. N., Lok, S. M., Hanson, B. J., Lin, C.-N., & Ooi, E. E. (2014). Leukocyte immunoglobulin-like receptor B1 is critical for antibody-dependent dengue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(7), 2722–2727. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317454111>
- Chang, C. C., Ciubotariu, R., Manavalan, J. S., Yuan, J., Colovai, A. I., Piazza, F., Lederman, S., Colonna, M., Cortesini, R., Dalla-Favera, R., & Suciú-Foca, N. (2002). Tolerization of dendritic cells by Ts cells: The crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nature Immunology*, 3(3), 237–243. <https://doi.org/10.1038/ni760>
- Chang, Chih Chao, Silvia, E. A., Ho, E. K., Vlad, G., Suciú-Foca, N., & Vasilescu, E. R. (2008). Polymorphism and linkage disequilibrium of immunoglobulin-like transcript 3 gene. *Human Immunology*, 69(4–5), 284–290. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2008.02.004>
- Chapel, A., Garcia-Beltran, W. F., Hölzemer, A., Ziegler, M., Lunemann, S., Martus, G., & Altfeld, M. (2017). Peptide-specific engagement of the activating NK cell receptor KIR2DS1. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02449-x>
- Chen, H.-M., van der Touw, W., Wang, Y. S., Kang, K., Mai, S., Zhang, J., Alsina-Beauchamp, D., Duty, J. A., Mungamuri, S. K., Zhang, B., Moran, T., Flavell, R., Aaronson, S., Hu, H.-M., Arase, H., Ramanathan, S., Flores, R., Pan, P.-Y., & Chen, S.-H. (2018). Blocking immunoinhibitory receptor LILRB2 reprograms tumor-associated myeloid cells and promotes antitumor immunity. *The Journal of Clinical Investigation*, 128(12), 5647–5662. <https://doi.org/10.1172/JCI97570>
- Chen, H., Li, C., Huang, J., Cung, T., Seiss, K., Beamon, J., Carrington, M. F., Porter, L. C., Burke, P. S., Yang, Y., Ryan, B. J., Liu, R., Weiss, R. H., Pereyra, F., Cress, W. D., Brass,

- A. L., Rosenberg, E. S., Walker, B. D., Yu, X. G., & Lichterfeld, M. (2011). CD4 + T cells from elite controllers resist HIV-1 infection by selective upregulation of p21. *Journal of Clinical Investigation*, 121(4), 1549–1560. <https://doi.org/10.1172/JCI44539>
- Chomont, N., El-Far, M., Ancuta, P., Trautmann, L., Procopio, F. A., Yassine-Diab, B., Boucher, G., Boulassel, M.-R., Ghattas, G., Brenchley, J. M., Schacker, T. W., Hill, B. J., Douek, D. C., Routy, J.-P., Haddad, E. K., & Sékaly, R.-P. (2009). HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nature Medicine*, 15(8), 893–900. <https://doi.org/10.1038/nm.1972>
- Chun, T. W., Carruth, L., Finzi, D., Shen, X., DiGiuseppe, J. A., Taylor, H., Hermankova, M., Chadwick, K., Margolick, J., Quinn, T. C., Kuo, Y. H., Brookmeyer, R., Zeiger, M. A., Barditch-Crovo, P., & Siliciano, R. F. (1997). Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature*, 387(6629), 183–188. <https://doi.org/10.1038/387183a0>
- Chun, T. W., Moir, S., & Fauci, A. S. (2015). HIV reservoirs as obstacles and opportunities for an HIV cure. In *Nature Immunology* (Vol. 16, Issue 6, pp. 584–589). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ni.3152>
- Chun, T. W., Nickle, D. C., Justement, J. S., Large, D., Semerjian, A., Curlin, M. E., O’Shea, M. A., Hallahan, C. W., Daucher, M., Ward, D. J., Moir, S., Mullins, J. I., Kovacs, C., & Fauci, A. S. (2005). HIV-infected individuals receiving effective antiviral therapy for extended periods of time continually replenish their viral reservoir. *Journal of Clinical Investigation*, 115(11), 3250–3255. <https://doi.org/10.1172/JCI26197>
- Cihlar, T., & Fordyce, M. (2016). Current status and prospects of HIV treatment. In *Current Opinion in Virology* (Vol. 18, pp. 50–56). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.03.004>
- Cillo, A. R., & Mellors, J. W. (2016). Which therapeutic strategy will achieve a cure for HIV-1? In *Current Opinion in Virology* (Vol. 18, pp. 14–19). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.02.001>
- Clapham, P. R., & McKnight, Á. (2001). HIV-1 receptors and cell tropism. In *British Medical Bulletin / Oxford Academic* (Vol. 58, Issue 1, p. Pages 43–59). <https://academic.oup.com/bmb/article/58/1/43/337216#118709893>
- Clapham, P. R., & McKnight, Á. (2002). Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. In *Journal of General Virology* (Vol. 83, Issue 8, pp. 1809–1829). Society for General Microbiology. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-8-1809>
- Clark, I. A., Budd, A. C., Alleva, L. M., & Cowden, W. B. (2006). Human malarial disease: A consequence of inflammatory cytokine release. In *Malaria Journal* (Vol. 5, p. 85). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-5-85>
- Clavel, F., Guétard, D., Brun-Vézinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M. O., Laurent, A. G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., Klatzmann, D., Champalimaud, J. L., & Montagnier, L. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*, 233(4761), 343–346. <https://doi.org/10.1126/science.2425430>
- Clavel, F., & Hance, A. J. (2004). HIV Drug Resistance. In *New England Journal of Medicine* (Vol. 350, Issue 10, pp. 1023–1035). <https://doi.org/10.1056/NEJMra025195>

- Coffin, J., & Swanstrom, R. (2013). HIV pathogenesis: Dynamics and genetics of viral populations and infected cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012526>
- Cohen, G. B., Gandhi, R. T., Davis, D. M., Mandelboim, O., Chen, B. K., Strominger, J. L., & Baltimore, D. (1999). The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity*, 10(6), 661–671. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80065-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80065-5)
- Cohen, M. S., & Gay, C. L. (2010). Treatment to prevent transmission of HIV-1. In *Clinical Infectious Diseases* (Vol. 50, Issue SUPPL. 3, p. S85). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1086/651478>
- Cohn, L. B., Da Silva, I. T., Valieris, R., Huang, A. S., Lorenzi, J. C. C., Cohen, Y. Z., Pai, J. A., Butler, A. L., Caskey, M., Jankovic, M., & Nussenzweig, M. C. (2018). Clonal CD4+ T cells in the HIV-1 latent reservoir display a distinct gene profile upon reactivation. *Nature Medicine*, 24(5), 604–609. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0017-7>
- Coindre, S., Tchitchek, N., Alaoui, L., Vaslin, B., Bourgeois, C., Goujard, C., Avettand-Fenoel, V., Lecuroux, C., Bruhns, P., Le Grand, R., Beignon, A.-S., Lambotte, O., Favier, B., & ANRS CO6 PRIMO Cohort. (2018). Mass Cytometry Analysis Reveals the Landscape and Dynamics of CD32a+ CD4+ T Cells From Early HIV Infection to Effective cART. *Frontiers in Immunology*, 9, 1217. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01217>
- Colby, D. J., Trautmann, L., Pinyakorn, S., Leyre, L., Pagliuzza, A., Kroon, E., Rolland, M., Takata, H., Buranapraditkun, S., Intasan, J., Chomchey, N., Muir, R., Haddad, E. K., Tovanabutra, S., Ubolyam, S., Bolton, D. L., Fullmer, B. A., Gorelick, R. J., Fox, L., ... Ananworanich, J. (2018). Rapid HIV RNA rebound after antiretroviral treatment interruption in persons durably suppressed in Fiebig I acute HIV infection. *Nature Medicine* 2018 24:7, 24(7), 923–926. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0026-6>
- Collins, K. L., Chen, B. K., Kalams, S. A., Walker, B. D., & Baltimore, D. (1998). HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature*, 391(6665), 397–401. <https://doi.org/10.1038/34929>
- Connor, R. I., Sheridan, K. E., Ceradini, D., Choe, S., & Landau, N. R. (1997). Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1- infected individuals. *Journal of Experimental Medicine*, 185(4), 621–628. <https://doi.org/10.1084/jem.185.4.621>
- Cory, T. J., Schacker, T. W., Stevenson, M., & Fletcher, C. V. (2013). Overcoming pharmacologic sanctuaries. In *Current Opinion in HIV and AIDS* (Vol. 8, Issue 3, pp. 190–195). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32835fc68a>
- Cosman, D., Fanger, N., Borges, L., Kubin, M., Chin, W., Peterson, L., & Hsu, M. L. (1997). A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity*, 7(2), 273–282. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9285411>
- Crowell, T. A., Fletcher, J. L. K., Sereti, I., Pinyakorn, S., Dewar, R., Krebs, S. J., Chomchey, N., Rerknimitr, R., Schuetz, A., Michael, N. L., Phanuphak, N., Chomont, N., & Ananworanich, J. (2016). Initiation of antiretroviral therapy before detection of colonic infiltration by HIV reduces viral reservoirs, inflammation and immune activation: *Journal of the International AIDS Society*, 19(1), 21163. <https://doi.org/10.7448/IAS.19.1.21163>
- Cumont, M.-C., Diop, O., Vaslin, B., Elbim, C., Viollet, L., Monceaux, V., Lay, S., Silvestri, G., Le Grand, R., Müller-Trutwin, M., Hurtrel, B., & Estaquier, J. (2008). Early divergence

- in lymphoid tissue apoptosis between pathogenic and nonpathogenic simian immunodeficiency virus infections of nonhuman primates. *Journal of Virology*, 82(3), 1175–1184. <https://doi.org/10.1128/JVI.00450-07>
- D'Arminio Monforte, A., Sabin, C. A., Phillips, A., Sterne, J., May, M., Justice, A., Dabis, F., Grabar, S., Ledergerber, B., Gill, J., Reiss, P., & Egger, M. (2005). The changing incidence of AIDS events in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Archives of Internal Medicine*, 165(4), 416–423. <https://doi.org/10.1001/archinte.165.4.416>
- D'Souza, M., Fontenot, A. P., Mack, D. G., Lozupone, C., Dillon, S., Meditz, A., Wilson, C. C., Connick, E., & Palmer, B. E. (2007). Programmed Death 1 Expression on HIV-Specific CD4 + T Cells Is Driven by Viral Replication and Associated with T Cell Dysfunction. *The Journal of Immunology*, 179(3), 1979–1987. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1979>
- Dalglish, A. G., Beverley, P. C. L., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F., & Weiss, R. A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, 312(5996), 763–767. <https://doi.org/10.1038/312763a0>
- Darcis, G., Berkhout, B., & Pasternak, A. O. (2019). The quest for cellular markers of HIV reservoirs: Any color you like. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10, p. 2251). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02251>
- Darcis, G., Kootstra, N. A., Hooibrink, B., van Montfort, T., Maurer, I., Groen, K., Jurriaans, S., Bakker, M., van Lint, C., Berkhout, B., & Pasternak, A. O. (2020). CD32+CD4+ T Cells Are Highly Enriched for HIV DNA and Can Support Transcriptional Latency. *Cell Reports*, 30(7), 2284–2296.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.071>
- Davey, R. T., Bhat, N., Yoder, C., Chun, T. W., Metcalf, J. A., Dewar, R., Natarajan, V., Lempicki, R. A., Adelsberger, J. W., Miller, K. D., Kovacs, J. A., Polis, M. A., Walker, R. E., Falloon, J., Masur, H., Gee, D., Baseler, M., Dimitrov, D. S., Fauci, A. S., & Lane, H. C. (1999). HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(26), 15109–15114. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.15109>
- Davidson, C. L., Li, N. L., & Burshtyn, D. N. (2010). LILRB1 polymorphism and surface phenotypes of natural killer cells. *Human Immunology*, 71(10), 942–949. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2010.06.015>
- Day, C. L., Kaufmann, D. E., Kiepiela, P., Brown, J. A., Moodley, E. S., Reddy, S., Mackey, E. W., Miller, J. D., Leslie, A. J., DePierres, C., Mncube, Z., Duraiswamy, J., Zhu, B., Eichbaum, Q., Altfeld, M., Wherry, E. J., Coovadia, H. M., Goulder, P. J. R., Klenerman, P., ... Walker, B. D. (2006). PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*, 443(7109), 350–354. <https://doi.org/10.1038/nature05115>
- De Maria, A., Fogli, M., Costa, P., Murdaca, G., Puppò, F., Mavilio, D., Moretta, A., & Moretta, L. (2003). The impaired NK cell cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp30 and NKp44). *European Journal of Immunology*, 33(9), 2410–2418. <https://doi.org/10.1002/eji.200324141>
- De Milito, A., Nilsson, A., Titanji, K., Thorstensson, R., Reizenstein, E., Narita, M.,

- Grutzmeier, S., Sönnnerborg, A., & Chiodi, F. (2004). Mechanisms of hypergammaglobulinemia and impaired antigen-specific humoral immunity in HIV-1 infection. *Blood*, *103*(6), 2180–2186. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-07-2375>
- De Wolf, F., Spijkerman, I., Schellekens, P. T., Langendam, M., Kuiken, C., Bakker, M., Roos, M., Coutinho, R., Miedema, F., & Goudsmit, J. (1997). AIDS prognosis based on HIV-1 RNA, CD4+ T-cell count and function: Markers with reciprocal predictive value over time after seroconversion. *AIDS*, *11*(15), 1799–1806. <https://doi.org/10.1097/00002030-199715000-00003>
- Decrion, A., Dichamp, I., Varin, A., & Herbein, G. (2005). HIV and Inflammation. *Current HIV Research*, *3*(3), 243–259. <https://doi.org/10.2174/1570162054368057>
- Deeks, S. G., Overbaugh, J., Phillips, A., & Buchbinder, S. (2015). HIV infection. *Nature Reviews Disease Primers*, *1*(1), 1–22. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.35>
- Deeks, S. G., Tracy, R., & Douek, D. C. (2013). Systemic effects of inflammation on health during chronic HIV infection. *Immunity*, *39*(4), 633–645. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.001>
- Deeks, S. G., Verdin, E., & McCune, J. M. (2012). Immunosenescence and HIV. In *Current Opinion in Immunology* (Vol. 24, Issue 4, pp. 501–506). <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.05.004>
- Dejnirattisai, W., Jumnainsong, A., Onsirisakul, N., Fitton, P., Vasanawathana, S., Limpitikul, W., Puttikhunt, C., Edwards, C., Duangchinda, T., Supasa, S., Chawansuntati, K., Malasit, P., Mongkolsapaya, J., & Screaton, G. (2010). Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science*, *328*(5979), 745–748. <https://doi.org/10.1126/science.1185181>
- den Uyl, D., van der Horst-Bruinsma, I. E., & van Agtmael, M. (2004). Progression of HIV to AIDS: A protective role for HLA-B27? In *AIDS Reviews* (Vol. 6, Issue 2, pp. 89–96).
- Deng, H. K., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R. E., Mark Hill, C., Davis, C. B., Peiper, S. C., Schall, T. J., Littman, D. R., & Landau, N. R. (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*, *381*(6584), 661–666. <https://doi.org/10.1038/381661a0>
- Deng, M., Gui, X., Kim, J., Xie, L., Chen, W., Li, Z., He, L., Chen, Y., Chen, H., Luo, W., Lu, Z., Xie, J., Churchill, H., Xu, Y., Zhou, Z., Wu, G., Yu, C., John, S., Hirayasu, K., ... Zhang, C. C. (2018). LILRB4 signalling in leukaemia cells mediates T cell suppression and tumour infiltration. *Nature*, *562*(7728), 605–609. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0615-z>
- Deng, M., Lu, Z., Zheng, J., Wan, X., Chen, X., Hirayasu, K., Sun, H., Lam, Y., Chen, L., Wang, Q., Song, C., Huang, N., Gao, G. F., Jiang, Y., Arase, H., & Zhang, C. C. (2014). A motif in LILRB2 critical for Angptl2 binding and activation. *Blood*, *124*(6), 924–935. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-549162>
- Dennis, G., Kubagawa, H., & Cooper, M. D. (2000). Paired Ig-like receptor homologs in birds and mammals share a common ancestor with mammalian Fc receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(24), 13245–13250. <https://doi.org/10.1073/pnas.230442897>
- Descours, B., Cribier, A., Chable-Bessia, C., Ayinde, D., Rice, G., Crow, Y., Yatim, A.,

- Schwartz, O., Laguette, N., & Benkirane, M. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4 + T-cells. *Retrovirology*, 9(1), 87. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-9-87>
- Descours, B., Petitjean, G., López-Zaragoza, J.-L., Bruel, T., Raffel, R., Psomas, C., Reynes, J., Lacabaratz, C., Levy, Y., Schwartz, O., Lelievre, J. D., & Benkirane, M. (2017). CD32a is a marker of a CD4 T-cell HIV reservoir harbouring replication-competent proviruses. *Nature*, 543(7646), 564–567. <https://doi.org/10.1038/nature21710>
- Dillon, S. M., Robertson, K. B., Pan, S. C., Mawhinney, S., Meditz, A. L., Folkvord, J. M., Connick, E., McCarter, M. D., & Wilson, C. C. (2008). Plasmacytoid and myeloid dendritic cells with a partial activation phenotype accumulate in lymphoid tissue during asymptomatic chronic HIV-1 infection. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 48(1), 1–12. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3181664b60>
- Doisne, J.-M., Urrutia, A., Lacabaratz-Porret, C., Goujard, C., Meyer, L., Chaix, M.-L., Sinet, M., & Venet, A. (2004). CD8 + T Cells Specific for EBV, Cytomegalovirus, and Influenza Virus Are Activated during Primary HIV Infection. *The Journal of Immunology*, 173(4), 2410–2418. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.4.2410>
- Doitsh, G., Cavrois, M., Lassen, K. G., Zepeda, O., Yang, Z., Santiago, M. L., Hebbeler, A. M., & Greene, W. C. (2010). Abortive HIV infection mediates CD4 T cell depletion and inflammation in human lymphoid tissue. *Cell*, 143(5), 789–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.001>
- Doitsh, G., Galloway, N. L. K., Geng, X., Yang, Z., Monroe, K. M., Zepeda, O., Hunt, P. W., Hatano, H., Sowinski, S., Muñoz-Arias, I., & Greene, W. C. (2014). Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature*, 505(7484), 509–514. <https://doi.org/10.1038/nature12940>
- Donaghy, H., Pozniak, A., Gazzard, B., Qazi, N., Gilmour, J., Gotch, F., & Patterson, S. (2001). Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood*, 98(8), 2574–2576. <https://doi.org/10.1182/blood.v98.8.2574>
- Donaghy, Heather, Gazzard, B., Gotch, F., & Patterson, S. (2003). Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. *Blood*, 101(11), 4505–4511. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3189>
- Doníz-Padilla, L., Paniagua, A. E., Sandoval-Correa, P., Monsiváis-Urenda, A., Leskela, S., Marazuela, M., & González-Amaro, R. (2011). Analysis of expression and function of the inhibitory receptor ILT2 in lymphocytes from patients with autoimmune thyroid disease. *European Journal of Endocrinology*, 165(1), 129–136. <https://doi.org/10.1530/EJE-11-0109>
- Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., Cayanan, C., Maddon, P. J., Koup, R. A., Moore, J. P., & Paxton, W. A. (1996). HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*, 381(6584), 667–673. <https://doi.org/10.1038/381667a0>
- Dugast, A.-S., Tonelli, A., Berger, C. T., Ackerman, M. E., Sciaranghella, G., Liu, Q., Sips, M., Toth, I., Piechocka-Trocha, A., Ghebremichael, M., & Alter, G. (2011). Decreased Fc receptor expression on innate immune cells is associated with impaired antibody-mediated cellular phagocytic activity in chronically HIV-1 infected individuals. *Virology*, 415(2),

- 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.03.012>
- Dunst, J., Kamena, F., & Matuschewski, K. (2017). Cytokines and chemokines in cerebral malaria pathogenesis. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 7, Issue JUL, p. 324). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00324>
- Eisele, E., & Siliciano, R. F. (2012). Redefining the Viral Reservoirs that Prevent HIV-1 Eradication. In *Immunity* (Vol. 37, Issue 3, pp. 377–388). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.010>
- El Hed, A., Khaitan, A., Kozhaya, L., Manel, N., Daskalakis, D., Borkowsky, W., Valentine, F., Littman, D. R., & Unutmaz, D. (2010). Susceptibility of Human Th17 Cells to Human Immunodeficiency Virus and Their Perturbation during Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 201(6), 843–854. <https://doi.org/10.1086/651021>
- Elbim, C., Monceaux, V., François, S., Hurtel, B., Gougerot-Pocidalò, M. A., & Estaquier, J. (2009). Increased neutrophil apoptosis in chronically SIV-infected macaques. *Retrovirology*, 6, 29. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-6-29>
- Ellery, P. J., Tippet, E., Chiu, Y.-L., Paukovics, G., Cameron, P. U., Solomon, A., Lewin, S. R., Gorry, P. R., Jaworowski, A., Greene, W. C., Sonza, S., & Crowe, S. M. (2007). The CD16 + Monocyte Subset Is More Permissive to Infection and Preferentially Harbors HIV-1 In Vivo . *The Journal of Immunology*, 178(10), 6581–6589. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.10.6581>
- Ellis, M., Gupta, S., Galant, S., Hakim, S., VandeVen, C., Toy, C., & Cairo, M. S. (1988). Impaired neutrophil function in patients with AIDS or AIDS-related complex: a comprehensive evaluation. *The Journal of Infectious Diseases*, 158(6), 1268–1276. <https://doi.org/10.1093/infdis/158.6.1268>
- Elsheikh, M. M., Tang, Y., Li, D., & Jiang, G. (2019). Deep latency: A new insight into a functional HIV cure. In *EBioMedicine* (Vol. 45, pp. 624–629). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.06.020>
- Engelman, A., & Cherepanov, P. (2012). The structural biology of HIV-1: Mechanistic and therapeutic insights. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 10, Issue 4, pp. 279–290). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2747>
- Esbjörnsson, J., Månsson, F., Kvist, A., da Silva, Z. J., Andersson, S., Fenyö, E. M., Isberg, P. E., Biague, A. J., Lindman, J., Palm, A. A., Rowland-Jones, S. L., Jansson, M., Medstrand, P., Norrgren, H., N’Buna, B., Biague, A. J., Biai, A., Camara, C., Karlson, S., ... Wilhelmson, S. (2019). Long-term follow-up of HIV-2-related AIDS and mortality in Guinea-Bissau: a prospective open cohort study. *The Lancet HIV*, 6(1), e25–e31. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(18\)30254-6](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(18)30254-6)
- Espíndola, M. S., Soares, L. S., Galvão-Lima, L. J., Zambuzi, F. A., Cacemiro, M. C., Brauer, V. S., Marzocchi-Machado, C. M., de Souza Gomes, M., Amaral, L. R., Martins-Filho, O. A., Bollela, V. R., & Frantz, F. G. (2018). Epigenetic alterations are associated with monocyte immune dysfunctions in HIV-1 infection. *Scientific Reports*, 8(1), 5505. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23841-1>
- Estes, J. D. (2013). Pathobiology Of HIV/SIV-Associated Changes In Secondary Lymphoid Tissues. *Immunological Reviews*, 254(1), 65–77. <https://doi.org/10.1111/imr.12070>
- Estes, J. D., Wietgreffe, S., Schacker, T., Southern, P., Beilman, G., Reilly, C., Milush, J. M.,

- Lifson, J. D., Sodora, D. L., Carlis, J. V., & Haase, A. T. (2007). Simian Immunodeficiency Virus–Induced Lymphatic Tissue Fibrosis Is Mediated by Transforming Growth Factor β 1–Positive Regulatory T Cells and Begins in Early Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 195(4), 551–561. <https://doi.org/10.1086/510852>
- Estes, J. D., Wong, S. W., & Brenchley, J. M. (2018). Nonhuman primate models of human viral infections. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 18, Issue 6, pp. 390–404). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0005-7>
- Etemad, B., Esmaeilzadeh, E., & Li, J. Z. (2019). Learning From the Exceptions: HIV Remission in Post-treatment Controllers. In *Frontiers in immunology* (Vol. 10, p. 1749). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01749>
- Evans, D. T., & Silvestri, G. (2013). Nonhuman primate models in AIDS research. In *Current Opinion in HIV and AIDS* (Vol. 8, Issue 4, pp. 255–261). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e328361cee8>
- Eyerich, S., Eyerich, K., Cavani, A., & Schmidt-Weber, C. (2010). IL-17 and IL-22: siblings, not twins. In *Trends in Immunology* (Vol. 31, Issue 9, pp. 354–361). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.06.004>
- Falcinelli, S. D., Ceriani, C., Margolis, D. M., & Archin, N. M. (2019). New Frontiers in Measuring and Characterizing the HIV Reservoir. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 10, p. 2878). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02878>
- Falivene, J., Ghiglione, Y., Laufer, N., Socías, M. E., Holgado, M. P., Ruiz, M. J., Maeto, C., Figueroa, M. I., Giavedoni, L. D., Cahn, P., Salomón, H., Sued, O., Turk, G., & Gherardi, M. M. (2015). Th17 and Th17/Treg ratio at early HIV infection associate with protective HIV-specific CD8+ T-cell responses and disease progression. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep11511>
- Fauci, A. S., Mavilio, D., & Kottlil, S. (2005). NK cells in HIV infection: Paradigm for protection or targets for ambush. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 5, Issue 11, pp. 835–843). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri1711>
- Feldman, S., Stein, D., Amrute, S., Denny, T., Garcia, Z., Kloser, P., Sun, Y., Megjugorac, N., & Fitzgerald-Bocarsly, P. (2001). Decreased interferon- α production in HIV-infected patients correlates with numerical and functional deficiencies in circulating type 2 dendritic cell precursors. *Clinical Immunology*, 101(2), 201–210. <https://doi.org/10.1006/clim.2001.5111>
- Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., & Berger, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: Functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, 272(5263), 872–877. <https://doi.org/10.1126/science.272.5263.872>
- Fidler, S., Olson, A. D., Bucher, H. C., Fox, J., Thornhill, J., Morrison, C., Muga, R., Phillips, A., Frater, J., & Porter, K. (2017). Virological blips and predictors of post treatment viral control after stopping ART started in primary HIV infection. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 74(2), 126–133. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000001220>
- Fife, B. T., & Bluestone, J. A. (2008). Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. In *Immunological Reviews* (Vol. 224, Issue 1, pp. 166–182). <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00662.x>

- Finke, J. S., Shodell, M., Shah, K., Siegal, F. P., & Steinman, R. M. (2004). Dendritic cell numbers in the blood of HIV-1 infected patients before and after changes in antiretroviral therapy. *Journal of Clinical Immunology*, *24*(6), 647–652. <https://doi.org/10.1007/s10875-004-6250-5>
- Fletcher, C. V., Staskus, K., Wietgreffe, S. W., Rothenberger, M., Reilly, C., Chipman, J. G., Beilman, G. J., Khoruts, A., Thorkelson, A., Schmidt, T. E., Anderson, J., Perkey, K., Stevenson, M., Perelson, A. S., Douek, D. C., Haase, A. T., & Schacker, T. W. (2014). Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(6), 2307–2312. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318249111>
- Flórez-Álvarez, L., Hernandez, J. C., & Zapata, W. (2018). NK cells in HIV-1 infection: From basic science to vaccine strategies. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Issue OCT, p. 2290). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02290>
- Frange, P., Faye, A., Avettand-Fenoël, V., Bellaton, E., Descamps, D., Angin, M., David, A., Caillat-Zucman, S., Peytavin, G., Dollfus, C., Le Chenadec, J., Warszawski, J., Rouzioux, C., & Sáez-Cirión, A. (2016). HIV-1 virological remission lasting more than 12 years after interruption of early antiretroviral therapy in a perinatally infected teenager enrolled in the French ANRS EPF-CO10 paediatric cohort: A case report. *The Lancet HIV*, *3*(1), e49–e54. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(15\)00232-5](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(15)00232-5)
- French, A. L., Evans, C. T., Agniel, D. M., Cohen, M. H., Peters, M., Landay, A. L., & Desai, S. N. (2013). Microbial translocation and liver disease progression in women coinfecting with HIV and hepatitis C virus. *The Journal of Infectious Diseases*, *208*(4), 679–689. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit225>
- French, M. A., King, M. S., Tschampa, J. M., da Silva, B. A., & Landay, A. L. (2009). Serum Immune Activation Markers Are Persistently Increased in Patients with HIV Infection after 6 Years of Antiretroviral Therapy despite Suppression of Viral Replication and Reconstitution of CD4 + T Cells . *The Journal of Infectious Diseases*, *200*(8), 1212–1215. <https://doi.org/10.1086/605890>
- Frleta, D., Ochoa, C. E., Kramer, H. B., Khan, S. A., Stacey, A. R., Borrow, P., Kessler, B. M., Haynes, B. F., & Bhardwaj, N. (2012). HIV-1 infection-induced apoptotic microparticles inhibit human DCs via CD44. *The Journal of Clinical Investigation*, *122*(12), 4685–4697. <https://doi.org/10.1172/JCI64439>
- Fromentin, R., Bakeman, W., Lawani, M. B., Khoury, G., Hartogensis, W., DaFonseca, S., Killian, M., Epling, L., Hoh, R., Sinclair, E., Hecht, F. M., Bacchetti, P., Deeks, S. G., Lewin, S. R., Sékaly, R. P., & Chomont, N. (2016). CD4+ T Cells Expressing PD-1, TIGIT and LAG-3 Contribute to HIV Persistence during ART. *PLoS Pathogens*, *12*(7), e1005761. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005761>
- Galvin, S. R., & Cohen, M. S. (2004). The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 2, Issue 1, pp. 33–42). <https://doi.org/10.1038/nrmicro794>
- Ganor, Y., Real, F., Sennepin, A., Dutertre, C. A., Prevedel, L., Xu, L., Tudor, D., Charmeteau, B., Couedel-Courteille, A., Marion, S., Zenak, A. R., Jourdain, J. P., Zhou, Z., Schmitt, A., Capron, C., Eugenin, E. A., Cheynier, R., Revol, M., Cristofari, S., ... Bomsel, M. (2019). HIV-1 reservoirs in urethral macrophages of patients under suppressive antiretroviral therapy. *Nature Microbiology*, *4*(4), 633–644.

<https://doi.org/10.1038/s41564-018-0335-z>

- Ganusov, V. V., Goonetilleke, N., Liu, M. K. P., Ferrari, G., Shaw, G. M., McMichael, A. J., Borrow, P., Korber, B. T., & Perelson, A. S. (2011). Fitness Costs and Diversity of the Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) Response Determine the Rate of CTL Escape during Acute and Chronic Phases of HIV Infection. *Journal of Virology*, *85*(20), 10518–10528. <https://doi.org/10.1128/jvi.00655-11>
- Gao, A., Sun, Y., & Peng, G. (2018). ILT4 functions as a potential checkpoint molecule for tumor immunotherapy. In *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (Vol. 1869, Issue 2, pp. 278–285). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.04.001>
- Garcia, E., Pion, M., Pelchen-Matthews, A., Collinson, L., Arrighi, J. F., Blot, G., Leuba, F., Escola, J. M., Demarex, N., Marsh, M., & Piguet, V. (2005). HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse. *Traffic*, *6*(6), 488–501. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00293.x>
- Gasper-Smith, N., Crossman, D. M., Whitesides, J. F., Mensali, N., Ottinger, J. S., Plonk, S. G., Moody, M. A., Ferrari, G., Weinhold, K. J., Miller, S. E., Reich, C. F., Qin, L., Self, S. G., Shaw, G. M., Denny, T. N., Jones, L. E., Pisetsky, D. S., & Haynes, B. F. (2008). Induction of Plasma (TRAIL), TNFR-2, Fas Ligand, and Plasma Microparticles after Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Transmission: Implications for HIV-1 Vaccine Design. *Journal of Virology*, *82*(15), 7700–7710. <https://doi.org/10.1128/jvi.00605-08>
- Geijtenbeek, T. B. H., Kwon, D. S., Torensma, R., Van Vliet, S. J., Van Duijnhoven, G. C. F., Middel, J., Cornelissen, I. L. M. H. A., Nottet, H. S. L. M., KewalRamani, V. N., Littman, D. R., Figdor, C. G., & Van Kooyk, Y. (2000). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*, *100*(5), 587–597. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80694-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80694-7)
- Ginhoux, F., & Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: Developmental pathways and tissue homeostasis. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 14, Issue 6, pp. 392–404). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri3671>
- Godal, R., Bachanova, V., Gleason, M., McCullar, V., Yun, G. H., Cooley, S., Verneris, M. R., McGlave, P. B., & Miller, J. S. (2010). Natural Killer Cell Killing of Acute Myelogenous Leukemia and Acute Lymphoblastic Leukemia Blasts by Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor-Negative Natural Killer Cells after NKG2A and LIR-1 Blockade. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, *16*(5), 612–621. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2010.01.019>
- Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A., & Saxon, A. (1981). Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *The New England Journal of Medicine*, *305*(24), 1425–1431. <https://doi.org/10.1056/NEJM198112103052401>
- Goujard, C., Bonarek, M., Meyer, L., Bonnet, F., Chaix, M.-L., Deveau, C., Sinet, M., Galimand, J., Delfraissy, J.-F., Venet, A., Rouzioux, C., & Morlat, P. (2006). CD4 Cell Count and HIV DNA Level Are Independent Predictors of Disease Progression after Primary HIV Type 1 Infection in Untreated Patients. *Clinical Infectious Diseases*, *42*(5), 709–715. <https://doi.org/10.1086/500213>

- Goujard, Cécile, Girault, I., Rouzioux, C., Lécuroux, C., Deveau, C., Chaix, M. L., Jacomet, C., Talamali, A., Delfraissy, J. F., Venet, A., Meyer, L., & Sinet, M. (2012). HIV-1 control after transient antiretroviral treatment initiated in primary infection: Role of patient characteristics and effect of therapy. *Antiviral Therapy*, *17*(6), 1001–1009. <https://doi.org/10.3851/IMP2273>
- Granelli-Piperno, A., Delgado, E., Finkel, V., Paxton, W., & Steinman, R. M. (1998). Immature Dendritic Cells Selectively Replicate Macrophagetropic (M-Tropic) Human Immunodeficiency Virus Type 1, while Mature Cells Efficiently Transmit both M- and T-Tropic Virus to T Cells. *Journal of Virology*, *72*(4), 2733–2737. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.4.2733-2737.1998>
- Granier, C., Soumelis, V., Mandavit, M., Gibault, L., Belazzoug, R., de Guillebon, E., Badoual, C., Tartour, E., & Roussel, H. (2017). The “immune checkpoints”, how does it work. In *Annales de Pathologie* (Vol. 37, Issue 1, pp. 18–28). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.annpat.2016.12.007>
- Grau-Expósito, J., Serra-Peinado, C., Miguel, L., Navarro, J., Curran, A., Burgos, J., Ocaña, I., Ribera, E., Torrella, A., Planas, B., Badía, R., Castellví, J., Falcó, V., Crespo, M., & Buzon, M. J. (2017). A Novel Single-Cell FISH-Flow Assay Identifies Effector Memory CD4⁺ T cells as a Major Niche for HIV-1 Transcription in HIV-Infected Patients. *MBio*, *8*(4), e00876-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00876-17>
- Groot, F., van Capel, T. M. M., Schuitemaker, J. H. N., Berkhout, B., & de Jong, E. C. (2006). Differential susceptibility of naïve, central memory and effector memory T cells to dendritic cell-mediated HIV-1 transmission. *Retrovirology*, *3*. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-3-52>
- Guilliams, M., Bruhns, P., Saeys, Y., Hammad, H., & Lambrecht, B. N. (2014). The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nature Reviews Immunology*, *14*(2), 94–108. <https://doi.org/10.1038/nri3582>
- Guma, M., Angulo, A., Vilches, C., Gómez-Lozano, N., Malats, N., & López-Botet, M. (2004). Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood*, *104*(12), 3664–3671. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-05-2058>
- Gustafson, C. E., Qi, Q., Hutter-Saunders, J., Gupta, S., Jadhav, R., Newell, E., Maecker, H., Weyand, C. M., & Goronzy, J. J. (2017). Immune checkpoint function of CD85j in CD8 T cell differentiation and aging. *Frontiers in Immunology*, *8*(JUN), 692. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00692>
- Guzman, M. G., Alvarez, M., & Halstead, S. B. (2013). Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: An historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. In *Archives of Virology* (Vol. 158, Issue 7, pp. 1445–1459). <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1645-3>
- Hamimi, C., David, A., Versmisse, P., Eiss, L., Bruel, T., Zucman, D., Appay, V., Moris, A., Ungeheuer, M. N., Lascoux-Combe, C., Barré-Sinoussi, F., Muller-Trutwin, M., Boufassa, F., Lambotte, O., Pancino, G., & Sáez-Cirión, A. (2016). Dendritic cells from HIV controllers have low susceptibility to HIV-1 infection in vitro but high capacity to capture HIV-1 particles. *PLoS ONE*, *11*(8), e0160251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160251>
- Harper, J., Gordon, S., Chan, C. N., Wang, H., Lindemuth, E., Galardi, C., Falcinelli, S. D.,

- Raines, S. L. M., Read, J. L., Nguyen, K., McGary, C. S., Nekorchuk, M., Busman-Sahay, K., Schawalder, J., King, C., Pino, M., Micci, L., Cervasi, B., Jean, S., ... Paiardini, M. (2020). CTLA-4 and PD-1 dual blockade induces SIV reactivation without control of rebound after antiretroviral therapy interruption. In *Nature Medicine*. Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0782-y>
- Hasegawa, A., Liu, H., Ling, B., Borda, J. T., Alvarez, X., Sugimoto, C., Vinet-Oliphant, H., Kim, W.-K., Williams, K. C., Ribeiro, R. M., Lackner, A. A., Veazey, R. S., & Kuroda, M. J. (2009). The level of monocyte turnover predicts disease progression in the macaque model of AIDS. *Blood*, *114*(14), 2917–2925. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-204263>
- Haspot, F., Fehr, T., Gibbons, C., Zhao, G., Hogan, T., Honjo, T., Freeman, G. J., & Sykes, M. (2008). Peripheral deletional tolerance of alloreactive CD8 but not CD4 T cells is dependent on the PD-1/PD-L1 pathway. *Blood*, *112*(5), 2149–2155. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-12-127449>
- Hatano, H., Delwart, E. L., Norris, P. J., Lee, T.-H., Dunn-Williams, J., Hunt, P. W., Hoh, R., Stramer, S. L., Linnen, J. M., McCune, J. M., Martin, J. N., Busch, M. P., & Deeks, S. G. (2009). Evidence for persistent low-level viremia in individuals who control human immunodeficiency virus in the absence of antiretroviral therapy. *Journal of Virology*, *83*(1), 329–335. <https://doi.org/10.1128/JVI.01763-08>
- Hayami, K., Fukuta, D., Nishikawa, Y., Yamashita, Y., Inui, M., Ohyama, Y., Hikida, M., Ohmori, H., & Takai, T. (1997). Molecular cloning of a novel murine cell-surface glycoprotein homologous to killer cell inhibitory receptors. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(11), 7320–7327. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.11.7320>
- Haynes, B. F., Fleming, J., St. Clair, E. W., Katinger, H., Stiegler, G., Kunert, R., Robinson, J., Scarce, R. M., Plonk, K., Staats, H. F., Ortel, T. L., Liao, H. X., & Alam, S. M. (2005). Immunology: Cardiolipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science*, *308*(5730), 1906–1908. <https://doi.org/10.1126/science.1111781>
- Hazenberg, M. D., Hamann, D., Schuitemaker, H., & Miedema, F. (2000). T cell depletion in HIV-1 infection: How CD4+ T cells go out of stock. In *Nature Immunology* (Vol. 1, Issue 4, pp. 285–289). Presse Dienstleistungsgesellschaft mbH und Co. KG. <https://doi.org/10.1038/79724>
- Hazenberg, M. D., Otto, S. A., Van Benthem, B. H. B., Roos, M. T. L., Coutinho, R. A., Lange, J. M. A., Hamann, D., Prins, M., & Miedema, F. (2003). Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *AIDS*, *17*(13), 1881–1888. <https://doi.org/10.1097/00002030-200309050-00006>
- Heesters, B. A., Lindqvist, M., Vagefi, P. A., Scully, E. P., Schildberg, F. A., Altfeld, M., Walker, B. D., Kaufmann, D. E., & Carroll, M. C. (2015). Follicular Dendritic Cells Retain Infectious HIV in Cycling Endosomes. *PLoS Pathogens*, *11*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005285>
- Held, W., & Mariuzza, R. A. (2008). Cis interactions of immunoreceptors with MHC and non-MHC ligands. *Nature Reviews. Immunology*, *8*(4), 269–278. <https://doi.org/10.1038/nri2278>
- Herbeuval, J. P., Grivel, J. C., Boasso, A., Hardy, A. W., Chougnnet, C., Dolan, M. J., Yagita, H., Lifson, J. D., & Shearer, G. M. (2005). CD4+ T-cell death induced by infectious and

- noninfectious HIV-1: Role of type 1 interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis. *Blood*, 106(10), 3524–3531. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1243>
- Hersperger, A. R., Pereyra, F., Nason, M., Demers, K., Sheth, P., Shin, L. Y., Kovacs, C. M., Rodriguez, B., Sieg, S. F., Teixeira-Johnson, L., Gudonis, D., Goepfert, P. A., Lederman, M. M., Frank, I., Makedonas, G., Kaul, R., Walker, B. D., & Betts, M. R. (2010). Perforin expression directly ex vivo by HIV-specific CD8+ T-cells is a correlate of HIV elite control. *PLoS Pathogens*, 6(5), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000917>
- Hirayasu, K., & Arase, H. (2015). Functional and genetic diversity of leukocyte immunoglobulin-like receptor and implication for disease associations. In *Journal of Human Genetics* (Vol. 60, Issue 11, pp. 703–708). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/jhg.2015.64>
- Hirayasu, K., & Arase, H. (2018). Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor (LILR). In *Encyclopedia of Signaling Molecules* (pp. 2854–2861). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4_101689
- Hirayasu, K., Ohashi, J., Tanaka, H., Kashiwase, K., Ogawa, A., Takanashi, M., Satake, M., Jia, G. J., Chinge, N. O., Sideltseva, E. W., Tokunaga, K., & Yabe, T. (2008). Evidence for Natural Selection on Leukocyte Immunoglobulin-like Receptors for HLA Class I in Northeast Asians. *American Journal of Human Genetics*, 82(5), 1075–1083. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.03.012>
- Hirayasu, K., Saito, F., Suenaga, T., Shida, K., Arase, N., Oikawa, K., Yamaoka, T., Murota, H., Chibana, H., Nakagawa, I., Kubori, T., Nagai, H., Nakamaru, Y., Katayama, I., Colonna, M., & Arase, H. (2016). Microbially cleaved immunoglobulins are sensed by the innate immune receptor LILRA2. *Nature Microbiology*, 1(6), 16054. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.54>
- Ho, J., Moir, S., Malaspina, A., Howell, M. L., Wang, W., DiPoto, A. C., O’Shea, M. A., Roby, G. A., Kwan, R., Mican, J. A. M., Chun, T. W., & Fauci, A. S. (2006). Two overrepresented B cell populations in HIV-infected individuals undergo apoptosis by different mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(51), 19436–19441. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609515103>
- Ho, Y. C., Shan, L., Hosmane, N. N., Wang, J., Laskey, S. B., Rosenbloom, D. I. S., Lai, J., Blankson, J. N., Siliciano, J. D., & Siliciano, R. F. (2013). Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell*, 155(3), 540. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.020>
- Hocqueloux, L., Avettand-Fènoël, V., Jacquot, S., Prazuck, T., Legac, E., Mélard, A., Niang, M., Mille, C., Le Moal, G., Viard, J.-P., Rouzioux, C., & AC32 (Coordinated Action on HIV Reservoirs) of the Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites Virales (ANRS). (2013). Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key to achieving both low HIV reservoirs and normal T cell counts. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(5), 1169–1178. <https://doi.org/10.1093/jac/dks533>
- Hocqueloux, L., Prazuck, T., Avettand-Fenoel, V., Lafeuillade, A., Cardon, B., Viard, J. P., & Rouzioux, C. (2010). Long-term immunovirologic control following antiretroviral therapy interruption in patients treated at the time of primary HIV-1 infection. *AIDS*, 24(10), 1598–1601. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32833b61ba>

- Hoffman, W., Lakkis, F. G., & Chalasani, G. (2016). B cells, antibodies, and more. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, *11*(1), 137–154. <https://doi.org/10.2215/CJN.09430915>
- Hogan, L., Bhujju, S., Jones, D. C., Laing, K., Trowsdale, J., Butcher, P., Singh, M., Vordermeier, M., & Allen, R. L. (2012). Characterisation of bovine leukocyte ig-like receptors. *PLoS ONE*, *7*(4), 34291. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034291>
- Homann, S., Smith, D., Little, S., Richman, D., & Guatelli, J. (2011). Upregulation of BST-2/Tetherin by HIV infection in vivo. *Journal of Virology*, *85*(20), 10659–10668. <https://doi.org/10.1128/JVI.05524-11>
- Hosmane, N. N., Kwon, K. J., Bruner, K. M., Capoferri, A. A., Beg, S., Rosenbloom, D. I. S., Keele, B. F., Ho, Y. C., Siliciano, J. D., & Siliciano, R. F. (2017). Proliferation of latently infected CD4+ T cells carrying replication-competent HIV-1: Potential role in latent reservoir dynamics. *Journal of Experimental Medicine*, *214*(4), 959–972. <https://doi.org/10.1084/jem.20170193>
- Hrecka, K., Hao, C., Gierszewska, M., Swanson, S. K., Kesik-Brodacka, M., Srivastava, S., Florens, L., Washburn, M. P., & Skowronski, J. (2011). Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature*, *474*(7353), 658–661. <https://doi.org/10.1038/nature10195>
- Hryniewicz, A., Boasso, A., Edghill-Smith, Y., Vaccari, M., Fuchs, D., Venzon, D., Nacsa, J., Betts, M. R., Tsai, W. P., Heraud, J. M., Beer, B., Blanset, D., Chougnet, C., Lowy, I., Shearer, G. M., & Franchini, G. (2006). CTLA-4 blockade decreases TGF- β , IDO, and viral RNA expression in tissues of SIVmac251-infected macaques. *Blood*, *108*(12), 3834–3842. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-010637>
- Hsu, D. C., Sereti, I., & Ananworanich, J. (2013). Serious Non-AIDS events: Immunopathogenesis and interventional strategies. In *AIDS Research and Therapy* (Vol. 10, Issue 1, p. 29). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/1742-6405-10-29>
- Hsue, P. Y., Hunt, P. W., Schnell, A., Kalapus, S. C., Hoh, R., Ganz, P., Martin, J. N., & Deeks, S. G. (2009). Role of viral replication, antiretroviral therapy, and immunodeficiency in HIV-associated atherosclerosis. *AIDS*, *23*(9), 1059–1067. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32832b514b>
- Hu, Q., Frank, I., Williams, V., Santos, J. J., Watts, P., Griffin, G. E., Moore, J. P., Pope, M., & Shattock, R. J. (2004). Blockade of Attachment and Fusion Receptors Inhibits HIV-1 Infection of Human Cervical Tissue. *Journal of Experimental Medicine*, *199*(8), 1065–1075. <https://doi.org/10.1084/jem.20022212>
- Huang, J., Burke, P. S., Cung, T. D. H., Pereyra, F., Toth, I., Walker, B. D., Borges, L., Lichterfeld, M., & Yu, X. G. (2010). Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptors Maintain Unique Antigen-Presenting Properties of Circulating Myeloid Dendritic Cells in HIV-1-Infected Elite Controllers. *Journal of Virology*, *84*(18), 9463–9471. <https://doi.org/10.1128/JVI.01009-10>
- Huang, Jinghe, Al-Mozaini, M., Rogich, J., Carrington, M. F., Seiss, K., Pereyra, F., Lichterfeld, M., & Yu, X. G. (2012). Systemic inhibition of myeloid dendritic cells by circulating HLA class I molecules in HIV-1 infection. *Retrovirology*, *9*(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-9-11>
- Huang, Jinghe, Burke, P., Yang, Y., Seiss, K., Beamon, J., Cung, T., Toth, I., Pereyra, F.,

- Lichterfeld, M., & Yu, X. G. (2010). Soluble HLA-G inhibits myeloid dendritic cell function in HIV-1 infection by interacting with leukocyte immunoglobulin-like receptor B2. *Journal of Virology*, 84(20), 10784–10791. <https://doi.org/10.1128/JVI.01292-10>
- Huang, Jinghe, Goedert, J. J., Sundberg, E. J., Cung, T. D. H., Burke, P. S., Martin, M. P., Preiss, L., Lifson, J., Lichterfeld, M., Carrington, M., & Yu, X. G. (2009). HLA-B*35-Px-mediated acceleration of HIV-1 infection by increased inhibitory immunoregulatory impulses. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(13), 2959–2966. <https://doi.org/10.1084/jem.20091386>
- Huang, Jinghe, Yang, Y., Al-Mozaini, M., Burke, P. S., Beamon, J., Carrington, M. F., Seiss, K., Rychert, J., Rosenberg, E. S., Lichterfeld, M., & Yu, X. G. (2011). Dendritic Cell Dysfunction During Primary HIV-1 Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 204(10), 1557–1562. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir616>
- Hudson, L. E., & Allen, R. L. (2016). Leukocyte Ig-like receptors - A Model for MHC Class I Disease Associations. *Frontiers in Immunology*, 7(JUL). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00281>
- Hunt, P. (2014). Chronic inflammation and its role in HIV pathogenesis. *International Journal of Infectious Diseases*, 21, 43. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.03.507>
- Hunt, P. W. (2012). HIV and inflammation: Mechanisms and consequences. *Current HIV/AIDS Reports*, 9(2), 139–147. <https://doi.org/10.1007/s11904-012-0118-8>
- Hunt, P. W., Brenchley, J., Sinclair, E., McCune, J. M., Roland, M., Page-Shafer, K., Hsue, P., Emu, B., Krone, M., Lampiris, H., Douek, D., Martin, J. N., & Deeks, S. G. (2008). Relationship between T Cell Activation and CD4 + T Cell Count in HIV-Seropositive Individuals with Undetectable Plasma HIV RNA Levels in the Absence of Therapy . *The Journal of Infectious Diseases*, 197(1), 126–133. <https://doi.org/10.1086/524143>
- Hunt, P. W., Martin, J. N., Sinclair, E., Brecht, B., Hagos, E., Lampiris, H., & Deeks, S. G. (2003). T Cell Activation Is Associated with Lower CD4 + T Cell Gains in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients with Sustained Viral Suppression during Antiretroviral Therapy . *The Journal of Infectious Diseases*, 187(10), 1534–1543. <https://doi.org/10.1086/374786>
- Huynh, O. A., Hampartzoumian, T., Arm, J. P., Hunt, J., Borges, L., Ahern, M., Smith, M., Geczy, C. L., McNeil, H. P., & Tedla, N. (2007). Down-regulation of leukocyte immunoglobulin-like receptor expression in the synovium of rheumatoid arthritis patients after treatment with disease-modifying anti-rheumatic drugs. *Rheumatology (Oxford, England)*, 46(5), 742–751. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kel405>
- HY, C., HJ, K., JW, K., & BP, Y. (2001). The Inflammation Hypothesis of Aging: Molecular Modulation by Calorie Restriction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 928, 327–335. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11795524>
- Innocenti-Francillard, P., Brengel, K., Guillon, C., Mallet, F., Morand, P., Gruters, R., & Seigneurin, J. M. (1994). Blood Monocytes Infected In Vivo by HIV-1 Variants with a Syncytium-Inducing Phenotype. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 10(6), 683–690. <https://doi.org/10.1089/aid.1994.10.683>
- Ishigaki, H., Shiina, T., & Ogasawara, K. (2018). MHC-identical and transgenic cynomolgus macaques for preclinical studies. In *Inflammation and Regeneration* (Vol. 38, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s41232-018-0088-3>

- Islam, F. M., Wu, J., Jansson, J., & Wilson, D. P. (2012). Relative risk of renal disease among people living with HIV: a systematic review and meta-analysis. In *BMC public health* (Vol. 12, p. 234). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-12-234>
- Ito, M., Ishida, T., He, L., Tanabe, F., Rongge, Y., Miyakawa, Y., & Terunuma, H. (1998). HIV type 1 Tat protein inhibits interleukin 12 production by human peripheral blood mononuclear cells. *AIDS Research and Human Retroviruses*, *14*(10), 845–849. <https://doi.org/10.1089/aid.1998.14.845>
- Ivashkiv, L. B. (2009). Cross-regulation of signaling by ITAM-associated receptors. In *Nature Immunology* (Vol. 10, Issue 4, pp. 340–347). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1038/ni.1706>
- Izquierdo-Useros, N., Lorizate, M., McLaren, P. J., Telenti, A., Kräusslich, H.-G., & Martinez-Picado, J. (2014). HIV-1 Capture and Transmission by Dendritic Cells: The Role of Viral Glycolipids and the Cellular Receptor Siglec-1. *PLoS Pathogens*, *10*(7), e1004146. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004146>
- Joly, E., & Hudrisier, D. (2003). What is trogocytosis and what is its purpose? *Nature Immunology*, *4*(9), 815–815. <https://doi.org/10.1038/ni0903-815>
- Jones, D. C., Kosmoliaptsis, V., Apps, R., Lapaque, N., Smith, I., Kono, A., Chang, C., Boyle, L. H., Taylor, C. J., Trowsdale, J., & Allen, R. L. (2011). HLA class I allelic sequence and conformation regulate leukocyte Ig-like receptor binding. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *186*(5), 2990–2997. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003078>
- Joseph, S. B., Swanstrom, R., Kashuba, A. D. M., & Cohen, M. S. (2015). Bottlenecks in HIV-1 transmission: Insights from the study of founder viruses. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 13, Issue 7, pp. 414–425). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3471>
- Kalidasan, V., & Theva Das, K. (2020). Lessons Learned From Failures and Success Stories of HIV Breakthroughs: Are We Getting Closer to an HIV Cure? In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11, p. 46). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00046>
- Kalmbach, Y., Boldt, A. B. W., Fendel, R., Mordmüller, B., Kreamsner, P. G., & Kun, J. F. J. (2006). Increase in annexin V-positive B cells expressing LILRB1/ILT2/CD85j in malaria. *European Cytokine Network*, *17*(3), 175–180. <https://doi.org/10.1684/ecn.2006.0032>
- Kamga, I., Kahi, S., Develioglu, L., Lichtner, M., Marañón, C., Deveau, C., Meyer, L., Goujard, C., Lebon, P., Sinet, M., & Hosmalin, A. (2005). Type I Interferon Production Is Profoundly and Transiently Impaired in Primary HIV-1 Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, *192*(2), 303–310. <https://doi.org/10.1086/430931>
- Kang, X., Kim, J., Deng, M., John, S., Chen, H., Wu, G., Phan, H., & Zhang, C. C. (2015). Inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors: immune checkpoint proteins and tumor sustaining factors. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *4101*(February). <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1121324>
- Kaplan, R. C., Sinclair, E., Landay, A. L., Lurain, N., Sharrett, A. R., Gange, S. J., Xue, X., Hunt, P., Karim, R., Kern, D. M., Hodis, H. N., & Deeks, S. G. (2011). T cell activation and senescence predict subclinical carotid artery disease in HIV-infected women. *The Journal of Infectious Diseases*, *203*(4), 452–463. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq071>
- Kaspar, M. B., & Sterling, R. K. (2017). Mechanisms of liver disease in patients infected with

- HIV. In *BMJ Open Gastroenterology* (Vol. 4, Issue 1). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/bmjgast-2017-000166>
- Kaspereit, J., Friderichs-Gromoll, S., Buse, E., & Habermann, G. (2007). Spontaneous neoplasms observed in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) during a 15-year period. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 59(3–4), 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2007.06.001>
- Katzelnick, L. C., Gresh, L., Halloran, M. E., Mercado, J. C., Kuan, G., Gordon, A., Balmaseda, A., & Harris, E. (2017). Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science*, 358(6365), 929–932. <https://doi.org/10.1126/science.aan6836>
- Kaufmann, D. E., Kavanagh, D. G., Pereyra, F., Zaunders, J. J., Mackey, E. W., Miura, T., Palmer, S., Brockman, M., Rathod, A., Piechocka-Trocha, A., Baker, B., Zhu, B., Le Gall, S., Waring, M. T., Ahern, R., Moss, K., Kelleher, A. D., Coffin, J. M., Freeman, G. J., ... Walker, B. D. (2007). Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nature Immunology*, 8(11), 1246–1254. <https://doi.org/10.1038/ni1515>
- Kaufmann, D. E., & Walker, B. D. (2009). PD-1 and CTLA-4 Inhibitory Cosignaling Pathways in HIV Infection and the Potential for Therapeutic Intervention. *The Journal of Immunology*, 182(10), 5891–5897. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803771>
- Kawamura, T., Gulden, F. O., Sugaya, M., McNamara, D. T., Borris, D. L., Lederman, M. M., Orenstein, J. M., Zimmerman, P. A., & Blauvelt, A. (2003). R5 HIV productively infects langerhans cells, and infection levels are regulated by compound CCR5 polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(14), 8401–8406. <https://doi.org/10.1073/pnas.1432450100>
- Keating, S. M., Heitman, J. W., Wu, S., Deng, X., Stacey, A. R., Zahn, R. C., de la Rosa, M., Finstad, S. L., Lifson, J. D., Piatak, M., Gauduin, M.-C., Kessler, B. M., Ternette, N., Carville, A., Johnson, R. P., Desrosiers, R. C., Letvin, N. L., Borrow, P., Norris, P. J., & Schmitz, J. E. (2016). Magnitude and Quality of Cytokine and Chemokine Storm during Acute Infection Distinguish Nonprogressive and Progressive Simian Immunodeficiency Virus Infections of Nonhuman Primates. *Journal of Virology*, 90(22), 10339–10350. <https://doi.org/10.1128/JVI.01061-16>
- Kedzierska, K., Azzam, R., Ellery, P., Mak, J., Jaworowski, A., & Crowe, S. M. (2003). Defective phagocytosis by human monocyte/macrophages following HIV-1 infection: underlying mechanisms and modulation by adjunctive cytokine therapy. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 26(2), 247–263. [https://doi.org/10.1016/s1386-6532\(02\)00123-3](https://doi.org/10.1016/s1386-6532(02)00123-3)
- Kedzierska, K., & Crowe, S. (2012). The Role of Monocytes and Macrophages in the Pathogenesis of HIV-1 Infection. *Current Medicinal Chemistry*, 9(21), 1893–1903. <https://doi.org/10.2174/0929867023368935>
- Keele, B. F., Giorgi, E. E., Salazar-Gonzalez, J. F., Decker, J. M., Pham, K. T., Salazar, M. G., Sun, C., Grayson, T., Wang, S., Li, H., Wei, X., Jiang, C., Kirchherr, J. L., Gao, F., Anderson, J. A., Ping, L. H., Swanstrom, R., Tomaras, G. D., Blattner, W. A., ... Shaw, G. M. (2008). Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(21), 7552–7557. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802203105>

- Keele, B. F., Jones, J. H., Terio, K. A., Estes, J. D., Rudicell, R. S., Wilson, M. L., Li, Y., Learn, G. H., Beasley, T. M., Schumacher-Stankey, J., Wroblewski, E., Mosser, A., Raphael, J., Kamenya, S., Lonsdorf, E. V., Travis, D. A., Mlengeya, T., Kinsel, M. J., Else, J. G., ... Hahn, B. H. (2009). Increased mortality and AIDS-like immunopathology in wild chimpanzees infected with SIVcpz. *Nature*, *460*(7254), 515–519. <https://doi.org/10.1038/nature08200>
- Keele, B. F., Tazi, L., Gartner, S., Liu, Y., Burgon, T. B., Estes, J. D., Thacker, T. C., Crandall, K. A., McArthur, J. C., & Burton, G. F. (2008). Characterization of the Follicular Dendritic Cell Reservoir of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Virology*, *82*(11), 5548–5561. <https://doi.org/10.1128/jvi.00124-08>
- Keizer, P., Higgs, E., & Smith, J. (1996). Neutropenia Is Associated With Bacteremia in Patients Infected With the Human Immunodeficiency Virus. *The American Journal of the Medical Sciences*, *312*(3), 118–122. <https://doi.org/10.1097/00000441-199609000-00004>
- Kijewski, S. D. G., & Gummuluru, S. (2015). A mechanistic overview of dendritic cell-mediated HIV-1 trans infection: The story so far. In *Future Virology* (Vol. 10, Issue 3, pp. 257–269). Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.2217/fvl.15.2>
- Killian, M. S., Fujimura, S. H., Hecht, F. M., & Levy, J. A. (2006). Similar changes in plasmacytoid dendritic cell and CD4 T-cell counts during primary HIV-1 infection and treatment. *AIDS*, *20*(9), 1247–1252. <https://doi.org/10.1097/01.aids.0000232231.34253.bd>
- Kim, A., Han, C.-J., Driver, I., Olow, A., Sewell, A. K., Zhang, Z., Ouyang, W., Egen, J. G., & Yu, X. (2019). LILRB1 Blockade Enhances Bispecific T Cell Engager Antibody-Induced Tumor Cell Killing by Effector CD8 + T Cells. *The Journal of Immunology*, *203*(4), 1076–1087. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801472>
- Kim, T., Vidal, G. S., Djurisic, M., William, C. M., Birnbaum, M. E., Garcia, K. C., Hyman, B. T., & Shatz, C. J. (2013). Human LILRB2 is a β -amyloid receptor and its murine homolog PirB regulates synaptic plasticity in an Alzheimer's model. *Science*, *341*(6152), 1399–1404. <https://doi.org/10.1126/science.1242077>
- Klatt, N. R., Estes, J. D., Sun, X., Ortiz, A. M., Barber, J. S., Harris, L. D., Cervasi, B., Yokomizo, L. K., Pan, L., Vinton, C. L., Tabb, B., Canary, L. A., Dang, Q., Hirsch, V. M., Alter, G., Belkaid, Y., Lifson, J. D., Silvestri, G., Milner, J. D., ... Brenchley, J. M. (2012). Loss of mucosal CD103 DCs and IL-17 and IL-22 lymphocytes is associated with mucosal damage in SIV infection. *Mucosal Immunology*, *5*(6), 646–657. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.38>
- Klatt, Nichole R., Chomont, N., Douek, D. C., & Deeks, S. G. (2013). Immune Activation And Hiv Persistence: Implications For Curative Approaches To Hiv Infection. *Immunological Reviews*, *254*(1), 326–342. <https://doi.org/10.1111/imr.12065>
- Klatt, Nichole R., Funderburg, N. T., & Brenchley, J. M. (2013). Microbial translocation, immune activation, and HIV disease. In *Trends in Microbiology* (Vol. 21, Issue 1, pp. 6–13). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.09.001>
- Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J. C., & Montagnier, L. (1984). T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*, *312*(5996), 767–768. <https://doi.org/10.1038/312767a0>
- Ko, A., Kang, G., Hattler, J. B., Galadima, H. I., Zhang, J., Li, Q., & Kim, W. K. (2019).

- Macrophages but not Astrocytes Harbor HIV DNA in the Brains of HIV-1-Infected Aviremic Individuals on Suppressive Antiretroviral Therapy. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 14(1), 110–119. <https://doi.org/10.1007/s11481-018-9809-2>
- Kohler, S. L., Pham, M. N., Folkvord, J. M., Arends, T., Miller, S. M., Miles, B., Meditz, A. L., McCarter, M., Levy, D. N., & Connick, E. (2016). Germinal Center T Follicular Helper Cells Are Highly Permissive to HIV-1 and Alter Their Phenotype during Virus Replication. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 196(6), 2711–2722. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502174>
- Koppensteiner, H., Brack-Werner, R., & Schindler, M. (2012). Macrophages and their relevance in Human Immunodeficiency Virus Type I infection. In *Retrovirology* (Vol. 9, p. 82). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-9-82>
- Kottlilil, S., Shin, K., Planta, M., McLaughlin, M., Hallahan, C. W., Ghany, M., Chun, T. -W., Sneller, M. C., & Fauci, A. S. (2004). Expression of Chemokine and Inhibitory Receptors on Natural Killer Cells: Effect of Immune Activation and HIV Viremia. *The Journal of Infectious Diseases*, 189(7), 1193–1198. <https://doi.org/10.1086/382090>
- Kottlilil, Shyam, Chun, T., Moir, S., Liu, S., McLaughlin, M., Hallahan, C. W., Maldarelli, F., Corey, L., & Fauci, A. S. (2003). Innate Immunity in Human Immunodeficiency Virus Infection: Effect of Viremia on Natural Killer Cell Function. *The Journal of Infectious Diseases*, 187(7), 1038–1045. <https://doi.org/10.1086/368222>
- Kottlilil, Shyam, Jackson, J. O., Reitano, K. N., O’Shea, M. A., Roby, G., Lloyd, M., Yang, J., Hallahan, C. W., Rehm, C. A., Arthos, J., Lempicki, R., & Fauci, A. S. (2007). Innate immunity in HIV infection: Enhanced susceptibility to CD95-mediated natural killer cell death and turnover induced by HIV viremia. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 46(2), 151–159. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3180dc9909>
- Koup, R. A., Safrit, J. T., Cao, Y., Andrews, C. A., McLeod, G., Borkowsky, W., Farthing, C., & Ho, D. D. (1994). Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *Journal of Virology*, 68(7), 4650–4655. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.7.4650-4655.1994>
- Koziel, H., Li, X., Armstrong, M. Y. K., Richards, F. F., & Rose, R. M. (2000). Alveolar macrophages from human immunodeficiency virus-infected persons demonstrate impaired oxidative burst response to *Pneumocystis carinii* in vitro. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 23(4), 452–459. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.23.4.4084>
- Krathwohl, M. D., Schacker, T. W., & Anderson, J. L. (2006). Abnormal Presence of Semimature Dendritic Cells That Induce Regulatory T Cells in HIV-Infected Subjects. *The Journal of Infectious Diseases*, 193(4), 494–504. <https://doi.org/10.1086/499597>
- Kruize, Z., & Kootstra, N. A. (2019). The Role of Macrophages in HIV-1 Persistence and Pathogenesis. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02828>
- Kubagawa, H., Burrows, P. D., & Cooper, M. D. (1997). A novel pair of immunoglobulin-like receptors expressed by B cells and myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(10), 5261–5266. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.10.5261>
- Kubagawa, H., Chen, C. C., Ho, L. H., Shimada, T., Gartland, L., Mashburn, C., Uehara, T.,

- Ravetch, J. V., & Cooper, M. D. (1999). Biochemical nature and cellular distribution of the paired immunoglobulin-like receptors, PIR-A and PIR-B. *Journal of Experimental Medicine*, 189(2), 309–317. <https://doi.org/10.1084/jem.189.2.309>
- Kuller, L. H., Tracy, R., Bellosso, W., De Wit, S., Drummond, F., Lane, H. C., Ledergerber, B., Lundgren, J., Neuhaus, J., Nixon, D., Paton, N. I., & Neaton, J. D. (2008). Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *PLoS Medicine*, 5(10), 1496–1508. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050203>
- Kumar, A., & Herbein, G. (2014). The macrophage: a therapeutic target in HIV-1 infection. *Molecular and Cellular Therapies*, 2(1), 10. <https://doi.org/10.1186/2052-8426-2-10>
- Kumar, S., & Samaras, K. (2018). The Impact of Weight Gain During HIV Treatment on Risk of Pre-diabetes, Diabetes Mellitus, Cardiovascular Disease, and Mortality. *Frontiers in Endocrinology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00705>
- Kuo, H. H., Ahmad, R., Lee, G. Q., Gao, C., Chen, H. R., Ouyang, Z., Szucs, M. J., Kim, D., Tsibris, A., Chun, T. W., Battivelli, E., Verdin, E., Rosenberg, E. S., Carr, S. A., Yu, X. G., & Lichterfeld, M. (2018). Anti-apoptotic Protein BIRC5 Maintains Survival of HIV-1-Infected CD4+ T Cells. *Immunity*, 48(6), 1183-1194.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.04.004>
- Kuritzkes, D. R. (2000). Neutropenia, Neutrophil Dysfunction, and Bacterial Infection in Patients with Human Immunodeficiency Virus Disease: The Role of Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *Clinical Infectious Diseases*, 30(2), 256–270. <https://doi.org/10.1086/313642>
- Kyei, G. B., Cheng, X., Ramani, R., & Ratner, L. (2015). Cyclin L2 is a critical HIV dependency factor in macrophages that controls samh1 abundance. *Cell Host and Microbe*, 17(1), 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.11.009>
- Laforge, M., Campillo-Gimenez, L., Monceaux, V., Cumont, M.-C., Hurtrel, B., Corbeil, J., Zaunders, J., Elbim, C., & Estaquier, J. (2011). HIV/SIV infection primes monocytes and dendritic cells for apoptosis. *PLoS Pathogens*, 7(6), e1002087. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002087>
- Lambotte, O., Boufassa, F., Madec, Y., Nguyen, A., Goujard, C., Meyer, L., Rouzioux, C., Venet, A., & Delfraissy, J.-F. (2005). HIV Controllers: A Homogeneous Group of HIV-1-Infected Patients with Spontaneous Control of Viral Replication. *Clinical Infectious Diseases*, 41(7), 1053–1056. <https://doi.org/10.1086/433188>
- Lambotte, O., Taoufik, Y., de Goër, M. G., Wallon, C., Goujard, C., & Delfraissy, J. F. (2000). Detection of infectious HIV in circulating monocytes from patients on prolonged highly active antiretroviral therapy. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)*, 23(2), 114–119. <https://doi.org/10.1097/00126334-200002010-00002>
- Lane, H. C., Masur, H., Edgar, L. C., Whalen, G., Rook, A. H., & Fauci, A. S. (1983). Abnormalities of B-Cell Activation and Immunoregulation in Patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 309(8), 453–458. <https://doi.org/10.1056/NEJM198308253090803>
- Lederman, M. M. (2001). Immune restoration and CD4+ T-cell function with antiretroviral therapies. *AIDS*, 15(SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1097/00002030-200102002-00003>
- Lee, B., Sharron, M., Montaner, L. J., Weissman, D., & Doms, R. W. (1999). Quantification of

- CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(9), 5215–5220. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.9.5215>
- Lee, C., Liu, Q.-H., Tomkowicz, B., Yi, Y., Freedman, B. D., & Collman, R. G. (2003). Macrophage activation through CCR5- and CXCR4-mediated gp120-elicited signaling pathways. *Journal of Leukocyte Biology*, 74(5), 676–682. <https://doi.org/10.1189/jlb.0503206>
- Lee, D. J., Sieling, P. A., Ochoa, M. T., Krutzik, S. R., Guo, B., Hernandez, M., Rea, T. H., Cheng, G., Colonna, M., & Modlin, R. L. (2007). LILRA2 Activation Inhibits Dendritic Cell Differentiation and Antigen Presentation to T Cells. *The Journal of Immunology*, 179(12), 8128–8136. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.12.8128>
- Lefrère, J. J., Morand-Joubert, L., Mariotti, M., Bludau, H., Burghoffer, B., Petit, J. C., & Roudot-Thoraval, F. (1997). Even individuals considered as long-term nonprogressors show biological signs of progression after 10 years of human immunodeficiency virus infection. *Blood*, 90(3), 1133–1140. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9242545>
- Lepin, E. J., Bastin, J. M., Allan, D. S., Roncador, G., Braud, V. M., Mason, D. Y., van der Merwe, P. A., McMichael, A. J., Bell, J. I., Powis, S. H., & O’Callaghan, C. A. (2000). Functional characterization of HLA-F and binding of HLA-F tetramers to ILT2 and ILT4 receptors. *European Journal of Immunology*, 30(12), 3552–3561. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200012\)30:12<3552::AID-IMMU3552>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200012)30:12<3552::AID-IMMU3552>3.0.CO;2-L)
- Leslie, A. J., Pfafferott, K. J., Chetty, P., Draenert, R., Addo, M. M., Feeney, M., Tang, Y., Holmes, E. C., Allen, T., Prado, J. G., Altfeld, M., Brander, C., Dixon, C., Ramduth, D., Jeena, P., Thomas, S. A., St. John, A., Roach, T. A., Kupfer, B., ... Goulder, P. J. R. (2004). HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nature Medicine*, 10(3), 282–289. <https://doi.org/10.1038/nm992>
- Lesport, E., Baudhuin, J., Sousa, S., LeMaout, J., Zamborlini, A., Rouas-Freiss, N., Carosella, E. D., & Favier, B. (2011). Inhibition of human V γ 9V δ 2 T-cell antitumoral activity through HLA-G: implications for immunotherapy of cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(20), 3385–3399. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0632-7>
- Li, D., Hong, A., Lu, Q., Gao, G. F., Jin, B., Screaton, G. R., & Xu, X.-N. (2012). A novel role of CD1c in regulating CD1d-mediated NKT cell recognition by competitive binding to Ig-like transcript 4. *International Immunology*, 24(11), 729–737. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxs082>
- Li, D., Wang, L., Yu, L., Freundt, E. C., Jin, B., Screaton, G. R., & Xu, X.-N. (2009). Ig-like transcript 4 inhibits lipid antigen presentation through direct CD1d interaction. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(2), 1033–1040. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19124746>
- Li, H., Evans, T. I., Gillis, J., Connole, M., & Reeves, R. K. (2015). Bone marrow-imprinted gut-homing of plasmacytoid dendritic cells (pDCs) in acute simian immunodeficiency virus infection results in massive accumulation of hyperfunctional CD4⁺ pDCs in the mucosae. *Journal of Infectious Diseases*, 211(11), 1717–1725. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu671>
- Li, J. Z., Etemad, B., Ahmed, H., Aga, E., Bosch, R. J., Mellors, J. W., Kuritzkes, D. R.,

- Lederman, M. M., Para, M., & Gandhi, R. T. (2016). The size of the expressed HIV reservoir predicts timing of viral rebound after treatment interruption. *AIDS*, *30*(3), 343–353. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000953>
- Li, N. L., Fu, L., Uchtenhagen, H., Achour, A., & Burshtyn, D. N. (2013). Cis association of leukocyte Ig-like receptor 1 with MHC class I modulates accessibility to antibodies and HCMV UL18. *European Journal of Immunology*, *43*(4), 1042–1052. <https://doi.org/10.1002/eji.201242607>
- Li, X., Wei, X., Xu, H., Sha, Z., Gao, A., Sun, Y., Li, J., & Xu, L. (2018). Expression of leukocyte immunoglobulin-like receptor B2 in hepatocellular carcinoma and its clinical significance. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, *14*(7), 1655–1659. https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_542_18
- Lichterfeld, M., & Yu, X. G. (2012). The emerging role of leukocyte immunoglobulin-like receptors (LILRs) in HIV-1 infection. *Journal of Leukocyte Biology*, *91*(1), 27–33. <https://doi.org/10.1189/jlb.0811442>
- Lichterfeld, Mathias, Kavanagh, D. G., Williams, K. L., Moza, B., Mui, S. K., Miura, T., Sivamurthy, R., Allgaier, R., Pereyra, F., Trocha, A., Feeney, M., Gandhi, R. T., Rosenberg, E. S., Altfeld, M., Allen, T. M., Allen, R., Walker, B. D., Sundberg, E. J., & Yu, X. G. (2007). A viral CTL escape mutation leading to immunoglobulin-like transcript 4-mediated functional inhibition of myelomonocytic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *204*(12), 2813–2824. <https://doi.org/10.1084/jem.20061865>
- Lichtfuss, G. F., Hoy, J., Rajasuriar, R., Kramski, M., Crowe, S. M., & Lewin, S. R. (2011). Biomarkers of immune dysfunction following combination antiretroviral therapy for HIV infection. *Biomarkers in Medicine*, *5*(2), 171–186. <https://doi.org/10.2217/bmm.11.15>
- Lin, Aifen, & Yan, W. H. (2015). Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in cancers: Roles in immune evasion, metastasis and target for therapy. In *Molecular Medicine* (Vol. 21, Issue 1, pp. 782–791). University of Michigan. <https://doi.org/10.2119/molmed.2015.00083>
- Lin, Ang, & Loré, K. (2017). Granulocytes: New members of the antigen-presenting cell family. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 8, Issue DEC, p. 1781). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01781>
- Liu, J., Wang, L., Gao, W., Li, L., Cui, X., Yang, H., Lin, W., Dang, Q., Zhang, N., & Sun, Y. (2014). Inhibitory receptor immunoglobulin-like transcript 4 was highly expressed in primary ductal and lobular breast cancer and significantly correlated with IL-10. *Diagnostic Pathology*, *9*(1), 85. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-9-85>
- Liu, X., Yu, X., Xie, J., Zhan, M., Yu, Z., Xie, L., Zeng, H., Zhang, F., Chen, G., Yi, X., & Zheng, J. (2015). ANGPTL2/LILRB2 signaling promotes the propagation of lung cancer cells. *Oncotarget*, *6*(25), 21004–21015. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4217>
- Lloyd, A. (1996). HIV infection and AIDS. *Papua and New Guinea Medical Journal*, *39*(3), 174–180. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9795558>
- López-Álvarez, M. R., Jones, D. C., Jiang, W., Traherne, J. A., & Trowsdale, J. (2014). Copy number and nucleotide variation of the LILR family of myelomonocytic cell activating and inhibitory receptors. *Immunogenetics*, *66*(2), 73–83. <https://doi.org/10.1007/s00251-013-0742-5>

- Lori, F. (2008). Treating HIV/AIDS by reducing immune system activation: The paradox of immune deficiency and immune hyperactivation. In *Current Opinion in HIV and AIDS* (Vol. 3, Issue 2, pp. 99–103). <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e3282f525cf>
- Low, H. Z., Ahrenstorf, G., Pommerenke, C., Habermann, N., Schughart, K., Ordóñez, D., Stripecke, R., Wilk, E., & Witte, T. (2016). TLR8 regulation of LILRA3 in monocytes is abrogated in human immunodeficiency virus infection and correlates to CD4 counts and virus loads. *Retrovirology*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/s12977-016-0248-y>
- Lu, Hao K., Mitchell, A., Endoh, Y., Hampartzoumian, T., Huynh, O., Borges, L., Geczy, C., Bryant, K., & Tedla, N. (2012). LILRA2 Selectively Modulates LPS-Mediated Cytokine Production and Inhibits Phagocytosis by Monocytes. *PLoS ONE*, *7*(3), e33478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033478>
- Lu, Hao Kim, Rentero, C., Raftery, M. J., Borges, L., Bryant, K., & Tedla, N. (2009). Leukocyte Ig-like receptor B4 (LILRB4) is a potent inhibitor of FcγRI-mediated monocyte activation via dephosphorylation of multiple kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(50), 34839–34848. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.035683>
- Lund, F. E., & Randall, T. D. (2010). Effector and regulatory B cells: Modulators of CD4+ T cell immunity. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 10, Issue 4, pp. 236–247). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri2729>
- Lyles, R. H., Muñoz, A., Yamashita, T. E., Bazmi, H., Detels, R., Rinaldo, C. R., Margolick, J. B., Phair, J. P., & Mellors, J. W. (2000). Natural History of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Viremia after Seroconversion and Proximal to AIDS in a Large Cohort of Homosexual Men. *The Journal of Infectious Diseases*, *181*(3), 872–880. <https://doi.org/10.1086/315339>
- Maggiolo, F., Di Filippo, E., Comi, L., & Callegaro, A. (2018). Post-treatment controllers after treatment interruption in chronically HIV-infected patients. *AIDS*, *32*(5), 623–628. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001743>
- Majumder, B., Janket, M. L., Schafer, E. A., Schaubert, K., Huang, X.-L., Kan-Mitchell, J., Rinaldo, C. R., & Ayyavoo, V. (2005). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr Impairs Dendritic Cell Maturation and T-Cell Activation: Implications for Viral Immune Escape. *Journal of Virology*, *79*(13), 7990–8003. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.13.7990-8003.2005>
- Malaspina, A., Moir, S., Kottlil, S., Hallahan, C. W., Ehler, L. A., Liu, S., Planta, M. A., Chun, T.-W., & Fauci, A. S. (2003). Deleterious Effect of HIV-1 Plasma Viremia on B Cell Costimulatory Function. *The Journal of Immunology*, *170*(12), 5965–5972. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.12.5965>
- Malleret, B., Maneglier, B., Karlsson, I., Lebon, P., Nascimbeni, M., Perie, L., Brochard, P., Delache, B., Calvo, J., Andrieu, T., Spreux-Varoquaux, O., Hosmalin, A., Le Grand, R., & Vaslin, B. (2008). Primary infection with simian immunodeficiency virus: plasmacytoid dendritic cell homing to lymph nodes, type I interferon, and immune suppression. *Blood*, *112*(12), 4598–4608. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-162651>
- Manavalan, J. S., Rossi, P. C., Vlad, G., Piazza, F., Yarilina, A., Cortesini, R., Mancini, D., & Suci-Foca, N. (2003). High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transplant Immunology*, *11*(3–4), 245–258. [https://doi.org/10.1016/S0966-3274\(03\)00058-3](https://doi.org/10.1016/S0966-3274(03)00058-3)

- Manches, O., & Bhardwaj, N. (2009). Resolution of immune activation defines nonpathogenic SIV infection. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 119, Issue 12, pp. 3512–3515). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI41509>
- Marandin, A., Katz, A., Oksenhendler, E., Tulliez, M., Picard, F., Vainchenker, W., & Louache, F. (1996). Loss of primitive hematopoietic progenitors in patients with human immunodeficiency virus infection. *Blood*, 88(12), 4568–4578. <https://doi.org/10.1182/blood.v88.12.4568.bloodjournal88124568>
- Margolis, D. M., Garcia, J. V., Hazuda, D. J., & Haynes, B. F. (2016). Latency reversal and viral clearance to cure HIV-1. In *Science* (Vol. 353, Issue 6297, p. aaf6517). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6517>
- Martin-Gayo, E., Buzon, M. J., Ouyang, Z., Hickman, T., Cronin, J., Pimenova, D., Walker, B. D., Lichterfeld, M., & Yu, X. G. (2015). Potent Cell-Intrinsic Immune Responses in Dendritic Cells Facilitate HIV-1-Specific T Cell Immunity in HIV-1 Elite Controllers. *PLoS Pathogens*, 11(6), e1004930. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004930>
- Martin-Gayo, E., Cole, M. B., Kolb, K. E., Ouyang, Z., Cronin, J., Kazer, S. W., Ordovas-Montanes, J., Lichterfeld, M., Walker, B. D., Yosef, N., Shalek, A. K., & Yu, X. G. (2018). A Reproducibility-Based Computational Framework Identifies an Inducible, Enhanced Antiviral State in Dendritic Cells from HIV-1 Elite Controllers. *Genome Biology*, 19(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1385-x>
- Martin-Gayo, E., & Yu, X. G. (2019). Role of dendritic cells in natural immune control of HIV-1 infection. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10, Issue JUN, p. 1306). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01306>
- Martín-Martín, L., Almeida, J., Hernández-Campo, P. M., Sánchez, M. L., Lécrevisse, Q., & Orfao, A. (2009). Immunophenotypical, morphologic, and functional characterization of maturation-associated plasmacytoid dendritic cell subsets in normal adult human bone marrow. *Transfusion*, 49(8), 1692–1708. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02170.x>
- Martin, A. M., Kulski, J. K., Witt, C., Pontarotti, P., & Christiansen, F. T. (2002). Leukocyte Ig-like receptor complex (LRC) in mice and men. In *Trends in Immunology* (Vol. 23, Issue 2, pp. 81–88). [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)02155-X](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02155-X)
- Martin, G. E., Pace, M., Thornhill, J. P., Phetsouphanh, C., Meyerowitz, J., Gossez, M., Brown, H., Olejniczak, N., Lwanga, J., Ramjee, G., Kaleebu, P., Porter, K., Willberg, C. B., Klenerman, P., Nwokolo, N., Fox, J., Fidler, S., Frater, J., Lever, A., ... Jolly, C. (2018). CD32-expressing CD4 T cells are phenotypically diverse and can contain proviral HIV DNA. *Frontiers in Immunology*, 9(MAY), 928. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00928>
- Martin, G., Pace, M., Thornhill, J., Phetsouphanh, C., Meyerowitz, J., Gossez, M., Hopkins, E., Brown, H., Robinson, N., Olejniczak, N., Ramjee, G., Kaleebu, P., Porter, K., Willberg, C., Klenerman, P., Nwokolo, N., Fox, J., Fidler, S., & Frater, J. (2017). Enrichment of the HIV reservoir in CD32+ CD4 T cells occurs early in blood and tissue. *BioRxiv*, 169342. <https://doi.org/10.1101/169342>
- Martínez-Maza, O., & Breen, E. C. (2002). B-cell activation and lymphoma in patients with HIV. In *Current Opinion in Oncology* (Vol. 14, Issue 5, pp. 528–532). <https://doi.org/10.1097/00001622-200209000-00009>

- Mattapallil, J. J., Douek, D. C., 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*(7037), 1093–1097. <https://doi.org/10.1038/nature03501>
- Mavilio, D., Benjamin, J., Daucher, M., Lombardo, G., Kottlil, S., Planta, M. A., Marcenaro, E., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A., & Fauci, A. S. (2003). Natural killer cells in HIV-1 infection: Dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(25), 15011–15016. <https://doi.org/10.1073/pnas.2336091100>
- Mcdougal, J. S., Kennedy, M. S., Sligh, J. M., Cort, S. P., Mawle, A., & Nicholson, J. K. A. (1986). Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science*, *231*(4736), 382–385. <https://doi.org/10.1126/science.3001934>
- McMichael, A. J., Borrow, P., Tomaras, G. D., Goonetilleke, N., & Haynes, B. F. (2010). The immune response during acute HIV-1 infection: Clues for vaccine development. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 10, Issue 1, pp. 11–23). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri2674>
- Mehandru, S., Poles, M. A., 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. *Journal of Experimental Medicine*, *200*(6), 761–770. <https://doi.org/10.1084/jem.20041196>
- Meier, A., Alter, G., Frahm, N., Sidhu, H., Li, B., Bagchi, A., Teigen, N., Streeck, H., Stellbrink, H.-J., Hellman, J., van Lunzen, J., & Altfeld, M. (2007). MyD88-dependent immune activation mediated by human immunodeficiency virus type 1-encoded Toll-like receptor ligands. *Journal of Virology*, *81*(15), 8180–8191. <https://doi.org/10.1128/JVI.00421-07>
- Meissner, E. G., Duus, K. M., Loomis, R., D'Agostin, R., & Su, L. (2003). HIV-1 Replication and Pathogenesis in the Human Thymus. *Current HIV Research*, *1*(3), 275.
- Mellors, J. W., Rinaldo, C. R., Gupta, P., White, R. M., Todd, J. A., & Kingsley, L. A. (1996). Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science*, *272*(5265), 1167–1170. <https://doi.org/10.1126/science.272.5265.1167>
- Merrill, J. E., Koyanagi, Y., & Chen, I. S. (1989). Interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha can be induced from mononuclear phagocytes by human immunodeficiency virus type 1 binding to the CD4 receptor. *Journal of Virology*, *63*(10), 4404–4408. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2789293>
- Metroka, C. E., Cunningham-Rundles, S., Pollack, M. S., Sonnabend, J. A., Davis, J. M., Gordon, B., Fernandez, R. D., & Mouradian, J. (1983). Generalized lymphadenopathy in homosexual men. *Annals of Internal Medicine*, *99*(5), 585–591. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-99-5-585>
- Meyers, J. H., Justement, J. S., Hallahan, C. W., Blair, E. T., Sun, Y. A., O'Shea, M. A., Roby, G., Kottlil, S., Moir, S., Kovacs, C. M., Chun, T. W., & Fauci, A. S. (2007). Impact of HIV on cell survival and antiviral activity of plasmacytoid dendritic cells. *PLoS ONE*, *2*(5), e458. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000458>
- Migueles, S. A., Weeks, K. A., Nou, E., Berkley, A. M., Rood, J. E., Osborne, C. M., Hallahan, C. W., Cogliano-Shutta, N. A., Metcalf, J. A., McLaughlin, M., Kwan, R., Mican, J. M., Davey, R. T., & Connors, M. (2009). Defective Human Immunodeficiency Virus-Specific

- CD8⁺ T-Cell Polyfunctionality, Proliferation, and Cytotoxicity Are Not Restored by Antiretroviral Therapy. *Journal of Virology*, 83(22), 11876–11889. <https://doi.org/10.1128/jvi.01153-09>
- Migueles, Stephen A., Laborico, A. C., Shupert, W. L., Sabbaghian, M. S., Rabin, R., Hallahan, C. W., 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. *Nature Immunology*, 3(11), 1061–1068. <https://doi.org/10.1038/ni845>
- Miller, E., & Bhardwaj, N. (2013). Dendritic cell dysregulation during HIV-1 infection. *Immunological Reviews*, 254(1), 170–189. <https://doi.org/10.1111/imr.12082>
- Mlcochova, P., Sutherland, K. A., Watters, S. A., Bertoli, C., Bruin, R. A., Rehwinkel, J., Neil, S. J., Lenzi, G. M., Kim, B., Khwaja, A., Gage, M. C., Georgiou, C., Chittka, A., Yona, S., Noursadeghi, M., Towers, G. J., & Gupta, R. K. (2017). A G1-like state allows HIV - 1 to bypass SAMHD 1 restriction in macrophages . *The EMBO Journal*, 36(5), 604–616. <https://doi.org/10.15252/embj.201696025>
- Moir, S., Malaspina, A., Ogwaro, K. M., Donoghue, E. T., Hallahan, C. W., Ehler, L. A., Liu, S., Adelsberger, J., Lapointe, R., Hwu, P., Baseler, M., Orenstein, J. M., Chun, T. W., Mican, J. A. M., & Fauci, A. S. (2001). HIV-1 induces phenotypic and functional perturbations of B cells in chronically infected individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(18), 10362–10367. <https://doi.org/10.1073/pnas.181347898>
- Moir, Susan, Buckner, C. M., Ho, J., Wang, W., Chen, J., Waldner, A. J., Posada, J. G., Kardava, L., O’Shea, M. A., Kottlil, S., Chun, T. W., Proschan, M. A., & Fauci, A. S. (2010). B cells in early and chronic HIV infection: Evidence for preservation of immune function associated with early initiation of antiretroviral therapy. *Blood*, 116(25), 5571–5579. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-285528>
- Moir, Susan, & Fauci, A. S. (2009). B cells in HIV infection and disease. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 9, Issue 4, pp. 235–245). <https://doi.org/10.1038/nri2524>
- Moir, Susan, Ho, J., Malaspina, A., Wang, W., DiPoto, A. C., O’Shea, M. A., Roby, G., Kottlil, S., Arthos, J., Proschan, M. A., Chun, T. W., & Fauci, A. S. (2008). Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *Journal of Experimental Medicine*, 205(8), 1797–1805. <https://doi.org/10.1084/jem.20072683>
- Moir, Susan, Malaspina, A., Pickeral, O. K., Donoghue, E. T., Vasquez, J., Miller, N. J., Krishnan, S. R., Planta, M. A., Turney, J. F., Justement, J. S., Kottlil, S., Dybul, M., Mican, J. A. M., Kovacs, C., Chun, T. W., Birse, C. E., & Fauci, A. S. (2004). Decreased survival of B cells of HIV-viremic patients mediated by altered expression of receptors of the TNF superfamily. *Journal of Experimental Medicine*, 200(5), 587–599. <https://doi.org/10.1084/jem.20032236>
- Molina, J. M., Scadden, D. T., Byrn, R., Dinarello, C. A., & Groopman, J. E. (1989). Production of tumor necrosis factor α and interleukin 1β by monocytic cells infected with human immunodeficiency virus. *Journal of Clinical Investigation*, 84(3), 733–737. <https://doi.org/10.1172/JCI114230>
- Monsiváis-Urenda, A., Niño-Moreno, P., Abud-Mendoza, C., Baranda, L., Layseca-Espinosa,

- E., López-Botet, M., & González-Amaro, R. (2007). Analysis of expression and function of the inhibitory receptor ILT2 (CD85j/LILRB1/LIR-1) in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Journal of Autoimmunity*, 29(2–3), 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2007.05.003>
- Monsiváis-Urenda, Adriana, Gómez-Martin, D., Santana-de-Anda, K., Cruz-Martínez, J., Alcocer-Varela, J., & González-Amaro, R. (2013). Defective expression and function of the ILT2/CD85j regulatory receptor in dendritic cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Human Immunology*, 74(9), 1088–1096. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2013.05.006>
- Morvan, M. G., & Lanier, L. L. (2016). NK cells and cancer: You can teach innate cells new tricks. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 16, Issue 1, pp. 7–19). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.5>
- Müller, F., Rollag, H., & Froland, S. S. (2008). Reduced oxidative burst responses in monocytes and monocyte-derived macrophages from HIV-infected subjects. *Clinical & Experimental Immunology*, 82(1), 10–15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1990.tb05396.x>
- Murray, A. J., Kwon, K. J., Farber, D. L., & Siliciano, R. F. (2016). The Latent Reservoir for HIV-1: How Immunologic Memory and Clonal Expansion Contribute to HIV-1 Persistence. *The Journal of Immunology*, 197(2), 407–417. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600343>
- Mylvaganam, G. H., Chea, L. S., Tharp, G. K., Hicks, S., Velu, V., Iyer, S. S., Deleage, C., Estes, J. D., Bosinger, S. E., Freeman, G. J., Ahmed, R., & Amara, R. R. (2018). Combination anti-PD-1 and antiretroviral therapy provides therapeutic benefit against SIV. *JCI Insight*, 3(18). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.122940>
- Mzingwane, M. L., & Tiemessen, C. T. (2017). Mechanisms of HIV persistence in HIV reservoirs. In *Reviews in Medical Virology* (Vol. 27, Issue 2). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/rmv.1924>
- Nagase, H., Agematsu, K., Kitano, K., Takamoto, M., Okubo, Y., Komiyama, A., & Sugane, K. (2001). Mechanism of hypergammaglobulinemia by HIV infection: Circulating memory B-cell reduction with plasmacytosis. *Clinical Immunology*, 100(2), 250–259. <https://doi.org/10.1006/clim.2001.5054>
- Naji, A., Menier, C., Maki, G., Carosella, E. D., & Rouas-Freiss, N. (2012). Neoplastic B-cell growth is impaired by HLA-G/ILT2 interaction. In *Leukemia* (Vol. 26, Issue 8, pp. 1889–1892). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.62>
- Naji, Abderrahim, Durrbach, A., Carosella, E. D., & Rouas-Freiss, N. (2007). Soluble HLA-G and HLA-G1 Expressing Antigen-Presenting Cells Inhibit T-Cell Alloproliferation through ILT-2/ILT-4/FasL-Mediated Pathways. *Human Immunology*, 68(4), 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2006.10.017>
- Nakajima, H., Samaridis, J., Angman, L., & Colonna, M. (1999). Human myeloid cells express an activating ILT receptor (ILT1) that associates with Fc receptor gamma-chain. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(1), 5–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9886363>
- Nakayama, M., Underhill, D. M., Petersen, T. W., Li, B., Kitamura, T., Takai, T., & Aderem, A. (2007). Paired Ig-Like Receptors Bind to Bacteria and Shape TLR-Mediated Cytokine Production. *The Journal of Immunology*, 178(7), 4250–4259.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4250>

- Namazi, G., Fajnzylber, J. M., Aga, E., Bosch, R. J., Acosta, E. P., Sharaf, R., Hartogensis, W., Jacobson, J. M., Connick, E., Volberding, P., Skiest, D., Margolis, D., Sneller, M. C., Little, S. J., Gianella, S., Smith, D. M., Kuritzkes, D. R., Gulick, R. M., Mellors, J. W., ... Li, J. Z. (2018). The Control of HIV After Antiretroviral Medication Pause (CHAMP) Study: Posttreatment Controllers Identified From 14 Clinical Studies. *The Journal of Infectious Diseases*, 218(12), 1954–1963. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy479>
- Nascimbeni, M., Perié, L., Chorro, L., Diocou, S., Kreitmann, L., Louis, S., Garderet, L., Fabiani, B., Berger, A., Schmitz, J., Marie, J. P., Molina, T. J., Pacanowski, J., Viard, J. P., Oksenhendler, E., Beq, S., Abehsira-Amar, O., Cheynier, R., & Hosmalin, A. (2009). Plasmacytoid dendritic cells accumulate in spleens from chronically HIV-infected patients but barely participate in interferon- α expression. *Blood*, 113(24), 6112–6119. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-170803>
- Navarro, F., Llano, M., Bellón, T., Colonna, M., Geraghty, D. E., & López-Botet, M. (1999). The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells. *European Journal of Immunology*, 29(1), 277–283. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199901\)29:01<277::AID-IMMU277>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199901)29:01<277::AID-IMMU277>3.0.CO;2-4)
- Nazli, A., Chan, O., Dobson-Belaire, W. N., Ouellet, M., Tremblay, M. J., Gray-Owen, S. D., Arsenaault, A. L., & Kaushic, C. (2010). Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PLoS Pathogens*, 6(4), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000852>
- Ndhlovu, Z. M., Kazer, S. W., Nkosi, T., Ogunshola, F., Muema, D. M., Anmole, G., Swann, S. A., Moodley, A., Dong, K., Reddy, T., Brockman, M. A., Shalek, A. K., Ndung'u, T., & Walker, B. D. (2019). Augmentation of HIV-specific T cell function by immediate treatment of hyperacute HIV-1 infection. *Science Translational Medicine*, 11(493). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau0528>
- Ndung'u, T., McCune, J. M., & Deeks, S. G. (2019). Why and where an HIV cure is needed and how it might be achieved. In *Nature* (Vol. 576, Issue 7787, pp. 397–405). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1841-8>
- Neil, S. J. D., Zang, T., & Bieniasz, P. D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*, 451(7177), 425–430. <https://doi.org/10.1038/nature06553>
- Neuhaus, J., Jacobs, Jr, D. R., Baker, J. V., Calmy, A., Duprez, D., La Rosa, A., Kuller, L. H., Pett, S. L., Ristola, M., Ross, M. J., Shlipak, M. G., Tracy, R., & Neaton, J. D. (2010). Markers of Inflammation, Coagulation, and Renal Function Are Elevated in Adults with HIV Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 201(12), 1788–1795. <https://doi.org/10.1086/652749>
- Nikolaidis, N., Klein, J., & Nei, M. (2005). Origin and evolution of the Ig-like domains present in mammalian leukocyte receptors: Insights from chicken, frog, and fish homologues. *Immunogenetics*, 57(1–2), 151–157. <https://doi.org/10.1007/s00251-004-0764-0>
- Nikolova, M., Musette, P., Bagot, M., Boumsell, L., & Bensussan, A. (2002). Engagement of ILT2/CD85j in Sézary syndrome cells inhibits their CD3/TCR signaling. *Blood*, 100(3), 1019–1025. <https://doi.org/10.1182/blood-2001-12-0303>

- Nilsson, J., Boasso, A., Velilla, P. A., Zhang, R., Vaccari, M., Franchini, G., Shearer, G. M., Andersson, J., & Chougnet, C. (2006). HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS. *Blood*, *108*(12), 3808–3817. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-021576>
- Nimmerjahn, F., & Lux, A. (2014). LILR-B1 blocks activating FcγR signaling to allow antibody dependent enhancement of dengue virus infection. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 111, Issue 7, pp. 2404–2405). <https://doi.org/10.1073/pnas.1324286111>
- Nishimura, Y., Donau, O. K., Dias, J., Ferrando-Martinez, S., Jesteadt, E., Sadjadpour, R., Gautam, R., Buckler-White, A., Geleziunas, R., Koup, R. A., Nussenzweig, M. C., & Martin, M. A. (2020). Immunotherapy during the acute SHIV infection of macaques confers long-term suppression of viremia. *The Journal of Experimental Medicine*, *218*(1). <https://doi.org/10.1084/jem.20201214>
- Nishimura, Y., Gautam, R., Chun, T. W., Sadjadpour, R., Foulds, K. E., Shingai, M., Klein, F., Gazumyan, A., Golijanin, J., Donaldson, M., Donau, O. K., Plishka, R. J., Buckler-White, A., Seaman, M. S., Lifson, J. D., Koup, R. A., Fauci, A. S., Nussenzweig, M. C., & Martin, M. A. (2017). Early antibody therapy can induce long-lasting immunity to SHIV. *Nature*, *543*(7646), 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature21435>
- Noel, N., Boufassa, F., Lécuroux, C., Saez-Cirion, A., Bourgeois, C., Dunyach-Remy, C., Goujard, C., Rouzioux, C., Meyer, L., Pancino, G., Venet, A., & Lambotte, O. (2014). Elevated IP10 levels are associated with immune activation and low CD4+ T-cell counts in HIV controller patients. *AIDS*, *28*(4), 467–476. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000174>
- Noel, N., Lerolle, N., Lécuroux, C., Goujard, C., Venet, A., Saez-Cirion, A., Avettand-Fenoël, V., Meyer, L., Boufassa, F., Lambotte, O., Agut, H., Autran, B., Barin, F., Costagliola, D., Pancino, G., Rouzioux, C., Samri-Hassimi, A., Taulera, O., Theodorou, I., ... Meyer, L. (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*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131922>
- Notermans, D. W., De Jong, J. J., Goudsmit, J., Bakker, M., Roos, M. T. L., Nijholt, L., Cremers, J., Hellings, J. A., Danner, S. A., & De Ronde, A. (2001). Potent antiretroviral therapy initiates normalization of hypergammaglobulinemia and a decline in hiv type 1-specific antibody responses. *AIDS Research and Human Retroviruses*, *17*(11), 1003–1008. <https://doi.org/10.1089/088922201300343681>
- Noto, A., Procopio, F. A., Banga, R., Suffiotti, M., Corpataux, J. M., Cavassini, M., Riva, A., Fenwick, C., Gottardo, R., Perreau, M., & Pantaleo, G. (2018). CD32 + and PD-1 + Lymph Node CD4 T cells support persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals. *Journal of Virology*, *92*(20). <https://doi.org/10.1101/329938>
- Nou, E., Lo, J., & Grinspoon, S. K. (2016). Inflammation, immune activation, and cardiovascular disease in HIV. *AIDS*, *30*(10), 1495–1509. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001109>
- Noursadeghi, M., Katz, D. R., & Miller, R. F. (2006). HIV-1 infection of mononuclear phagocytic cells: the case for bacterial innate immune deficiency in AIDS. In *Lancet Infectious Diseases* (Vol. 6, Issue 12, pp. 794–804). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70656-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70656-9)

- Nyamweya, S., Hegedus, A., Jaye, A., Rowland-Jones, S., Flanagan, K. L., & Macallan, D. C. (2013). Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. In *Reviews in Medical Virology* (Vol. 23, Issue 4, pp. 221–240). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/rmv.1739>
- O'Connor, G. M., Holmes, A., Mulcahy, F., & Gardiner, C. M. (2007). Natural Killer cells from long-term non-progressor HIV patients are characterized by altered phenotype and function. *Clinical Immunology*, *124*(3), 277–283. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2007.05.016>
- Okulicz, J. F., Marconi, V. C., Landrum, M. L., Wegner, S., Weintrob, A., Ganesan, A., Hale, B., Crum-Cianflone, N., Delmar, J., Barthel, V., Quinnan, G., Agan, B. K., & Dolan, M. J. (2009). Clinical Outcomes of Elite Controllers, Viremic Controllers, and Long-Term Nonprogressors in the US Department of Defense HIV Natural History Study. *The Journal of Infectious Diseases*, *200*(11), 1714–1723. <https://doi.org/10.1086/646609>
- Oliva, A., Kinter, A. L., Vaccarezza, M., Rubbert, A., Catanzaro, A., Moir, S., Monaco, J. A., Ehler, L., Mizell, S., Jackson, R., Li, Y., Romano, J. W., & Fauci, A. S. (1998). Natural killer cells from human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals are an important source of CC-chemokines and suppress HIV-1 entry and replication in vitro. *Journal of Clinical Investigation*, *102*(1), 223–231. <https://doi.org/10.1172/JCI2323>
- Ong, E. Z., Zhang, S. L., Tan, H. C., Gan, E. S., Chan, K. R., & Ooi, E. E. (2017). Dengue virus compartmentalization during antibody-enhanced infection. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep40923>
- ONUSIDA/UNAIDS. (2020). *Global HIV & AIDS statistics — 2020 fact sheet | UNAIDS*. UnAids.Org. <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>
- Operskalski, E. A., & Kovacs, A. (2011). HIV/HCV co-infection: Pathogenesis, clinical complications, treatment, and new therapeutic technologies. In *Current HIV/AIDS Reports* (Vol. 8, Issue 1, pp. 12–22). <https://doi.org/10.1007/s11904-010-0071-3>
- Opravil, M., Fierz, W., Matter, L., Blaser, J., & Lüthy, R. (1991). Poor antibody response after tetanus and pneumococcal vaccination in immunocompromised, HIV-infected patients. *Clinical & Experimental Immunology*, *84*(2), 185–189. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1991.tb08146.x>
- Osada, N., Hettiarachchi, N., Babarinde, I. A., Saitou, N., & Blancher, A. (2015). Whole-Genome Sequencing of Six Mauritian Cynomolgus Macaques (*Macaca fascicularis*) Reveals a Genome-Wide Pattern of Polymorphisms under Extreme Population Bottleneck | Genome Biology and Evolution | Oxford Academic. *Genome Biology and Evolution*, *7*(3), 821–830. <https://academic.oup.com/gbe/article/7/3/821/603281>
- Osuna, C. E., Lim, S. Y., Kublin, J. L., Apps, R., Chen, E., Mota, T. M., Huang, S. H., Ren, Y., Bachtel, N. D., Tsibris, A. M., Ackerman, M. E., Jones, R. B., Nixon, D. F., & Whitney, J. B. (2018). Evidence that CD32a does not mark the HIV-1 latent reservoir. *Nature*, *561*(7723), E20–E28. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0495-2>
- Oxenius, A., Price, D. A., Easterbrook, P. J., O'Callaghan, C. A., Kelleher, A. D., Whelan, J. A., Sontag, G., Sewell, A. K., & Phillips, R. E. (2000). Early highly active antiretroviral therapy for acute HIV-1 infection preserves immune function of CD8+ and CD4+ T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(7), 3382–3387. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.7.3382>

- Pacanowski, J., Kahi, S., Baillet, M., Lebon, P., Deveau, C., Goujard, C., Meyer, L., Oksenhendler, E., Sinet, M., & Hosmalin, A. (2001). Reduced blood CD123+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. *Blood*, 98(10), 3016–3021. <https://doi.org/10.1182/blood.v98.10.3016>
- Paiardini, M., Dhodapkar, K., Harper, J., Deeks, S. G., & Ahmed, R. (2020). Editorial: HIV and Cancer Immunotherapy: Similar Challenges and Converging Approaches. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00519>
- Palella, F. J., Baker, R. K., Moorman, A. C., Chmiel, J. S., Wood, K. C., Brooks, J. T., & Holmberg, S. D. (2006). Mortality in the highly active antiretroviral therapy era: Changing causes of death and disease in the HIV outpatient study. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 43(1), 27–34. <https://doi.org/10.1097/01.qai.0000233310.90484.16>
- Palella, F. J., Delaney, K. M., Moorman, A. C., Loveless, M. O., Fuhrer, J., Satten, G. A., Aschman, D. J., & Holmberg, S. D. (1998). Declining Morbidity and Mortality among Patients with Advanced Human Immunodeficiency Virus Infection. *New England Journal of Medicine*, 338(13), 853–860. <https://doi.org/10.1056/NEJM199803263381301>
- Palmer, B. E., Boritz, E., & Wilson, C. C. (2004). Effects of Sustained HIV-1 Plasma Viremia on HIV-1 Gag-Specific CD4 + T Cell Maturation and Function . *The Journal of Immunology*, 172(5), 3337–3347. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.3337>
- Pan, X., Baldauf, H. M., Keppler, O. T., & Fackler, O. T. (2013). Restrictions to HIV-1 replication in resting CD4 + T lymphocytes. In *Cell Research* (Vol. 23, Issue 7, pp. 876–885). <https://doi.org/10.1038/cr.2013.74>
- Pannus, P., Rutsaert, S., De Wit, S., Allard, S. D., Vanham, G., Cole, B., Nescoi, C., Aerts, J., De Spiegelaere, W., Tsoumanis, A., Couttenye, M. M., Herssens, N., De Scheerder, M. A., Vandekerckhove, L., & Florence, E. (2020). Rapid viral rebound after analytical treatment interruption in patients with very small HIV reservoir and minimal on-going viral transcription. *Journal of the International AIDS Society*, 23(2). <https://doi.org/10.1002/jia2.25453>
- Papagno, L., Spina, C. A., Marchant, A., Salio, M., Rufier, N., Little, S., Dong, T., Chesney, G., Waters, A., Easterbrook, P., Dunbar, P. R., Shepherd, D., Cerundolo, V., Emery, V., Griffiths, P., Conlon, C., McMichael, A. J., Richman, D. D., Rowland-Jones, S. L., & Appay, V. (2004). Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection. *PLoS Biology*, 2(2), E20. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020020>
- Park, M., Raftery, M. J., Thomas, P. S., Geczy, C. L., Bryant, K., & Tedla, N. (2016). Leukocyte immunoglobulin-like receptor B4 regulates key signalling molecules involved in FcγRI-mediated clathrin-dependent endocytosis and phagocytosis. *Scientific Reports*, 6(1), 35085. <https://doi.org/10.1038/srep35085>
- Passaes, C., Millet, A., Madelain, V., Monceaux, V., David, A., Versmisse, P., Sylla, N., Gostick, E., Llewellyn-Lacey, S., Price, D. A., Blancher, A., Dereuddre-Bosquet, N., Desjardins, D., Pancino, G., Le Grand, R., Lambotte, O., Müller-Trutwin, M., Rouzioux, C., Guedj, J., ... Sáez-Cirión, A. (2020). Optimal Maturation of the SIV-Specific CD8+ T Cell Response after Primary Infection Is Associated with Natural Control of SIV: ANRS SIC Study. *Cell Reports*, 32(12). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108174>

- Pasternak, A. O., Lukashov, V. V., & Berkhout, B. (2013). Cell-associated HIV RNA: A dynamic biomarker of viral persistence. In *Retrovirology* (Vol. 10, Issue 1, p. 41). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-41>
- Patterson, S., Rae, A., Hockey, N., Gilmour, J., & Gotch, F. (2001). Plasmacytoid Dendritic Cells Are Highly Susceptible to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and Release Infectious Virus. *Journal of Virology*, 75(14), 6710–6713. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.14.6710-6713.2001>
- Pena-Cruz, V., Agosto, L. M., Akiyama, H., Olson, A., Moreau, Y., Larrieux, J. R., Henderson, A., Gummuluru, S., & Sagar, M. (2018). HIV-1 replicates and persists in vaginal epithelial dendritic cells. *Journal of Clinical Investigation*, 128(8), 3439–3444. <https://doi.org/10.1172/JCI98943>
- Peretz, Y., He, Z., Shi, Y., Yassine-Diab, B., Goulet, J. P., Bordi, R., Filali-Mouhim, A., Loubert, J. B., El-Far, M., Dupuy, F. P., Boulassel, M. R., Tremblay, C., Routy, J. P., Bernard, N., Balderas, R., Haddad, E. K., & Sékaly, R. P. (2012). CD160 and PD-1 Co-Expression on HIV-Specific CD8 T Cells Defines a Subset with Advanced Dysfunction. *PLoS Pathogens*, 8(8), e1002840. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002840>
- Pereyra, F., Lo, J., Triant, V. A., Wei, J., Buzon, M. J., Fitch, K. V., Hwang, J., Campbell, J. H., Burdo, T. H., Williams, K. C., Abbara, S., & Grinspoon, S. K. (2012). Increased coronary atherosclerosis and immune activation in HIV-1 elite controllers. *AIDS*, 26(18), 2409–2412. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32835a9950>
- Pereyra, F., Palmer, S., Miura, T., Block, B. L., Wiegand, A., Rothchild, A. C., Baker, B., Rosenberg, R., Cutrell, E., Seaman, M. S., Coffin, J. M., & Walker, B. D. (2009). Persistent Low-Level Viremia in HIV-1 Elite Controllers and Relationship to Immunologic Parameters. *The Journal of Infectious Diseases*, 200(6), 984–990. <https://doi.org/10.1086/605446>
- Pérez, L., Anderson, J., Chipman, J., Thorkelson, A., Chun, T. W., Moir, S., Haase, A. T., Douek, D. C., Schacker, T. W., & Boritz, E. A. (2018). Conflicting evidence for HIV enrichment in CD32+ CD4 T cells. *Nature*, 561(7723), E9–E16. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0493-4>
- Perkins, M. J., Bradley, W. P., Lalani, T., Agan, B. K., Whitman, T. J., Ferguson, T. M., Okulicz, J. F., & Ganesan, A. (2017). Brief Report: Prevalence of Posttreatment Controller Phenotype Is Rare in HIV-Infected Persons after Stopping Antiretroviral Therapy. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 75(3), 364–369. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000001393>
- Phillips, A. N., & Lundgren, J. D. (2006). The CD4 lymphocyte count and risk of clinical progression. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 1(1), 43–49. <https://doi.org/10.1097/01.coh.0000194106.12816.b1>
- Pitrak, D. L. (1999). Neutrophil deficiency and dysfunction in HIV-infected patients. *American Journal of Health-System Pharmacy : AJHP : Official Journal of the American Society of Health-System Pharmacists*, 56 Suppl 5, S9–16. https://doi.org/10.1093/ajhp/56.suppl_5.S9
- Pizzato, N., Garmy-Susini, B., Le Bouteiller, P., & Lenfant, F. (2003). Down-regulation of HLA-G1 cell surface expression in human cytomegalovirus infected cells. *American Journal of Reproductive Immunology*, 50(4), 328–333. <https://doi.org/10.1034/j.1600->

0897.2003.00087.x

- Plantin, J., Massanella, M., & Chomont, N. (2018). Inducible HIV RNA transcription assays to measure HIV persistence: Pros and cons of a compromise. In *Retrovirology* (Vol. 15, Issue 1, p. 9). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12977-017-0385-y>
- Policicchio, B. B., Pandrea, I., & Apetrei, C. (2016). Animal models for HIV cure research. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 7, Issue JAN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00012>
- Poorolajal, J., Hooshmand, E., Mahjub, H., Esmailnasab, N., & Jenabi, E. (2016). Survival rate of AIDS disease and mortality in HIV-infected patients: a meta-analysis. In *Public Health* (Vol. 139, pp. 3–12). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2016.05.004>
- Porichis, F., & Kaufmann, D. E. (2012). Role of PD-1 in HIV pathogenesis and as target for therapy. In *Current HIV/AIDS Reports* (Vol. 9, Issue 1, pp. 81–90). <https://doi.org/10.1007/s11904-011-0106-4>
- Potter, S. J., Lacabaratz, C., Lambotte, O., Perez-Patrigeon, S., Vingert, B., Sinet, M., Colle, J.-H., Urrutia, A., Scott-Algara, D., Boufassa, F., Delfraissy, J.-F., Thèze, J., Venet, A., & Chakrabarti, L. A. (2007). Preserved central memory and activated effector memory CD4+ T-cell subsets in human immunodeficiency virus controllers: an ANRS EP36 study. *Journal of Virology*, *81*(24), 13904–13915. <https://doi.org/10.1128/JVI.01401-07>
- Prod'homme, V., Griffin, C., Aicheler, R. J., Wang, E. C. Y., McSharry, B. P., Rickards, C. R., Stanton, R. J., Borysiewicz, L. K., López-Botet, M., Wilkinson, G. W. G., & Tomasec, P. (2007). The Human Cytomegalovirus MHC Class I Homolog UL18 Inhibits LIR-1 + but Activates LIR-1 – NK Cells . *The Journal of Immunology*, *178*(7), 4473–4481. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4473>
- Puppo, F., Brenci, S., Lanza, L., Bosco, O., Imro, M. A., Scudeletti, M., Indiveri, F., & Ferrone, S. (1994). Increased level of serum HLA class I antigens in HIV infection. Correlation with disease progression. *Human Immunology*, *40*(4), 259–266. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8002375>
- Qiao, X., He, B., Chiu, A., Knowles, D. M., Chadburn, A., & Cerutti, A. (2006). Human immunodeficiency virus 1 Nef suppresses CD40-dependent immunoglobulin class switching in bystander B cells. *Nature Immunology*, *7*(3), 302–310. <https://doi.org/10.1038/ni1302>
- Quinn, T. C. (1994). Population migration and the spread of types 1 and 2 human immunodeficiency viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(7), 2407–2414. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.7.2407>
- Reddy, M., Eirikis, E., Davis, C., Davis, H. M., & Prabhakar, U. (2004). Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: An in vitro model to monitor cellular immune function. *Journal of Immunological Methods*, *293*(1–2), 127–142. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.07.006>
- Reisler, R. B., Han, C., Burman, W. J., Tedaldi, E. M., & Neaton, J. D. (2003). Grade 4 Events Are as Important as AIDS Events in the Era of HAART. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, *34*(4), 379–386. <https://doi.org/10.1097/00126334-200312010-00004>

- Reizis, B. (2019). Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. *Immunity*, 50(1), 37–50. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2018.12.027>
- Ribeiro, R. M., Qin, L., Chavez, L. L., Li, D., Self, S. G., & Perelson, A. S. (2010). Estimation of the Initial Viral Growth Rate and Basic Reproductive Number during Acute HIV-1 Infection. *Journal of Virology*, 84(12), 6096–6102. <https://doi.org/10.1128/jvi.00127-10>
- Roberti, M. P., Juliá, E. P., Rocca, Y. S., Amat, M., Bravo, A. I., Loza, J., Coló, F., Loza, C. M., Fabiano, V., Maino, M., Podhorzer, A., Fainboim, L., Barrio, M. M., Mordoh, J., & Levy, E. M. (2015). Overexpression of CD85j in TNBC patients inhibits Cetuximab-mediated NK-cell ADCC but can be restored with CD85j functional blockade. *European Journal of Immunology*, 45(5), 1560–1569. <https://doi.org/10.1002/eji.201445353>
- Roberts, L., Passmore, J. A. S., Williamson, C., Little, F., Bebell, L. M., Mlisana, K., Burgers, W. A., Van Loggerenberg, F., Walzl, G., Djoba Siawaya, J. F., Abdool Karim, Q., & Abdool Karim, S. S. (2010). Plasma cytokine levels during acute HIV-1 infection predict HIV disease progression. *AIDS*, 24(6), 819–831. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283367836>
- Roguin, L. P., & Retegui, L. A. (2003). Monoclonal Antibodies Inducing Conformational Changes on the Antigen Molecule. *Scandinavian Journal of Immunology*, 58(4), 387–394. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2003.01320.x>
- Rothe, K., Quandt, D., Schubert, K., Rossol, M., Klingner, M., Jasinski-Bergner, S., Scholz, R., Seliger, B., Pierer, M., Baerwald, C., & Wagner, U. (2016). Latent Cytomegalovirus Infection in Rheumatoid Arthritis and Increased Frequencies of Cytolytic LIR-1+CD8+ T Cells. *Arthritis and Rheumatology*, 68(2), 337–346. <https://doi.org/10.1002/art.39331>
- Ruffin, N., Gea-Mallorquí, E., Brouiller, F., Jouve, M., Silvin, A., See, P., Dutertre, C. A., Ginhoux, F., & Benaroch, P. (2019). Constitutive Siglec-1 expression confers susceptibility to HIV-1 infection of human dendritic cell precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(43), 21685–21693. <https://doi.org/10.1073/pnas.1911007116>
- Rutishauser, R., Deguit, C. D., Hiatt, J., Blaeschke, F., Roth, T., Wang, L., Raymond, K., Starke, C., Mudd, J., Chen, W., Smullin, C., Matus-Nicodemos, R., Hoh, R., Krone, M., Hecht, F., Pilcher, C., Martin, J., Koup, R., Douek, D., ... Hunt, P. (2020). TCF-1 regulates the stem-like memory potential of HIV-specific CD8+ T cells in elite controllers. *BioRxiv*, 2020.01.07.894535. <https://doi.org/10.1101/2020.01.07.894535>
- Ryu, M., Chen, Y., Qi, J., Liu, J., Fan, Z., Nam, G., Shi, Y., Cheng, H., & Gao, G. F. (2011). LILRA3 Binds Both Classical and Non-Classical HLA Class I Molecules but with Reduced Affinities Compared to LILRB1/LILRB2: Structural Evidence. *PLoS ONE*, 6(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019245>
- Saba, E., Grivel, J. C., Vanpouille, C., Brichacek, B., Fitzgerald, W., Margolis, L., & Lisco, A. (2010). HIV-1 sexual transmission: Early events of HIV-1 infection of human cervico-vaginal tissue in an optimized ex vivo model. *Mucosal Immunology*, 3(3), 280–290. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.2>
- Sacre, K., Hunt, P. W., Hsue, P. Y., Maidji, E., Martin, J. N., Deeks, S. G., Autran, B., & McCune, J. M. (2012). A role for cytomegalovirus-specific CD4+CX3CR1+ T cells and cytomegalovirus-induced T-cell immunopathology in HIV-associated atherosclerosis. *AIDS*, 26(7), 805–814. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328351f780>

- Sáez-Ciri3n, A., Bacchus, C., Hocqueloux, L., Avettand-Fenoel, V., Girault, I., Lecuroux, C., Potard, V., Versmisse, P., Melard, A., Prazuck, T., Descours, B., Guernon, J., Viard, J.-P., Boufassa, F., Lambotte, O., Goujard, C., Meyer, L., Costagliola, D., Venet, A., ... Rouzioux, C. (2013). Post-Treatment HIV-1 Controllers with a Long-Term Virological Remission after the Interruption of Early Initiated Antiretroviral Therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathogens*, 9(3), e1003211. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003211>
- Saez-Cirion, A., Jacquelin, B., Barr3-Sinoussi, F., & M3ller-Trutwin, M. (2014). Immune responses during spontaneous control of HIV and AIDS: What is the hope for a cure? In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 369, Issue 1645). Royal Society. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0436>
- Sáez-Ciri3n, A., Lacabaratz, C., Lambotte, O., Versmisse, P., Urrutia, A., Boufassa, F., Barr3-Sinoussi, F., Delfraissy, J. F., Sinet, M., Pancino, G., & Venet, A. (2007). HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(16), 6776–6781. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611244104>
- Sáez-Ciri3n, A., & Pancino, G. (2013). HIV Controllers: A Genetically Determined Or Inducible Phenotype? *Immunological Reviews*, 254(1), 281–294. <https://doi.org/10.1111/imr.12076>
- Sáez-Ciri3n, A., & Sereti, I. (2020). Immunometabolism and HIV-1 pathogenesis: food for thought. In *Nature Reviews Immunology*. Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0381-7>
- Sáez-Ciri3n, A., Sinet, M., Shin, S. Y., Urrutia, A., Versmisse, P., Lacabaratz, C., Boufassa, F., Avettand-F3no3l, V., Rouzioux, C., Delfraissy, J.-F., Barr3-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. *The Journal of Immunology*, 182(12), 7828–7837. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803928>
- Saito, F., Hirayasu, K., Satoh, T., Wang, C. W., Lusingu, J., Arimori, T., Shida, K., Palacpac, N. M. Q., Itagaki, S., Iwanaga, S., Takashima, E., Tsuboi, T., Kohyama, M., Suenaga, T., Colonna, M., Takagi, J., Lavstsen, T., Horii, T., & Arase, H. (2017). Immune evasion of *Plasmodium falciparum* by RIFIN via inhibitory receptors. *Nature*, 552(7683), 101–105. <https://doi.org/10.1038/nature24994>
- Saleh, S., Solomon, A., Wightman, F., Xhilaga, M., Cameron, P. U., & Lewin, S. R. (2007). CCR7 ligands CCL19 and CCL21 increase permissiveness of resting memory CD4+ T cells to HIV-1 infection: A novel model of HIV-1 latency. *Blood*, 110(13), 4161–4164. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-097907>
- Salgado, M., Rabi, S. A., O'Connell, K. A., Buckheit, R. W., Bailey, J. R., Chaudhry, A. A., Bread, A. R., Marzinke, M. A., Clarke, W., Margolick, J. B., Siliciano, R. F., & Blankson, J. N. (2011). Prolonged control of replication-competent dual-tropic human immunodeficiency virus-1 following cessation of highly active antiretroviral therapy. *Retrovirology*, 8, 97. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-8-97>
- Salmen, S., Ter3n, G., Borges, L., Goncalves, L., Albarr3n, B., Urdaneta, H., Montes, H., & Berrueta, L. (2004). Increased Fas-mediated apoptosis in polymorphonuclear cells from HIV-infected patients. *Clinical and Experimental Immunology*, 137(1), 166–172.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02503.x>

- Salvarani, C., Pipitone, N., Catanoso, M., Chiarolanza, I., Boiardi, L., Caruso, A., Pazzola, G., Macchioni, P., Di Lernia, V., & Albertini, G. (2012). Adalimumab in psoriatic arthritis. *Journal of Rheumatology*, 39(SUPPL. 89), 77–81. <https://doi.org/10.3899/jrheum.120251>
- Samuelsson, A., Sönnernborg, A., Heuts, N., Cöster, J., & Chiodi, F. (1997). Progressive B cell apoptosis and expression of Fas ligand during human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 13(12), 1031–1038. <https://doi.org/10.1089/aid.1997.13.1031>
- Sandler, N. G., & Douek, D. C. (2012). Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities. *Nature Reviews Microbiology*, 10(9), 655–666. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2848>
- Sankaran, S., George, M. D., Reay, E., Guadalupe, M., Flamm, J., Prindiville, T., & Dandekar, S. (2008). Rapid onset of intestinal epithelial barrier dysfunction in primary human immunodeficiency virus infection is driven by an imbalance between immune response and mucosal repair and regeneration. *Journal of Virology*, 82(1), 538–545. <https://doi.org/10.1128/JVI.01449-07>
- 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, A. D., Simon, A., Meyer, L., Costagliola, D., Deeks, S. G., ... Appay, V. (2011). HIV disease progression despite suppression of viral replication is associated with exhaustion of lymphopoiesis. *Blood*, 117(19), 5142–5151. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-331306>
- Saunders, K. O. (2019). Conceptual approaches to modulating antibody effector functions and circulation half-life. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10, Issue JUN, p. 1296). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01296>
- Saverino, D., Ghiotto, F., Merlo, A., Bruno, S., Battini, L., Occhino, M., Maffei, M., Tenca, C., Pileri, S., Baldi, L., Fabbi, M., Bachi, A., De Santanna, A., Grossi, C. E., & Ciccone, E. (2004). Specific Recognition of the Viral Protein UL18 by CD85j/LIR-1/ILT2 on CD8 + T Cells Mediates the Non-MHC-Restricted Lysis of Human Cytomegalovirus-Infected Cells. *The Journal of Immunology*, 172(9), 5629–5637. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.9.5629>
- Saylor, D., Dickens, A. M., Sacktor, N., Haughey, N., Slusher, B., Pletnikov, M., Mankowski, J. L., Brown, A., Volsky, D. J., & McArthur, J. C. (2016). HIV-associated neurocognitive disorder - Pathogenesis and prospects for treatment. In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 12, Issue 4, pp. 234–248). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.27>
- Schacker, T. W., Brenchley, J. M., Beilman, G. J., Reilly, C., Pambuccian, S. E., Taylor, J., Skarda, D., Larson, M., Douek, D. C., & Haase, A. T. (2006). Lymphatic tissue fibrosis is associated with reduced numbers of naïve CD4+ T cells in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(5), 556–560. <https://doi.org/10.1128/CVI.13.5.556-560.2006>
- Schacker, T. W., Nguyen, P. L., Beilman, G. J., Wolinsky, S., Larson, M., Reilly, C., & Haase, A. T. (2002). Collagen deposition in HIV-1 infected lymphatic tissues and T cell homeostasis. *Journal of Clinical Investigation*, 110(8), 1133–1139.

<https://doi.org/10.1172/jci16413>

- Schmidt, B., Scott, I., Whitmore, R. G., Foster, H., Fujimura, S., Schmitz, J., & Levy, J. A. (2004). Low-level HIV infection of plasmacytoid dendritic cells: Onset of cytopathic effects and cell death after PDC maturation. *Virology*, *329*(2), 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.08.016>
- Schmitz, H., Rokos, K., Florian, P., Gitter, A. H., Fromm, M., Scholz, P., Ullrich, R., Zeitz, M., Pauli, G., & Schulzke, J. D. (2002). Supernatants of HIV-infected immune cells affect the barrier function of human HT-29/B6 intestinal epithelial cells. *AIDS*, *16*(7), 983–991. <https://doi.org/10.1097/00002030-200205030-00004>
- See, P., Dutertre, C.-A., Chen, J., Günther, P., McGovern, N., Irac, S. E., Gunawan, M., Beyer, M., Händler, K., Duan, K., Sumatoh, H. R. Bin, Ruffin, N., Jouve, M., Gea-Mallorquí, E., Hennekam, R. C. M., Lim, T., Yip, C. C., Wen, M., Malleret, B., ... Ginhoux, F. (2017). Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science (New York, N.Y.)*, *356*(6342), eaag3009. <https://doi.org/10.1126/science.aag3009>
- Selik, R. M., Mokotoff, E. D., Branson, B., Michele Owen, S., Whitmore, S., & Irene Hall, H. (2014). Revised surveillance case definition for HIV infection - United States, 2014. *MMWR Recommendations and Reports*, *63*(1).
- Shankar, P., Russo, M., Harnisch, B., Patterson, M., Skolnik, P., & Lieberman, J. (2000). Impaired function of circulating HIV-specific CD8+ T cells in chronic human immunodeficiency virus infection. *Blood*, *96*(9), 3094–3101. https://doi.org/10.1182/blood.v96.9.3094.h8003094_3094_3101
- Sharma, P., & Allison, J. P. (2015). The future of immune checkpoint therapy. *Science*, *348*(6230), 56–61. <https://doi.org/10.1126/science.aaa8172>
- Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *1*(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006841>
- Shaw, G. M., & Hunter, E. (2012). HIV transmission. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006965>
- Shen, R., Richter, H. E., Clements, R. H., Novak, L., Huff, K., Bimczok, D., Sankaran-Walters, S., Dandekar, S., Clapham, P. R., Smythies, L. E., & Smith, P. D. (2009). Macrophages in Vaginal but Not Intestinal Mucosa Are Monocyte-Like and Permissive to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Journal of Virology*, *83*(7), 3258–3267. <https://doi.org/10.1128/jvi.01796-08>
- Shetty, R. D., Velu, V., Titanji, K., Bosinger, S. E., Freeman, G. J., Silvestri, G., & Amara, R. R. (2012). PD-1 blockade during chronic SIV infection reduces hyperimmune activation and microbial translocation in rhesus macaques. *Journal of Clinical Investigation*, *122*(5), 1712–1716. <https://doi.org/10.1172/JCI60612>
- Shi, X., Sims, M. D., Hanna, M. M., Xie, M., Gulick, P. G., Zheng, Y. H., Basson, M. D., & Zhang, P. (2014). Neutropenia during HIV infection: Adverse consequences and remedies. In *International Reviews of Immunology* (Vol. 33, Issue 6, pp. 511–536). Informa Healthcare. <https://doi.org/10.3109/08830185.2014.893301>
- Shields, R. L., Namenuk, A. K., Hong, K., Meng, Y. G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., Fox, J. A., & Presta, L. G. (2001). High Resolution Mapping of the Binding Site on Human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcRn and Design of IgG1

- Variants with Improved Binding to the FcγR. *Journal of Biological Chemistry*, 276(9), 6591–6604. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009483200>
- Shiina, T., & Blancher, A. (2019). The Cynomolgus Macaque MHC Polymorphism in Experimental Medicine. In *Cells* (Vol. 8, Issue 9). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells8090978>
- Shirai, A., Cosentino, M., Leitman-Klinman, S. F., & Klinman, D. M. (1992). Human immunodeficiency virus infection induces both polyclonal and virus-specific B cell activation. *Journal of Clinical Investigation*, 89(2), 561–566. <https://doi.org/10.1172/JCI115621>
- Shiroishi, M., Kuroki, K., Rasubala, L., Tsumoto, K., Kumagai, I., Kurimoto, E., Kato, K., Kohda, D., & Maenaka, K. (2006). Structural basis for recognition of the nonclassical MHC molecule HLA-G by the leukocyte Ig-like receptor B2 (LILRB2/LIR2/ILT4/CD85d). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(44), 16412–16417. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605228103>
- Shiroishi, M., Tsumoto, K., Amano, K., Shirakihara, Y., Colonna, M., Braud, V. M., Allan, D. S. J., Makadzange, A., Rowland-Jones, S., Willcox, B., Jones, E. Y., van der Merwe, P. A., Kumagai, I., & Maenaka, K. (2003). Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(15), 8856–8861. <https://doi.org/10.1073/pnas.1431057100>
- Siliciano, J. D., Kajdas, J., Finzi, D., Quinn, T. C., Chadwick, K., Margolick, J. B., Kovacs, C., Gange, S. J., & Siliciano, R. F. (2003). Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nature Medicine*, 9(6), 727–728. <https://doi.org/10.1038/nm880>
- Silvestri, G., Paiardini, M., Pandrea, I., Lederman, M. M., & Sodora, D. L. (2007). Understanding the benign nature of SIV infection in natural hosts. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 117, Issue 11, pp. 3148–3154). <https://doi.org/10.1172/JCI33034>
- Silvin, A., Yu, C. I., Lahaye, X., Imperatore, F., Brault, J. B., Cardinaud, S., Becker, C., Kwan, W. H., Conrad, C., Maurin, M., Goudot, C., Marques-Ladeira, S., Wang, Y., Pascual, V., Anguiano, E., Albrecht, R. A., Iannacone, M., García-Sastre, A., Goud, B., ... Manel, N. (2017). Constitutive resistance to viral infection in human CD141+ dendritic cells. *Science Immunology*, 2(13). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aai8071>
- Slukvin, I. I., Grendell, R. L., Rao, D. S., Hughes, A. L., & Golos, T. G. (2006). Cloning of rhesus monkey LILRs. *Tissue Antigens*, 67(4), 331–337. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2006.00579.x>
- Smed-Sörensen, A., & Loré, K. (2011). Dendritic cells at the interface of innate and adaptive immunity to HIV-1. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 6(5), 405–410. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e328349b06b>
- Smith, B. A., Gartner, S., Liu, Y., Perelson, A. S., Stilianakis, N. I., Keele, B. F., Kerkering, T. M., Ferreira-Gonzalez, A., Szakal, A. K., Tew, J. G., & Burton, G. F. (2001). Persistence of Infectious HIV on Follicular Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 166(1), 690–696. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.1.690>
- Smith, M. Z., Bastidas, S., Karrer, U., & Oxenius, A. (2013). Impact of antigen specificity on

- CD4+ T cell activation in chronic HIV-1 infection. *BMC Infectious Diseases*, 13(1), 100. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-100>
- Smith, P. D., Meng, G., Shaw, G. M., & Li, L. (1997). Infection of gastrointestinal tract macrophages by HIV-1. *Journal of Leukocyte Biology*, 62(1), 72–77. <https://doi.org/10.1002/jlb.62.1.72>
- Sokoya, T., Steel, H. C., Nieuwoudt, M., & Rossouw, T. M. (2017). HIV as a Cause of Immune Activation and Immunosenescence. In *Mediators of Inflammation* (Vol. 2017). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2017/6825493>
- Sonza, S., Mutimer, H. P., Oelrichs, R., Jardine, D., Harvey, K., Dunne, A., Purcell, D. F., Birch, C., & Crowe, S. M. (2001). Monocytes harbour replication-competent, non-latent HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *AIDS*, 15(1), 17–22. <https://doi.org/10.1097/00002030-200101050-00005>
- Soriano-Sarabia, N., Bateson, R. E., Dahl, N. P., Crooks, A. M., Kuruc, J. D., Margolis, D. M., & Archin, N. M. (2014). Quantitation of replication-competent HIV-1 in populations of resting CD4+ T cells. *Journal of Virology*, 88(24), 14070–14077. <https://doi.org/10.1128/JVI.01900-14>
- Soumelis, V., Scott, I., Gheyas, F., Bouhour, D., Cozon, G., Cotte, L., Huang, L., Levy, J. A., & Liu, Y. J. (2001). Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood*, 98(4), 906–912. <https://doi.org/10.1182/blood.v98.4.906>
- Stacey, A. R., Norris, P. J., Qin, L., Haygreen, E. A., Taylor, E., Heitman, J., Lebedeva, M., DeCamp, A., Li, D., Grove, D., Self, S. G., & 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. *Journal of Virology*, 83(8), 3719–3733. <https://doi.org/10.1128/JVI.01844-08>
- Stetson, D. B., & Medzhitov, R. (2006). Type I Interferons in Host Defense. In *Immunity* (Vol. 25, Issue 3, pp. 373–381). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.08.007>
- Stevenson, M. (2003). HIV-1 pathogenesis. In *Nature Medicine* (Vol. 9, Issue 7, pp. 853–860). <https://doi.org/10.1038/nm0703-853>
- Swingler, S., Mann, A., Jacqué, J. M., Brichacek, B., Sasseville, V. G., Williams, K., Lackner, A. A., Janoff, E. N., Wang, R., Fisher, D., & Stevenson, M. (1999). HIV-1 nef mediates lymphocyte chemotaxis and activation by infected macrophages. *Nature Medicine*, 5(9), 997–1003. <https://doi.org/10.1038/12433>
- Swingler, Simon, Mann, A. M., Zhou, J., Swingler, C., & Stevenson, M. (2007). Apoptotic killing of HIV-1-infected macrophages is subverted by the viral envelope glycoprotein. *PLoS Pathogens*, 3(9), 1281–1290. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030134>
- Takai, T. (2004). Role of paired Ig-like receptor-B in the humoral immune response. In *Allergology International* (Vol. 53, Issue 2, pp. 93–99). Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1592.2004.00327.x>
- Takai, T. (2005a). A novel recognition system for MHC class I molecules constituted by PIR. *Advances in Immunology*, 88, 161–192. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(05\)88005-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(05)88005-8)
- Takai, T. (2005b). Paired immunoglobulin-like receptors and their MHC class I recognition.

- Immunology*, 115(4), 433–440. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02177.x>
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. In *Cell* (Vol. 140, Issue 6, pp. 805–820). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
- Tasca, S., Tambussi, G., Nozza, S., Capiluppi, B., Zocchi, M. R., Soldini, L., Veglia, F., Poli, G., Lazzarin, A., & Fortis, C. (2003). Escape of monocyte-derived dendritic cells of HIV-1 infected individuals from natural killer cell-mediated lysis. *AIDS*, 17(16), 2291–2298. <https://doi.org/10.1097/00002030-200311070-00003>
- Thèze, J., Chakrabarti, L. A., Vingert, B., Porichis, F., & Kaufmann, D. E. (2011). HIV controllers: A multifactorial phenotype of spontaneous viral suppression. In *Clinical Immunology* (Vol. 141, Issue 1, pp. 15–30). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2011.07.007>
- Thieblemont, N., Weiss, L., Sadeghi, H. M., Estcourt, C., & Haeffner-Cavaillon, N. (1995). CD14^{low}CD16^{high}: A cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection. *European Journal of Immunology*, 25(12), 3418–3424. <https://doi.org/10.1002/eji.1830251232>
- Thomas, R., Apps, R., Qi, Y., Gao, X., Male, V., O’Huigin, C., O’Connor, G., Ge, D., Fellay, J., Martin, J. N., Margolick, J., Goedert, J. J., Buchbinder, S., Kirk, G. D., Martin, M. P., Telenti, A., Deeks, S. G., Walker, B. D., Goldstein, D., ... Carrington, M. (2009). HLA-C cell surface expression and control of HIV/AIDS correlate with a variant upstream of HLA-C. *Nature Genetics*, 41(12), 1290–1294. <https://doi.org/10.1038/ng.486>
- Thorlund, K., Horwitz, M. S., Fife, B. T., Lester, R., & Cameron, D. W. (2017). Landscape review of current HIV “kick and kill” cure research - some kicking, not enough killing. In *BMC Infectious Diseases* (Vol. 17, Issue 1, p. 595). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2683-3>
- Tilton, J. C., Luskin, M. R., Johnson, A. J., Manion, M., Hallahan, C. W., Metcalf, J. A., McLaughlin, M., Davey, R. T., & Connors, M. (2007). Changes in paracrine interleukin-2 requirement, CCR7 expression, frequency, and cytokine secretion of human immunodeficiency virus-specific CD4⁺ T cells are a consequence of antigen load. *Journal of Virology*, 81(6), 2713–2725. <https://doi.org/10.1128/JVI.01830-06>
- Tincati, C., Bellistr`bellistr`1, G. M., Ancona, G., Merlini, E., D’ A., Monforte, A., & Marchetti, G. (2012). Clinical Study Role of In Vitro Stimulation with Lipopolysaccharide on T-Cell Activation in HIV-Infected Antiretroviral-Treated Patients. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/935425>
- Trautmann, L., Janbazian, L., Chomont, N., Said, E. A., Gimmig, S., Bessette, B., Boulassel, M. R., Delwart, E., Sepulveda, H., Balderas, R. S., Routy, J. P., Haddad, E. K., & Sekaly, R. P. (2006). Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8⁺ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nature Medicine*, 12(10), 1198–1202. <https://doi.org/10.1038/nm1482>
- Trémeaux, P., Lenfant, T., Boufassa, F., Essat, A., Mélard, A., Gousset, M., Delelis, O., Viard, J. P., Bary, M., Goujard, C., Rouzioux, C., Meyer, L., & Avettand-Fenoel, V. (2019). Increasing contribution of integrated forms to total HIV DNA in blood during HIV disease progression from primary infection. *EBioMedicine*, 41, 455–464. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.02.016>
- Truong, A. D., Hong, Y., Lee, J., Lee, K., Thanh Tran, H. T., Dang, H. V., Nguyen, V. K.,

- Lillehoj, H. S., & Hong, Y. H. (2019). Chicken novel leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamilies B1 and B3 are transcriptional regulators of major histocompatibility complex class I genes and signaling pathways. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 32(5), 614–628. <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0561>
- Tudor Ilca, F., Neerinx, A., Wills, M. R., De La Roche, M., & Boyle, L. H. (2018). Utilizing TAPBPR to promote exogenous peptide loading onto cell surface MHC I molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(40), E9353–E9361. <https://doi.org/10.1073/pnas.1809465115>
- Turville, S. G., Aravantinou, M., Stössel, H., Romani, N., & Robbiani, M. (2008). Resolution of de novo HIV production and trafficking in immature dendritic cells. *Nature Methods*, 5(1), 75–85. <https://doi.org/10.1038/nmeth1137>
- Tuttle, D. L., Harrison, J. K., Anders, C., Sleasman, J. W., & Goodenow, M. M. (1998). Expression of CCR5 Increases during Monocyte Differentiation and Directly Mediates Macrophage Susceptibility to Infection by Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Virology*, 72(6), 4962–4969. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.6.4962-4969.1998>
- Tuyama, A. C., Hong, F., Saiman, Y., Wang, C., Ozkok, D., Mosoian, A., Chen, P., Chen, B. K., Klotman, M. E., & Bansal, M. B. (2010). Human Immunodeficiency Virus (HIV)-1 infects human hepatic stellate cells and promotes collagen I and monocyte chemoattractant protein-1 expression: Implications for the pathogenesis of HIV/hepatitis C virus-induced liver fibrosis. *Hepatology*, 52(2), 612–622. <https://doi.org/10.1002/hep.23679>
- Ueda, H., Howard, O. M. Z., Grimm, M. C., Su, S. B., Gong, W., Evans, G., Ruscetti, F. W., Oppenheim, J. J., & Wang, J. M. (1998). HIV-1 envelope gp41 is a potent inhibitor of chemoattractant receptor expression and function in monocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 102(4), 804–812. <https://doi.org/10.1172/JCI3273>
- Utay, N. S., & Hunt, P. W. (2016). Role of immune activation in progression to AIDS. In *Current Opinion in HIV and AIDS* (Vol. 11, Issue 2, pp. 131–137). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000242>
- Valle-Casuso, J. C., Angin, M., Volant, S., Passaes, C., Monceaux, V., Mikhailova, A., Bourdic, K., Avettand-Fenoel, V., Boufassa, F., Sitbon, M., Lambotte, O., Thoulouze, M. I., Müller-Trutwin, M., Chomont, N., & Sáez-Cirión, A. (2019). Cellular Metabolism Is a Major Determinant of HIV-1 Reservoir Seeding in CD4 + T Cells and Offers an Opportunity to Tackle Infection. *Cell Metabolism*, 29(3), 611–626.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.11.015>
- Van der Touw, W., Chen, H. M., Pan, P. Y., & Chen, S. H. (2017). LILRB receptor-mediated regulation of myeloid cell maturation and function. In *Cancer Immunology, Immunotherapy* (Vol. 66, Issue 8, pp. 1079–1087). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00262-017-2023-x>
- Vanhamel, J., Bruggemans, A., & Debyser, Z. (2019). Establishment of latent HIV-1 reservoirs: what do we really know? *Journal of Virus Eradication*, 5(1), 3–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30800420>
- Vasquez, J. J., Aguilar-Rodriguez, B. L., Rodriguez, L., Hogan, L. E., Somsouk, M., McCune, J. M., Deeks, S. G., Laszik, Z. G., Hunt, P. W., & Henrich, T. J. (2019). CD32-RNA Co-localizes with HIV-RNA in CD3+ Cells Found within Gut Tissues from Viremic and ART-Suppressed Individuals. *Pathogens and Immunity*, 4(1), 147–160.

<https://doi.org/10.20411/pai.v4i1.271>

- Veazey, R. S., Mansfield, K. G., Tham, I. C., Carville, A. C., Shvetz, D. E., Forand, A. E., & Lackner, A. A. (2000). Dynamics of CCR5 Expression by CD4+ T Cells in Lymphoid Tissues during Simian Immunodeficiency Virus Infection. *Journal of Virology*, 74(23), 11001–11007. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.23.11001-11007.2000>
- Veazey, Ronald S., Marx, P. A., & Lackner, A. A. (2003). Vaginal CD4 + T Cells Express High Levels of CCR5 and Are Rapidly Depleted in Simian Immunodeficiency Virus Infection . *The Journal of Infectious Diseases*, 187(5), 769–776. <https://doi.org/10.1086/368386>
- Veazey, Ronald S., DeMaria, M. A., Chalifoux, L. V., Shvetz, D. E., Pauley, D. R., Knight, H. L., Rosenzweig, M., Johnson, R. P., Desrosiers, R. C., & Lackner, A. A. (1998). Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science*, 280(5362), 427–431. <https://doi.org/10.1126/science.280.5362.427>
- Velu, V., Titanji, K., Zhu, B., Husain, S., Pladevega, A., Lai, L., Vanderford, T. H., Chennareddi, L., Silvestri, G., Freeman, G. J., Ahmed, R., & Amara, R. R. (2009). Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature*, 458(7235), 206–210. <https://doi.org/10.1038/nature07662>
- Venet, F., Schilling, J., Cazalis, M. A., Demaret, J., Poujol, F., Girardot, T., Rouget, C., Pachot, A., Lepape, A., Friggeri, A., Rimmelé, T., Monneret, G., & Textoris, J. (2017). Modulation of LILRB2 protein and mRNA expressions in septic shock patients and after ex vivo lipopolysaccharide stimulation. *Human Immunology*, 78(5–6), 441–450. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2017.03.010>
- Verbruggen, L. A., Rebmann, V., Demanet, C., De Cock, S., & Grosse-Wilde, H. (2006). Soluble HLA-G in Rheumatoid Arthritis. *Human Immunology*, 67(8), 561–567. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2006.03.023>
- Villa-Álvarez, M., Lorenzo-Herrero, S., Gonzalez-Rodriguez, A. P., López-Soto, A., Payer, A. R., Gonzalez-Garcia, E., Huergo-Zapico, L., & Gonzalez, S. (2017). Ig-like transcript 2 (ILT2) suppresses T cell function in chronic lymphocytic leukemia. *OncoImmunology*, 6(10), e1353856. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1353856>
- Villa-Álvarez, M., Sordo-Bahamonde, C., Lorenzo-Herrero, S., Gonzalez-Rodriguez, A. P., Payer, A. R., Gonzalez-Garcia, E., Villa-Álvarez, M. C., López-Soto, A., & Gonzalez, S. (2018). Ig-Like Transcript 2 (ILT2) Blockade and Lenalidomide Restore NK Cell Function in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Frontiers in Immunology*, 9, 2917. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02917>
- Villani, A.-C., Satija, R., Reynolds, G., Sarkizova, S., Shekhar, K., Fletcher, J., Griesbeck, M., Butler, A., Zheng, S., Lazo, S., Jardine, L., Dixon, D., Stephenson, E., Nilsson, E., Grundberg, I., McDonald, D., Filby, A., Li, W., De Jager, P. L., ... Hacohen, N. (2017). Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science (New York, N.Y.)*, 356(6335). <https://doi.org/10.1126/science.aah4573>
- Vingert, B., Perez-Patrigéon, S., Jeannin, P., Lambotte, O., Boufassa, F., Lemaître, F., Kwok, W. W., Theodorou, I., Delfraissy, J. F., Théze, J., & Chakrabarti, L. A. (2010). HIV controller CD4+ T cells respond to minimal amounts of Gag antigen due to high TCR avidity. *PLoS Pathogens*, 6(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000780>

- Vittinghoff, E., Scheer, S., O'Malley, P., Colfax, G., Holmberg, S. D., & Buchbinder, S. P. (1999). Combination Antiretroviral Therapy and Recent Declines in AIDS Incidence and Mortality. *The Journal of Infectious Diseases*, 179(3), 717–720. <https://doi.org/10.1086/314623>
- Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L., Yokoyama, W. M., & Ugolini, S. (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. In *Science* (Vol. 331, Issue 6013, pp. 44–49). <https://doi.org/10.1126/science.1198687>
- Vlad, G., Piazza, F., Colovai, A., Cortesini, R., Della Pietra, F., Suci-Foca, N., & Manavalan, J. S. (2003). Interleukin-10 induces the upregulation of the inhibitory receptor ILT4 in monocytes from HIV positive individuals. *Human Immunology*, 64(5), 483–489. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12691698>
- Volz, A., Wende, H., Laun, K., & Ziegler, A. (2001). Genesis of the ILT/LIR/MIR clusters within the human leukocyte receptor complex. In *Immunological Reviews* (Vol. 181, pp. 39–51). <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2001.1810103.x>
- Wagner, C. S., Rölle, A., Cosman, D., Ljunggren, H. G., Berndt, K. D., & Achour, A. (2007). Structural Elements Underlying the High Binding Affinity of Human Cytomegalovirus UL18 to Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor-1. *Journal of Molecular Biology*, 373(3), 695–705. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.08.020>
- Wakiguchi, H., Hasegawa, S., Suzuki, Y., Kudo, K., & Ichiyama, T. (2015). Relationship between T-cell HLA-DR expression and intravenous immunoglobulin treatment response in Kawasaki disease. *Pediatric Research*, 77(4), 536–540. <https://doi.org/10.1038/pr.2015.12>
- Wang, J. K., Kiyokawa, E., Verdin, E., & Trono, D. (2000). The Nef protein of HIV-1 associates with rafts and primes T cells for activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(1), 394–399. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.1.394>
- Wang, J. M., Ueda, H., Howard, O. M., Grimm, M. C., Chertov, O., Gong, X., Gong, W., Resau, J. H., Broder, C. C., Evans, G., Arthur, L. O., Ruscetti, F. W., & Oppenheim, J. J. (1998). HIV-1 envelope gp120 inhibits the monocyte response to chemokines through CD4 signal-dependent chemokine receptor down-regulation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(8), 4309–4317. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9780207>
- Wang, L., Geng, T., Guo, X., Liu, J., Zhang, P., Yang, D., Li, J., Yu, S., & Sun, Y. (2015). Co-expression of immunoglobulin-like transcript 4 and angiopoietin-like proteins in human non-small cell lung cancer. *Molecular Medicine Reports*, 11(4), 2789–2796. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.3029>
- Wang, Q., Song, H., Cheng, H., Qi, J., Nam, G., Tan, S., Wang, J., Fang, M., Shi, Y., Tian, Z., Cao, X., An, Z., Yan, J., & Gao, G. F. (2019). Structures of the four Ig-like domain LILRB2 and the four-domain LILRB1 and HLA-G1 complex. *Cellular and Molecular Immunology*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0258-5>
- Ward, J. P., Bonaparte, M. I., & Barker, E. (2004). HLA-C and HLA-E reduce antibody-dependent natural killer cell-mediated cytotoxicity of HIV-infected primary T cell blasts. *AIDS*, 18(13), 1769–1779. <https://doi.org/10.1097/00002030-200409030-00005>
- Weber, C., Belge, K. U., Von Hundelshausen, P., Draude, G., Steppich, B., Mack, M.,

- Frankenberger, M., Weber, K. S. C., & Ziegler-Heitbrock, H. W. L. (2000). Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *Journal of Leukocyte Biology*, 67(5), 699–704. <https://doi.org/10.1002/jlb.67.5.699>
- Wei, X., Decker, J. M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J. C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J. F., Salazar, M. G., Kilby, J. M., Saag, M. S., Komarova, N. L., Nowak, M. A., Hahn, B. H., Kwong, P. D., & Shaw, G. M. (2003). Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature*, 422(6929), 307–312. <https://doi.org/10.1038/nature01470>
- Weiner, L. M., Surana, R., & Wang, S. (2010). Monoclonal antibodies: Versatile platforms for cancer immunotherapy. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 10, Issue 5, pp. 317–327). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri2744>
- Wiegand, A., Spindler, J., Hong, F. F., Shaoc, W., Cyktor, J. C., Cillo, A. R., Halvas, E. K., Coffin, J. M., Mellors, J. W., & Kearney, M. F. (2017). Single-cell analysis of HIV-1 transcriptional activity reveals expression of proviruses in expanded clones during ART. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(18), E3659–E3668. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617961114>
- Wiendl, H., Feger, U., Mittelbronn, M., Jack, C., Schreiner, B., Stadelmann, C., Antel, J., Brueck, W., Meyermann, R., Bar-Or, A., Kieseier, B. C., & Weller, M. (2005). Expression of the immune-tolerogenic major histocompatibility molecule HLA-G in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. *Brain: A Journal of Neurology*, 128(Pt 11), 2689–2704. <https://doi.org/10.1093/brain/awh609>
- Wijewardana, V., Soloff, A. C., Liu, X., Brown, K. N., & Barratt-Boyes, S. M. (2010). Early myeloid dendritic cell dysregulation is predictive of disease progression in simian immunodeficiency virus infection. *PLoS Pathogens*, 6(12), e1001235. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001235>
- Wilén, C. B., Tilton, J. C., & Doms, R. W. (2012). HIV: Cell binding and entry. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006866>
- Willcox, B. E., Thomas, L. M., & Bjorkman, P. J. (2003). Crystal structure of HLA-A2 bound to LIR-1, a host and viral major histocompatibility complex receptor. *Nature Immunology*, 4(9), 913–919. <https://doi.org/10.1038/ni961>
- Wilson, M. J., Torkar, M., Haude, A., Milne, S., Jones, T., Sheer, D., Beck, S., & Trowsdale, J. (2000). Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9), 4778–4783. <https://doi.org/10.1073/pnas.080588597>
- Wittner, M., Dunay, G. A., Kummer, S., Bockhorn, M., Hüfner, A., Schmiedel, S., Degen, O., van Lunzen, J., Eberhard, J. M., & Schulze zur Wiesch, J. (2017). CD32 Expression of Different Memory T Cell Subpopulations in the Blood and Lymph Nodal Tissue of HIV Patients and Healthy Controls Correlates with Immune Activation. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 1. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000001622>
- Wonderlich, E. R., Wu, W.-C., Normolle, D. P., & Barratt-Boyes, S. M. (2015). Macrophages and Myeloid Dendritic Cells Lose T Cell-Stimulating Function in Simian Immunodeficiency Virus Infection Associated with Diminished IL-12 and IFN- α Production. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 195(7), 3284–3292. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500683>

- Wong, J. K., & Yukl, S. A. (2016). Tissue reservoirs of HIV. In *Current Opinion in HIV and AIDS* (Vol. 11, Issue 4, pp. 362–370). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000293>
- Wong, M. E., Jaworowski, A., & Hearn, A. C. (2019). The HIV reservoir in monocytes and macrophages. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10, Issue JUN, p. 1435). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01435>
- Wu, L., & KewalRamani, V. N. (2006). Dendritic-cell interactions with HIV: Infection and viral dissemination. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 6, Issue 11, pp. 859–868). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1038/nri1960>
- Wykes, M. N., & Lewin, S. R. (2018). Immune checkpoint blockade in infectious diseases. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 18, Issue 2, pp. 91–104). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.112>
- Xiao, Q., Guo, D., & Chen, S. (2019). Application of CRISPR/Cas9-based gene editing in HIV-1/AIDS therapy. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 9, Issue MAR, p. 69). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00069>
- Xue, C., Raveendran, M., Alan Harris, R., Fawcett, G. L., Liu, X., White, S., Dahdouli, M., Deiros, D. R., Below, J. E., Salerno, W., Cox, L., Fan, G., Ferguson, B., Horvath, J., Johnson, Z., Kanthaswamy, S., Michael Kubisch, H., Liu, D., Platt, M., ... Rogers, J. (2016). The population genomics of rhesus macaques (*Macaca mulatta*) based on whole-genome sequences. *Genome Research*, 26(12), 1651–1662. <https://doi.org/10.1101/gr.204255.116>
- Yang, O. O., Nguyen, P. T., Kalams, S. A., Dorfman, T., Gottlinger, H. G., Stewart, S., Chen, I. S. Y., Threlkeld, S., & Walker, B. D. (2002). Nef-Mediated Resistance of Human Immunodeficiency Virus Type 1 to Antiviral Cytotoxic T Lymphocytes. *Journal of Virology*, 76(4), 1626–1631. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.4.1626-1631.2002>
- Yang, Y., Huang, J., Toth, I., Lichterfeld, M., & Yu, X. G. (2010). Mutational Escape in HIV-1 CTL Epitopes Leads to Increased Binding to Inhibitory Myelomonocytic MHC Class I Receptors. *PLoS ONE*, 5(12), e15084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015084>
- Yang, Z., & Bjorkman, P. J. (2008). Structure of UL18, a peptide-binding viral MHC mimic, bound to a host inhibitory receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(29), 10095–10100. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804551105>
- Ye, P., Kirschner, D., & Kourtis, A. (2005). The Thymus During HIV Disease: Role in Pathogenesis and in Immune Recovery. *Current HIV Research*, 2(2), 177–183. <https://doi.org/10.2174/1570162043484898>
- Younes, S. A., Yassine-Diab, B., Dumont, A. R., Boulassel, M. R., Grossman, Z., Routy, J. P., & Sékaly, R. P. (2003). HIV-1 Viremia Prevents the Establishment of Interleukin 2-producing HIV-specific Memory CD4+ T Cells Endowed with Proliferative Capacity. *Journal of Experimental Medicine*, 198(12), 1909–1922. <https://doi.org/10.1084/jem.20031598>
- Yukl, S. A., Kaiser, P., Kim, P., Telwatte, S., Joshi, S. K., Vu, M., Lampiris, H., & Wong, J. K. (2018). HIV latency in isolated patient CD4+ T cells may be due to blocks in HIV transcriptional elongation, completion, and splicing. *Science Translational Medicine*, 10(430), 1–16. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aap9927>

- Zalar, A., Figueroa, M. I., Ruibal-Ares, B., Baré, P., Cahn, P., de Bracco, M. M. de E., & Belmonte, L. (2010). Macrophage HIV-1 infection in duodenal tissue of patients on long term HAART. *Antiviral Research*, 87(2), 269–271. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2010.05.005>
- Zaunders, J., & Van Bockel, D. (2013). Innate and adaptive immunity in long-term non-progression in HIV disease. *Frontiers in Immunology*, 4(APR), 95. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00095>
- Zeng, M., Southern, P. J., Reilly, C. S., Beilman, G. J., Chipman, J. G., Schacker, T. W., & Haase, A. T. (2012). Lymphoid Tissue Damage in HIV-1 Infection Depletes Naïve T Cells and Limits T Cell Reconstitution after Antiretroviral Therapy. *PLoS Pathogens*, 8(1), e1002437. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002437>
- Zhang, D., Shankar, P., Xu, Z., Harnisch, B., Chen, G., Lange, C., Lee, S. J., Valdez, H., Lederman, M. M., & Lieberman, J. (2003). Most antiviral CD8 T cells during chronic viral infection do not express high levels of perforin and are not directly cytotoxic. *Blood*, 101(1), 226–235. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-03-0791>
- Zhang, J., Mai, S., Chen, H.-M., Kang, K., Li, X. C., Chen, S.-H., & Pan, P.-Y. (2017). Leukocyte immunoglobulin-like receptors in human diseases: an overview of their distribution, function, and potential application for immunotherapies. *Journal of Leukocyte Biology*, 102(2), 351–360. <https://doi.org/10.1189/jlb.5mr1216-534r>
- Zhang, J. Y., Zhang, Z., Wang, X., Fu, J. L., Yao, J., Jiao, Y., Chen, L., Zhang, H., Wei, J., Jin, L., Shi, M., Gao, G. F., Wu, H., & Wang, F. S. (2007). PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8+ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood*, 109(11), 4671–4678. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-09-044826>
- Zhang, P., Guo, X., Li, J., Yu, S., Wang, L., Jiang, G., Yang, D., Wei, Z., Zhang, N., Liu, J., & Sun, Y. (2015). Immunoglobulin-like transcript 4 promotes tumor progression and metastasis and up-regulates VEGF-C expression via ERK signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 6(15), 13550–13563. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3624>
- Zhang, P., Yu, S., Li, H., Liu, C., Li, J., Lin, W., Gao, A., Wang, L., Gao, W., & Sun, Y. (2015). ILT4 drives B7-H3 expression via PI3K/AKT/mTOR signalling and ILT4/B7-H3 co-expression correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer. *FEBS Letters*, 589(17), 2248–2256. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.06.037>
- Zhang, R., Fichtenbaum, C. J., Hildeman, D. A., Lifson, J. D., & Choungnet, C. (2004). CD40 Ligand Dysregulation in HIV Infection: HIV Glycoprotein 120 Inhibits Signaling Cascades Upstream of CD40 Ligand Transcription. *The Journal of Immunology*, 172(4), 2678–2686. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.4.2678>
- Zhang, Y., Zhao, J., Qiu, L., Zhang, P., Li, J., Yang, D., Wei, X., Han, Y., Nie, S., & Sun, Y. (2016). Co-expression of ILT4/HLA-G in human non-small cell lung cancer correlates with poor prognosis and ILT4-HLA-G interaction activates ERK signaling. *Tumor Biology*, 37(8), 11187–11198. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5002-5>
- Zhang, Z., Hatano, H., Shaw, J., Nordkamp, M. O., Jiang, G., Li, D., & Kollnberger, S. (2015). The leukocyte immunoglobulin-like receptor family member LILRB5 binds to HLA-class I heavy chains. *PLoS ONE*, 10(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129063>

- Zheng, J., Umikawa, M., Cui, C., Li, J., Chen, X., Zhang, C., Hyunh, H., Kang, X., Silvano, R., Wan, X., Ye, J., Cantó, A. P., Chen, S. H., Wang, H. Y., Ward, E. S., & Zhang, C. C. (2012). Inhibitory receptors bind ANGPTLs and support blood stem cells and leukaemia development. *Nature*, *485*(7400), 656–660. <https://doi.org/10.1038/nature11095>
- Zhou, G., Ding, Z.-C., Fu, J., & Levitsky, H. I. (2011). Presentation of acquired peptide-MHC class II ligands by CD4⁺ regulatory T cells or helper cells differentially regulates antigen-specific CD4⁺ T cell response. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *186*(4), 2148–2155. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002917>
- Zhou, Y., Zhang, H., Siliciano, J. D., & Siliciano, R. F. (2005). Kinetics of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Decay following Entry into Resting CD4⁺ T Cells. *Journal of Virology*, *79*(4), 2199–2210. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.4.2199-2210.2005>
- Zhu, T., Muthui, D., Holte, S., Nickle, D., Feng, F., Brodie, S., Hwangbo, Y., Mullins, J. I., & Corey, L. (2002). Evidence for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication In Vivo in CD14⁺ Monocytes and Its Potential Role as a Source of Virus in Patients on Highly Active Antiretroviral Therapy. *Journal of Virology*, *76*(2), 707–716. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.2.707-716.2002>
- Ziegler, M. C., Grañana, F. B., Garcia-Beltran, W. F., Wiesch, J. S. Zur, Hoffmann, C., Rechten, A., Lunemann, S., & Altfeld, M. (2018). Stable frequencies of HLA-C*03:04/peptide-binding KIR2DL2/3⁺ natural killer cells following vaccination. *Frontiers in Immunology*, *9*(OCT). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02361>

Titre : Etude de la dynamique des réponses immunitaires et génération d'anticorps monoclonaux à visée thérapeutique dans la pathogenèse du SIV/VIH

Mots clés : VIH/SIV, cytométrie de masse, CD32a, cellules myéloïdes, LILRB1/LILRB2, anticorps monoclonaux

Résumé : L'infection par le VIH-1 engendre une dérégulation des réponses immunitaires ainsi que la persistance de réservoirs VIH-1 latents. Une meilleure compréhension des événements cellulaires et moléculaires impliqués dans ces mécanismes est nécessaire pour élaborer de nouvelles thérapies permettant une rémission durable du VIH-1. A cet égard, notre première étude confirme chez des patients VIH⁺ la présence de cellules T CD4⁺ CD32a⁺ initialement proposées comme spécifiques du réservoir latent du VIH-1. Néanmoins, nos données indiquent que ces cellules sont aussi retrouvées chez des individus séronégatifs. Ces résultats révèlent également l'importante diversité et la dynamique de ces cellules à différentes phases de l'infection.

Dans une seconde étude, nous avons examiné les cellules myéloïdes, qui jouent un rôle clé dans la mise en place des réponses immunitaires. Nos résultats

montrent que ces cellules subissent aussi des modifications d'abondances dès la phase précoce de l'infection au VIH-1. Cette étude met également en évidence une sous-population particulière de cDC2 surreprésentée chez les patients contrôleurs du VIH. Enfin, nous nous sommes intéressés aux stratégies thérapeutiques visant à restaurer la fonction du système immunitaire contre le VIH-1 par le blocage de certains récepteurs immunomodulateurs. Dans ce contexte et pour notre dernière étude, nous avons développé deux anticorps monoclonaux (AcM) bloquant l'interaction *in vitro* des récepteurs inhibiteurs LILRB1 et/ou LILRB2 avec leurs ligands du CMH-I, à la fois chez l'Homme et le macaque. Ces AcM pourraient ouvrir la voie à des études précliniques dans le modèle SIV et ainsi révéler l'implication *in vivo* de ces récepteurs dans la physiopathologie de l'infection au SIV/VIH.

Title : Study of the dynamic of immune responses and generation of monoclonal antibodies for therapeutic purposes in SIV/HIV pathogenesis

Keywords : HIV/SIV, mass cytometry, CD32a, myeloid cells, LILRB1/LILRB2, monoclonal antibodies

Abstract : HIV-1 infection induces numerous deregulations of immune responses and persistence of latent HIV-1 reservoirs. A better understanding of the cellular and molecular events associated to these mechanisms is necessary to develop a long-lasting remission of HIV-1. In this regard, our first study confirms in HIV⁺ patients the presence of CD32a⁺ CD4⁺ T cells initially proposed as specific to latent HIV reservoir. However, our data indicate that these cells are also found in seronegative individuals. Moreover, these results reveal the high diversity and dynamics of these cells at different stages of the infection.

In our second study, we looked over myeloid cells, which play a key role in setting up immune responses. Our results show that these cells also undergo abundance modifications from the early

phase of HIV-1 infection. This study highlights a particular cDC2 subpopulation overrepresented in HIV controllers patients.

Finally, we were interested in therapeutic strategies aimed to restore the function of the immune system against HIV-1 by the blockade of immunomodulatory receptors. In this regard and for our latest study, we developed two monoclonal antibodies (mAb) able to block the interaction of the inhibitory-receptors LILRB1 and/or LILRB2 with their MHC-I ligands in both humans and macaques. These blocking mAb could pave the way for preclinical studies in macaque model of SIV infection and help to reveal the *in vivo* involvement of these receptors in the pathophysiology of SIV/HIV infection.