Université Pierre et Marie Curie

École doctorale Physiologie, Physiopathologie, Thérapeutique

Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris)

Angéline Rouers

Impact de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine sur les populations de lymphocytes T folliculaires helper et les réponses B mémoires

Thèse de doctorat d'immunologie

Dirigée par Arnaud Moris et Stéphanie Graff-Dubois

Soutenue le 27 septembre 2016

Docteur Stéphane PAUL	Rapporteur
Docteur Nabila SEDDIKI	Rapporteur
Professeur Olivier LAMBOTTE	Examinateur
Docteur Christiane MOOG	Examinateur
Docteur Hans YSSEL	Président du jury

Except where otherwise noted, this work is licensed under
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

« Ce sont nos choix, Harry, qui montrent ce que nous sommes vraiment, beaucoup plus que nos aptitudes. »

J.K. Rowling

Remerciements

Un grand merci à **Arnaud Moris** et **Stéphanie Graff-Dubois** qui ont encadré ma thèse de façon complémentaire et constructive. Vous m'avez accompagné dans mes différents projets, en m'incitant à aller de l'avant.
Stéphanie, tu as toujours eu une oreille attentive et m'a donné de précieux conseils aussi bien d'un point de vue scientifique que personnel. La période où nous étions voisines de bureau me laisse de très bons souvenirs et puis même après, nous n'étions jamais bien loin !
Arnaud, j'ai apprécié ton esprit positif en toutes circonstances, c'est surement ce qui m'a fait prendre un peu plus d'assurance tout au long de ces 3 ans.
Grâce à vous deux, qui avez toujours soutenu mes choix, je peux maintenant m'envoler vers de nouvelles aventures sans jamais oublier ce que vous m'avez apporté.

Merci ensuite à **Christophe Combadière** de m'avoir permis d'effectuer ces 3 années de thèse au CIMI-Paris. Malgré tes multiples fonctions de directeur, tu as toujours pu te rendre disponible.

Un merci tout particulier à **Clémence Richetta**, avec qui des liens d'amitié se sont rapidement formés dès son arrivée. Nos pauses papotages vont me manquer…Tu as réellement été d'un grand soutien pendant ma thèse et également source de conseils.

Merci à **Anne Bet**, ma seconde voisine de bureau avec qui j'ai pu échanger et améliorer mon anglais. Ton chat/chien « orange » gardera toujours une petite place dans mon cœur.

Merci à l'ensemble des étudiants que j'ai côtoyé lors de leur stage dans l'équipe : **Manu** qui s'assure toujours de temps en temps que tout se passe bien, **Delphine** toujours souriante et volontaire, **Mathias** qui va poursuivre l'aventure ! Et plus particulièrement **Julie** et **Hélène** que j'ai pu encadrer pendant ma thèse, elles ont toutes les deux largement contribué à l'avancée de mes travaux et je garderai un très bon souvenir de leur séjour au labo.

Merci également aux anciens membres de l'équipe. **Lucie Colineau**, qui a lancé le projet « Tfh » et m'a transmis les outils nécessaires pour poser les bases de mon projet thèse. **Sylvain Cardinaud** et **Pierre Grégoire Coulon** avec qui j'ai passé de bons moments à la paillasse et en dehors du labo.

Je remercie ensuite toute l'équipe de la Cité des Sciences avec qui j'ai partagé ma dernière année de thèse. **Mélanie**, ma tutrice super organisée ! Mais également **Cyrielle, Isabelle, Caroline, Christelle, Coco, Agathe, Zuléma, Anneli, Florence, Annick, Anne et Mitty** (oui que des filles !). A vos côtés j'ai appris à partager les sciences avec les enfants, une expérience enrichissante et tellement agréable ☺

Un grand Merci à **Bin Su** avec qui j'ai mis au point avec acharnement les Elispot B, ce qui a fini par payer ! Au delà des manips, j'ai pu partager ma passion du thé avec toi et je n'oublierai jamais toutes les gentilles attentions que tu as eu à mon égard.

MERCI également à…

L'ensemble des doctorants du CIMI, notamment **Zineb, Delphine Sterlin, Clément, Jessica, Pauline, Pilou, James, Aline et Emilie**. C'est toujours réconfortant de pouvoir échanger avec des personnes qui vivent la même expérience de thésard.

Olivia, Hélène, Sophie et Assia pour votre aide précieuse dans la conception et la réalisation de mes manips.

Toute la « VA Team » **Victor, Laura, Solène, Delphine, Tina, Francesco**. J'ai le souvenir d'une soirée mémorable à la taverne autrichienne avec une partie d'entre vous. Solène, c'était toujours un plaisir de maniper en ta compagnie dans le P2.

Béhazine Combadière, pour ton initiation mémorable à la danse orientale mais surtout pour ton soutien dans mes projets à venir.

Brigitte Autran, pour les interactions scientifiques que nous avons eu pendant ma thèse et les interactions à venir qui promettent d'être enrichissantes.

Philippe Deterre, alias Alain Delon à ses heures perdues.

Pascale, Maryse, Saddi, Djamila, Mann-Sieck, Nadiège, Sandrine et Marie-Ange. Vous avez toutes, à votre façon, contribué au bon déroulement de ma thèse.

L'ensemble des **collaborateurs** du projet « CODEX ».

Hugo Mouquet, pour son support scientifique et son expertise lors de mon comité de mi-thèse.

Charlotte, Fabien, Gwladys, Audrey, Sylvie. Que de bons moments à vos côtés pendant mon stage de Master.

Sothea, Nicolas et Mathieu, nous nous sommes soutenus mutuellement pendant ces 3 années. Une belle amitié est née et ce n'est surement que le commencement.

Mes parents, mon frère Anthony, mes grands-parents et mes beaux-parents. Vous avez tous toujours cru en moi, aujourd'hui j'y suis arrivée et c'est en grande partie grâce à vous.

Mon chéri, qui sait très bien ce que je pense. Merci avec un grand M.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ 11

ABRÉVIATIONS 13

FIGURES ET TABLEAUX 14

IMPACT DES TRAVAUX DANS LE DOMAINE 15

AVANT-PROPOS 17

ÉTAT DE L'ART 21

1. Etablissement de la réponse T dépendante 25

1.1 Acteurs cellulaires et localisation de la réponse T dépendante 25

1.1.1 Développement des acteurs cellulaires d'une réponse T dépendante 25

1.1.1.1. Les LB 25

1.1.1.2. Les LT 27

1.1.1.3. Les DC 28

1.1.2. La présentation des antigènes sur les molécules du CMH 30

1.1.2.1. Présentation sur les molécules du CMH-I 30

1.1.2.2. Présentation sur les molécules du CMH-II 31

1.1.3 Établissement des réponses T dépendantes dans les OLII 33

1.1.3.1. Les ganglions 34

1.1.3.2. La rate 34

1.2. Interactions entre le LT CD4$^+$ naïf et la DC dans la zone T 36

1.2.1. Les signaux nécessaires à l'activation d'un LT 36

1.2.2. Diversité des LTh 37

1.2.3. Engagement de la différenciation d'un LT CD4$^+$ naïf en Tfh 38

1.3. Interactions entre le pré-Tfh et le LB à la bordure de la zone B 41

1.3.1. Maturation et activation du LB dans la rate 41

1.3.1.1. Du lymphocyte B transitionnel au LB mature 41

1.3.1.2. Activation du LB 41

1.3.2. Les acteurs moléculaires impliqués dans l'interaction pré-Tfh/LB 42

1.3.3. Devenir du LB à l'issue de cette première interaction avec le pré-Tfh 44

1.3.3.1. Commutation de la classe isotypique 44

1.3.3.2. Différenciation du LB 44

1.3.3.2.1 Les plasmocytes à courte durée de vie 45

1.3.3.2.2. Les LB folliculaires 45

1.4. Interactions entre le Tfh et le LB dans les CG de la zone B 46

1.4.1. Les Tfh du CG (CG-Tfh) 47

1.4.2. Les LB du CG (CG-LB) 47

1.4.3. Les acteurs moléculaires des interactions Tfh/LB dans les CG 48

1.4.4. La réaction du CG et la réponse humorale 51

1.4.4.1. Devenir du CG-LB suite à son interaction avec un CG-Tfh 51

1.4.4.1.1. Les LB mémoires 51

1.4.4.1.2. Les plasmablastes 52

1.4.4.2. Les fonctions effectrices des anticorps 54

1.4.4.3. Les différentes classes d'anticorps et leurs fonctions 54
1.4.5. Régulation de la réaction du CG 59

2. La réaction du CG et la réponse humorale lors de l'infection par le VIH 62
2.1. Généralités sur le VIH/SIDA 62
2.1.1. Données épidémiologiques en France et dans le monde 62
2.1.2. Les différents sous-type du VIH 62
2.1.3. La structure du VIH 63
2.1.4. Cycle de réplication du VIH 64
2.1.5. Les phases cliniques de l'infection par le VIH 65
2.1.6. Les réservoirs du VIH 67
2.2. L'impact de l'infection par le VIH sur les CG 68
2.2.1. Tfh et établissement du réservoir 68
2.2.2. Impact de l'infection par le VIH sur la dynamique des Tfh 69
2.2.3. Impact de l'infection par le VIH sur les Tfr 70
2.2.4. Impact de l'infection par le VIH sur les populations de LB 71
2.3. La réponse humorale lors de l'infection par le VIH 72
2.3.1. L'émergence d'anticorps auto-immuns 72
2.3.2. Les anticorps anti-VIH 74
2.3.2.1. Caractéristiques des anticorps anti-VIH 74
2.3.2.2. Production d'anticorps neutralisants 75
2.3.2.3. Les bnAbs 76
2.3.2.4. Les anticorps anti-VIH non neutralisants 77
2.4. Les contrôleurs du VIH 78
2.4.1 Définitions cliniques 78
2.4.2. Contrôle du VIH et réponses $CD8^+$ cytotoxiques 79
2.4.3. Contrôle du VIH et paramètres génétiques 80
2.4.4. Contrôle du VIH et paramètres virologiques 81
2.4.5. Contrôle du VIH, réponse immunitaire innée et réponse intrinsèque 81
2.4.6. Contrôle du VIH et rôle des LT $CD4^+$ 82
2.4.7. Contrôle du VIH et réponse humorale 83

3. Suivi des réponses T dépendantes dans le sang 86
3.1. Les Tfh dans le sang (pTfh) 86
3.1.1. Identification et fonctions des pTfh 86
3.1.2. Les différentes populations de pTfh 87
3.1.3. pTfh et vaccination 88
3.1.4. pTfh et infection par le VIH 89
3.2. Les LB dans le sang 92
3.2.1. Identification des populations de LB dans le sang 92
3.2.2. Les outils pour étudier les LB spécifiques du VIH dans le sang 94
3.2.3. Impact de l'infection par le VIH sur les populations de LB dans le sang 94

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE 97

RÉSULTATS 101
AXE 1 DU TRAVAIL DE THÈSE : Caractérisation des Populations de Tfh dans des rates de patients infectés par le VIH 103

AXE 2 DU TRAVAIL DE THÈSE : **Étude des réponses B mémoires dans le sang de patients infectés par le VIH** **133**

CONCLUSIONS ET DISCUSSION **169**

CONCLUSIONS ET DISCUSSION DE L'AXE 1 ..... **171**

Dynamique des populations de Tfh dans la rate de patients infectés par le VIH 171

(a) Prolifération / Survie 171

(b) Différenciation vers un profil Tfh 172

(c) Contrôle du CG 173

(d) Expression des facteurs de restrictions et co-facteurs 174

Altération des fonctions des Tfh lors de l'infection par le VIH 175

CONCLUSIONS ET DISCUSSION DE L'AXE 2 ..... **178**

Préservation du compartiment B mémoire chez les *Elite Controller* 178

Détection des réponses B mémoires anti-VIH par la technique d'Elispot B 180

Maintien des réponses B mémoires anti-VIH chez les EC 181

Capacité de neutralisation des anticorps présents dans le sérum des EC 183

CONCLUSIONS GÉNÉRALES DES TRAVAUX DE THÈSE ET PERSPECTIVES **184**

BIBLIOGRAPHIE **187**

ANNEXES **209**

RÉSUMÉ

La réponse humorale est altérée lors de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Cependant, une minorité de patients sécrètent des anticorps neutralisants un large spectre de souches du VIH (bnAbs : *broadly neutralizing antibodies*). Les bnAbs sont des anticorps hypermutés issus de la maturation des lymphocytes B (LB) dans les centres germinatifs (CG). Cette réaction du CG est contrôlée par une sous-population de lymphocytes T $CD4^+$ appelés lymphocytes T folliculaires helper (Tfh). Les Tfh expriment fortement la molécule CXCR5 leur permettant de rejoindre la zone B des organes lymphoïdes secondaires pour apporter les signaux nécessaires à la maturation et la différenciation des LB.
Mon travail de thèse s'est articulé autour de deux axes complémentaires visant à étudier les Tfh et les réponses B mémoires lors de l'infection par le VIH.

La rate étant l'organe où les réponses immunitaires contre les pathogènes du sang sont initiées, j'ai d'abord étudié les Tfh spléniques lors de la phase chronique de l'infection par le VIH. J'ai identifié les populations de Tfh, Tfh du CG (CG-Tfh) et Tfh régulateurs (Tfr) issus de la rate de patients VIH^+ par cytométrie de flux. Ces 3 populations sont en proportions plus importantes dans les rates VIH^+ comparé aux rates VIH^-. L'analyse du profil d'expression des gènes dans les Tfh et les CG-Tfh a révélé une réduction de l'expression des ARNm codant pour des molécules de co-stimulation, de régulation et de transduction du signal. J'ai ensuite mis en évidence une diminution de la production d'IL-4 et d'IL-10 par les splénocytes VIH^+ comparé aux splénocytes VIH^-. Parallèlement, la maturation des LB est altérée dans les rates VIH^+. Ces travaux soulignent un défaut fonctionnel des Tfh et des CG-Tfh dans la rate des patients chroniquement infectés par le VIH en lien avec le défaut de maturation des LB observé.

Dans le second axe de ma thèse, j'ai étudié les réponses B mémoires anti-VIH dans différentes cohortes de patients VIH^+ : *Elite controller* (EC*)* ou *Viremic controller* (VC) contrôlant naturellement l'infection et des patients avirémiques sous traitement antirétroviral combiné (cART). J'ai d'abord réalisé un immuno-monitorage des différentes sous-populations de LB mémoires du sang et montré que les EC préservent naturellement leurs compartiments B mémoires. J'ai ensuite caractérisé par Elispot B les immunoglobulines (Ig) anti-VIH secrétées par les LB mémoires des patients EC et cART. Alors que 80% des EC présentaient des réponses B mémoires anti-VIH, ces réponses ont été détectées chez moins de 10% des patients cART et majoritairement avant l'initiation des traitements chez des patients VC. Ces résultats suggèrent une présence résiduelle du virus chez les EC, permettant le maintien des réponses B mémoires anti-VIH. Les réponses B mémoires $IgG1^+$ anti-VIH sont majoritaires chez les EC, tandis que les réponses $IgG2^+$ et $IgG3^+$ sont plus rares.

Ces travaux permettent une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'infection par le VIH en apportant de nouveaux éléments sur la fonctionnalité des Tfh et les réponses B mémoires anti-VIH.

ABRÉVIATIONS

ADCC : Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
ADN: Acide désoxyribonucléique
Ag: Antigène
AID : Activation-induced cytidine deaminase
AM : Activate memory
ANRS : Agence nationale de la recherche sur les Sida et les hépatites
AP-1 : Activator prtein 1
APC : Antigen presenting cell
APOBEC : Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like
APRIL : A proliferation-inducing ligand
ARN : Acide ribonucléique
ART : Antiretroviral therapy
AZT : Azidothymidine
BAFFR : B-cell activating factor receptor
Bcl-(x) : B-cell lymphoma
BCR : B-cell receptor
Blimp-1 : B lymphocyte-induced maturation protein-1
bnAb : Broadly neutralizing antibody
Breg : Regulatory B-cell
CCL(x) : Chemokine ligand
CCR(x) : Chemokine receptor
CD(x)(L) : Cluster of differenciation (Ligand)
CDR : Complementary determining region
CG : Centre germinatif
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CODEX : Cohorte des Extrêmes
CSA : Cellule sécrétrice d'anticorps
CSF : Colony-stimulating factor
CTLA-4 : cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CXCL(x) : Chemokine (C-X-C motif) ligand
CXCR(x) : Chemokine (C-X-C motif) receptor
DC : Dendritic cell
DN : Double négatif
DP : Double positif
EBI-2 : Epstein-Barr virus-induced G-protein coupled receptor 2
EC : Elite controller
Env : envelope
FCRL4 : Fc receptor-like protein 4
FDC : follicular dendritic cell
FLT3 : Fms-like tyrosine kinase 3
FO-LB : Lymphocyte B folliculaires
FOXO3 : Forkhead box O3
FOXP3 : forkhead box P3
Gag : Group-specific antigen
gp : glycoprotéine
HEV : veinule à endothélium épais
HLA-(x) : human leukocyte antigen
HSC : hematopoietic stem cell
ICOS(L) : Inducible T-cell COStimulator (ligand)
IFN : Interferon
Ig(x) : Immunoglobuline
IL(x) : Interleukine
IM : Intermediate memory
LB : Lymphocyte B
LT : Lymphocyte T
LTh : Lymphocyte T helper
LTR : Long terminal repeat sequence
MafB : V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B
MIP1β : Macrophage Inflammatory Proteins 1β
MO : Moelle osseuse
Mono-DC : Monocyte-derived dendritic cell
MPER : membrane-proximal external region
mTOR : mammalian target of rapamycin
MZ-LB : Lymphocyte B de la zone marginale
Nef : Negative regulatory factor
NFAT : Nuclear factor of activated T-cells
NF-κB : nuclear factor-kappa B
NK : Natural killer
OL : Organe lymphoïde
PCL : Progéniteur commun lymphoïde
PD-1(L) : Programmed cell death 1 (ligand)
pDC : Plasmacytoid dendritic cell
PMC : Progéniteur myéloïde commun
Pol : polymérase
PreP : Prophylaxie pré-exposition
pTfh : Tfh périphériques
PTI : Purpura thrombocytopénique idiopathique
RAG : Recombination-activating genes
RM : Resting memory
SAP : SLAM associated protein
SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise
SIV : Simian immunodeficiency virus
SLAM : Signaling lymphocytic activation molecule
SP : Simple positif
STAT(x) : Signal Transducers and Activators of Transcription
TAP : Transporter associated with antigen processing
TCR : T cell receptor
Tfh : Follicular helper T cell
Tfr : Regulatory follicular T cell
Treg : Regulatory T cell
TGF : Transforming growth factor
TLAM : Tissue lymphoïde associé aux muqueuses
TLM : Tissue-like memory
TLR : Toll-like receptor
TNF : Tumor necrosis factor
TRIM : Tripartite motif-containing
VC : Viremic controller
Vif : Viral infectivity factor
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
Vpr : Viral protein

FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Processus de développent des LB dans la moelle osseuse……26

Figure 2 : Processus de développement et de maturation des LT dans le thymus……28

Figure 3 : Les différentes populations de DCs dans la peau et les ganglions……29

Figure 4 : Présentation des antigènes sur les molécules du CMH-I et du CMH-II……31

Figure 5 : Processus de présentation d'antigènes endogènes sur les molécules du CMH-II…33

Figure 6 : Organisation et dynamique cellulaire dans les ganglions et la rate……35

Figure 7 : Différenciation d'un LT CD4+ naïf en LTh……38

Figure 8 : Régulation transcriptionnelle de la différenciation d'un LT $CD4^+$ naïf en Tfh……40

Figure 9 : Établissement d'une réponse T dépendante……53

Figure 10 : Sites de glycosylation des différentes classes d'Ig ……58

Figure 11 : Structure du VIH……64

Figure 12 : Cycle de réplication du VIH……65

Figure 13 : Les stades cliniques de l'infection par le VIH……66

Figure 14 : Production des anticorps anti-VIH au cours du temps……75

Figure 15 : Les sites de fixation des bnAbs……76

Figure 16 : Schéma bilan de la conclusion générale……185

Tableau 1: Caractéristiques des sous-types d'IgG……57

Tableau 2 : Dynamique des Tfh observée dans différentes études……70

Tableau 3 : Dynamique des pTfh chez les patients VIH^+……90

Tableau 4 : Phénotype des différentes populations de LB du sang……93

IMPACT DES TRAVAUX DANS LE DOMAINE

J'ai réalisé mes 3 année de thèse dans l'équipe « Immunobiologie des infections virales et présentation des antigènes » dirigée par le D^{r} Arnaud Moris au sein du Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris). Dans ce contexte, j'ai contribué à la compréhension de la physiopathologie de l'infection par le VIH en étudiant particulièrement les interactions hôte-pathogène.

Je me suis principalement intéressée aux interactions entre les Tfh et les LB lors de l'infection par le VIH. Ces travaux sont présentés en détail dans ce mémoire et ont donné lieu à l'écriture de 2 papiers dont je suis 1er auteur : 1er co-auteur pour les travaux présentés dans l'axe 1 (publiés dans le journal *Plos One*) et 1er auteur pour les travaux présentés dans l'axe 2 (soumission prochaine).

En parallèle, j'ai eu l'occasion de collaborer avec différents membres de l'équipe sur des projets visant à étudier la présentation des antigènes du VIH par les cellules dendritiques aux LT CD4^{+} et CD8^{+}. Dans ce contexte j'ai contribué à l'étude de l'implication de l'autophagie dans la présentation des antigènes du VIH en m'intéressant particulièrement à la présentation des antigènes de l'enveloppe aux LT CD4^{+}. Ces travaux, dont je suis 2ème co-auteur, ont été publiés dans *Journal of Immunology* (voir annexe 4). J'ai également contribué à l'étude de l'impact de l'engagement des récepteurs de l'immunité innée dans la présentation des antigènes du VIH aux LT CD8^{+}. Ces travaux, dont je suis 3ème auteur, sont en cours de révision dans *European Journal of Immunology* (voir annexe 7).

L'interaction Tfh/LB nécessite la présentation des antigènes par les LB. Ce mécanisme est très peu décrit dans le contexte de l'infection par le VIH. Pendant ma thèse, j'ai eu l'opportunité de collaborer avec l'équipe d'Olivier Thaunat à la mise au point d'une stratégie innovante permettant la présentation d'antigènes du VIH par des LB humains. Cette stratégie ouvre sur de nouvelles perspectives pour disséquer les voies impliquées dans la présentation des antigènes du VIH par les LB et a donné lieu à une publication, dont je suis 5ème auteur, dans le journal *Nano Letters* (voir annexe 5).

Enfin, mon intérêt pour l'étude des interactions Tfh/LB m'a amené à participer à l'écriture d'une revue portant sur la réaction du centre germinatif lors de l'infection par le VIH. Cette revue est en cours de révision dans le journal *Frontiers in Immunology* (voir annexe 6).

AVANT-PROPOS

Les anticorps sont produits lors des réponses immunitaires adaptatives par les lymphocytes B (LB). Ils reconnaissent spécifiquement les microorganismes pathogènes et participent à leur élimination. La production d'anticorps par les LB ne nécessite pas toujours l'intervention des lymphocytes T (LT), on parle des réponses T indépendantes. Les réponses T indépendantes sont assurées par des populations de LB particulières : les LB B1 et les LB de la zone marginale (MZ-LB). Les LB B1 se localisent dans la cavité péritonéale et la cavité pleurale tandis que les MZ-LB se situent dans la zone marginale de la rate. Ces LB reconnaissent des antigènes bactériens et initient rapidement la production d'anticorps pour former une première barrière protectrice (Fagarasan and Honjo, 2000). Les réponses T indépendantes s'initient suite à la reconnaissance de motifs antigéniques répétitifs particuliers et sont plus rares que les réponses T dépendantes.

A l'inverse, les réponses T dépendantes nécessitent des interactions entre les LT et les LB. La découverte de la coopération entre les LT et les LB permettant la production d'anticorps remonte aux années 60. Un des travaux princeps a montré que la production d'anticorps dirigés contre des globules rouges de mouton était diminuée dans des souris dépourvues de thymus, mettant en évidence le rôle des LT dans la production d'anticorps (Miller, 1965). Quelques années plus tard, la preuve qu'un LT spécifique d'une protéine « carrier » apporte l'aide nécessaire à la maturation d'un LB spécifique d'un haptène a permis de confirmer le rôle des LT dans la production d'anticorps (Mitchison, 1971). Cependant, à cette époque, il était suggéré que les antigènes se concentraient à la surface du LT pour être présentés au LB (Rajewsky et al., 1969). C'est seulement lors de la découverte du rôle des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II (CMH-II) (Rosenthal and Shevach, 1973) et du processus de chargement des peptides sur les molécules du CMH-II à la surface des LB (Lanzavecchia, 1982) que le mécanisme de cette interaction spécifique de l'antigène s'est éclaircie. Depuis, il est clairement établi que les antigènes sont reconnus par le récepteur (TCR) des LT $CD4^+$ sous forme de peptides associés aux molécules du CMH-II à la surface du LB.

Dans les années 2000, la population particulière de LT $CD4^+$ impliquée dans la production d'anticorps a été identifiée. Il s'agit des LT folliculaires « helper » (Tfh) (Schaerli et al., 2000). Ces Tfh expriment fortement la molécule CXCR5 leur permettant de se localiser dans les organes lymphoïdes secondaires (OLII) pour interagir avec les LB. La communication avec les

Tfh apporte l'aide nécessaire aux LB pour leur différenciation et la maturation d'affinité de leurs anticorps.

La production d'anticorps est altérée chez les personnes infectées par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Des hypergammaglobulinémies sont, par exemple, souvent observées chez ces patients. Finalement, seuls quelques rares individus VIH^+ produisent des anticorps anti-VIH capables de neutraliser un large spectre de souches du VIH (bnAbs : *broadly neutralizing antibodies*). Les bnAbs sont hautement mutés, suggérant des interactions successives des LB avec les Tfh. Cependant, dans la plupart des cas, les bnAbs n'apparaissent que plusieurs années après l'infection par le VIH.

Ces éléments suggèrent un défaut d'interaction entre les Tfh et les LB chez les patients infectés par le VIH. L'étude des mécanismes des interactions Tfh/LB lors de l'infection par le VIH semble donc cruciale pour comprendre le défaut global de la réponse humoral et la production tardive des bnAbs chez les patients infectés par le VIH.

ÉTAT DE L'ART

Dans ce chapitre, je détaillerai les différentes étapes de l'établissement d'une réponse immunitaire T dépendante permettant la production d'anticorps par les LB. Ces étapes correspondent à des interactions successives du LT $CD4^+$ avec différentes cellules présentatrices d'antigènes (APC) à différents endroits des OLII. Je commencerai par détailler les acteurs cellulaires d'une réponse T dépendante et la structure des OLII. Je passerai ensuite en revue les différentes interactions du LT $CD4^+$ avec les APC : (i) l'interaction d'un LT $CD4^+$ naïf avec une cellule dendritique (DC) initiant leur différenciation vers un profil Tfh dans la zone T ; (ii) l'interaction pré-Tfh/LB en bordure de la zone B ; (iii) puis l'interaction Tfh/LB dans les centres germinatifs (CG).

Je me placerai ensuite dans le cas de l'infection par le VIH en détaillant les altérations de la réponse T dépendante dans ce contexte pathologique. Nous verrons l'impact de l'infection sur les Tfh, les LB et la production des anticorps.

Pour finir j'aborderai les possibilités d'un suivi immunologique des réponses T et B dans le sang de façon à apprécier la qualité de la réponse immunitaire dans des contextes pathologiques et dans le cadre de protocoles de vaccination.

1. Etablissement de la réponse T dépendante

1.1 Acteurs cellulaires et localisation de la réponse T dépendante

Les LT et les LB se développent dans les organes lymphoïdes primaires (OLI), respectivement dans le thymus et la moelle osseuse (MO).

Le développement du LB du stade pro-B au stade transitionnel immature a lieu dans la MO. A la sortie de la MO, les LB expriment un récepteur (BCR) fonctionnel. Quant aux LT, ils se différencient dans la MO puis migrent dans le thymus pour la maturation de leur TCR.

Les antigènes (Ag) de la lymphe et/ou du sang sont acheminés jusqu'aux OLII. La forte concentration d'Ag dans les OLII permet leur rencontre avec des LT et des LB naïfs et l'initiation des réponses immunitaires adaptatives. Le BCR des LB reconnaît des antigènes solubles ou particulaires à la surface de cellules comme les macrophages alors que le TCR des LT reconnaît uniquement des antigènes présentés sur les molécules du CMH par une APC telle qu'une cellule dendritique (DC). Les DC patrouillent en périphérie et participent à la réponse innée avant de migrer vers les OLII pour présenter des antigènes aux LT et initier la réponse adaptative. Les DC jouent donc un rôle pivot entre les réponses immunitaires innées et adaptatives.

Dans cette partie je vais décrire le développement et la maturation des LB, des LT et des DC. Nous verrons ensuite la présentation des Ag sur les molécules du CMH. Pour finir, j'aborderai la structure des principaux OLII.

1.1.1 Développement des acteurs cellulaires d'une réponse T dépendante

1.1.1.1. Les LB

Les LB se développent dans la MO à partir d'un progéniteur commun lymphoïde (PCL), lui-même dérivé d'une cellule souche hématopoïétique (Eibel et al., 2014; Pieper et al., 2013). Les différents stades de développement des LB dans la MO se distinguent par l'expression progressive du BCR **(Fig.1)**.

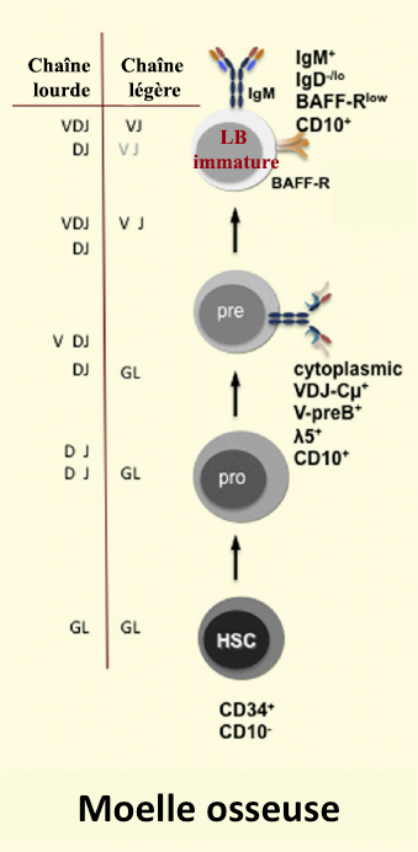


Figure 1 *: Processus de développent des LB dans la moelle osseuse.* ***Adaptée de (Pieper et al., 2013)****.Une cellule souche (HSC) s'engage dans la voie de développement des LB. La recombinaison des segments V, D et J de la chaîne lourde s'initie au stade pro-B. La recombinaison de la chaîne légère a lieu au stade pré-B. Le LB immature exprime une Ig de type IgM et quitte la MO pour rejoindre la rate. GL, Germline.*

Le BCR est une immunoglobuline (Ig) composée de deux chaînes lourdes (chaînes H) et deux chaînes légères (chaînes L qui peuvent être de sous type κ ou λ). L'expression du BCR nécessite le réarrangement des segments de gènes V (*variable*), D (*diversity*) et J (*joining*) des chaînes lourdes et uniquement V et J des chaînes légères. Le passage du stade hématopoïétique au stade pro-B se caractérise par la recombinaison des segments D et J des chaînes lourdes. Au stade pré-B, le LB exprime à sa surface un pré-BCR composé des chaînes lourdes entièrement réarrangées (V et DJ) associées à des substituts de chaînes légères. Suite au réarrangement des segments V et J des chaînes légères, le LB dit « immature » exprime un BCR de type IgM (chaînes lourdes μ) et quitte la MO pour rejoindre la rate (Pieper et al., 2013) (**Fig.1**). Le processus de réarrangement des fragments V, D et J fait

intervenir les protéines RAG-1 et RAG-2. La mutation d'une de ces protéines chez la souris bloque le développement des LB et des LT (Mombaerts et al., 1992; Shinkai et al., 1992).
La dernière étape de maturation du LB aura lieu dans la rate. Nous l'aborderons plus en détail dans la partie «1.3.1».

1.1.1.2. Les LT

Le développement des LT a été détaillé dans une revue de Koch et Radtke en 2011 (Koch and Radtke, 2011).
Les LT se différencient également dans la MO à partir du même PLC que les LB puis migrent dans le thymus. Le LT immature évolue dans les différentes zones du thymus et sa maturation se traduit notamment par le réarrangement progressif de son TCR (**Fig.2**).
Les stades de la maturation du LT sont connus sous les noms de : DN1 (Double Négatif), DN2, DN3, DN4, DP (Double positif) et SP (Simple Positif) faisant référence à l'expression différentielle des molécules CD4 et CD8 au cours de la maturation (**Fig.2**).

Le TCR est constitué d'une chaîne α et d'une chaîne β (nous n'aborderons pas les LTγδ qui rejoignent la circulation à partir du stade DN2/DN3). Le réarrangement de la partie variable de ces deux chaînes se déroule sur le même principe que pour les chaînes des Ig. Les segments V, D et J de la chaîne β du TCR se réarrangent lors des stades DN2 et DN3. Au stade DN4, le TCR est composé d'une chaîne β réarrangée et d'un substitut de chaîne α. La chaîne α, composée des segments de gènes V et J, se réarrange lors du stade DP (Koch and Radtke, 2011). A la fin du stade DP, le LT exprime un TCR fonctionnel et subit la sélection positive et négative. La sélection consiste à éliminer les LT qui reconnaissent les antigènes du soi et à diriger le LT vers le lignage CD4 ou CD8 selon la reconnaissance des molécules CMH-II ou CMH-I par leur TCR (Klein et al., 2009). Moins de 5% des LT SP $CD4^+$ ou SP $CD8^+$ rejoindront la circulation suite à la sélection. Ils pourront ensuite, tout comme les LB, accéder aux ganglions via la veinule à endothélium épais (HEV) et à la rate via la veine splénique.

Dans les LT et les LB, la recombinaison VDJ des TCR et des BCR permet d'obtenir un répertoire diversifié, capable de reconnaître un grand nombre d'Ag. Cette diversité est due à l'association aléatoire des segments V, D et J et à l'ajout ou délétion de bases nucléiques à la jonction de ces différents segments pendant la recombinaison. Au cours de la différenciation du LB, Le BCR subira d'autres modifications influençant sa diversité et son affinité.

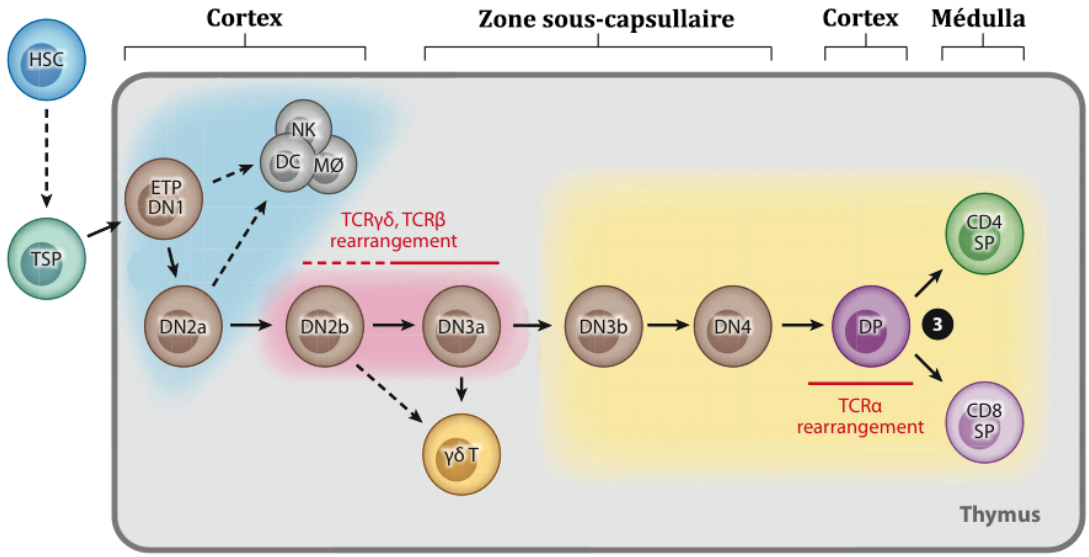


Figure 2 *: Processus de développement et de maturation des LT dans le thymus.* ***Adaptée de (Koch and Radtke, 2011).*** *Le progéniteur thymique (TSP) est dérivé d'une cellule souche (HSC) provenant de la MO. La maturation du LT a lieu dans le thymus en plusieurs étapes successives en progressant dans les différentes zones du thymus (cortex, zone sous-capsulaire et médulla). Les stades DN1 et DN2a ont encore le potentiel de se différencier en DC, NK ou macrophage. Les LTγδ dérivent des stades DN2b et DN3a. Les LT ayant réarrangé la chaîne β du TCR continuent leur maturation dans le thymus et réarrangent ensuite la chaîne α du TCR. A la fin du stade DP, le LT exprime un TCR mature ainsi que les molécules CD4 et CD8. Suite au processus de sélection, le LT exprimera CD4 ou CD8 et rejoindra la circulation. DN, double négatif ; DP, double positif ; SP, simple positif ; TSP, thymic seeding progenitor ; ETP, early thymic progenitor.* α et β *correspondent aux chaînes du TCR.*

1.1.1.3. Les DC

Classiquement, il est décrit que les DC se développent à partir d'un progéniteur myéloïde commun (PMC) dans la MO. Cependant, elles peuvent également provenir d'un PLC. Ainsi les précurseurs des DC seraient des PMC et des PLC exprimant FLT3 (D'Amico and Wu, 2003).

Ces progéniteurs donnent naissance à des précurseurs sanguins qui, sous l'influence de diverses cytokines, vont se différencier en plusieurs sous-populations de DC pouvant notamment rejoindre les tissus (Haniffa et al., 2013).

Les DC forment une population hétérogène et sont classées selon leurs localisations et leurs fonctions (Heath and Carbone, 2009; Mildner and Jung, 2014) (**Fig.3**).

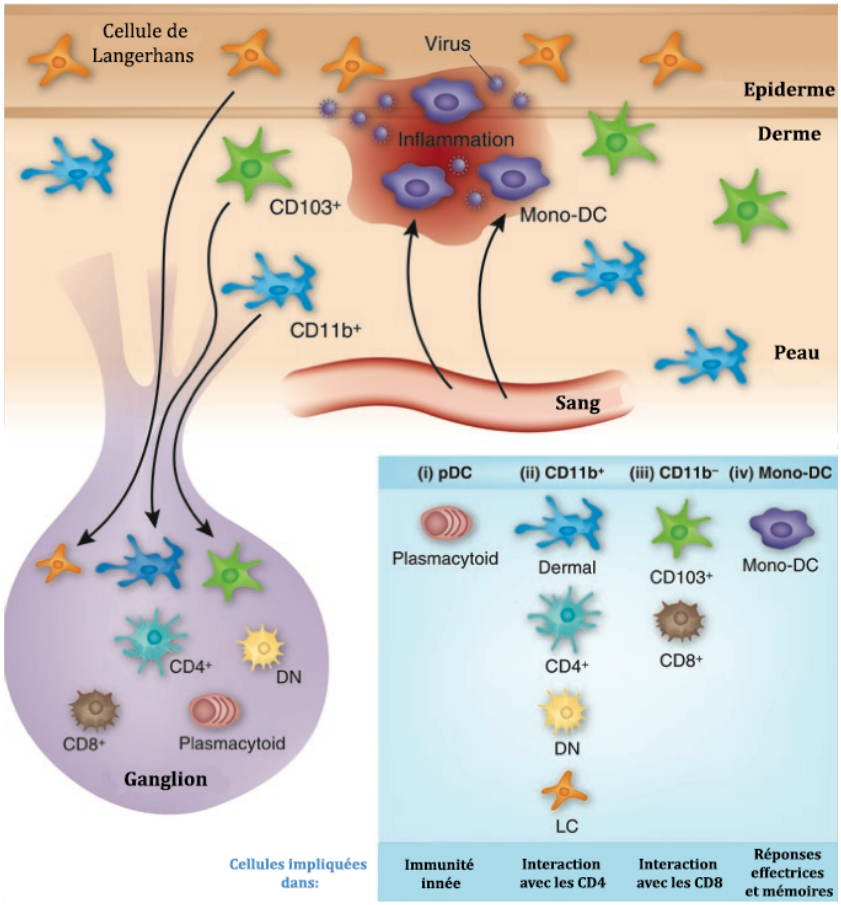


Figure 3 *: Les différentes populations de DCs dans la peau et les ganglions.* ***Adaptée de (Heath and Carbone, 2009).*** *Suite à la capture d'un antigène, les cellules de Langerhans (LC) et les DCs CD11b$^+$ et CD11b$^-$ migrent dans les ganglions pour interagir avec des LT CD4$^+$ ou CD8$^+$. Les DCs plasmacytoides (pDC) sont impliquées dans les réponses immunitaires innées. Les DCs dérivées de monocytes (Mono-DC) sont localement recrutées lors d'une inflammation.*

De façon générale, on distingue les DC résidentes, restant immatures en absence d'infection (Wilson et al., 2003), et les DC migratoires matures. Les DC résidentes patrouillent dans les tissus et capturent constamment des antigènes. Elles expriment une grande variété de récepteurs de l'immunité innée, dont les TLR (*Toll Like receptor*), permettant la

reconnaissance de motifs microbiens. La présence d'antigènes microbiens et/ou une atteinte des tissus induisent la maturation et la migration des DC vers les OLII (**Fig.3**). Les DC migratoires capturent moins d'Ag, sur-expriment les molécules de co-stimulation et maintiennent plus longtemps l'expression des complexes CMH chargés avec le peptide ($CMH^{peptide}$) à leur surface (Haniffa et al., 2013).

1.1.2. La présentation des antigènes sur les molécules du CMH

Le TCR des LT reconnaît les Ag présentés sous forme de peptides sur les molécules du CMH. Le TCR des LT $CD8^+$ reconnait des Ag sur le CMH-I alors que le TCR des LT $CD4^+$ reconnaît des Ag sur le CMH-II. De plus, tandis que les molécules du CMH-I sont exprimées de façon ubiquitaire, seuls les APC expriment les molécules du CMH-II.
Les voies d'apprêtement des Ag sur les molécules du CMH-I ou du CMH-II sont différentes (Blum et al., 2013) (**Fig.4**).

1.1.2.1. Présentation sur les molécules du CMH-I

Les molécules du CMH-I sont constituées d'une chaîne lourde divisée en 3 domaines (α1, α2 et α3) ancrés à la membrane, associée à une sous-unité β2-microglobuline au niveau du domaine α3. Le TCR d'un LT $CD8^+$ reconnaît l'Ag au niveau du sillon peptidique situé entre les régions α1 et α2. L'interaction est renforcée par la liaison de la molécule CD8 à la partie α3 du CMH-I. Les peptides présentés sur les molécules du CMH-I proviennent généralement de la dégradation de protéines endogènes via le protéasome. Les protéines clivées sont acheminées dans le réticulum endoplasmique par les transporteurs TAP où elles sont ensuite chargées sur les molécules du CMH-I préalablement assemblées. Le complexe $CMH\text{-}I^{peptide}$ est finalement exprimé à la surface de la cellule (Blum et al., 2013) (**Fig.4** à gauche).
Cependant les APC sont capables d'apprêter et de présenter sur les molécules du CMH-I des peptides issus de la dégradation d'Ag phagocytés provenant du milieu extracellulaire. Ce mécanisme est appelé « présentation croisée » et les DC sont les APC les plus aptes à effectuer ce type de présentation (Joffre et al., 2012) (**Fig.4** à droite).

La présentation des antigènes sur les molécules du CMH-I est indispensable à l'initiation d'une réponse T CD8 cytotoxique, en particulier contre les cellules infectées et les cellules tumorales.

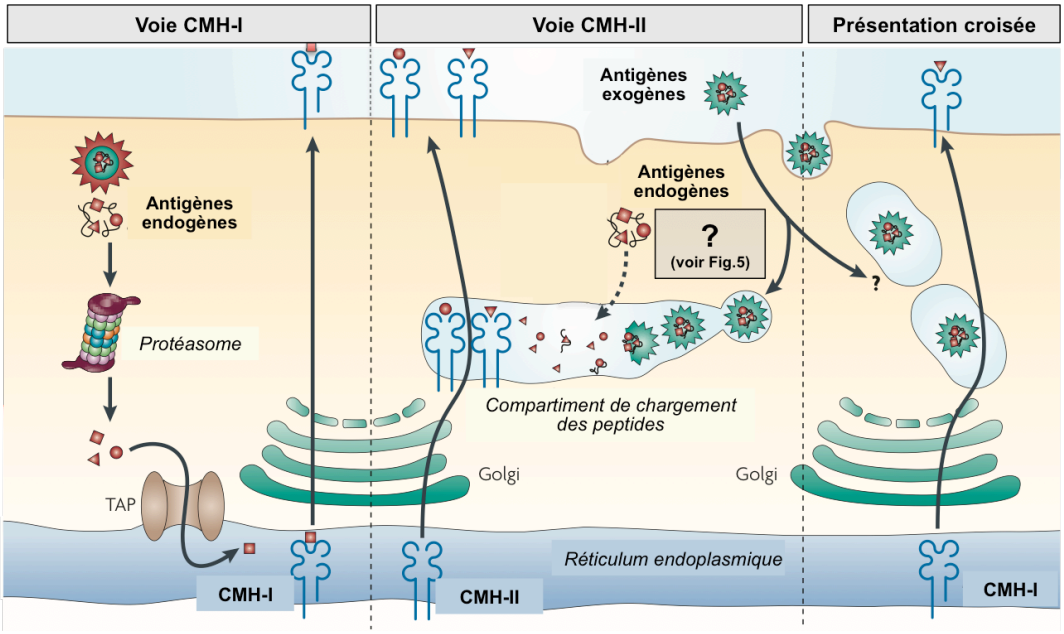


Figure 4 *: Présentation des antigènes sur les molécules du CMH-I et du CMH-II.* ***Adaptée de (Villadangos and Schnorrer, 2007).*** *Les Ag endogènes sont présentés sur les molécules du CMH-I en empruntant la voie du protéasome (panel de gauche). Des Ag exogènes peuvent également être présentés sur les molécules du CMH-I par le mécanisme de présentation croisée (panel de droite). Généralement, les Ag exogènes sont chargés sur les molécules du CMH-II dans le compartiment de chargement des peptides (panel du milieu). Le complexe CMH-II^{peptide} est ensuite exprimé à la surface de la cellule. La présentation d'Ag endogènes sur les molécules du CMH-II est illustrée dans la Figure 5.*

1.1.2.2. Présentation sur les molécules du CMH-II

Les APC (DC, monocytes, macrophages, LB) expriment les molécules du CMH-II. Les molécules du CMH-II sont constituées de deux chaînes homologues α et β ancrées à la membrane. Chaque chaîne est organisée en deux sous-domaines (α1/α2 et β1/β2). Le sillon peptidique se forme au niveau des sous-domaines α1 et β1 et est plus ouvert que celui du CMH-I, permettant ainsi la fixation de peptides plus longs. Le TCR d'un LT CD4$^+$ reconnaît l'Ag au niveau du sillon peptidique et l'interaction est renforcée par la liaison de la molécule CD4 au niveau de la région β2 du CMH-II. Les peptides présentés sur le CMH-II proviennent

classiquement d'Ag internalisés par phagocytose, macropinocytose ou endocytose par les APC dans le milieu extracellulaire. Les Ag sont dégradés dans le lysosome qui va ensuite fusionner avec le compartiment de chargement des peptides. Ce compartiment contient les molécules CMH-II qui vont être chargées avec les peptides puis exprimées à la surface de la cellule (Blum et al., 2013) (**Fig.4** au centre).

Des Ag endogènes sont également présentés sur les molécules du CMH-II. Des antigènes viraux d'influenza peuvent notamment être chargés sur les molécules CMH-II probablement via les transporteurs TAP et le protéasome. D'autre part, des protéines cytoplasmiques et nucléaires peuvent être séquestrées dans un autophagosome puis dégradées suite à la fusion de ce compartiment avec un lysosome pour enfin être chargées sur les molécules du CMH-II (macroautophagie) (**Fig.5**). Nous avons récemment montré au laboratoire que le ciblage de la protéine gag du VIH dans les autophagosomes améliore l'activation des LT $CD4^+$ (Coulon et al., 2016) (voir annexe). Des antigènes peuvent également être ciblés vers une dégradation lysosomale par l'autophagie dépendante des protéines chaperonnes (CMA) et ainsi rejoindre le compartiment de chargement des peptides (**Fig.5**).

La présentation des Ag sur les molécules du CMH-II permet d'initier les réponses immunitaires adaptatives d'une part en orientant et initiant la différenciation des LT (interaction LT $CD4^+$ / DC) et d'autre part en intervenant dans la réaction du CG (interaction Tfh / LB).

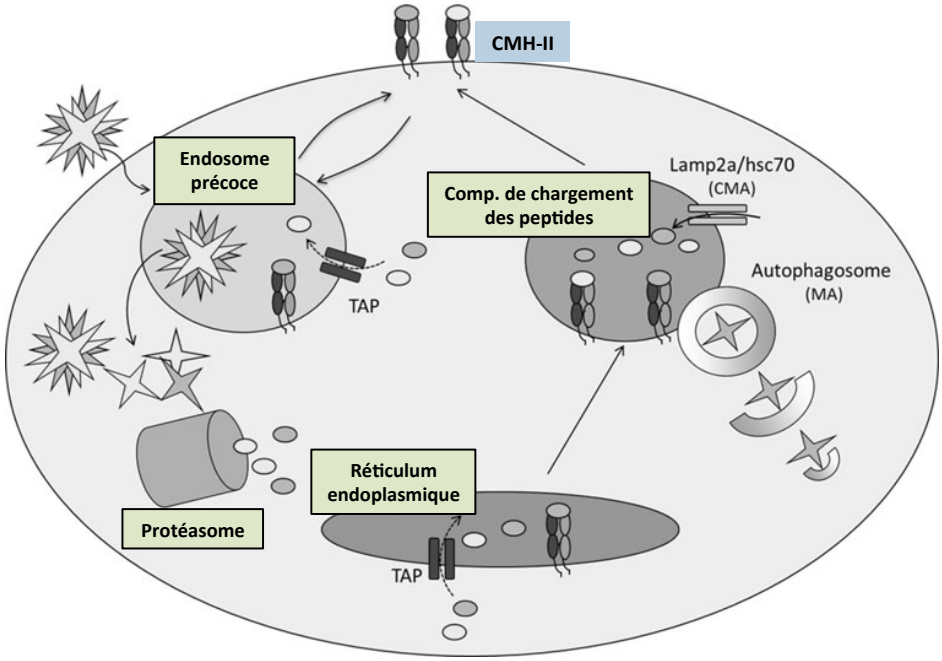


***Figure 5** : Processus de présentation d'antigènes endogènes sur les molécules du CMH-II.* ***Adaptée de (Eisenlohr et al., 2011)**. Des Ag endogènes peuvent être présentés sur les molécules du CMH-II en empruntant les transporteurs TAP ou via le processus d'autophagie : macroautophagie (MA) ou autophagie dépendante des protéines chaperonnes (CMA).*

Les molécules du CMH-I et du CMH-II présentent divers Ag à la surface des cellules et participent à la mise en place des réponses immunitaires. Alors que l'interaction TCR/CMH-I soutient les réponses cytotoxiques, l'interaction TCR/CMH-II va plutôt initier les réponses immunitaires adaptatives dépendantes des LT $CD4^+$. Bien que, généralement, les molécules du CMH-I fixent des Ag endogènes et les molécules du CMH-II des Ag exogènes, les deux molécules ont finalement accès aux deux types d'Ag par le biais de voies alternes.

Dans le contexte de l'établissement des réponses immunitaires T dépendantes, nous allons nous intéresser principalement à la présentation des Ag sur les molécules du CMH-II aux LT $CD4^+$ dans les OLII.

1.1.3 Établissement des réponses T dépendantes dans les OLII

Les OLII peuvent être encapsulés et structurés, comme les ganglions et la rate, ou non encapsulés dans un organe, comme les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (TLAM). Les TLAM regroupent les plaques de Peyer, les amygdales et les tissus lymphoïdes associés aux voies respiratoires.

Les ganglions concentrent des Ag interstitiels, tandis que la rate, très vascularisée, permet de piéger des Ag circulant dans le sang. Enfin, les TLAM protègent les muqueuses auxquelles ils sont associés en accumulant les Ag locaux.
Je vais détailler la structure et la composition des ganglions et de la rate, organes sur lesquels je me concentrerai par la suite pour décrire les réponses T dépendantes.

1.1.3.1. Les ganglions

Les ganglions, aussi appelés nœuds lymphatiques, se situent à la jonction des vaisseaux lymphatiques et sont répartis dans tout l'organisme. Ils sont majoritairement constitués de lymphocytes et d'APC (Gasteiger et al., 2016). Les DC chargées d'Ag et les Ag solubles entrent dans les ganglions par les vaisseaux lymphatiques afférents situés tout autour de la capsule. Les LT et les LB accèdent aux ganglions par la HEV et vont se repartir dans des zones distinctes de l'organe : le cortex (zone B) et le paracortex (zone T). La répartition dans ces différentes zones est dictée par des gradients de chimiokines (CXCL13 pour la zone B et CCL19/CCL21 pour la zone T) (Cesta, 2006) (**Fig.6** à gauche).
La zone T est le lieu d'interactions entre les LT et les DC. La zone B, riche en LB, macrophages et DC folliculaires (FDC), s'organise en follicules lymphoïdes où les LB se différencient et prolifèrent. Des CG se forment au sein de ces follicules lors de l'activation des LB (Gasteiger G et al., 2016).
Les LT et les LB peuvent quitter les ganglions par les vaisseaux lymphatiques efférents.

1.1.3.2. La rate

La rate, organe beaucoup plus volumineux qu'un ganglion, est située dans l'hypocondre gauche. Elle a à la fois un rôle dans l'immunité mais également dans la régénération des hématies. Ces deux rôles sont associés à des structures bien distinctes de la rate : la pulpe rouge et la pulpe blanche (Mebius and Kraal, 2005).
La pulpe rouge constitue 99% de l'organe et abrite majoritairement des macrophages impliqués dans la dégradation des hématies. L'activité immunitaire de la rate se situe dans la pulpe blanche, ne représentant finalement que 1% de l'organe. La pulpe blanche s'organise

autour des artérioles. Cette configuration particulière permet la détection des microorganismes du sang. Dans chaque région de pulpe blanche de la rate, la même organisation que le ganglion est retrouvée : une zone T (LT et DC) surplombée par une zone B (LB, macrophages, FDC) et en périphérie une zone marginale spécifique à la rate (Mebius and Kraal, 2005) (**Fig.6** à droite). La zone marginale abrite des LB particuliers (MZ-LB) impliqués dans la réponse T indépendante. Les MZ-LB forment une première barrière de protection notamment contre les polysaccharides bactériens (Martin and Kearney, 2002).

Contrairement aux ganglions, la rate n'est pas directement drainée par les vaisseaux lymphatiques (**Fig.6** à droite). Cet organe est considéré comme un « filtre » du sang en intervenant à la fois dans la régénération les hématies et dans l'immuno-surveillance des agents infectieux ou des éléments immunogènes circulant dans le sang.

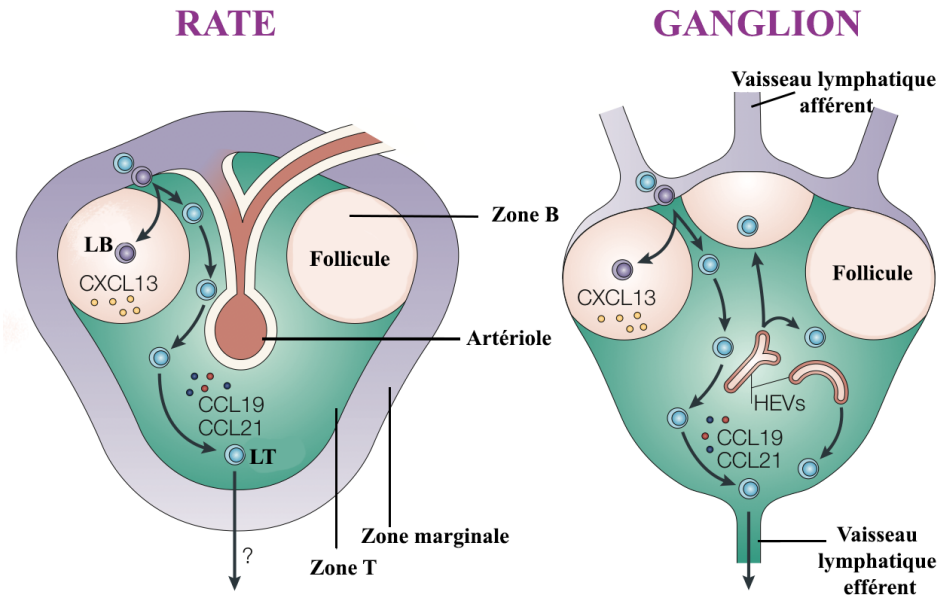


Figure 6 *: Organisation et dynamique cellulaire dans les ganglions et la rate.* ***Adaptée de (Mebius and Kraal, 2005).*** *Les nodules de la rate (à gauche) et les ganglions (à droite) sont constitués d'une zone T (en vert) et une zone B (en beige). La rate est constituée de plusieurs nodules constituant la pulpe blanche. Chaque nodule est irrigué par une artériole. La présence d'une zone marginale est spécifique à la rate. Cette zone héberge les MZ-LB. Les ganglions, contrairement à la rate, sont directement irrigués par des vaisseaux lymphatiques. Dans les ganglions comme dans la rate, les LT et les LB se localisent dans leur zone respective en suivant un gradient de chimiokines : CXCL13 (zone B) et CCL19/CCL21 (zone T). Les lymphocytes quittent les ganglions par les vaisseaux lymphatiques efférents. Le processus de sortie à partir de la rate reste, quant à lui, mal décrit.*

Mon but étant de décrire la mise en place d'une réponse immunitaire T dépendante, je vais par la suite me concentrer sur les LT $CD4^+$. Nous allons aborder les étapes successives de la mise en place de cette réponse depuis la rencontre d'un LT $CD4^+$ naïf avec une DC jusqu'à la réaction du CG.

1.2. Interactions entre le LT $CD4^+$ naïf et la DC dans la zone T

Dans la zone T des OLII, les LT $CD4^+$ naïfs vont rencontrer pour la première fois l'Ag présenté par les DC. Cette interaction permettra au LT $CD4^+$ activé de se différencier en un LT auxiliaire ou « *helper* » (LTh) avec un phénotype et des fonctions particulières. Dans cette partie, je vais d'abord décrire les signaux impliqués dans l'interaction LT/DC. J'aborderai ensuite les différentes populations de LTh qui se différencient au contact de la DC. Pour finir, je détaillerai le processus de différenciation des LT $CD4^+$ en Tfh.

1.2.1. Les signaux nécessaires à l'activation d'un LT

Trois signaux sont indispensables à l'activation et la différenciation d'un LT lors de son interaction avec une DC : La **reconnaissance de l'Ag**, la **co-stimulation** et les **cytokines (Fig.9 (1))**.

- *La reconnaissance de l'Ag* : le TCR du LT $CD4^+$ reconnaît l'Ag sous forme de peptides présentés sur les molécules du CMH-II. La DC capture l'Ag, le dégrade en peptides et les charge sur les molécules du CMH-II. Le complexe CMH-$II^{peptide}$ est ensuite exprimé à la surface de la cellule. Ces différentes étapes conditionnent la quantité de peptides présentés à la surface de la DC. La densité des complexes CMH-$II^{peptide}$ peut influencer l'intensité de l'interaction avec le LT et diriger sa différenciation (Fazilleau et al., 2009; Panhuys, 2016).

- *La co-stimulation* : Les DC expriment à leur surface les molécules CD80 et CD86 interagissant avec la molécule CD28 exprimée à la surface des LT. L'engagement de CD28 entraîne l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-xL dans les LT et permet leur survie

(Boise et al., 1995). Les LT expriment d'autres molécules telles que ICOS, OX40, CD40L, CD27 et CD157 (4-1BB). Les ligands de ces molécules sont exprimés par les DC et leur engagement est nécessaire à la différenciation complète des LT. La seule reconnaissance de l'Ag par le TCR, en l'absence de ces signaux de co-stimulation, interrompt l'activation du LT et entraîne sa tolérance vis à vis de l'Ag (Schwartz, 2003).

- *Les cytokines* sont des molécules impliquées dans la transmission des signaux entre les cellules du système immunitaire. Il peut s'agir d'interleukines (IL), d'interférons (IF), de facteurs nécrosant les tumeurs (TNF), de facteurs de croissance transformant (TGF) ou de facteurs stimulants les colonies (CSF). Elles sont notamment sécrétées par les DC et permettent d'orienter la différenciation des LT $CD4^+$ vers les différentes sous-populations de LTh. Je détaillerai dans le paragraphe suivant la diversité de ces cytokines et leur implication dans la différenciation des sous-types de LTh.

En conclusion, l'engagement du TCR permet l'activation du LT, la co-stimulation assure sa survie et les cytokines sont impliquées dans sa différenciation et sa polarisation.

1.2.2. Diversité des LTh

Pendant longtemps, la réponse T CD4 auxiliaire a été définie de façon restrictive. Il était considéré qu'un LT $CD4^+$ naïf se différenciait soit en LTh1 soit en LTh2 suite à son interaction avec une DC. Les LTh1 pouvant soutenir la réponse cytotoxique et les LTh2 la réponse humorale (Mosmann and Coffman, 1989).
Aujourd'hui, nous avons une vision plus complète de la diversité des LTh. On distingue des LTh effecteurs et des LTh régulateurs. Les LTh effecteurs regroupent les Th17 (Korn, 2009), les Th9 (Veldhoen et al., 2008), les Th22 (Eyerich et al., 2009) et les Tfh (Schaerli et al., 2000) en plus des Th1 et des Th2. les LTh régulateurs comprennent les Treg naturels (nTreg) (Ng et al., 2001), les Treg induits (iTreg) (Baecher-Allan, 2001) et les Tfh régulateurs (Tfr) (Linterman et al., 2011).
La différenciation d'un LT $CD4^+$ vers les différents sous types de LTh effecteurs est conditionnée par un environnement cytokinique propre à chaque filiation. De plus, chaque

LTh est associé à l'expression d'un facteur de transcription « signature » qui dirige leur engagement dans cette voie de différenciation (**Fig.7**).

Un LT CD4$^+$ naïf peut acquérir des fonctions régulatrices en se différenciant en iTreg. Par contre, les nTreg sont initiés dès le développement des LT CD4$^+$ dans le thymus. L'interaction entre un nTreg naïf et une DC dans les OLII, permet de « spécialiser » le nTreg. Ainsi, un nTreg recevant les signaux impliqués dans la différenciation en Tfh, peut se différencier en Tfr spécialisé dans la régulation du CG.

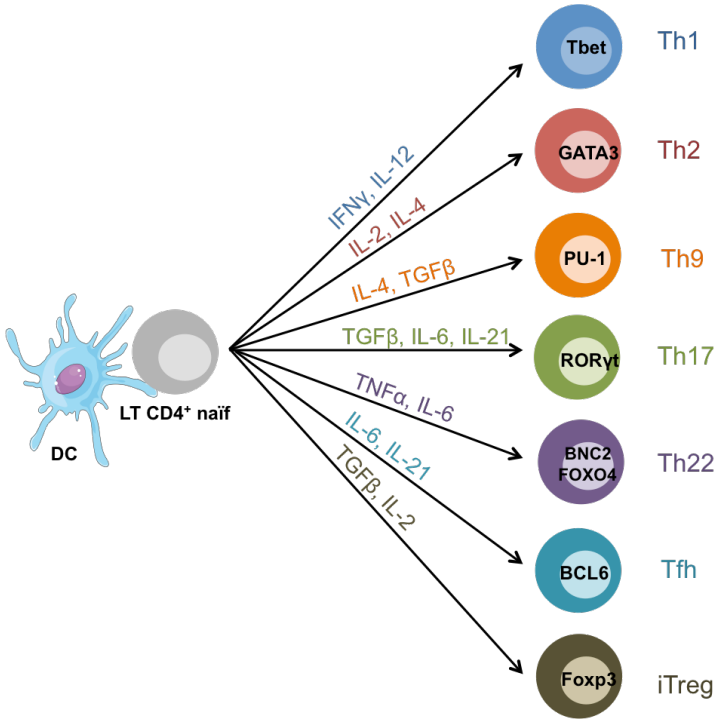


***Figure 7** : Différenciation d'un LT CD4$^+$ naïf en LTh. Selon l'environnement cytokinique imposé par la DC, le LT CD4$^+$ se différencie en un LTh particulier. Chaque LTh est associé à l'expression d'un facteur de transcription « signature ». Les nTreg ne sont pas représentés dans cette figure car ils sont initiés dès leur développement dans le thymus.*

1.2.3. Engagement de la différenciation d'un LT CD4$^+$ naïf en Tfh

La différenciation en Tfh est complexe et multifactorielle. L'interaction avec la DC n'est que la première étape permettant au LT CD4$^+$ de devenir un pré-Tfh.

L'engagement, par la DC, de la molécule ICOS à la surface du LT CD4$^+$ est requis pour l'orienter vers une différenciation en Tfh. L'absence d'expression d'ICOS bloque la

différenciation des LT $CD4^+$ en Tfh et se traduit par l'absence de ces cellules chez la souris (Choi et al., 2011).

La sécrétion d'IL-6 et d'IL-21 par les DC favorise la différenciation en Tfh en engageant respectivement les voies STAT1 et STAT3 (Choi et al., 2013; Nurieva et al., 2008; Vogelzang et al., 2008). Au contraire, l'IL-2 limite cette orientation via STAT5 (Ballesteros-tato et al., 2012; Johnston et al., 2012).

Peu d'éléments sont connus concernant le sous-type de DC capable d'induire la différenciation en Tfh. Il y a probablement plusieurs voies possibles impliquant des sous-type de DC différents selon les conditions (Ballesteros-Tato and Randall, 2014). Une étude récente démontre, par exemple, que l'engagement de la molécule DC-SIGN par des motifs fucosés permet à la DC d'orienter la différenciation d'un LT $CD4^+$ en Tfh (Gringhuis et al., 2014). Cette différenciation est dépendante de l'IL-27 produite par les DC.

Précocement au cours de l'initiation de la différenciation en Tfh, le répresseur transcriptionnel Bcl-6 est exprimé (Baumjohann et al., 2011). L'expression de Bcl-6 est nécessaire et suffisante à la différenciation des Tfh. Au contraire, Blimp1 inhibe cette différenciation (Johnston et al., 2009). Une régulation fine de l'expression des facteurs de transcription impliqués dans l'orientation vers les différentes populations de LTh est indispensable. Les microARN (miARN) miR-17~92 répriment l'expression des facteurs de transcription guidant la différenciation en Th17 et Th22 de façon à favoriser l'orientation en Tfh. Des souris déficientes pour miR-17~92 produisent des Tfh hybrides, c'est à dire exprimant certains gènes associés aux Tfh en plus de gènes associés aux Th17 et aux Th22 (Baumjohann et al., 2013a). Bcl-6 et Blimp1 sont les facteurs de transcription les plus référencés dans la littérature pour leur rôle respectif dans l'initiation et la répression de la différenciation d'un LT $CD4^+$ en Tfh. Cependant, de nombreux autres facteurs de transcription sont impliqués (Liu et al., 2013; Stauss et al., 2016; Vinuesa et al., 2016). La **figure 8** résume la régulation transcriptionnelle initiée dans un LT $CD4^+$ lors de sa différenciation en Tfh, en lien avec les voies en amont et en aval de ces facteurs de transcription.

D'autre part, la balance entre Th1 et Tfh est régulée par la voie de signalisation de mTOR, associée au métabolisme de la cellule. Une faible activité de mTOR dans les Tfh permet de maintenir l'expression de NFAT ce qui n'est pas le cas des Th1 (Ray et al., 2015). NFAT est

d'ailleurs requis pour la sécrétion d'IL-21, une cytokine sécrétée spécifiquement par les Tfh (Kim, 2005).

L'interaction avec la DC permet d'initier la différenciation du LT $CD4^+$ en Tfh mais ne permet pas sa différenciation complète (Goenka et al., 2011). Pour poursuivre sa différenciation, le pré-Tfh doit interagir avec d'autres APC. L'expression de la molécule CXCR5 par le pré-Tfh lui permet de migrer à la bordure entre les zones T et B, en suivant un gradient de chimiokines CXCL13, pour interagir avec un LB (Nurieva et al., 2008).

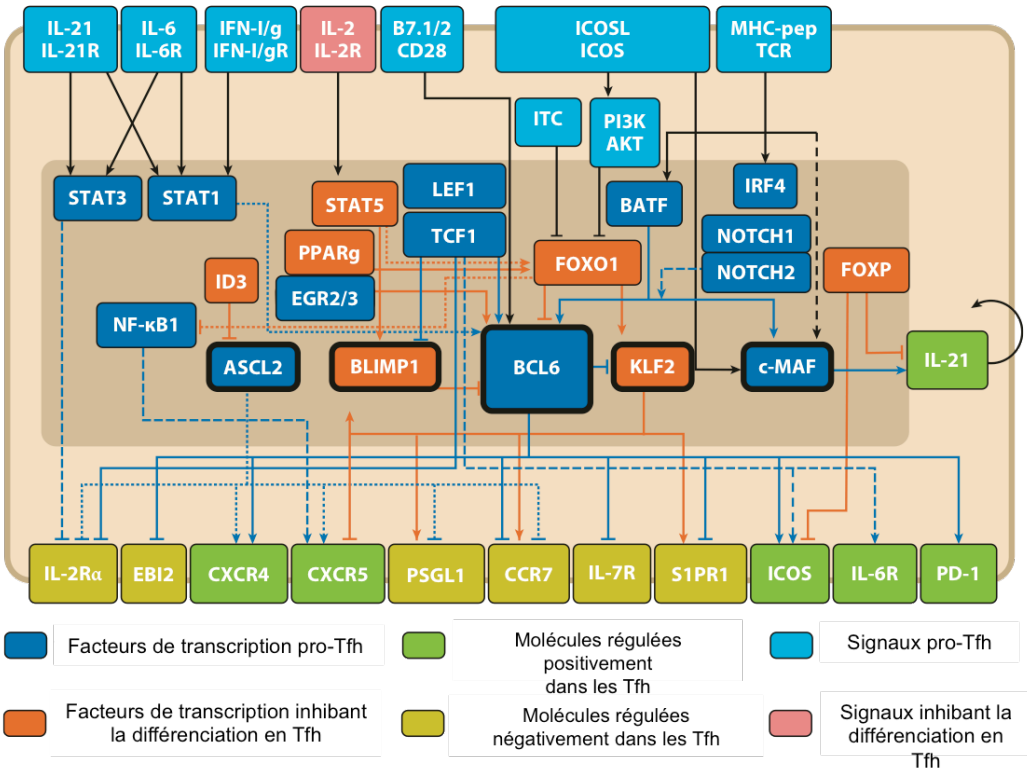


Figure 8 *: Régulation transcriptionnelle de la différenciation d'un LT $CD4^+$ naïf en Tfh.* ***Adaptée de (Vinuesa et al., 2016)****. Les facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la différenciation des Tfh sont représentés au centre de la figure (cadres bleu foncé et orange). De nombreux signaux se situent en amont de ces facteurs de transcription et vont permettre d'initier ou d'inhiber leur expression (cadres bleu clair et rose). Le profil transcriptionnel du Tfh dicte l'expression de diverses molécules à la surface de la cellule (cadres vert clair et vert foncé).*

1.3. Interactions entre le pré-Tfh et le LB à la bordure de la zone B

L'expression de CXCR5, amorcée par son interaction avec la DC, permet au pré-Tfh de rejoindre la bordure T/B pour interagir avec une seconde APC : le LB. Nous avons précédemment abordé le développement des LB dans la MO jusqu'à son arrivée à un stade immature dans la rate. Dans cette partie, je vais d'abord détailler la maturation du LB et son activation suite à la reconnaissance de l'Ag. Je décrirai ensuite les acteurs moléculaires impliqués dans son interaction avec le pré-Tfh puis l'impact de cette interaction sur le LB.

1.3.1. Maturation et activation du LB dans la rate

1.3.1.1. Du lymphocyte B transitionnel au LB mature

A leur entrée dans la rate, les LB sont à un stade transitionnel et expriment l'IgD en plus de l'IgM. L'expression du récepteur BAFFR leur permet de recevoir un signal de survie (Mackay et al., 2003).

Les LB transitionnels se subdivisent en 3 stades (T1, T2 et T3) se caractérisant par une perte progressive de l'expression des marqueurs CD24 et CD38. Ces sous-types ont d'abord été mis en évidence chez la souris (Loder et al., 1999) puis leur présence a été confirmée chez l'Homme (Palanichamy et al., 2009). Les LB T1 sont considérés comme les précurseurs des T2 qui eux même sont les précurseurs de T3. A l'inverse des sous-types T1 et T2, les LB T3 ont perdu l'expression de la molécule CD10, un marqueur des cellules immatures (Kaminski et al., 2012). De ce fait le stade T3 est considéré comme un intermédiaire entre les LB immatures et les LB matures naïfs.

1.3.1.2. Activation du LB

L'activation du LB est induite suite à la reconnaissance de l'Ag par le BCR. La plupart du temps, les antigènes sont présentés aux LB sous forme de complexes immuns à la surface de macrophage ou de FDC (Batista and Harwood, 2009). La liaison de l'antigène par le BCR entraîne l'internalisation de ce complexe dans un endosome qui va ensuite fusionner avec un lysosome entraînant la dégradation de l'Ag. Les peptides antigéniques issus de la

dégradation sont chargés sur les molécules du CMH-II et présentés à la surface du LB au pré-Tfh.

Généralement, la reconnaissance de l'Ag par un BCR entraîne le recrutement d'autres BCR et de molécules adaptatrices comme CD19, le tout formant une synapse immunologique. L'activation simultanée de plusieurs récepteurs par l'Ag induit une cascade d'activation des kinases et aboutit à l'expression de facteurs de transcriptions tels que NF-κB, NFAT et AP-1 permettant la prolifération et la différenciation du LB.

L'engagement des TLR et leur lien avec l'activation des LB lors d'une réponse T indépendante est bien décrit (Alugupalli et al., 2007). Cependant, leur implication dans les réponses T dépendantes est moins bien établie et se base principalement sur des études *in vitro* suggérant que leur engagement amplifie l'activation des LB mais n'est pas nécessairement requis (Hou et al., 2011; Meyer-Bahlburg et al., 2007).

Suite à son activation, le LB exprime la molécule CCR7 lui permettant de rejoindre la bordure de la zone B pour rencontrer un pré-Tfh (provenant de la zone T). Les interactions entre le LB et le pré-Tfh sont indispensables à la différenciation complète du LB.

1.3.2. Les acteurs moléculaires impliqués dans l'interaction pré-Tfh/LB

Tout comme lors de l'interaction LT/DC, la communication entre le pré-Tfh et le LB nécessite 3 signaux : reconnaissance de l'Ag, co-stimulation et cytokines (**Fig.9** (2)).

- *Reconnaissance de l'Ag par le pré-Tfh :* Le pré-Tfh reconnaît un antigène présenté sur les molécules CMH-II du LB. Le LB est spécifique de l'Ag qu'il capture, internalise et présente au pré-Tfh. Cette spécificité permet une interaction TCR/CMH-II^{peptide} plus intense entre un LT et un LB qu'entre un LT et une DC notamment dans un contexte de faible concentration de l'Ag (Crawford et al., 2006). L'intensité du signal reçu par un LT prend généralement en compte 3 paramètres : la concentration des complexes CMH-II^{peptide} exprimés à la surface de l'APC, la quantité de TCR engagés et la concentration des molécules de co-stimulation (Lanzavecchia and Sallusto, 2002). Le niveau d'intensité d'interaction entre le LT et le LB dicte le processus de différenciation et de prolifération des LT et des LB (Lanzavecchia & Sallusto, 2002).

- *La co-stimulation :* les interactions CD40/CD40L, OX40/OX40L et ICOS/ICOSL sont les plus couramment rapportées dans le contexte de la communication entre un LT et un LB. L'interaction est à bénéfices mutuels, permettant à la fois une poursuite de la différenciation du pré-Tfh et du LB.

CD40/CD40L : L'engagement de la molécule CD40 sur le LB, par son ligand CD40L exprimé par le LT, est nécessaire à la stimulation et la prolifération des LB (Clark and Ledbetter, 1986) et empêche leur mort par apoptose (Tangye et al., 2012). L'activation de CD40 permet aussi de stimuler l'expression des molécules du CMH-II, de CD80 et d'OX40L à la surface du LB, renforçant ainsi l'interaction avec le LT (Clatza et al., 2003; Roger et al., 2001)

OX40/OX40L : La molécule de co-stimulation OX40 fait partie de la famille du TNF (Tumor Necrosis Factor). Elle est exprimée à la surface des Tfh et interagit avec OX40L exprimé par les LB. OX40 est principalement connu pour son rôle dans la survie et la division des cellules (Croft, 2010). L'engagement d'OX40 à la surface du LT induit l'expression des facteurs anti-apoptotique Bcl-xL et Bcl-2 (Rogers et al., 2001), permettant la survie du LT. Le LB, en apportant le signal OX40L au LT, participe à sa polarisation en Tfh en facilitant la sécrétion de cytokines qui lui sont propres comme l'IL-4 (Linton et al., 2003).

ICOS/ICOSL : L'expression d'ICOSL par les DC est nécessaire à la première étape de différenciation en Tfh. ICOSL est également exprimé par les LB, permettant d'engager ICOS à la surface des pré-Tfh et de poursuivre leur différenciation en Tfh. Chez la souris, des LB déficient pour la molécule ICOSL présentent une diminution quantitative et qualitative des Tfh (Nurieva et al., 2008).

Les cytokines : les pré-Tfh sécrètent des cytokines pour soutenir la différenciation des LB. L'IL-21 permet aux LB de se différencier en cellules sécrétrices d'anticorps (Ettinger et al., 2005) et est impliquée dans la différenciation des Tfh (Nurieva et al., 2008). L'interaction ICOS/ICOSL entre le pré-Tfh et le LB stimule la production d'IL-21 par le pré-Tfh permettant de soutenir sa différenciation par une signalisation paracrine (Bauquet et al., 2009).
L'implication de l'IL-4 dans la différenciation et la survie des LB est connue depuis les années 80 (We Paul, 1987). L'IL-4, sécrétée par les pré-Tfh, permet également d'engager la

commutation de classe des anticorps du LB (Cunningham et al., 2004). Enfin, l'IL-4 collabore avec l'IL-21 pour assurer une réponse humorale efficace (McGuire et al., 2015).

1.3.3. Devenir du LB à l'issue de cette première interaction avec le pré-Tfh

1.3.3.1. Commutation de la classe isotypique

Suite à l'interaction avec les pré-Tfh, le LB réarrange de façon irréversible certains fragments d'ADN codant pour les Ig. La séquence d'ADN codant pour la région constante Cμ (IgM) ou Cδ (IgD) est excisée, permettant l'expression des gènes codant pour les régions constantes Cγ (IgG), Cα (IgA) ou Cε (IgE). A nouveau, les protéines RAG-1 et RAG-2 sont impliquées dans ce processus. Suite à la commutation de classe (ou *switch* isotypique), les Ig exprimées, qui étaient jusqu'alors de type IgM et IgD, pourront être de type IgG, IgA ou IgE. Nous aborderons plus loin les fonctions de ces différents anticorps.

1.3.3.2. Différenciation du LB

L'interaction du LB avec le pré-Tfh entraîne sa différenciation soit en plasmocyte à courte durée de vie soit en LB folliculaire (**Fig.9** (3)).

Plusieurs travaux chez la souris suggèrent que l'orientation de la différenciation en plasmocytes ou en LB folliculaires est dépendante de la reconnaissance de l'Ag par le BCR (O'Connor et al., 2006; Paus et al., 2006). Une meilleure affinité du BCR pour l'Ag oriente la différenciation du LB vers les plasmocytes de façon à promouvoir une réponse extrafolliculaire. A l'inverse, les LB ayant un BCR de moins forte affinité rejoindront les CG où ils pourront augmenter leur affinité.

1.3.3.2.1 Les plasmocytes à courte durée de vie

Les plasmocytes sont des cellules B sécrétant de large quantité d'anticorps. Les anticorps sécrétés par les plasmocytes à courte durée de vie n'ont pas encore subit de mutations améliorant leur affinité (Smith et al., 1996). Ce processus nécessite l'entrée du LB dans les CG. De plus, ces cellules ne survivent que quelques jours (Ho et al.,1986). Elles assurent cependant une réponse rapide lors d'une infection et permettent la formation d'une première barrière de protection.

La différenciation en plasmocytes s'effectue sous le contrôle du récepteur couplé aux protéines G EBI-2 (Gatto et al., 2009; Pereira et al., 2009). Ce récepteur est exprimé par les LB matures, surexprimé par les plasmocytes et sous-exprimé par les LB folliculaires.

Il est parfois suggéré que, dans la rate, les plasmocytes à courte durée de vie se différencient à partir des LB de la zone marginale (les MZ-LB abordés dans le paragraphe 1.1.3.2). Nous avons présenté les MZ-LB comme des cellules impliquées dans les réponses T indépendantes. Il faut cependant nuancer ce propos puisqu'ils peuvent également entrer en jeu lors des réponses T dépendantes. Chez la souris, les MZ-LB ont une capacité de capture et de présentation des antigènes aux LT plus rapide et plus efficace ainsi qu'une meilleure aptitude à délivrer les signaux de co-stimulation comparé à d'autres LB matures aussi bien *in vitro* que *in vivo* (Attanavanich and Kearney, 2004).

1.3.3.2.2. Les LB folliculaires

Les LB folliculaires, contrairement aux plasmocytes à courte durée de vie, retournent dans la zone B suite à l'interaction avec le pré-Tfh. Ils participeront à la réaction du CG que nous aborderons dans la prochaine partie. L'interaction LB/pré-Tfh à la bordure entre les zones T et B, permet d'initier l'expression du facteur de transcription Bcl-6 dans les LB (Kitano et al., 2011). D'ailleurs, une forte expression de Bcl-6 caractérise les LB folliculaires (Kitano et al., 2011).

Peu d'éléments sont connus concernant le mécanisme guidant le retour de ces LB dans les follicules. Une réduction de l'expression du récepteur EBI-2 par les LB folliculaires est

probablement impliquée dans cette migration (Gatto et al., 2009; Pereira et al., 2009). Il est suggéré que le récepteur EBI-1 est une cible du répresseur Bcl-6 exprimé par les FO-LB (Basso et al., 2010). Ainsi, les Tfh semblent impliqués dans le retour des LB au sein des follicules via leur rôle dans l'initiation de l'expression de Bcl-6 par les LB folliculaires.

L'interaction pré-Tfh/LB permet d'apporter les signaux nécessaires aux deux cellules pour leur différenciation. Le Tfh, à la sortie de cette interaction, exprime fortement la molécule CXCR5 lui permettant de rejoindre la zone folliculaire B (Haynes et al., 2007). De nouvelles interactions vont avoir lieu entre les Tfh et les LB au sein des CG.

1.4. Interactions entre le Tfh et le LB dans les CG de la zone B

Dans un OLII non activé, la zone B est constituée de follicules primaires contenant majoritairement des LB naïfs. Environ une semaine après l'exposition à un antigène, des follicules secondaires se forment : les centres germinatifs (CG) (Victora and Nussenzweig, 2012). Les LB naïfs sont exclus de cette nouvelle structure et se rassemblent en un compartiment appelé « manteau folliculaire ». Le CG se subdivise en une zone sombre et une zone claire. La zone sombre est quasiment exclusivement composée de LB en prolifération tandis que la zone claire contient différentes populations de LB en plus des FDC et des Tfh. Quelques LT $CD8^+$ (Kelsoe, 1996) et d'autres populations de DC peuvent également composer les CG (Grouard et al., 1996; Lindquist et al., 2004).

Dans cette partie, je vais d'abord décrire d'un point de vue phénotypique les Tfh et les LB du CG. J'aborderai ensuite l'activité des LB du CG dans la zone claire et dans la zone sombre. Puis, je détaillerai les acteurs moléculaires impliqués spécifiquement dans les interactions Tfh/LB du CG avant de décrire la réponse humorale qui en découle et la façon dont celle-ci est régulée.

1.4.1. Les Tfh du CG (CG-Tfh)

Dans les CG, les Tfh se localisent dans la zone claire, riche en CXCL13 (Allen et al., 2007), et maintiennent une expression élevée des marqueurs CXCR5 et Bcl-6 (Kerfoot et al., 2011) en plus des marqueurs PD-1 (Haynes et al., 2007) et ICOS (Chtanova et al., 2004). La sécrétion d'IL-21 par les CG-Tfh est accrue, suggérant une fonctionnalité plus soutenue que les pré-Tfh (Chtanova et al., 2004). Bien qu'à des niveaux d'expression réduits, tous ces marqueurs sont aussi exprimés par les pré-Tfh. Les cellules $CD57^+$ sont particulièrement sensibles à l'apoptose et probablement à un stade terminal de leur différenciation (Marinova et al., 2006). L'expression du marqueur CD57 semble restreinte aux LT situés dans les CG (Hufert et al., 1997). Les travaux qui ont suivi ont en effet montré que les Tfh $CXCR5^+CD57^+$ se situent exclusivement dans les CG et non à l'extérieur (Kim, 2005; Kim et al., 2001). De plus, cette population de Tfh $CXCR5^+CD57^+$ présente une meilleure capacité *in vitro* à apporter de l'aide aux LB pour la production d'Ig comparé aux cellules $CXCR5^+CD57^-$. Cependant, d'autres études nuancent ces propos en démontrant que les populations de cellules $CXCR5^+CD57^+$ et $CXCR5^+CD57^-$ ne diffèrent pas au niveau de leur profil transcriptionnel (Chtanova et al., 2004) et que la fonction des Tfh semble indépendante de l'expression du marquer CD57 (Rasheed et al., 2006). Seule la molécule MafB (*Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B*) est surexprimée à la surface des Tfh $CD57^+$ (Chtanova et al., 2004) mais son rôle dans la fonction des LT est très peu décrit. Bien que le rôle de l'expression de CD57 dans la fonction des Tfh soit peu clair, l'expression de ce marqueur semble tout de même restreinte aux CG. Ainsi, en nous basant sur cette littérature, nous avons fait le choix d'inclure le marqueur CD57 dans notre étude pour identifier les Tfh du CG.

1.4.2. Les LB du CG (CG-LB)

Les différents stades de différenciation des LB dans les OLII se caractérisent par l'expression différentielle du marqueur CD38 et de l'IgD (Pascual et al., 1994). Ainsi, les CG-LB sont de phénotype IgD^-CD38^+. Les CG-LB suivent un gradient de chimiokines CXCL13 ou CXCL12 pour rejoindre respectivement la zone claire ou la zone sombre du CG (Allen et al., 2004).
Dans la zone sombre, les LB sont en intense prolifération comme le suggère l'expression du marqueur Ki-67 (Gerdes et al., 1983). La prolifération des LB s'accompagne de la mutation

de leur BCR (De Silva and Klein, 2015). La maturation d'affinité du BCR consiste en l'apport d'hypermutations somatiques par l'enzyme AID (*Activation Induced Desaminase*) au niveau des régions variables des chaînes lourdes et légères de l'Ig.

Dans la zone claire, la présence des Tfh et des FDC permet la sélection des LB de haute affinité. Il a d'abord été suggéré que les FDC avaient un rôle majeur dans la sélection des LB. Les LB de haute affinité pourraient engager des interactions longues avec les FDC et monopoliser les Ag disponibles. La reconnaissance de l'Ag via le BCR est requise pour l'induction de signaux nécessaires à leur survie. Aussi, les LB de faible affinité n'interagissant pas avec l'Ag ne recevraient pas ces signaux et seraient éliminés (MacLennan, 1994). Cette hypothèse a été abandonnée par la démonstration que les LB ne pouvaient pas former d'interactions longues et stables avec les FDC (Schwickert et al., 2007).

Les Tfh sont les acteurs principaux de la sélection des LB de haute affinité. Ils sélectionnent les LB sur la base de la quantité de complexe CMH-II^{peptide} présentés à leur surface (Depoil et al., 2005). Une quantité accrue de Tfh dans les CG mène à une altération de la sélection des LB et à des phénomènes auto-immuns (Zhang et al., 2013).

La sélection d'un LB dans la zone claire induit l'expression de CXCR4 à sa surface lui permettant de rejoindre la zone sombre pour proliférer (Allen et al., 2004). Les LB circulent plusieurs fois entre la zone claire et la zone sombre des CG. Chaque interaction avec le Tfh dans la zone claire entraîne le LB à rejoindre la zone sombre où il subit un cycle de maturation d'affinité avant de retourner dans la zone claire pour être à nouveau sélectionné par un Tfh (Gitlin et al., 2014).

1.4.3. Les acteurs moléculaires des interactions Tfh/LB dans les CG

Le CG-LB interagit avec le CG-Tfh dans la zone claire. Comme à la bordure de la zone B, cette interaction est spécifique de l'Ag et nous avons vu que la sélection du LB est dépendante de la quantité de peptides présentée à sa surface. La persistance de l'Ag dans les CG est d'ailleurs impliquée dans l'activité des Tfh et le maintien de leur phénotype (Baumjohann et al., 2013b).

Les molécules de co-stimulation abordées dans l'interaction pré-Tfh/LB sont à nouveau impliquées en plus d'autres molécules plus spécifiques de la communication CG-Tfh/CG-LB (**Fig.9** (4)).

CD40/CD40L : L'expression de CD40L sur les CG-Tfh est en partie régulée positivement par Bcl-6 (Kroenke et al., 2012). L'interaction entre CD40 et CD40L est indispensable au maintien de la réaction du CG. Chez la souris comme chez l'Homme, le fait de bloquer l'interaction CD40/CD40L entraîne la disparition de CG déjà formés (Casamayor-Palleja M et al., 1996; Han S et al., 1995). De plus, un blocage de la voie CD40/CD40L chez la souris entraîne une diminution du nombre de Tfh (Baumjohann et al., 2013b). Chez l'Homme, une mutation génétique associée à une perte de fonction de CD40 ou CD40L entraîne l'absence de CG et la sécrétion d'anticorps de faible affinité (Allen et al., 1993; Ferrari et al., 2001).

OX40/OX40L : Les interactions entre OX40, exprimé par les CG-Tfh, et OX40L, exprimé par les CG-LB, sont importantes pour permettre la production d'anticorps lors d'une réponse mémoire (Gaspal et al., 2005) et plus particulièrement pour la production d'anticorps de type IgG (Morimoto et al., 2000). Une mutation d'OX40 est associée au sarcome de Kaposi chez de jeunes adultes et se traduit par une diminution de la proportion de LB mémoires circulants mais sans qu'il y ait d'incidence sur la quantité d'anticorps produits (Byun et al., 2013).

ICOS/ICOSL : ICOSL est fortement exprimé sur les CG-LB de haute affinité (Liu et al., 2015). L'engagement d'ICOS à la surface des CG-Tfh entraîne la surexpression de CD40L lui même stimulant l'expression d'ICOSL par le CG-LB. Cette boucle d'activation, initiée par l'expression d'ICOSL, participe à la sélection des LB de haute affinité.
D'autre part, une mutation de la molécule ICOS chez l'Homme entraîne une diminution des LB mémoires (Grimbacher et al., 2003; Warnatz et al., 2006). Enfin, lorsque l'on bloque l'interaction entre ICOS et ICOSL chez la souris, le nombre de Tfh est diminué (Baumjohann et al., 2013b).

SAP : SAP (*Signaling lymphocytic activation (SLAM)-associated protein*) est exprimée par les CG-Tfh et permet une interaction longue est stable entre le Tfh et le LB dans les CG. En son absence, l'adhésion entre les CG-Tfh et les CG-LB n'est plus assurée et mène à une diminution du nombre de CG-Tfh retenus dans les CG et à l'arrêt de la différenciation des LB (Qi, 2008). Des souris SAP^- mises en contact avec le virus de la chorioméningite

lymphocytaire perdent leur capacité à produire des LB mémoires et des plasmocytes à longue durée de vie spécifiques du virus (Crotty, 2003).

PD-1/PD-L : L'interaction entre ces deux molécules est principalement impliquée dans la tolérance immunitaire (Okazaki and Honjo, 2006). Comme nous l'avons noté précédemment, Les CG-Tfh présentent une forte expression de PD-1 à leur surface (Haynes et al., 2007). Dans le cadre de l'interaction Tfh /LB, l'engagement de cette molécule par les ligands PD-L1 ou PD-L2 entraîne des modifications fonctionnelles du CG-Tfh dont une augmentation de la sécrétion d'IL-4 et d'IL-21 (Good-Jacobson et al., 2010). L'absence de PD-1 sur les CG-Tfh mène à une diminution du nombre de plasmocytes à longe durée de vie.

Cytokines : La production d'IL-4 et d'IL-21 par les CG-Tfh est en partie dépendante de l'expression de SAP (Yusuf et al., 2010). Les CG-Tfh produisent ces cytokines en plus grande quantité que les pré-Tfh pouvant expliquer leur meilleure capacité à apporter de l'aide aux LB.

L'IL-21 participe à la maturation d'affinité des CG-LB ainsi qu'au maintien de l'expression de Bcl-6 par les CG-LB (Linterman et al., 2010). Cependant, l'absence d'IL-21 n'a pas d'impact sur la production précoce de LB mémoire (Linterman et al., 2010). Par contre, l'absence de production d'IL-21 par les CG-Tfh ou la non expression du récepteur à l'IL-21 par le LB a un impact négatif sur la prolifération des CG-LB et entraîne une diminution des plasmocytes dans la rate et la MO (Zotos et al., 2010). L'IL-21 a donc un rôle direct sur les LB dans le CG et permet le maintien de la réaction du CG.

Bien que l'IL-21 ait un rôle dans la différenciation des Tfh (Nurieva et al., 2008), d'autres travaux montrent que l'absence d'IL-21 ne semble pas avoir d'impact sur l'apparition de LT $CD4^+$ capables d'apporter de l'aide aux LB dans les CG (Zotos et al., 2010).

L'IL-4 joue un rôle anti-apoptotique sur les CG-LB particulièrement sensibles à l'apoptose (Wurster et al., 2002) et est également impliquée dans la sélection des CG-LB (Cunningham et al., 2004).

Les CG-Tfh peuvent également produire de l'IFNγ (Crotty, 2011). Les cytokines produites par les CG-Tfh orientent la classe d'anticorps produite par les LB (Reinhardt et al., 2009). J'aborderai ce point plus en détails dans le paragraphe 1.4.4.3.

1.4.4. La réaction du CG et la réponse humorale

La réaction du CG permet la différenciation complète des LB grâce à l'aide apportée par les CG-Tfh. Les LB se différencient en LB mémoires ou en plasmablastes (qui pourront engager leur différenciation terminale en plasmocytes à longue durée de vie) exprimant tout deux des Ig de haute affinité. Contrairement aux LB mémoires, les plasmablastes sécrètent leurs anticorps qui reconnaissent et éliminent les Ag par différents mécanismes. Je vais détailler les deux populations de LB (mémoires et plasmablastes) avant d'aborder les sous-types et modes d'action des anticorps sécrétés. Nous verrons, pour finir, les mécanismes de régulation de la réaction du CG.

1.4.4.1. Devenir du CG-LB suite à son interaction avec un CG-Tfh

L'interaction LB/Tfh dans les CG permet aux LB de se différencier en LB mémoires ou en plasmablastes (Kurosaki et al., 2015; Nutt et al., 2015) (**Fig.9** (5)).

1.4.4.1.1. Les LB mémoires

Les LB mémoires sortent du CG et peuvent rejoindre la circulation sanguine. Ils ont une longue durée de vie et peuvent rapidement former des CG secondaires dans les OLII ou directement se différencier en plasmablastes lors d'une seconde rencontre avec l'Ag lors d'une réinfection par exemple (Kurosaki et al., 2015). Il a été suggéré que, lors d'une restimulation antigénique, les LB mémoires IgM^+ vont plutôt former des CG 2^{aire} alors que les LB mémoires IgG^+ vont plutôt se différencier en plasmablastes (Dogan et al., 2009; Pape et al., 2011). Cependant, Les LB mémoires forment une population hétérogène au sein même des sous populations IgG^+ et IgM^+. Il n'est donc pas exclu que des LB mémoires IgM^+ se différencient directement en plasmablastes et réciproquement.

La longévité des LB mémoires ne semble pas être dépendante de la présence des LT (Vieira and Rajewsky, 1990). Par contre, l'absence de réponse B mémoire chez des souris déficientes pour un récepteur au complément sur les FDC, suggère un rôle des FDC dans le maintien des LB mémoires IgG^+ en particulier (Barrington et al., 2002). Les conclusions

divergent concernant la nécessité d'une persistance de l'antigène pour maintenir les LB mémoires (Defrance et al., 2002). Les LB mémoires sont plutôt proposées comme étant une population de cellules quiescentes (Kurosaki et al., 2015).

1.4.4.1.2. Les plasmablastes

Les plasmablastes issus du CG sont des cellules spécialisées dans la sécrétion d'anticorps de haute affinité. Les CG-LB de plus haute affinité semblent se différencier en plasmablastes alors que ceux d'affinité plus faible se différencieraient en LB mémoires (Victora and Nussenzweig, 2012).

A la sortie du CG, une partie des plasmablastes sécrète des anticorps dans les OLII et dans le sang tandis que d'autres rejoignent la MO où ils vont recevoir des signaux de survie (Kometani and Kurosaki, 2015). Dans la MO, les plasmablastes engagent leur différenciation terminale en plasmocytes à longue durée de vie. Ces cellules seront mobilisables en cas de réexposition à l'Ag et produiront rapidement des anticorps de haute affinité. La formation d'une niche cellulaire, composée majoritairement d'éosinophiles et de mégacaryocytes, dans la MO permet le maintien sur le long terme des plasmocytes. Les cellules de la niche sécrètent la chimiokine CXCL12, la molécule APRIL et l'IL-12 pour assurer la survie des plasmocytes (Kometani and Kurosaki, 2015).

L'expression du facteur de transcription Blimp-1 est requise pour la différenciation en plasmocytes à longue durée de vie (Shapiro-Shelef and Calame, 2005). Blimp-1 permet également le maintien de ces cellules à un état quiescent dans la MO (Shapiro-Shelef et al., 2005).

La sécrétion d'anticorps est l'une des finalités d'une réponse immunitaire adaptative. Ces anticorps sont produits par des plasmocytes à courte durée de vie issus d'une réponse extra-folliculaire ou par des plasmablastes et plasmocytes à longue durée de vie issus de la réaction du CG. Les anticorps sécrétés par l'un ou l'autre de ces plasmocytes auront une affinité plus ou moins haute pour l'Ag. Enfin, à chaque classe isotypique correspond une fonction particulière qui, associée à l'affinité de la partie variable, permettra une réponse humorale adaptée à l'agent immunogène qui l'a initiée.

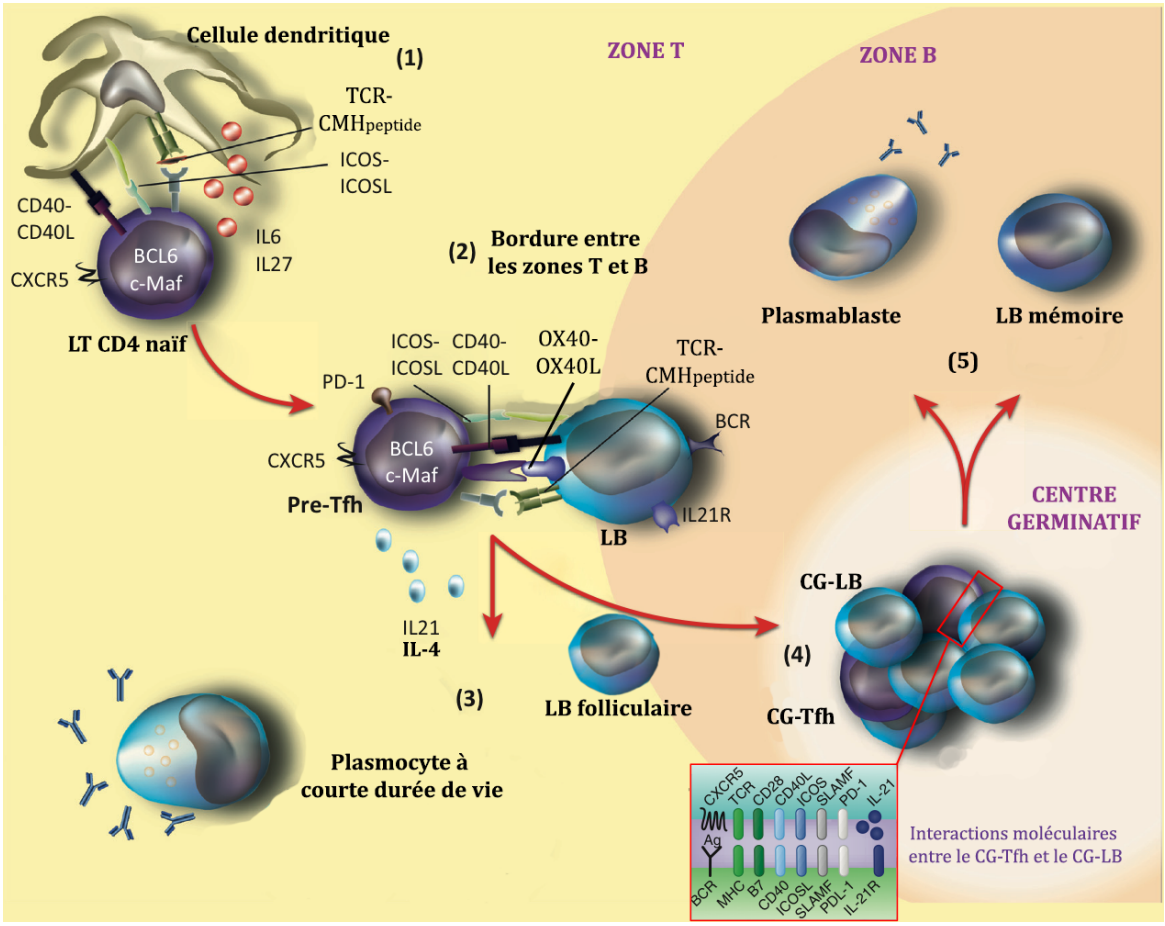


Figure 9 *: Établissement d'une réponse T dépendante.* ***Adaptée de*** **(Pissani and Streeck, 2014).** *Les réponses humorales T dépendantes se déroulent dans les OLII et font principalement intervenir des Tfh, des LB et des DC. Une première interaction entre un LT CD4^{+} et une DC dans la zone T permet d'initier la différenciation vers un profil Tfh. En bordure de la zone B, les pré-Tfh interagissent avec des LB pré-activés. Cette réaction extra-folliculaire permet aux LB de se différencier en plasmocytes à courte durée de vie ou en LB folliculaires. Les plasmocytes à courte durée de vie produisent majoritairement des anticorps de faible affinité constituant une première barrière de protection. Les LB folliculaires retournent dans la zone B accompagnés des Tfh pour former un CG. Des allers-retours successifs des LB entre la zone claire et la zone sombre des CG leur permettent d'accumuler les hypermutations somatiques dans la zone sombre et d'être sélectionnés dans la zone claire par les Tfh. A la sortie du CG les LB sont différenciés soit en LB mémoires soit en plasmablastes. Les LB mémoires pourront rapidement se différencier en plasmablastes ou participer à la réaction d'un CG 2^{aire} lors d'une restimulation antigénique. Les plasmablastes sécrètent de grande quantité d'anticorps de haute affinité et peuvent rejoindre la MO pour devenir des plasmocytes à longue durée de vie.*

1.4.4.2. Les fonctions effectrices des anticorps

Les anticorps agissent par différents mécanismes pour éliminer un microorganisme pathogène.

- Les anticorps peuvent avoir une activité neutralisante contre un virus. La neutralisation consiste en la fixation de l'anticorps sur un site particulier du virus empêchant son entrée dans la cellule cible. Cette fonction neutralisante peut être associée à d'autres fonctions effectrices (Klasse, 2014).
- La reconnaissance d'un antigène libre ou à la surface d'une cellule par un anticorps peut engager la voie classique du complément (Melis et al., 2015). La protéine C1q du complément se fixe à la partie Fc de l'anticorps et entraîne une réaction en cascade. La cascade du complément permet, *in fine*, la lyse directe de la cellule infectée ou l'opsonisation du microorganisme pathogène facilitant son internalisation par des cellules phagocytaires.
- Les anticorps peuvent directement se fixer à d'autres cellules via leur partie Fc. Ces cellules, comprenant les NK (Natural Killer), les monocytes, les macrophages, les éosinophiles, les neutrophiles, les basophiles et différentes populations de DC. Certaines d'entre elles peuvent exercer une activité cytotoxique pour éliminer les cellules infectées exprimant à leur surface l'Ag reconnu par l'anticorps. Ce mécanisme est appelé ADCC pour *Antibody-Dependant Cell-mediated Cytotoxicity* (Teillaud, 2012).

1.4.4.3. Les différentes classes d'anticorps et leurs fonctions

Dans le sérum, les anticorps sont de classes isotypiques variées. Les IgM sont prédominantes lors de la première phase d'une réponse immunitaire puis apparaissent ensuite les IgG qui représenteront 10 à 20% des protéines du plasma. Chaque classe d'anticorps est associée à une ou des fonction(s) effectrice(s) préférentielles(s). La structure et les fonctions de ces différents anticorps (ou Ig) ont été résumées dans une revue de Schroeder et Cavacini parue en 2010 (Schroeder and Cavacini, 2010).

Les IgM sont les seules à pouvoir adopter une structure pentamérique en se regroupant autour de la pièce J. Ils agissent principalement par opsonisation du microorganisme pathogène et via la fixation du complément. Etant donnée leur production précoce, les IgM n'ont pas ou peu subit les hypermutations somatiques. Cette particularité leur confère une poly-réactivité nécessaire à la reconnaissance d'Ag variés lors des premières phases de la réponse immunitaire. Leur structure pentamérique leur permet cependant d'améliorer leur avidité pour l'Ag, notamment lorsque celui-ci présente des motifs de reconnaissance répétés (Schroeder and Cavacini, 2010).

Les IgD sont présentes en faible quantité dans le sérum notamment à cause de leur courte durée de vie en lien avec leur sensibilité à la protéolyse. Leurs fonctions effectrices sont peu connues. Les IgD circulantes peuvent par exemple reconnaître des protéines bactériennes et activer les LB (Riesbeck and Nordstrom, 2006).
Le rôle de l'expression de l'IgD à la surface des LB n'est pas plus clair. Il est proposé que la signalisation engagée par l'IgD régule l'orientation du LB lors des différentes phases de son développement (Geisberger et al., 2006).

Les IgA sont sous forme de monomères dans le sérum mais peuvent aussi être sous forme de dimères (parfois des trimères ou tétramères) sécrétés au niveau des muqueuses. Les IgA sont principalement impliquées dans la défense des muqueuses grâce à leur capacité à neutraliser les virus, les bactéries et les toxines (Schroeder and Cavacini, 2010). Les autres fonctions effectrices sont moins représentées pour cet istotype. Des récepteurs aux IgA sont tout de même exprimés à la surface des neutrophiles permettant, localement, une ADCC. Par contre, le recrutement du complément semble être peu initié par les IgA au niveau des muqueuses (Schroeder and Cavacini, 2010). Les IgA se subdivisent en deux sous-classes IgA1 et IgA2 se différenciant par la structure de leur région charnière. L'allongement de la région charnière des IgA1 les rend plus sensibles aux protéases bactériennes. De ce fait, une majorité d'IgA2 sont sécrétées au niveau des muqueuses alors que dans le sérum les IgA1 sont prédominantes (Schroeder and Cavacini, 2010).

Les IgE sont associées aux réponses allergiques et aux infections parasitaires. Elles se fixent efficacement sur les récepteurs FcεR exprimés par les mastocytes, les basophiles, les éosinophiles et les cellules de Langerhans (Schroeder and Cavacini, 2010).

Les IgG forment la classe d'anticorps la plus représentée dans l'organisme. Elles se divisent en quatre sous-classes en lien avec leur présence dans le sérum (IgG1>IgG2>IgG3>IgG4) (Vidarsson et al., 2014) (**Tableau 1**). La production de l'une ou l'autre des sous-classe dépend à la fois du microorganisme pathogène impliqué et des signaux reçus par le LB (Pone et al., 2010). Ainsi les IgG1 sont majoritairement produites en réponse à des Ag solubles et des protéines de membrane, les IgG2 en réponse à des polysaccharides (généralement lors d'une réponse T indépendante) et les IgG4 accompagnent les IgE en réponse à des allergènes (Vidarsson et al., 2014). Dans le cadre des réponses T dépendantes, la sécrétion d'IL-21 par les Tfh oriente la production d'anticorps vers la sous-classe IgG1 alors que la sécrétion d'IFNy mène plutôt à la production d'IgG2 (Reinhardt et al., 2009).

Les IgG1, majoritairement représentées, peuvent fixer tous les FcγR et activer la cascade du complément (Vidarsson et al., 2014) (**Tableau 1**).

Les IgG2 apparaissent généralement en réponse à des infections bactériennes et peuvent même être la seule sous-classe d'IgG produite dans ce contexte (Barrett and Ayoub, 1986). Elles ne se fixent qu'aux FcγRII et activent moins efficacement la cascade du complément que les IgG1 (**Tableau 1**).

Les IgG3 ont une demi vie courte mais présentent les fonctions effectrices les plus efficaces par rapport aux autres sous-classes aussi bien concernant la fixation aux FcγR que pour l'activation du complément (Vidarsson et al., 2014) (**Tableau 1**). Les IgG3 sont détectées précocement lors des infections virales, suivi par les IgG1 (Ferrante et al., 1990).

Les IgG4 ne représentent que 1 à 3% des IgG présents dans le sérum. Elles peuvent néanmoins devenir la sous-classe dominante lors d'une exposition prolongée à un allergène. Leurs fonctions effectrices sont limitées : bien que les IgG4 puissent se fixer sur certains FcγR, leur capacité à induire le complément est quasi nulle (Vidarsson et al., 2014) (**Tableau**

1). La production d'IL-10 semble moduler la recombinaison isotypique en favorisant la production d'IgG4, peu inflammatoires, au détriment des IgE (Jutel and Akdis, 2011).

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Général				
Masse moléculaire (kD)	146	146	170	146
Concentration moyenne dans le serum chez l'adulte (g/l)	6.98	3.8	0.51	0.56
Fréquence relative (%)	60	32	4	4
Demi-vie (jours)	21	21	7/21[a]	21
Antigènes reconnus				
Protéines	++	+/-	++	++
Polysaccharides	+	+++	+/-	+/-
Allergènes	+	-	-	++
Activation du complément				
Fixation à C1q	++	+	+++	-
Fixation aux récepteurs Fcγ				
FcγRI	+++	-	++++	++
FcγRIIa	+++	++	++++	++
FcγRIIb/c	+	-	++	+
FcγRIIIa	+++	+/-[b]	++++	+/-[b]
FcγRIIIb	+++	-	++++	-

***Tableau 1** : Caractéristiques des sous-types d'IgG. **Adapté de (Vidarsson et al., 2014).** Les signes « + » et « - » représentent respectivement une capacité ou une incapacité des IgG à se fixer aux différents antigènes, au complément ou aux différents récepteurs Fcγ. Le nombre de signes « + » informe sur l'intensité relative de la capacité de fixation.*

[a] En fonction du sous-type d'IgG3.

[b] En fonction des motifs exposés au niveau du domaine extracellulaire du FcγRIIIa.

Chaque classe d'Ig présente des glycosylations, indispensables aux fonctions effectrices, à des sites qui leur sont propres (**Figure 10**). Ces glycosylations se situent au niveau d'un résidu d'asparagine (Asn) (= N-glycosylation) ou au niveau de résidus de sérine (Ser) ou thréonine (Thr) (= O-glycosylation).

Par exemple, toutes les sous-classes d'IgG (G1, G2, G3 et G4) présentent une N-glycosylation au site Asn-297 permettant de maintenir la structure quaternaire et la stabilité de leur partie Fc. Concernant les autre classes d'Ig, grâce aux N- et/ou O-glycosylations, les IgA assurent la liaison au pathogène et leur élimination, les IgE se fixent aux récepteurs FcεRI, les IgD peuvent correctement s'assembler et être sécrétées et les IgM pentamériques agglutinent

les organismes pathogènes. Les glycosylations permettent également de protéger les régions charnières des IgA et des IgD contre les protéases (Arnold et al., 2007).

La nature de la glycosylation impact la conformation de la partie Fc des anticorps et dicte ainsi leur affinité et leurs capacités effectrices. C'est par exemple le cas de l'acide sialique qui, lorsqu'il est greffé à la partie Fc d'un anticorps, favorise sa fixation à la molécule DC-SIGN au détriment des récepteurs Fcγ (Sondermann et al., 2013).

Dans le contexte de développement d'anticorps thérapeutiques, des glycosylations sont souvent apportées pour réguler les fonctions effectrices des anticorps. Par ce processus, il est notamment possible de moduler les capacités d'un anticorps à initier l'ADCC, la cascade du complément ou encore la phagocytose.

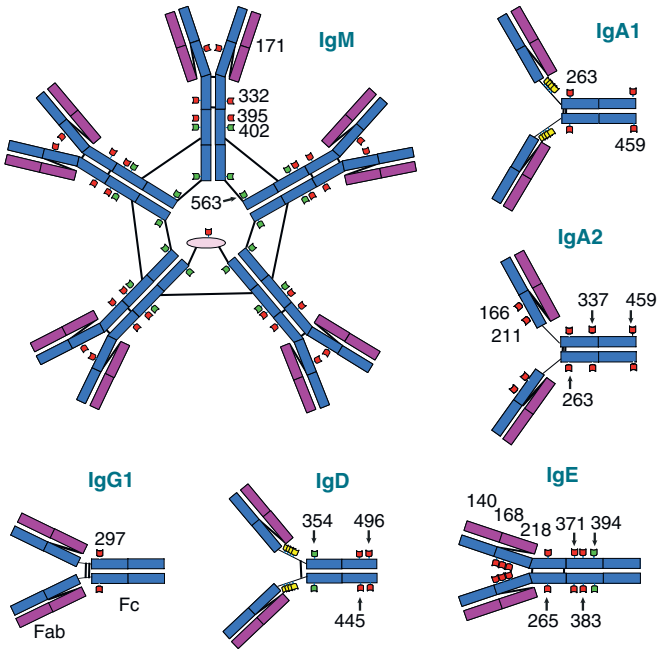


Figure 10 : *Sites de glycosylation des différentes classes d'Ig* **(Arnold et al., 2007).** Chaque classe d'Ig se caractérise par un profil de glycosylation particulier. Les IgG sont représentées par les IgG1 étant la sous-classe prédominante. Les N-glycosylations sont représentées en rouge (complexes glycans) et vert (oligomannose) et les O-glycosylations en jaune. Les nombres correspondent à la position de l'acide aminé glycosylé.

Les anticorps ont des fonctions variées et forment une barrière efficace contre diverses infections. Cependant, la production non contrôlée d'anticorps peut entraîner un contexte inflammatoire exacerbé et éventuellement le développement de pathologies auto-immunes.

Pour limiter ces risques, il est particulièrement nécessaire de réguler la réaction du CG, à l'origine de la production des anticorps.

1.4.5. Régulation de la réaction du CG

Une dérégulation du CG aboutit à la sélection de clones de LB peu affins et/ou à une production excessive d'anticorps par les LB. Pour comprendre ce phénomène, il faut revenir au cœur de l'interaction Tfh/LB dans les CG.

D'abord, la surexpression de certaines molécules impliquées dans l'interaction Tfh/LB peut mener à une activation exacerbée des LB et à l'émergence de syndromes auto-immuns. Chez la souris, une mutation du gène *roquin* codant pour un répresseur de la molécule ICOS, entraîne des symptômes proches de ceux du lupus érythémateux chez l'Homme (Heissmeyer and Vogel, 2013). L'expression exacerbée d'ICOS par les Tfh de ces souris entraîne l'augmentation de la formation de CG ainsi qu'une production plus importante d'IL-21 et l'émergence d'auto-anticorps (Vinuesa et al., 2005). Dans les Tfh, l'expression d'ICOS est en partie régulée par les micro-ARN MiR-146a. MiR-146a contrôle également le nombre de Tfh dans les CG (Pratama et al., 2015).

La quantité de Tfh présents dans les CG est un paramètre crucial pour la sélection des LB de haute affinité. L'augmentation du nombre de Tfh est probablement liée à la sélection et à l'activation de clones de LB peu affins pouvant participer à l'apparition de phénomènes auto-immuns (Pratama and Vinuesa, 2014).
Au moins trois populations de cellules régulatrices ont été décrites comme intervenant dans la régulation du CG pour limiter la production d'anticorps auto-immuns : Les Tfh régulateurs (Tfr), les LT $CD8^+$ régulateurs et les LB régulateurs (Breg) (Kim et al., 2013). A ces populations s'ajoute une population de LT $CD8^+$ cytotoxiques récemment identifiée dans la zone B des OLII (Leong et al., 2016).

Les Tfr sont le versant régulateur des Tfh (Linterman et al., 2011). Ils se différencient probablement à partir de LT régulateurs naturels (Treg). Leur localisation dans les follicules est dépendante de NFAT2, ce qui n'est pas le cas des Tfh. L'expression de NFAT2 par les Tfr

est essentielle pour amorcer l'expression de CXCR5 et donc leur migration dans les follicules. Ces cellules régulatrices expriment les marqueurs caractéristiques des Tfh en plus des marqueurs CTLA-4 et FOXP3, caractéristiques des Tregs (Linterman et al., 2011).

Les Tfr régulent les interactions entre les Tfh et les LB par des mécanismes nécessitant un contact cellulaire ou via des cytokines. CTLA-4 est certainement la molécule décrite comme étant la plus impliquée dans le rôle suppresseur des Tfr (Sage et al., 2014). Elle régule négativement l'interaction entre CD28 exprimé par les Tfh et CD80/CD86 exprimés par les LB. Chez la souris, la délétion de CTLA-4 sur les Tfr entraîne une diminution de leur capacité suppressive et une activation des CG-LB (Sage et al., 2014).

La production de cytokines régulatrices telles que l'IL-10 et le TGFβ, la sécrétion de granzymes provoquant la lyse des cellules ou encore la séparation mécanique du couple Tfh/LB sont également impliquées dans la fonction régulatrice des Tfr (Sage and Sharpe, 2015).

Des travaux récents ont mis en évidence une différenciation/spécialisation progressive des Tfh impliquée dans la modulation de la réaction du CG (Weinstein et al., 2016). Ainsi, des Tfh IL-21$^+$ sont identifiés dans un premier temps, lors de la réponse immunitaire, et associés à l'apport d'hypermutations des gènes codant pour les Ig dans les LB. Ces Tfh poursuivent ensuite leur différenciation et adoptent un phénotype IL-4$^+$ facilitant la différenciation en plasmablastes (Weinstein et al., 2016).

Les LT CD8$^+$ régulateurs : Chez la souris, une population de LT CD8$^+$ICOSL$^+$ peut inhiber l'activité des Tfh exprimant la molécules Qa-1 (un sous-type murin de la molécule CMH-I, équivalent à la molécule HLA-E chez l'Homme) (H. Kim et al., 2010). Chez l'Homme, cette population de LT CD8$^+$ régulateurs est impliquée dans le contrôle de maladies auto-immunes comme le diabète de type 1 (Jiang et al., 2010).

D'autre part, une population de LT CD8$^+$ cytotoxiques exprimant le marqueur CXCR5 a récemment été identifiée dans la zone B des OLII chez la souris comme chez l'Homme (Leong et al., 2016). Ces LT CD8$^+$ ont été appelés LT folliculaires cytotoxiques (Tfc) et partagent certaines caractéristiques des Tfh comme l'expression de Bcl-6. Les Tfc rejoignent la zone B grâce à leur expression de CXCR5 et sont capables d'éliminer des Tfh infectés par le LCMV chez la souris. De façon intéressante, d'autres études avaient précédemment montré que les LT CD8$^+$ étaient exclus des follicules (Fukazawa et al., 2015; Hong et al., 2012). Au vu de ces

nouvelles données, il semblerait que l'expression de CXCR5 permette aux LT $CD8^+$ d'accéder à ces structures.

Les Breg peuvent réguler la réaction du CG en sécrétant des cytokines et par interactions directes avec les LT. Les LB peuvent adopter des fonctions régulatrices suite à l'engagement de CD40 à leur surface lors d'une interaction Ag-spécifique avec un LT (Lemoine et al., 2009). La connaissance de la totalité des signaux impliqués dans la génération des Breg est actuellement incomplète (Lemoine et al., 2009).

Plusieurs sous populations de Breg existent chez la souris comme chez l'Homme. Leurs phénotypes ont été résumés dans une revue de Rosser et Mauri parue en 2015 (Rosser and Mauri, 2015). Les Breg peuvent sécrèter de l'IL-10, du TGFβ et de l'IL-35 pour réguler les fonctions effectrices de différentes cellules telles que les Th17, les Th1 , les DC et les LT $CD8^+$ cytotoxiques (Rosser and Mauri, 2015). L'interaction directe des Breg avec des LT ainsi que la sécrétion d'IL-10 permettent de soutenir la différenciation des Treg classiques $FOXP3^+$ et des Tregs induits (iTreg). Ces deux populations de cellules régulatrices participent au contrôle de la réponse immunitaire au-delà du CG (Rosser et al., 2014). Chez l'Homme, la population de Breg regroupant l'ensemble des fonctions citées est de phénotype $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ (Flores-Borja et al., 2013).

Les Tfr, Les LT $CD8^+$ régulateurs et les Breg participent au maintien de l'homéostasie du CG. Par différents mécanismes, ces cellules régulent finement le nombre de Tfh et l'intensité de leur interaction avec les LB de façon à sélectionner uniquement les clones de LB les plus affins et de limiter leur activation.

Certaines pathologies sont associées à une rupture de l'homéostasie des CG. C'est par exemple le cas des maladies auto-immunes. Une hyperactivité des Tfh participe à l'émergence de syndromes tels que le lupus érythémateux et l'arthrite rhumatoïde (Park et al., 2014). La réponse humorale peut également être perturbée lors d'infections virales. Les personnes infectées par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) présente une sécrétion spontanée d'anticorps en lien avec des phénomènes d'hypergammaglobulinémie (Lane HC et al., 1983). Dans ce contexte, mes travaux de thèse se sont axés sur l'impact de l'infection par le VIH sur les acteurs cellulaires de la réaction du CG.

2. La réaction du CG et la réponse humorale lors de l'infection par le VIH

2.1. Généralités sur le VIH/SIDA

2.1.1. Données épidémiologiques en France et dans le monde

D'après Onusida 2015, 36.9 millions de personnes sont infectées par le VIH dans le monde. Malgré les campagnes de prévention, 1.9 millions de nouvelles infections ont été comptabilisées en 2014. Les traitements antirétroviraux (ART) permettent aux patients d'avoir une meilleure qualité de vie. Cependant, moins de la moitié des personnes infectées ont accès à des traitements ART. C'est notamment le cas en Afrique qui est pourtant la partie du monde la plus touchée par le SIDA.

En plus des infections référencées, il est estimé qu'environ 17 millions de personnes dans le monde sont porteuses du virus et l'ignorent.

En France, près de 6600 personnes ont été nouvellement infectées en 2014 (Rapport InVS, 23 novembre 2015). Le plan national de lutte contre le VIH 2010-2014 avait eu pour effet d'augmenter le nombre de dépistages (environ 5.6 millions) en 2011 mais ce nombre est resté stable ces 4 dernières années. La mise en place de la PreP (prophylaxie pré-exposition) début 2016 en France, est un espoir pour faire reculer le nombre de nouvelles infections dans les années à venir (Krakower and Mayer, 2015). La PreP est un traitement préventif (Truvada®) qui peut être pris par une personne séronégative s'exposant à un risque d'infection par le VIH. Le Truvada® a d'abord été utilisé en traitement curatif puis autorisé comme traitement préventif aux États-Unis en 2012.

2.1.2. Les différents sous-type du VIH

Le VIH-1 a été découvert en 1983 (Barré-Sinoussi et al., 1983) et est responsable de la majorité des infections dans le monde. Quelques années plus tard, le VIH-2 , plus proche de son homologue simien (SIV), a été caractérisé (Clavel et al., 1986a, 1986b). Le VIH-2 touche surtout l'Afrique de l'ouest et semble moins pathogénique que le VIH-1 (Hughes and Corrah, 1990).

Le VIH-1 se divisent en 4 groupes distincts (M, N, O et P) en fonction de leur séquence génétique (Peeters et al., 2014). Le groupe M est le plus représenté dans le monde et se subdivise en 9 clades (A à H et O) toujours sur la base de variations génétiques. En Europe, le clade B est prédominant (Hemelaar, 2012).

Mes travaux portent exclusivement sur l'étude du VIH-1. Par la suite j'utiliserai donc le terme VIH en référence au sous type VIH-1

2.1.3. La structure du VIH

Le VIH appartient à famille des *Retroviridae* et au genre des Lentivirus. Son génome est composé de deux copies d'ARN simple brin enfermées dans une capside composée de protéines p24 (Turner and Summers, 1999). L'ARN viral est stabilisé sous forme d'un complexe ribonucléoprotéique comprenant des protéines de la nucléocapside (p7), des intégrases (p31) et des réverse-transcriptases (p66/p51). La capside contient également les protéines accessoires Vif, Vpr, Nef et p7 (**Fig.11**).

Le virus est enveloppé d'une bicouche lipidique provenant de la cellule hôte. Des glycoprotéines d'enveloppe sont ancrées à cette membrane : la protéine de surface (gp120) stabilisée par une protéine transmembranaire (gp41). Sous la bicouche lipidique, les protéines de la matrice (p17) permettent de protéger la capside. Des protéases (p11), nécessaires à l'assemblage et la maturation du virus, sont contenues à l'extérieur de la capside (Turner and Summers, 1999) (**Fig.11**).

Le génome du VIH est organisé en trois régions (gag, pol, env) comprises entre 2 séquences LTR (*Long-Terminal repeats*). La région gag code pour le précurseur p55 qui sera ensuite clivé en protéines de la matrice, de la capside et de la nucléocapside en plus de la protéine p6. La région pol code pour les enzymes (protéase, réverse-transcriptase et intégrase) et la région env code pour les protéines d'enveloppe et les protéines accessoires.

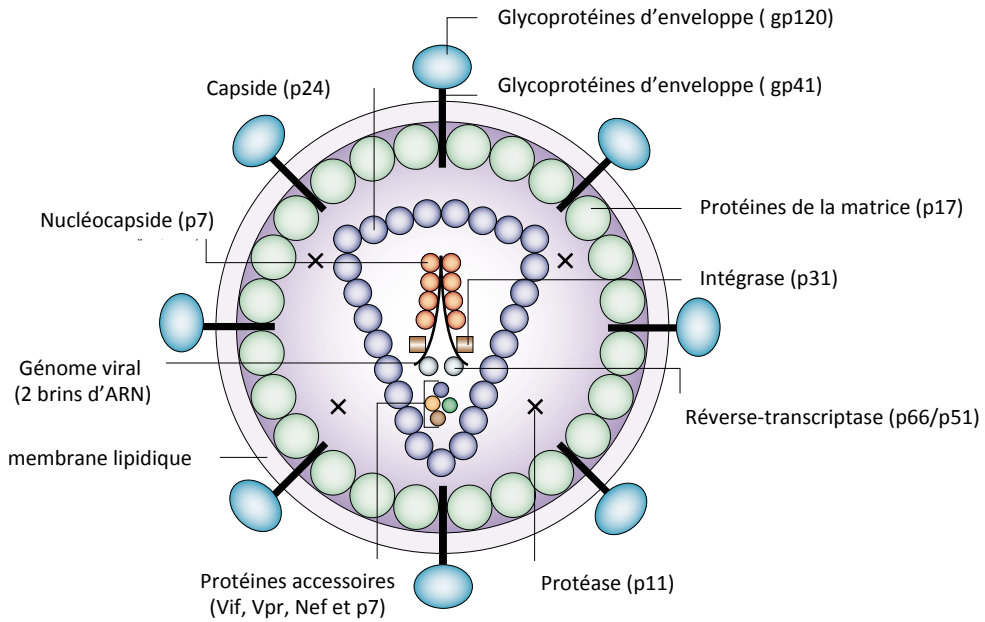


Figure 11 *: Structure du VIH.* ***Adaptée de (Robinson, 2002)****. L'enveloppe du VIH est constituée d'une membrane lipidique et des glycoprotéines gp120 et gp41. Sous l'enveloppe, les protéines de la matrice (p17) protègent la capside. La capside est composée de protéines p24. L'intégrase (p31), la réverse transcriptase (p66/p51), la nucléocapside (p7), les protéines accessoires (Vif, Vpr et Nef) et le génome viral se situent à l'intérieur de la capside. Les protéases (p11) se localisent entre la capside et les protéines de la matrice.*

2.1.4. Cycle de réplication du VIH

Les protéines d'enveloppe gp120 du VIH se fixent aux protéines de surface CD4 des cellules cibles, comprenant les LT $CD4^+$, les DC et les monocytes/macrophages. Selon son tropisme (« R5 » ou « X4 »), le virus utilise la molécule CCR5 ou CXCR4 comme co-récepteur pour fusionner avec la membrane de la cellule (**Fig.12**).

Suite à la fusion, la capside, contenant le matériel génétique et les différentes enzymes et protéines accessoires du virus, est libérée dans le cytoplasme de la cellule. La réverse-transcriptase permet de transformer le brin d'ARN en double brin d'ADN (ADN proviral) par transcription inverse. La réverse-transcriptase incorpore de nombreuses erreurs lors de ce processus de transcription inverse, ce qui explique la variabilité génétique exceptionnelle du VIH. L'ADN proviral s'associe notamment à l'enzyme intégrase pour former un complexe de pré-intégration dans le cytoplasme. Ce complexe rejoint le noyau par translocation et l'intégrase permet d'insérer l'ADN du virus (grâce aux séquences LTR) au hasard dans le

génome de la cellule hôte (**Fig.12**). L'ADN du VIH est alors transcrit en même temps que l'ADN cellulaire. Les ARN produits sont traduits en protéines virales capables de s'auto-assembler en encapsidant l'ARN viral au niveau de la membrane cellulaire puis de sortir de la cellule par bourgeonnement. A l'extérieur de la cellule, le virus achève sa maturation grâce à l'action des protéases et peut infecter une nouvelle cellule (Barre-Sinoussi et al., 2013) (**Fig.12**).

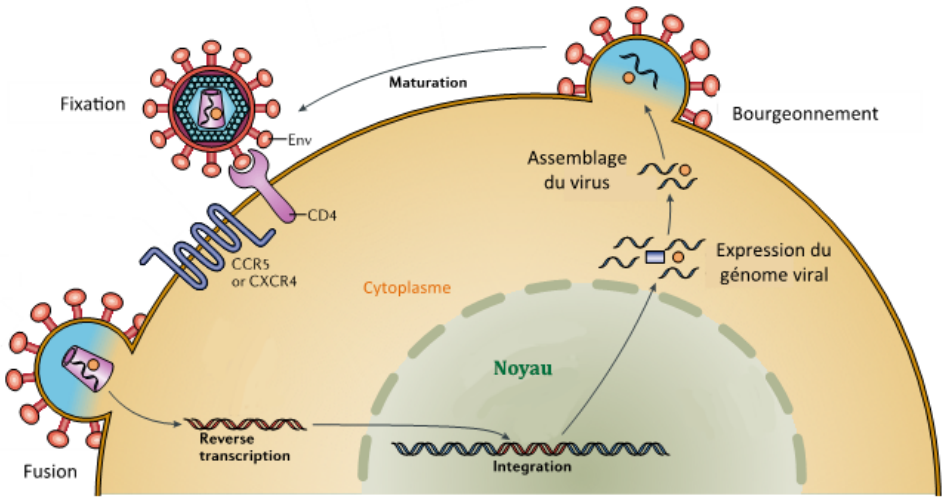


***Figure 12** : Cycle de réplication du VIH. **Adaptée de (Laskey and Siliciano, 2014)**. Le VIH fusionne avec la membrane de la cellule et libère le contenu de sa capside dans le cytoplasme. La réverse-transcriptase transforme l'ARN viral en ADN qui peut entrer dans le noyau cellulaire sous forme d'un complexe de pré-intégration. La machinerie cellulaire transcrit puis traduit le génome viral en même temps que son propre génome. Le virus s'auto-assemble et bourgeonne à la surface de la cellule. Le virus pourra achever sa maturation par l'action des protéases puis réinfecter une nouvelle cellule.*

2.1.5. Les phases cliniques de l'infection par le VIH

Le VIH se transmet majoritairement par les voies mucosales mais peut également se transmettre suite à une exposition au sang (lors d'injection ou de transfusion) ou par transmission mère/fœtus.

L'infection se décline en trois phases : la primo-infection, la phase chronique et la phase SIDA (Syndrome de l'immunodéficience acquise).

Les symptômes de la primo-infection apparaissent généralement 2 à 4 semaines après l'infection. Il peut s'agir d'un état grippal, de maux de tête, de diarrhée, d'une lymphadénopathie ou encore de rougeurs cutanées (Schacker et al., 1996). Lors de cette phase de primo-infection, le nombre de LT $CD4^+$ dans le sang chute rapidement et s'accompagne d'une diminution des LT $CD4^+$ mémoires au niveau des tissus lymphoïdes associés à l'intestin. Parallèlement la charge virale augmente de façon exponentielle pour atteindre un pic 3 à 4 semaines post-exposition (Little et al., 1999). La charge virale et le nombre de LT $CD4^+$ vont ensuite se stabiliser marquant l'entrée dans la phase chronique. Cette phase est parfois aussi appelée « latente », cependant le virus continue à se répliquer. Lors de la phase chronique, la destruction des LT $CD4^+$ est progressive et touche particulièrement les cellules des ganglions et de la rate (Pantaleo et al., 1993). Une chute des LT $CD4^+$ en dessous de 200 cellules/µL de sang entraîne l'apparition de maladies opportunistes et caractérise l'entrée dans la phase SIDA (Douek et al., 2003) (**Fig.13**).

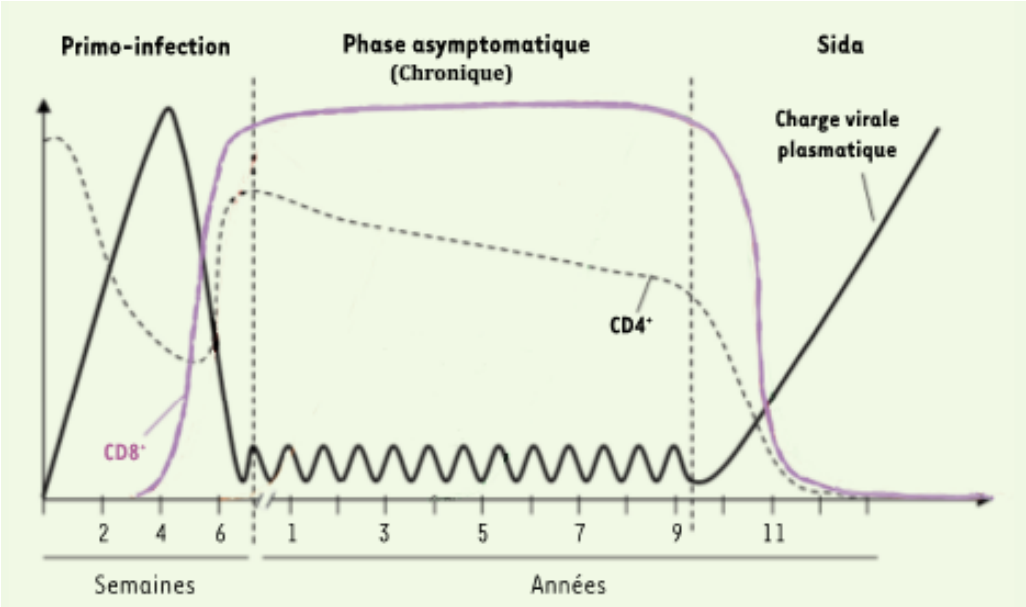


Figure 13 *: Les stades cliniques de l'infection par le VIH.* ***Adaptée de (Peressin et al., 2014).*** *La primo infection dure environ 6 semaines et se caractérise par une chute des LT $CD4^+$ et un pic de la charge virale plasmatique. L'activité des LT $CD8^+$ permet de contrôler le virus et une remontée des LT $CD4^+$. Pendant la phase asymptomatique (plusieurs années), les LT $CD4^+$ chutent progressivement jusqu'à atteindre un niveau critique insuffisant pour assurer les défenses immunitaires, c'est l'entrée dans la phase SIDA.*

Le premier traitement antirétroviral (ART), l'azidothymidine (AZT), apparait en 1987 (Fischl et al., 1987). Il s'agit d'une molécule ciblant la réverse-transcriptase du VIH. Cependant, le virus s'adapte rapidement à cette monothérapie. Dans les années 1990, de nombreuses molécules antirétrovirales ciblant la réverse-transcriptase sont mises sur le marché puis apparaissent ensuite des molécules ciblant d'autres protéines du VIH comme la protéase (Laskey and Siliciano, 2014). C'est seulement à partir de 1997 que les traitements combinés (cART) sont mis en place. Ces traitements consistent en la combinaison d'au moins 2 molécules (le plus souvent 3 : trithérapie). Aujourd'hui, 41 molécules antirétrovirale existent sur le marché.

Certains patients progressent lentement vers la phase SIDA sans aucun traitement et maintiennent une charge virale basse ainsi qu'un taux de LT $CD4^+$ normal (Pantaleo et al., 1995). Parmi eux, quelques rares patients, appelés « *Elite Controller* », présentent une capacité de contrôle exceptionnelle en maintenant une charge virale indétectable toujours sans aucun traitement (Lambotte and Delfraissy, 2005). J'aborderai les caractéristiques génétiques, immunologiques et virologiques des différents groupes de contrôleurs dans le paragraphe 2.4.

2.1.6. Les réservoirs du VIH

Les traitements cART permettent de contrôler la charge virale des patients à un niveau indétectable. Le virus n'est cependant pas éradiqué de l'organisme.
Les réservoirs du virus se forment probablement dès les premiers jours après infection (Moir et al., 2011). Lors de l'intégration du virus dans le génome d'une cellule cible, cette dernière produit de nouveaux virions puis est amenée à mourir. Cependant le virus peut s'intégrer dans des LT $CD4^+$ qui vont adopter un état quiescent (Pierson et al., 2000). Le VIH est alors protégé des traitements ART puisqu'il ne se réplique plus mais pourra se disséminer lors de la réactivation de la cellule. Les réservoirs du VIH peuvent également correspondre à des sites anatomiques particuliers comme le système nerveux central (Pierson et al., 2000).

Le VIH infecte les cellules qui expriment le marqueur CD4, notamment les LT $CD4^+$. Les Tfh peuvent donc être une cible pour le virus et participent même à l'établissement du réservoir.

De plus, le VIH se localise précocement dans les OLII et provoque une hyperplasie (Pantaleo et al., 1993). Ces observations suggèrent une altération des populations cellulaires présentes dans les OLII et un éventuel impact sur la réaction du CG et la production d'anticorps.

2.2. L'impact de l'infection par le VIH sur les CG

Dans cette sous-partie, je vais détailler l'impact de l'infection par le VIH sur les Tfh et les LB **dans les OLII**. J'aborderai ensuite la production d'anticorps (résultat d'une réaction extra-folliculaire et ou de la réaction du CG) chez les patients VIH^+.
A noter que la $3^{ème}$ partie de mon introduction se concentrera sur le suivi de la réponse immunitaire dans le sang. Dans ce contexte, j'aborderai les observations faites en périphérie sur les populations de LB et de Tfh du sang lors de l'infection par le VIH.

2.2.1. Tfh et établissement du réservoir

Depuis longtemps, les LT présents dans les CG sont connus comme étant des cibles privilégiées pour la persistance et la réplication du virus (Hufert et al., 1997).
Les Tfh sont en effet des cibles du VIH et contiennent le plus grand nombre de copies d'ADN parmi les populations de LT $CD4^+$ mémoires (Perreau et al., 2013). Les Tfh forment donc un compartiment majeur pour la réplication et la production de particules virales dans les ganglions de patients virémiques (Perreau et al., 2013) et servent probablement de réservoir au virus. Dans le cas de l'infection par le SIV, de l'ADN proviral persiste dans les Tfh issus de ganglions des macaques SIV^+ traités (Fukazawa et al., 2015). Le VIH persiste également dans les ganglions issus de patients VIH^+ contrôleurs (voir paragraphe 2.4), en particulier dans les Tfh (Boritz et al., 2016). De plus, Cette étude montre que le virus présent dans les lymphocytes du sang correspond à celui détecté dans les ganglions, suggérant bien un lien entre le réservoir des OLII et la circulation (Boritz et al., 2016).
De façon intéressante, le facteur de restriction SAMHD1 est moins exprimé dans les Tfh, rendant cette population particulièrement susceptible à l'infection par le VIH (Ruffin et al., 2015). In vitro, les CG-Tfh issus des ganglions humains non infectés sont en effet hautement

sensibles à l'infection par le VIH (Kohler et al., 2016). Des virus de tropisme R5 ou X4 peuvent infecter les CG-Tfh (Kohler et al., 2016).

2.2.2. Impact de l'infection par le VIH sur la dynamique des Tfh

Paradoxalement, plusieurs études mettent en évidence une augmentation de la proportion de Tfh dans les ganglions des patients en stade chronique (Lindqvist et al., 2012; Perreau et al., 2013). L'accumulation des Tfh est plus marquée lorsque les patients ne reçoivent pas de traitements ART, suggérant un lien avec la persistance du virus. De plus, la fréquence des Tfh corrèle positivement avec la charge virale mesurée dans le plasma (Lindqvist et al., 2012; Perreau et al., 2013). Les ganglions et la rate concentrent de large quantité de virus associés aux FDC (Cheynier et al., 1994; Embretson et al., 1993; Pantaleo et al., 1998), ce qui supporte l'hypothèse d'un lien entre persistance de l'antigène et accumulation des Tfh dans les OLII des patients infectés.

L'infection des Tfh et leur accumulation ont également été observées dans les ganglions et la rate de macaques SIV^+ en stade chronique (Hong et al., 2012; Petrovas et al., 2012; Xu et al., 2015a). Pendant la primo-infection, la fréquence des Tfh diffère selon la vitesse à laquelle les macaques vont progresser vers le stade SIDA (Hong et al., 2014; Moukambi et al., 2015). Ainsi, la dynamique des Tfh dans le contexte de l'infection par le VIH ou le SIV peut dépendre du stade de l'infection (primo-infection ou chronique), de la population de Tfh étudiée (définie par un phénotype particulier) ou de la vitesse de progression vers le stade SIDA (individus progresseurs ou contrôleurs) (**Tableau 2**).

Peu d'études se sont intéressées à la fonctionnalité des Tfh lors de l'infection par le VIH. Des Tfh, issus des ganglions ou des amygdales de patients VIH^+, mis en culture avec des LB autologues, n'apportent pas l'aide nécessaire aux LB pour la sécrétion d'IgG (Cubas et al., 2013). Ce défaut pourrait être lié à une surexpression de PD-L1 par les LB qui altère la sécrétion d'IL-21 par les Tfh. En effet, un ajout d'IL-21 dans la culture restaure la sécrétion d'IgG par les LB (Cubas et al., 2013).

Virus	Stade	Progression	Organe	Phénotype	Dynamique	Ref.
VIH	Chronique	N.D.	Ganglions	$CXCR5^+PD\text{-}1^+$ $Bcl\text{-}6^+$	Accumulation	(Perreau et al., 2013)
VIH	Chronique	N.D.	Ganglions	$CXCR5^+PD\text{-}1^+$ $Bcl\text{-}6^+$ ($CCR7^-$ $CD45RA^-$)	Accumulation	(Lindqvist et al., 2012)
SIV	Précoce	Progresseurs	Rate	$CXCR5^+PD^-1^+$	Perte	(Moukambi et al., 2015)
SIV	Précoce	Progresseurs lents	Ganglions	$CXCR5^+PD\text{-}1^+$	Accumulation	(Hong et al., 2014)
SIV	Précoce	Progresseurs rapides	Ganglions	$CXCR5^+PD\text{-}1^+$	Pas d'accumulation	(Hong et al., 2014)
SIV	Chronique	Progresseurs lents	Ganglions	$CXCR5^+PD\text{-}1^+$	Accumulation	(Hong et al., 2012)
SIV	Chronique	Progresseurs lents	Rate Ganglions	$CD45RA^-CD62L^+$ $CXCR5^+PD\text{-}1^+$	Accumulation	(Moukambi et al., 2015)
SIV	Chronique	Progresseurs rapides	Ganglions	$CXCR5^+PD\text{-}1^+$	Perte	(Moukambi et al., 2015)
SIV	SIDA	Progresseurs	Ganglions	$CXCR5^+PD\text{-}1^+$	Perte	(Xu et al., 2015b)
SIV	Chronique	Contrôleurs	Ganglions	$CXCR5^+PD\text{-}1^+$	Préservation	(Xu et al., 2015b)
SIV	Chronique	Progresseurs	Ganglions	$CXCR5^+PD\text{-}1^+$	Accumulation	(Xu et al., 2015a)
SIV	Chronique	N.D.	Ganglions	$CD28^{hi}CD95^{hi}$ $CCR7^{lo}PD\text{-}1^{hi}$	Accumulation	(Petrovas et al., 2012)

***Tableau 2** : Dynamique des Tfh observée dans différentes études. N.D. : Non determiné ; hi : high ; lo : low.*

2.2.3. Impact de l'infection par le VIH sur les Tfr

Tout comme les Tfh et les Treg classiques, les Tfr issus de macaques SIV^+ contiennent de l'ADN viral, signe de leur infection (Blackburn et al., 2015; Chowdhury et al., 2015). Les Tfr participent à la régulation du CG (voir partie 1.4.5). Un éventuel défaut de leur fonction et/ou une réduction de leur nombre lors de l'infection par le SIV ou le VIH peut participer à l'accumulation des Tfh et à une sélection incontrôlée de LB dans le CG.

Lors de l'infection chronique par le VIH ou le SIV, les Tfr sont augmentés dans les ganglions (Miles et al., 2015). A l'inverse, d'autres travaux montrent une diminution de la proportion

des Tfr dans les ganglions de macaques SIV^+ en lien avec l'accumulation des Tfh durant le phase chronique (Blackburn et al., 2015). A noter que, dans ces deux études, les populations de Tfr ne sont pas identifiées par la même stratégie : $CD3^+CD8^-CXCR5^+CD127^-CD25^{hi}FOXP3^+$ (Miles et al., 2015) ou $CD3^+CD4^+CD95^+CXCR5^+CCR7^-CD25^+FOXP3^+$ (Blackburn et al., 2015) et que les souches de SIV utilisées pour infecter les macaques sont différentes SIV_{mac239} (Miles et al., 2015) ou SIV_{mac251} (Blackburn et al., 2015). D'autres travaux soulignent une diminution des Tfr lors de l'infection chronique par le SIV en lien avec l'accumulation des Tfh (Chowdhury et al., 2015).

Les Tfh sont donc une cible majeure du VIH. Leur proportion est augmentée lors de la phase chronique de l'infection et certains éléments suggèrent une altération de leurs fonctions. A ce jour, aucune étude ne décrit les populations de Tfh dans la rate lors de l'infection par le VIH. De plus, peu de choses sont connues sur la fonctionnalité des Tfh dans ce contexte.
Parallèlement, la réponse humorale est altérée chez les patients VIH^+ probablement en lien avec un défaut qualitatif et/ou une quantité excessive de Tfh. Je vais détailler l'impact de l'infection sur les populations de LB des OLII et sur la production d'anticorps.

2.2.4. Impact de l'infection par le VIH sur les populations de LB

Dans les OLII, les différentes étapes de la maturation des LB sont identifiées par les marqueurs IgD et CD38. Ainsi, les CG-LB sont de phénotype IgD^-CD38^+ et les plasmocytes sont de phénotype IgD^-CD38^{hi} (Pascual et al., 1994). Bien que les LB ne soient pas des cibles directes du VIH, le virus opsonisé par des molécules du complément peut se fixer aux LB en interagissant avec la molécule CD21 (Moir et al., 2000). Les LB sont ainsi considérés comme un réservoir extracellulaire du virus et participent à la transmission du virus aux LT. La fixation du virus à la molécule CD21 mène également à une diminution de l'expression de cette molécule par les LB (Moir et al., 2000).
Parallèlement à l'accumulation des Tfh, deux études mettent en évidence une augmentation des CG-LB et des plasmocytes dans les ganglions des patients VIH^+ non traités en phase chronique (Lindqvist et al., 2012; Perreau et al., 2013). Les traitements ART permettent de modérer (Lindqvist et al., 2012) voir de normaliser (Perreau et al., 2013) les proportions de CG-LB et de plasmocytes dans les ganglions.

Les LB des patients infectés par le VIH présentent une expression exacerbée de marqueurs tels que CD70 et CD71 en lien avec leur hyperactivité (Martinez-Maza et al., 1987; De Milito et al., 2004). Cette hyperactivité des LB dans les OLII a d'abord été associée à un phénomène extra-folliculaire impliquant le facteur viral Nef (Swingler et al., 2008; Xu et al., 2009). Ces études suggèrent que la transmission de Nef des macrophages aux LB initie l'activation du LB et affecte la réponse anti-VIH en manipulant le mécanisme de recombinaison de classe des Ig. Cependant, les récentes découvertes sur la dynamique des Tfh lors de l'infection par le VIH suggèrent plutôt un rôle des Tfh dans l'hyperactivité des LB (Cubas and Perreau, 2014; Petrovas et al., 2012). L'impact de l'infection par le VIH sur les LB est donc probablement lié à un dysfonctionnement des interactions entre les Tfh et les LB plutôt qu'à des mécanismes extra-folliculaires.

Finalement, une quantité excessive de Tfh et de LB dans les CG lors de l'infection par le VIH participe probablement à l'hyperplasie observée chez les patients au début de l'infection.

2.3. La réponse humorale lors de l'infection par le VIH

L'apparition d'hypergammaglobulinémies lors de l'infection par le VIH est l'une des premières caractéristiques cliniques à avoir été formellement établie (Lane HC et al., 1983). L'hymergammaglobulinémie se traduit par une sécrétion spontanée et incontrôlée d'anticorps, notamment des IgG1, en lien avec l'hyperactivité des LB (Müller et al., 1989). Dans cette sous-partie, je vais d'abord décrire la sécrétion d'anticorps auto-immuns lors de l'infection par le VIH. J'aborderai ensuite les caractéristiques des anticorps anti-VIH produits par les patients VIH^+ et leur cinétique d'apparition.

2.3.1. L'émergence d'anticorps auto-immuns

L'infection par le VIH pourrait est associée à l'apparition de syndromes auto-immuns chez les patients.

Les patients VIH^+ peuvent développer diverses pathologies auto-immunes dont un lupus érythémateux, une thrombocytopénie, une vasculite, une polymyosite ou une

dermatomyosite (Zandman-Goddard and Shoenfeld, 2002). Ces pathologies apparaissent rapidement suite à l'infection et ont majoritairement été rapportées avant l'introduction des traitements ART. L'introduction des traitements ART a globalement permis de limiter l'émergence des phénomènes auto-immuns. Cependant, certaines pathologies telles que la sarcoïdose sont plus fréquemment rapportées chez les patients VIH^+ depuis la mise en place des traitements.

Parallèlement, des auto-anticorps (anti-ADN, anti-cardiolipine, anti-myosine par exemple (Zandman-Goddard and Shoenfeld, 2002)) peuvent être détectés dans le sang des patients VIH^+.

La production d'auto-anticorps reflète une hyper-activation du système immunitaire, ce qui peut d'abord paraître contradictoire étant donné l'état d'immunodéficience imposé par l'infection par le VIH. Pourtant, malgré une perte globale des LT $CD4^+$, nous avons vu que les Tfh étaient en quantité augmentée dans les OLII. L'activation polyclonale des LB (Lane HC et al., 1983) est probablement due un défaut de sélection des LB par les Tfh présents en quantité excessive dans les CG. La limitation de la quantité de Tfh, permettant la sélection des clones de LB les plus affins, a déjà été démontrée (Pratama and Vinuesa, 2014). Cependant, la production d'anticorps auto-immuns peut également provenir de l'activation polyclonale de LB à l'extérieur des CG (William et al., 2002). Dans ce cas, les auto-anticorps présentent tout de même des hypermutations, démontrant que le processus de maturation d'affinité peut également avoir lieu en dehors des CG. Dans tous les cas, une dérégulation des Tfh semble liée à l'apparition de phénomènes auto-immuns.

Certains patients VIH^+ peuvent développer un purpura thrombocytopénique idiopathique (PTI) (Morris et al., 1982) se caractérisant par l'apparition d'anticorps anti-plaquettes. Très fréquente avant l'introduction des traitements antirétroviraux, la progression de cette pathologie pouvait être ralentie en retirant la rate des patients (Oksenhendler et al., 1993). Des rates ont pu être collectées dans les années 90 par l'équipe de B. Autran et ont déjà fait l'objet de nombreuses études (Cheynier et al., 1994; Gratton et al., 2000; Hosmalin A et al., 2001; McIlroy et al., 1995, 2001). Dans le premier axe de mes travaux de thèse, j'ai eu accès à cette collection de rates humaines pour caractériser les populations de Tfh et de LB.

2.3.2. Les anticorps anti-VIH

2.3.2.1. Caractéristiques des anticorps anti-VIH

Les patients VIH$^+$ produisent des anticorps spécifiques des protéines du VIH. Ces anticorps reconnaissent aussi bien des antigènes au niveau de l'enveloppe du virus que des antigènes internes de la capside ou encore des antigènes issus des protéines accessoires comme *Vif* et *Nef* (Boyd and James, 1992). Lorsqu'ils sont spécifiques de l'enveloppe du VIH, les anticorps reconnaissent des épitopes de la gp160 (Zolla-Pazner, 2004). La gp160 est un hétéro-trimère de l'enveloppe du VIH composé de la gp120 et de la gp41.

Nous avons abordé dans le paragraphe 1.4.4.3. les différentes classes d'anticorps et leurs fonctions. Les anticorps anti-VIH sont des IgG et des IgA. Les IgA sont généralement impliquées dans les défenses des muqueuses (Woof and Ken, 2006) et semblent former une barrière efficace contre le VIH. En effet, des IgA anti-VIH sont détectées dans le sang de personnes séronégatives couramment exposées au VIH et peuvent prévenir l'infection chez les macaques (Zhou and Ruprecht, 2014). Les IgG anti-VIH détectées dans le sang des patients sont majoritairement de sous-type IgG1(Banerjee et al., 2010). Cependant, les patients capables de contrôler l'infection par le VIH semblent produire des IgG2 anti-VIH en lien avec le contrôle de la réplication virale (Ngo-Giang-Huong et al., 2001). D'autre part, la sécrétion d'IgG3 pourrait également être liée au contrôle de l'infection (Ackerman et al., 2016). Nous aborderons ce sujet plus en détails dans la partie 2.4.

Peu de temps après la découverte du VIH, des anticorps capables de neutraliser le virus ont été détectés dans le sérum des patients (Robert-Guroff et al., 1985; Weiss et al., 1985). Les anticorps anti-VIH neutralisants reconnaissent le virus entier et sont donc exclusivement spécifiques de l'enveloppe du virus. Nous aborderons uniquement les IgG neutralisantes.

2.3.2.2. Production d'anticorps neutralisants

Les anticorps anti-VIH apparaissent environ 1 semaine après l'infection mais leur activité ne permet pas de contrôler la propagation du virus (Tomaras et al., 2008) (**Fig.14**). C'est seulement plusieurs mois après l'infection que des anticorps neutralisants sont produits. Cependant, ces anticorps neutralisent des souches de virus autologues, c'est à dire provenant du patient, mais restent inefficaces contre les souches hétérologues (Moog et al., 1997) (**Fig.14**). Des anticorps capables de neutraliser plusieurs souches hétérologues du VIH (cross-réactifs) sont généralement produits 2 à 4 ans après l'infection (Gray et al., 2011) (**Fig.14**). Environ 20% des patients VIH^+ présentent une sécrétion prédominante d'anticorps neutralisant cross-réactifs (Gray et al., 2007). Parmi ces patients, environ 1% sécrètent des anticorps neutralisants un large spectre de souches du VIH (bnAbs : « *broadly neutralizing antibodies* » (Simek et al., 2009).

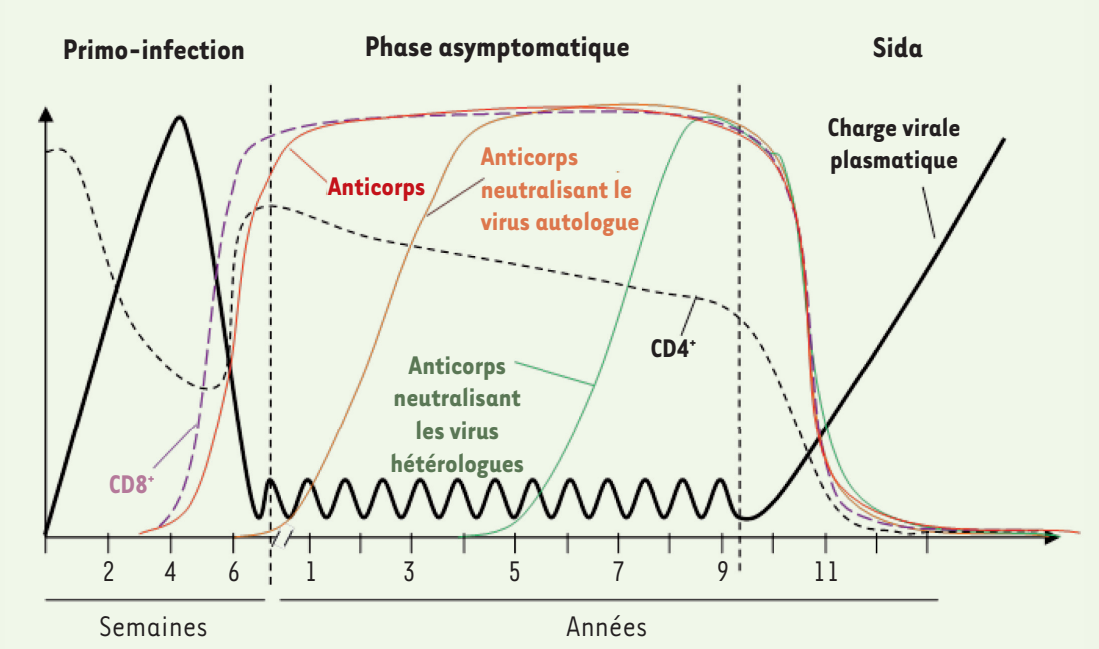


Figure 14 *: Production des anticorps anti-VIH au cours du temps* **(Peressin et al., 2014).** *Des anticorps anti-VIH apparaissent rapidement lors de la primo-infection mais ne neutralisent pas le virus. Des anticorps neutralisants la souche autologue sont produits plusieurs mois après l'infection, pendant la phase asymptomatique (ou chronique). Finalement, des anticorps capables de neutraliser les souches hétérologues du VIH (cross-réactifs) apparaissent seulement plusieurs années après l'infection, lorsque la phase asymptomatique est déjà bien avancée.*

2.3.2.3. Les bnAbs

Les bnAbs sont des anticorps capables de reconnaître plusieurs centaines de souches différentes du VIH. Ils ciblent généralement des régions vulnérables du virus dont le site de fixation à la molécule CD4 (CD4bs), le site N-glycan des boucles V1V2 et V3 et la région MPER (membrane proximal external region) de la gp41 (Mouquet, 2014) (**Fig.15**).

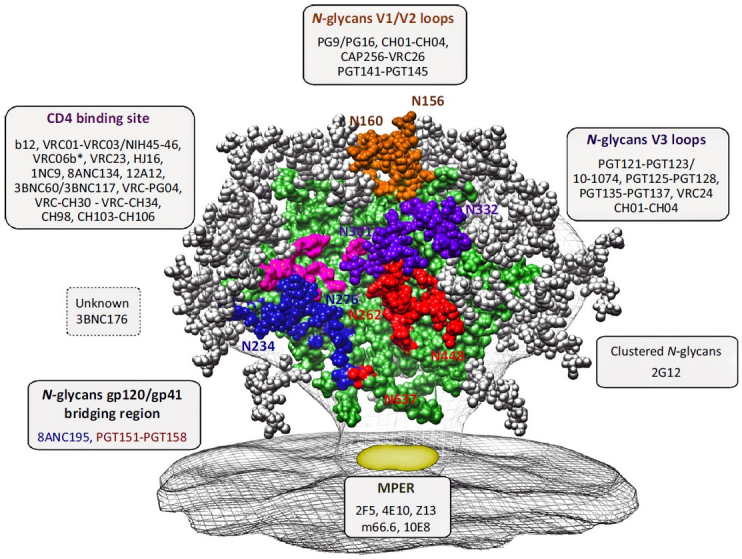


***Figure 15**: Les sites de fixation des bnAbs* **(Mouquet, 2014).** *Les bnAbs reconnaissent des sites vulnérables de l'enveloppe du VIH : le site de fixation à la molécule CD4 (CD4bs) de la gp120, le sites V1V2 et V3 de la gp120, la région MPER (membrane proximal external region) de la gp41 et la région charnière entre la gp120 et la gp41. Des bnAbs, identifiés comme reconnaissant ces différentes zones du virus, sont listés pour chaque site de fixation.*

Les hypermutations sont nombreuses au niveau des chaînes variables lourdes et légères des bnAbs, en lien avec leur haut pouvoir de neutralisation. Environ 40% des acides aminés sont substitués dans ces régions et la plupart des bnAbs présentent une boucle variable de la chaîne lourde (CDRH3) inhabituellement longue permettant d'accéder à des régions cryptiques du VIH (Mouquet, 2014). Ces modifications supposent de multiples cycles de maturation des LB dans les CG et donc un rôle des Tfh dans la génération des bnAbs (Pissani and Streeck, 2014).

Certains bnAbs ciblant des régions de la gp41 sont polyréactifs et peuvent donc reconnaître d'autres Ag que ceux du VIH. C'est notamment le cas des bnAbs connus sous les noms 2F5 et 4E10, capables de reconnaître des phospholipides membranaires en plus de la gp41 du VIH

(Alam et al., 2007). De la même manière, le bnAb CH98 a été identifié chez un patients VIH$^+$ atteint d'un lupus érythémateux (Bonsignori et al., 2014). Le bnAb CH98 reconnaît le site de fixation au CD4 au niveau de l'enveloppe du VIH aussi bien que des antigènes humain comme l'ADN double brin (Bonsignori et al., 2014). La poly-réactivité et plus particulièrement l'auto-réactivité de cet anticorps suggère que certains bnAbs pourraient être produits grâce à une tolérance du système immunitaire vis à vis de LB auto-réactifs.
Cependant, la majorité des bnAbs identifiés ne présentent pas de polyréactivité et/ou d'auto-réactivité (Mouquet and Nussenzweig, 2012). Les facteurs influençant la génération des bnAbs lors de l'infection par le VIH restent donc mal compris. Il s'agit probablement d'un ensemble de facteurs génétiques, immunitaires et virologiques.
La majorité des bnAbs décrits sont des IgG. Cependant, des IgA ciblant le même épitope que le bnAbs 2F5 (voir Fig.15) et présentant une activité neutralisante ont déjà été identifiées (Alfsen et al., 2001). De plus, des IgA1 à fort pouvoir neutralisant ont récemment pu être produites in vivo chez des souris humanisées (Benjelloun et al., 2016). Contrairement au bnAbs « classiques », ces IgA1 présentent une région CDRH3 courte et un faible taux de mutations somatiques. Le développement d'IgA neutralisants représente un grand intérêt étant donné leur localisation au niveau des muqueuses, porte d'entrée principale du VIH.

Aujourd'hui, les protocoles de vaccinations anti-VIH ont pour but de promouvoir la production de bnAbs. Malgré la complexité du mécanisme de génération des bnAbs, une récente stratégie a permis de promouvoir, chez la souris, la sécrétion d'anticorps anti-VIH ayant les mêmes caractéristiques que le bnAb VRC01 (Jardine et al., 2015). Cette stratégie consiste à prédire l'antigène à l'origine de l'activation du précurseur du bnAb VRC01 et de l'utiliser pour immuniser les souris.

2.3.2.4. Les anticorps anti-VIH non neutralisants

Bien que la fonction neutralisante des anticorps anti-VIH soit majoritairement mise en avant, d'autres fonctions effectrices peuvent participer au contrôle de l'infection. Dans une revue parue en 2014 dans le journal « *Trends in Immunology* », Hugo Mouquet aborde la capacité des anticorps anti-VIH à (a) limiter la transmission du VIH de cellules à cellules, (b) induire

l'ADCC via les récepteurs Fcγ, (c) inhiber le transcytose du virus au niveau des cellules épithéliales des muqueuses et (d) neutraliser le virus à l'intérieur des cellules épithéliales (Mouquet, 2014).

Les paramètres dictant la capacité des bnAbs à éliminer des cellules infectées par le mécanisme d'ADCC ont récemment été étudiés (Bruel et al., 2016). Ces travaux démontrent une corrélation positive entre l'intensité de fixation des bnAbs à l'Ag et leur capacité à induire une ADCC.

D'autre part, les anticorps anti-VIH peuvent être polyfonctionnels (Ackerman et al., 2013). La notion de polyfonctionnalité regroupe les capacités d'ADCC, d'initiation de la phagocytose par les neutrophiles et les macrophages et l'initiation de la cascade du complément (Ackerman et al., 2016). Les IgG3 et les IgG1 anti-VIH seraient les plus aptes à adopter un profil polyfonctionnel (Ackerman et al., 2016).

Les fonctions effectrices des anticorps anti-VIH sont très hétérogènes selon les patients. Bien que certains patients présentent dans leur sérum des anticorps anti-VIH au fort potentiel neutralisant, cette particularité n'est pas nécessairement liée à un meilleur pronostic. Le VIH, par ses capacités à muter et à former des réservoirs, peut échapper à la réponse immunitaire dépendante des anticorps.

Cependant, quelques rares patients peuvent contrôler naturellement l'infection par le VIH.

2.4. Les contrôleurs du VIH

2.4.1 Définitions cliniques

Les contrôleurs du VIH maîtrisent naturellement la réplication du virus sans aucun traitement ART depuis au moins 8 ans et ne présentent aucun symptôme. En France, ils représentent moins de 2% des patients VIH^+ selon une étude menée en 2009 (Grabar et al., 2009).

Deux groupes de patients se distinguent :

- Les contrôleurs virémiques (VC), généralement recrutés sur des critères de contrôle immunologique (maintien d'un taux de CD4 ≥ 500/µL ou 600/µL) ;

- Les contrôleurs non virémiques, aussi appelés *Elite Controller* (EC) qui maintiennent un nombre de copies d'ARN viral sous le seuil détectable (<50 copies/mL). Cependant l'ANRS (France Recherche Nord&Sud Sida-HIV Hépatites) considère parfois comme EC les patients ayant réalisé au moins 5 tests de charge virale < 400 copies/mL et n'ayant reçu aucun traitement ces 5 dernières années (Madec et al., 2013).

La **CO**horte **D**es **EX**trêmes (CODEX ou CO21), sous l'égide de l'ANRS, est une cohorte française de contrôleurs du VIH. Elle regroupe des patients VC et EC ainsi que des contrôleurs post-traitement (voir annexe 1). Initiée en février 2012, des patients continuent à être inclus dans la cohorte.

De nombreuses études sont menées pour élucider les paramètres virologiques, immunologiques et/ou génétiques permettant le contrôle de l'infection par ces patients. Une revue parue en 2009 résume les éléments connus, notamment chez les EC (O'Connell et al., 2009). Depuis, la littérature s'est enrichie et de nombreuses pistes sont envisagées.

2.4.2. Contrôle du VIH et réponses $CD8^+$ cytotoxiques

Les LT $CD8^+$ sont impliqués dans le contrôle de la réplication du virus. En effet, un déplétion des LT $CD8^+$ chez des macaques chroniquement infectés par le SIV entraîne une augmentation de la charge virale (Jin et al., 1999). Une partie des contrôleurs du VIH présentent une forte réponse CD8 cytotoxique dirigée contre le VIH (Hersperger et al., 2011; Lambotte and Delfraissy, 2005; Sáez-Cirión et al., 2007). Cette réponse cytotoxique a été identifiée contre différents Ag du VIH dont gag, env et les protéines accessoires (O'Connell et al., 2009) mais la réponse cytotoxique anti-gag semble être majoritairement associée au maintien d'une charge virale basse (Kiepiela et al., 2007). La réponse cytotoxique se traduit par le relargage de perforines et de granzymes accompagné par la sécrétion de cytokines comme l'IFNγ, le TNFα, l'IL-2 et le MIP1β (Hersperger et al., 2011; Migueles et al., 2008). La qualité de la réponse, plutôt que la quantité, semble être associée à un meilleur contrôle. Ainsi, plus la réponse cytotoxique fait intervenir de facteurs différents, plus la virémie est basse (Betts et al., 2006). Cependant la capacité suppressive des LT $CD8^+$ cytotoxiques

semble liée à la fréquence de LT $CD8^+$ spécifiques du VIH, en particulier de gag (Sáez-Cirión et al., 2009).

Une forte réponse $CD8^+$ cytotoxique chez les contrôleurs du VIH est généralement associée à l'expression de l'allèle HLA-B*57 (Betts et al., 2006; Lambotte and Delfraissy, 2005; Migueles et al., 2000; Pereyra et al., 2008; Sáez-Cirión et al., 2007; Xie et al., 2010). L'allèle B*57 est d'ailleurs surreprésenté dans la population de contrôleurs du VIH (Pereyra et al., 2008). Chez les contrôleurs HLA-$B*57^+$, la réponse CD8 cytotoxique est majoritairement dirigée contre des épitopes du VIH dont la fixation est restreinte à l'allèle B*57 (Migueles et al., 2000). Cependant, l'éventuelle prédominance d'un clone de TCR en lien avec l'expression de l'allèle B*57 et le contrôle du VIH n'est pas claire. Si l'étude du répertoire des TCR de LT $CD8^+$ issus de patients contrôleurs HLA $B*57^+$ ne révèle pas de différences avec celui de patients non contrôleurs également HLA $B*57^+$ (Mendoza et al., 2012), d'autres travaux relient le contrôle de la réplication du virus chez les contrôleurs HLA $B*57^+$ avec l'expression d'un clone particulier de TCR (Chen et al., 2012). L'expression de l'allèle B*57 par les contrôleurs est également associée à une augmentation de la fréquence des LT $CD8^+$ mémoires anti-gag en lien avec un niveau bas de la virémie, ce qui n'est pas le cas pour les LT $CD8^+$ anti-Nef (Xie et al., 2010).

Cependant une forte réponse $CD8^+$ cytotoxique dirigée contre le VIH n'est pas détectée chez tous les contrôleurs du VIH suggérant l'implication d'autres paramètres (Sáez-Cirión et al., 2009).

2.4.3. Contrôle du VIH et paramètres génétiques

En plus de l'allèle HLA-B*57, les allèles B*5801 et B*27 sont également surreprésentés dans la population de contrôleurs du VIH et potentiellement liés à une forte réponse $CD8^+$ cytotoxique (O'Connell et al., 2009).

D'autres particularités génétiques peuvent être en lien avec le contrôle de l'infection par le VIH. C'est par exemple le cas d'une mutation de la molécule CCR5 (Poropatich and Sullivan, 2011). Une délétion de 32 paires de bases (CCR5Δ32) introduit un codon stop et aboutit à la production d'une protéine tronquée qui sera retenue dans les endosomes et non exprimée à la surface de la cellule. L'expression hétérozygote de CCR5Δ32 limite l'infection des cellules par les virus de tropisme R5 et corrèle avec une progression lente vers la phase SIDA. Ce

polymorphisme de CCR5 est d'ailleurs plus fréquent chez les contrôleur du VIH (Poropatich and Sullivan, 2011).

2.4.4. Contrôle du VIH et paramètres virologiques

Plusieurs travaux ont d'abord suggéré que les contrôleurs du VIH étaient infectés par un virus déficient facilitant le contrôle de la réplication virale (O'Connell et al., 2009). Cette hypothèse est remise en cause par la démonstration (*in vitro* et *in vivo*) que des virus isolés chez des EC se répliquent normalement et sont bien capables d'infecter *de novo* des LT $CD4^+$ (Salgado et al., 2014). De plus, les EC continuent à contrôler l'infection lorsqu'ils sont surinfectés par une autre souche du virus et une même souche du VIH peut très bien mener à une progression jusqu'au stade SIDA ou à un contrôle de l'infection selon les individus (O'Connell et al., 2009). Ce dernier point a été établi lors d'une étude de la transmission du virus de patients en phase SIDA à des individus qui contrôleront l'infection.
Pourtant, il a récemment été montré qu'un défaut d'expression de Nef par le virus est associé à un contrôle précoce de l'infection (Kuang et al., 2014). Chez certains contrôleurs, un défaut du virus pourrait donc participer à leur capacité à contrôler l'infection.

2.4.5. Contrôle du VIH, réponse immunitaire innée et réponse intrinsèque

Le contrôle précoce de l'infection, dès la phase de primo-infection, suggère l'implication de la réponse immunitaire innée. Les NK (*Natural Killer*) peuvent par exemple éliminer les cellules présentant une expression diminuée des molécules du CMH-I suite à l'infection par le VIH (Fauci et al., 2005). Le phénotype des NK est altéré chez la plupart des patients VIH^+ mais reste inchangé chez les EC (Barker et al., 2007). L'expression de récepteur KIR (Killer Immunoglobulin-like Receptors) KIR3DS1 par les NK et sa liaison à un HLA-B particulier pourrait être impliqué dans le contrôle de l'infection par le VIH (Martin et al., 2002). Dans ce cas, il s'agit davantage d'une prédisposition génétique. Le fonctionnement des NK *in vivo* lors de l'infection par le VIH reste cependant peu connu et rend donc difficile une association formelle entre l'activité des NK et le contrôle de la réplication virale (Fauci et al., 2005).
D'autre part, le polymorphisme du récepteur de l'immunité innée TLR9 et une forte concentration de MBL (Mannose-binding lectin) dans le sérum peuvent favoriser un contrôle

de l'infection et une progression lente de la maladie par les patients VIH$^+$ (Poropatich and Sullivan, 2011).

D'autres pistes, impliquant des réponses intrinsèques sont envisagées pour expliquer le contrôle de l'infection par le VIH. Le facteur de restriction APOBEC3G bloque l'intégration du VIH. Une expression élevée d'APOBEC3G chez les patients VIH$^+$ permet une progression lente vers le stade SIDA (Jin et al., 2007). De la même façon, l'expression de certains allèles du gène codant pour TRIM5, un autre facteur de restriction du VIH, est en faveur d'un contrôle de l'infection (Van Manen et al., 2008).

2.4.6. Contrôle du VIH et rôle des LT CD4$^+$

Récemment, le répertoire des LT CD4$^+$ des patients VIH$^+$ contrôleurs a été étudié (Benati et al., 2016). Comparés à des patients VIH$^+$ traités, les contrôleurs présentent un biais du répertoire de TCR exprimés par leur LT CD4$^+$ en faveur d'un clonotype dirigé contre un peptide immunoprévalent de la protéine gag du VIH. Le transfert de ce TCR particulier dans des LT CD4$^+$ issus de donneurs sains leur confère une forte affinité contre gag et la capacité à produire simultanément un large panel de cytokines (Benati et al., 2016). D'autre part, les LT CD4$^+$ issus de patients VIH$^+$ contrôleurs présentent une meilleure avidité pour gag (Vingert et al., 2010). Un maintien de la fonction des LT CD4$^+$ mémoires chez les contrôleurs pourrait également être impliqué (Saez-Cirion et al., 2014). En effet, l'expression de la molécule inhibitrice CTLA-4 et de la molécule pro-apoptotique FOXO3a est réduite à la surface des LT CD4$^+$ mémoires des contrôleurs du VIH (Saez-Cirion et al., 2014).

Nous avons largement abordé les Tfh dans la partie 1. Les Tfh sont augmentés lors de l'infection par le VIH et le SIV. Cependant, chez des macaques contrôlant l'infection par le SIV, la proportion de Tfh est maintenue (Xu et al., 2015a). De plus, la fréquence de Tfh infectés chez l'hôte naturel du SIV (singe Mangabey) et moins importante que chez les patients VIH$^+$ et les macaques SIV$^+$ (Brenchley et al., 2012). Actuellement, peu d'éléments sont connus concernant un lien entre les Tfh et le contrôle de l'infection par le VIH chez l'Homme.

2.4.7. Contrôle du VIH et réponse humorale

La réponse humorale est hétérogène chez les contrôleurs du VIH notamment en ce qui concerne les fonctions effectrices des anticorps anti-VIH. Ainsi, seuls quelques contrôleurs produisent des bnAbs (Scheid et al., 2009a). Des contrôleurs infectés par deux souches du VIH présentent un spectre de neutralisation par les anticorps plus large que des contrôleurs infectés par une seule souche (Pernas et al., 2015). Cette étude soutient l'hypothèse d'un lien entre diversité antigénique et production de bnAbs. D'autre part, les capacités neutralisantes des anticorps anti-VIH ne sont pas meilleures chez des patients VIH^+ progresseurs non traités que chez des patients VIH^+ contrôleurs (Lambotte et al., 2009). De plus, les spectres de neutralisation des anticorps produits par les contrôleurs sont très hétérogènes. Finalement, une présence accrue d'anticorps capables d'ADCC pourrait différencier les patients VIH^+ contrôleurs des non contrôleurs (Lambotte et al., 2009). Comme abordé précédemment, une récente étude démontre, chez les contrôleurs, une polyfonction des anticorps anti-VIH qui pourrait participer au contrôle de l'infection (Ackerman et al., 2016). Dans ce contexte, les IgG3 et les IgG1 anti-VIH seraient les plus aptes à adopter ce profil polyfonctionnel (Ackerman et al., 2016). Les contrôleurs produisent majoritairement des IgG1 tout comme les non contrôleurs (Banerjee et al., 2010). Les IgG1 anti-p24 et anti-gp120 sont détectés en plus grande quantité dans le sérum des contrôleurs comparé à des patients progresseurs non traités. Des IgG3 anti-gp120, bien qu'en faible quantité, sont plus fréquemment détectés dans le sérum des contrôleurs (Banerjee et al., 2010). Dans cette étude, aucune différence significative n'est relevée concernant la présence d'IgG2 anti-VIH bien que, globalement, la réponse IgG2 anti-gp120 soit prédominante comparée à la réponse anti-gp41 dans les deux groupes de patients. D'autres travaux ont montré que la présence d'IgG2 anti-gag et anti-gp41 corrèle avec la diminution de la charge virale chez des patients contrôleurs (Martinez et al., 2005; Ngo-Giang-Huong et al., 2001). Cependant les patients contrôleurs étudiés ne présentent pas les mêmes caractéristiques puisqu'ils ont été inclus soit sur des critères virologiques (nombre de copies d'ARN viral/mL) (Banerjee et al., 2010) soit sur des critères immunologiques (nombre de CD4/µL) (Ngo-Giang-Huong et al., 2001). Ainsi, il reste difficile de tirer des conclusions sur les paramètres impliqués dans le contrôle naturel du VIH puisque chaque observation est propre à une cohorte en particulier.

Cette complexité de définition des contrôleurs du VIH amène parfois à des résultats divergents lors de l'étude de leurs réponses immunitaires. De nombreuses pistes ont été envisagées pour expliquer la capacité de ces patients à contrôler naturellement l'infection. Cependant, aucune ne semble être privilégiée et il s'agit probablement de l'action d'un ensemble de facteurs qui peuvent différer selon les individus. Ainsi, nous pouvons supposer qu'il existe différents « schémas » combinant des paramètres virologiques, immunologiques et génétiques pour permettre à certains individus de contrôler le VIH.
Dans le second axe de ma thèse, j'ai étudié la réponse B mémoire dans le sang de patients contrôleurs inclus dans la cohorte « CODEX ».

L'infection par le VIH a un impact sur la réponse humorale probablement en lien avec l'altération des CG. Les proportions de Tfh et de LB dans les CG sont anormalement élevées lors de l'infection par le VIH et les Tfh semblent présenter un défaut fonctionnel. Dans ces conditions, la réaction du CG peut être perturbée et mener (a) à la production d'anticorps auto-immuns, via la sélection de clones de LB peu affins et (b) à un délai dans la maturation des LB pour la production d'anticorps anti-VIH hypermutés et hautement neutralisants. Quelques rares patients VIH^+ réussissent à contrôler l'infection par le VIH sans ART mais cette capacité n'est pas nécessairement liée à de meilleures réponses humorales bien qu'elles y participent probablement dans certains cas. L'étude de la réponse immunitaire des contrôleurs du VIH est un point clé pour tenter de comprendre les mécanismes intervenant dans le contrôle de l'infection. Ces nouvelles connaissances pourront par exemple être appliquées dans l'élaboration d'un vaccin anti-VIH.
Quelques semaines après une infection ou une vaccination, des anticorps spécifiques de l'antigène en question sont facilement détectables. Les interactions Tfh/LB sont au centre de la production des anticorps et sont régies par de nombreux paramètres (voir partie 1). Cependant, les OLII sont difficiles d'accès chez l'Homme, limitant l'étude des Tfh et des LB dans ces organes. Récemment, des LTh circulants, présentant des capacités à induire *in vitro* une maturation des LB, ont été identifiés dans le sang, compartiment bien plus accessible que les ganglions ou la rate. Cette population de LTh est appelée Tfh périphériques (pTfh) (Morita et al., 2011). Les pTfh sont considérés comme le reflet direct des Tfh (et donc de

l'activité des CG) et offrent ainsi la possibilité d'étudier les paramètres des réponses T dépendantes dans le sang.

3. Suivi des réponses T dépendantes dans le sang

Dans le sang, les lymphocytes présents peuvent à la fois être des lymphocytes effecteurs, des lymphocytes naïfs provenant des OLI et des lymphocytes mémoires provenant des OLII ou de la MO. L'étude de ces populations lymphocytaires dans le sang permet d'avoir un aperçu de la réponse immunitaire initiée par (1) un agent pathogène dans un contexte infectieux ou (2) par la vaccination.

Je vais d'abord décrire les pTfh, leur identification et leurs fonctions. J'aborderai ensuite le suivi des pTfh dans le cadre de la vaccination et l'impact de l'infection par le VIH sur ces cellules. Dans un second temps, je décrirai les différentes populations de LB dans le sang ainsi que les outils disponibles pour étudier leur spécificité dans le contexte de l'infection par le VIH. Pour finir, j'exposerai les impacts de l'infection par le VIH sur les LB du sang.

3.1. Les Tfh dans le sang (pTfh)

3.1.1. Identification et fonctions des pTfh

En même temps que l'identification des Tfh dans les OLII, des LT $CD4^+CXCR5^+$ ont été caractérisés dans le sang (Schaerli et al., 2000). Les LT $CXCR5^+$ en périphérie co-expriment les marqueurs CD62L et CCR7 et ont été proposés comme une sous population de LT « central mémoire » (Tcm) qui diffère des LT « effecteurs mémoires » (Tem) $CCR7^-$. D'autre part, les LT $CXCR5^+$ semblent sécréter moins de cytokines comparés aux Tfh dans les OLII (Schaerli et al., 2000). Cependant, le lien entre les LT $CXCR5^+$ dans le sang et les Tfh dans les OLII n'était pas clairement établi. Plus tard, la preuve qu'une délétion du gène codant pour ICOS mène à une réduction des LT $CXCR5^+$ dans les OLII et dans le sang a conforté l'hypothèse d'un lien entre ces deux populations (Bossaller et al., 2006).

C'est seulement en 2011 que Morita et al. montrent que des LB du sang en co-culture avec des LT $CXCR5^+$ du sang produisent plus d'anticorps comparé à une co-culture avec des LT $CXCR5^-$ (Morita et al., 2011). Les LT $CXCR5^+$ sont proposés comme le versant mémoire périphérique des Tfh et sont alors appelés pTfh (Chevalier et al., 2011).

Comparée aux Tfh, l'expression de CXCR5 et ICOS est moins intense à la surface des pTfh et Bcl-6 n'est plus exprimé (Morita et al., 2011; Schaerli et al., 2000; Simpson et al., 2010).
Finalement, les pTfh forment une population hétérogène et leur origine n'est pas claire. Ils pourraient provenir des centres germinatifs et/ou d'étapes extra-folliculaires plus précoces.

3.1.2. Les différentes populations de pTfh

Les pTfh sont appelés Tfh1, Tfh2 et Tfh17 en lien avec leurs ressemblances aux Th1, Th2 et Th17 (Morita et al., 2011). L'hétérogénéité des pTfh peut notamment s'expliquer par le contexte cytokinique lors de la différenciation d'un LT $CD4^+$ naïf en LTh. Dans le paragraphe 1.2.3., nous avons vu que la différenciation en Tfh nécessite la présence d'IL-6, d'IL-21 et l'engagement d'ICOS. Cependant, la présence de cytokines additionnelles impliquées dans la différenciation d'autres sous-type de LTh influencerait également la différenciation des Tfh et dicterait leur futur profil fonctionnel (Hale and Ahmed, 2015). Ainsi la présence d'IL-12/IFNγ ou IL-4 ou IL-6/ IL-1β/TGFβ lors des premières étapes de différenciation influencerait respectivement l'apparition de Tfh1, Tfh2 ou Tfh17.
L'expression des marqueurs ICOS, CCR7 et PD-1 témoigne de l'état activé ($ICOS^+PD1^+CCR7^-$) ou quiescent ($ICOS^-PD\text{-}1^{+/-}CCR7^+$) de ces cellules. Chaque population de pTfh présente des aptitudes différentes à soutenir la production *in vitro* d'anticorps par les LB. Alors que les Tfh1 semblent avoir perdu leur aptitude à soutenir la différenciation des LB, les Tfh2 et les Tfh17 activés ont bien ce rôle : les Tfh2 vont plutôt induire la production d'IgG et d'IgE, alors que les Tfh17 favorisent la sécrétion d'IgG et d'IgA (Morita et al., 2011).
Une population particulière de pTfh $CCR7^-PD\text{-}1^{hi}CXCR5^+CD4^+$ semble provenir de LT n'étant jamais entrés dans les CG, suggérant l'existence d'une réponse mémoire précoce des Tfh (He et al., 2013). Ces pTfh peuvent induire une réponse anticorps rapide lors d'une réexposition à l'Ag (He et al., 2013).
Plus récemment, des travaux ont mis en évidence que, dans le sang, les LT $CD4^+$ sécrétant de l'IL-21 sont les plus proches phénotypiquement (expression de BCL-6, MAF et CXCR5) et sur un plan fonctionnel des Tfh des OLII (Schultz et al., 2016).
Les pTfh forment donc une population hétérogène. En fonction du contexte inflammatoire, en lien avec l'agent infectieux rencontré, les pTfh adoptent des profils différents associés à des fonctions différentes. Le suivi des populations de pTfh dans le sang permet d'apprécier

la qualité de la réponse immunitaire. Dans le cadre de la vaccination, il est particulièrement important d'avoir un aperçu de la réponse immunitaire qui a été initiée de façon à prédire l'efficacité du vaccin. Ainsi, étant donné le lien entre les Tfh et la production d'anticorps, les pTfh semblent être de bons marqueurs de l'efficacité vaccinale.

3.1.3. pTfh et vaccination

Plusieurs études mettent en évidence une corrélation positive entre l'augmentation des pTfh, une dizaine de jours après la vaccination anti-grippe, et l'apparition d'anticorps protecteurs dirigés contre influenza quelques semaines plus tard (Bentebibel et al., 2013; Pallikkuth et al., 2012; Spensieri et al., 2013). Bien que les pTfh ne soient pas caractérisés de la même façon : $CD4^+CXCR5^+$ (Pallikkuth et al., 2012) $CD4^+ICOS^+CXCR3^+CXCR5^+$ (Bentebibel et al., 2013) ou $CD4^+CXCR5^-ICOS^+IL\text{-}21^+$ (Spensieri et al., 2013), dans tous les cas, une expansion des pTfh suite à la vaccination corrèle positivement avec l'apparition d'anticorps anti-influenza. D'autre part, les pTfh anti-influenza présentent bien la capacité d'induire, *in vitro*, la différenciation des LB anti-influenza en plasmocytes.

La dynamique des pTfh a également été étudiée dans le cadre d'une vaccination anti-grippe comparant de jeunes adultes à des personnes âgées (Herati et al., 2014). L'augmentation des pTfh $CXCR5^+PD1^+$ dans le sang de sujets jeunes corrèle positivement avec la production d'anticorps spécifiques. Cette corrélation n'est pas retrouvée chez les personnes âgées. De plus, les pTfh de personnes âgées présentent une réduction de l'expression d'ICOS et une fonctionnalité *in vitro* moins importante comparativement aux pTfh de sujets jeunes. Cette différence d'expansion et de fonctionnalité des pTfh chez les personnes âgées pourrait en partie refléter les échecs vaccinaux observés dans cette population lors des campagnes de vaccination anti-grippe.

A ce jour, une seule étude s'est intéressée au suivi des pTfh dans le cadre de la vaccination anti-VIH chez l'Homme (Schultz et al., 2016). Les individus impliqués dans l'essai « Thaï » RV144 (Supachai Rerks-Ngarm, Punnee Pitisuttithum et al., 2009) présentent une proportion plus élevée de pTfh anti-VIH $IL\text{-}21^+$ comparés aux individus impliqués dans d'autres protocoles de vaccination anti-VIH (Schultz et al., 2016). L'essai « Thaï » est actuellement le seul à avoir permis une réduction de 31% du taux d'infection dans la population vaccinée.

L'augmentation des pTfh chez ces individus suggère que la protection pourrait être conférée par les anticorps induits par cette vaccination.
La même observation a été faite dans des ganglions de macaques lors du test d'un candidat vaccin anti VIH/SIV (Vargas-inchaustegui et al., 2016). Dans cet essai, la fréquence élevée de pTfh anti-SIV IL-21^{+} est associée à une augmentation de la taille et du nombre des CG et à une fréquence accrue de LB sécrétant des anticorps anti-SIV.

Dans le cadre de la vaccination anti-grippe, une augmentation des pTfh semble prédire une bonne protection en cas d'infection notamment via la production d'anticorps. Mais qu'en est il lors de l'infection par le VIH sans vaccination préalable. Nous avons vu dans le paragraphe 2.2.1 que les Tfh du CG sont affectés par le VIH. Je vais maintenant aborder l'impact de l'infection par le VIH sur les pTfh et le lien potentiel avec la production de bnAbs.

3.1.4. pTfh et infection par le VIH

Dans les ganglions, les Tfh sont hautement infectés et s'accumulent lors de la phase chronique de l'infection par le VIH. Les pTfh sont également préférentiellement infectés par le VIH et forment un réservoir du virus dans le sang (Pallikkuth et al., 2015). Par contre, les observations divergent concernant les variations de leur proportions, tandis que certains observent une proportion de pTfh préservée (Cohen et al., 2014; Pallikkuth et al., 2012), d'autres montrent une augmentation (Locci et al., 2013; Pallikkuth et al., 2015) voir une diminution (Bekele et al., 2015; Boswell et al., 2014). Cependant, en fonction des études, les populations de pTfh ne sont pas identifiées (a) selon les mêmes phénotypes et/ou (b) lors du même stade de l'infection et/ou (c) en présence ou non d'ART (**Tableau 3**).
De façon intéressante, la proportion de pTfh identifiée par le phénotype CD4^{+}PD-1^{+}CXCR3^{-} CXCR5^{+} corrèle positivement avec l'apparition de bnAbs dans le sang de patients VIH^{+} ce qui n'est pas le cas des pTfh seulement identifiés par le phénotype CD4^{+}CXCR5^{+} (Locci et al., 2013). Cette observation soulève 2 points : (a) le choix des marqueurs pour l'identification des pTfh est crucial et (b) la proportion de pTfh semble être liée à la capacité de neutralisation des anticorps. Cela peut expliquer la discordance des études concernant la dynamique des pTfh lors de l'infection par le VIH. Certains proposent qu'une diminution des

pTfh dans le sang des patients VIH$^+$ pourrait être due à une rétention des Tfh dans les OLII suite à l'altération de ces structures lors de l'infection par le VIH (Boswell et al., 2014).

Stade	ART	Progression	Commentaires	Phénotype	Dynamique	Ref.
Chronique	oui	N.D.	-	CXCR5$^+$	Préservation	(Pallikkuth et al., 2012)
Chronique	oui	N.D.	Cohorte d'enfants	CXCR5$^+$ or CD45RO$^+$CXCR5$^+$	Perte	(Bekele et al., 2015)
Précoce	non	Contrôleurs	Production de bnAbs	CXCR5$^+$PD-1$^+$	Préservation	(Cohen et al., 2014)
Chronique	non	Progresseurs	Initiation d'ART = % Tfh rétablit	CCR7$^+$CXCR5$^+$ CCR6$^+$PD-1$^+$ (+/-CXCR3)	Perte	(Boswell et al., 2014)
Précoce (environ 9 mois)	non	N.D.	Production de bnAbs (40 mois post-infection)	PD-1$^+$ CXCR3$^-$ (% of CXCR5$^+$)	Accumulation	(Locci et al., 2013)
Chronique	oui	N.D.	-	CCR7$^+$CXCR5$^+$PD$^-$1$^+$ CXCR3$^-$	Accumulation	(Pallikkuth et al., 2015)

***Tableau 3** : Dynamique des pTfh chez les patients VIH$^+$. N.D. : Non déterminé.*

Le phénotype et la fonctionnalité des pTfh sont globalement altérés lors de l'infection par le VIH. La proportion de cellules exprimant ICOS et/ou PD-1 est diminuée parmi les pTfh CD4$^+$CXCR5$^+$CD45RO$^+$ dans le sang d'enfants VIH$^+$ comparé à des donneurs sains (Bekele et al., 2015). Les pTfh VIH$^+$ présentent également un profil Tfh1 plus marqué comparé au pTfh VIH$^-$ se traduisant par une forte production d'IFNγ au détriment de l'IL-21 (Cubas et al., 2015). Lors d'une stimulation avec un super-antigène, les pTfh VIH$^+$ expriment moins de cytokines telles que l'IL-4 (Bekele et al., 2015) et l'Il-21 et apportent moins d'aide au LB pour leur différenciation et la productions d'anticorps (Boswell et al., 2014).

Le défaut fonctionnel des pTfh lors de l'infection par le VIH peut avoir des répercussions sur la réponse immunitaire contre d'autres infections telles que le virus influenza. Environ la moitié des patients VIH$^+$ sont dits « non-répondeurs » lors d'une vaccination anti-grippe, c'est à dire qu'ils ne développent pas une quantité suffisante d'anticorps anti-influenza pour être protégés de l'infection. Tandis que chez les patients VIH$^+$ répondeurs et les donneurs contrôles, la proportion de pTfh augmente 4 semaines après la vaccination, le proportion de pTfh des patients VIH$^+$ non-répondeurs reste quasiment inchangée (Pallikkuth et al., 2012). De plus, la co-culture *in vitro* de LB avec les pTfh des patients VIH$^+$ non-répondeurs mène à une production réduite d'anticorps anti-influenza. Un défaut fonctionnel des pTfh semble

donc bien être à l'origine du statut non-répondeur de certains patients VIH$^+$ (Pallikkuth et al., 2012)

Malgré tout, la quantité de pTfh CD4$^+$PD-1$^+$ CXCR5$^+$CXCR3^{-ou+} dans les phases précoces de l'infection (environ 4 mois après l'infection) corrèle positivement avec l'apparition de bnAbs plusieurs mois ou années plus tard (Cohen et al., 2014; Locci et al., 2013). D'autre part, plus la proportion de pTfh est importante, plus le spectre de neutralisation des bnAbs sera large (Cohen et al., 2014). Les travaux de Cohen et al. insistent sur l'importance d'une préservation précoce des pTfh lors de l'infection par le VIH. En effet, bien que pendant la phase chronique aucune différence significative ne soit relevée concernant la proportion de pTfh entres les patients VIH$^+$ qui sécréteront des bnAbs (« *broad* ») et ceux qui sécréteront des anticorps faiblement neutralisant (« *narrow* »), dans la phase précoce de l'infection les patients *narrow* présentent clairement une proportion plus faible de pTfh comparé aux patients *broad.* D'un point de vu fonctionnel, lorsque des pTfh de patients *narrow* ou *broad sont* mis en co-culture avec des LB, la même quantité d'Ig est détectée. Cependant, les anticorps sécrétés par les LB en culture avec des pTfh issus du sang de patients *broad* ont d'avantage subi la commutation de classe isotypique en lien avec une expression plus forte du gène codant pour l'enzyme AID dans ces LB (Cohen et al., 2014).

Pour conclure, les pTfh correspondent au compartiment mémoire circulant des Tfh. Lors de l'infection par le VIH, leur dynamique peut être modifiée. Cependant, selon la sous-population de pTfh étudiée, une préservation, une augmentation ou une diminution ont été rapportés.

La facilité d'accès au compartiment sanguin a permis de mener des études plus approfondies sur la fonctionnalité des pTfh lors de l'infection par le VIH. Les pTfh sont donc des cibles de l'infection VIH et présentent un défaut fonctionnel dans l'apport d'aide aux LB.

L'étude des pTfh apporte de nouveaux éléments de compréhension concernant le rôle des Tfh dans le défaut de la réponse humoral chez les patients VIH$^+$. De plus, étant donné leur rôle de réservoir, les pTfh pourront être étudiés pour estimer l'efficacité de nouveaux traitements sur la latence du virus et la purge du réservoir.

3.2. Les LB dans le sang

L'étude des pTfh permet de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le défaut de la réponse humorale lors de l'infection par le VIH alors que les LB sont le reflet direct de la qualité de la réponse humorale. Ainsi, les sous-populations de LB du sang ont largement été étudiées et leur phénotype est bien établi. Je vais d'abord décrire les différentes sous-populations de LB dans le sang. J'aborderai ensuite brièvement les outils existant pour étudier les LB spécifiques du VIH avant d'exposer l'impact de l'infection sur les populations de LB.

3.2.1. Identification des populations de LB dans le sang

Quatre grandes populations de LB sont présentes dans le sang : Les LB immatures/transitionnels, Les LB matures naïfs, Les LB mémoires et les cellules sécrétrices d'anticorps (CSA) (Kaminski et al., 2012) (**Tableau 4**). Toutes ces populations expriment le marqueur CD19.

Les LB immatures/transitionnels sont identifiés par le phénotype $IgD^{+}CD27^{-}$. Le marqueur CD10 permet de séparer les stades T1/T2 ($CD10^{+}$) du stade T3 ($CD10^{-}$). Une perte progressive de l'expression des marqueurs CD24 et CD38 permet de distinguer le stade T1 du stade T2 (**Tableau 4**).

Les LB matures naïfs sont à première vue semblables au LB en stade T3 ($IgD^{+}CD27^{-}CD10^{-}$). Ils sont cependant les précurseurs circulants des LB du CG, des LB mémoires et des ASC et se différencient des LB T3 par l'expression de molécules de co-stimulation telles que CD80/86 (**Tableau 4**).

Les LB mémoires se caractérisent par l'expression du marqueur CD27, comme les LT mémoires. Le compartiment des LB mémoires se divise en plusieurs sous-populations. Les LB mémoires n'ayant pas subi le *switch* isotypique expriment encore l'IgD ($CD27^{+}IgD^{+}$) qui est perdue à la surface des LB mémoires *switchés* en plus d'une perte de l'IgM ($CD27^{+}IgD^{-}IgM^{-}$). Une population de LB $CD27^{+}IgD^{-}IgM^{+}$ est appelée « *marginal zone-like* » (MZ-like). Les LB MZ-

like semblent provenir directement de la zone marginale de la rate et sont en charge des réponses T indépendantes dirigées contre les bactéries (Weller et al., 2004) (**Tableau 4**).

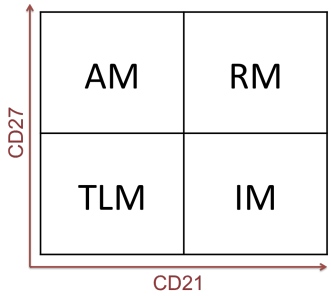
Les CSA sont de phénotype $IgD^{-}CD27^{hi}CD38^{hi}$ et ont perdu l'expression du marqueur CD20 généralement exprimé par les autres populations de LB. Les CSA sont divisées en 2 sous populations : les plasmocytes et les plasmablastes. Nous avions abordé la différenciation dans les OLII de ces sous-populations dans les paragraphes 1.3.3.2.1 et 1.4.4.1.2. Les plasmocytes expriment le marqueur CD138 ce qui n'est pas le cas des plasmablastes (**Tableau 4**).

Populations	Sous-populations	Phénotype
LB immatures/naïfs	T1	$IgD^{+}CD27^{-}CD10^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$
	T2	$IgD^{+}CD27^{-}CD10^{+}CD24^{+}CD38^{+}$
	T3	$IgD^{+}CD27^{-}CD10^{-}CD24^{+/-}CD38^{+/-}$
LB matures naïfs		$IgD^{+}CD27^{-}CD10^{-}CD80/86^{+}$
LB mémoires	Non switchés	IgD^{+}**$CD27^{+}$**
	Switchés	$IgD^{-}IgM^{-}$**$CD27^{+}$**
	MZ-like	$IgD^{-}IgM^{+}$**$CD27^{+}$**
Cellules sécrétrices d'anticorps (CSA)	Plasmocytes	**$CD20^{-}$**$IgD^{-}CD27^{hi}CD38^{hi}$**$CD138^{+}$**
	Plasmablastes	**$CD20^{-}$**$IgD^{-}CD27^{hi}CD38^{hi}$**$CD138^{-}$**

***Tableau 4** : Phénotype des différentes populations de LB du sang. Toutes les populations de LB expriment le marqueur CD19. Le marqueur CD20 est également exprimé par les LB sauf par les CSA. L'expression du marqueur CD10 est perdue par toutes les populations de LB matures.*

Dans le contexte particulier de l'infection par le VIH, 4 sous-populations de LB sont classiquement identifiées en se basant sur l'expression de marqueurs CD21 et CD27 (Moir et al., 2008). Ces populations sont nommées :

- *Activated memory* (AM): $CD27^{+}CD21^{-}$
- *Resting memory* (RM): $CD27^{+}CD21^{+}$
- *Intermediate memory* (IM): $CD27^{-}CD21^{+}$
- *Tissue like memory* (TLM): $CD27^{-}CD21^{-}$



J'aborderai dans le paragraphe 3.2.3 la dynamique de ces sous-populations lors de l'infection par le VIH.

3.2.2. Les outils pour étudier les LB spécifiques du VIH dans le sang

L'étude de la quantité et de la qualité des anticorps anti-VIH dans le sang des patients VIH$^+$ permet d'apprécier la qualité de la réponse humorale. Cependant, il est également indispensable de pouvoir étudier la fréquence et le phénotype des LB à l'origine de la production de ces anticorps. La caractérisation des LB spécifiques du VIH dans le sang permet d'évaluer le maintien des réponses B mémoires dans différentes cohortes de patients VIH$^+$ et de relier ces observations à d'autres paramètres comme la fonctionnalité des Tfh ou les capacités neutralisantes des anticorps.

Classiquement, 2 approches sont utilisées pour étudier les LB spécifiques du VIH :

- Par cytométrie de flux, l'incubation des LB avec un trimère de protéines d'enveloppe gp140 permet d'identifier les LB exprimant un BCR spécifique de la gp140 (Scheid et al., 2009b). Il est ensuite possible de déterminer la répartition des LB anti-VIH dans les différentes sous-populations.
- L'Elispot B est une méthode utilisée depuis les années 90 permettant de déterminer la fréquence des LB spécifiques de divers Ag du VIH (Shirai et al., 1992). Aujourd'hui, la large gamme d'anticorps disponible sur le marché permet de faire un screening complet des LB anti-VIH en combinant divers Ag du VIH et des anticorps de révélations ciblant les différents isotypes d'Ig. A notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée aux sous types d'IgG (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) sécrétées par les LB, par la méthode d'Elispot B et particulièrement dans le contexte de l'infection par le VIH. Cette méthode nécessite au préalable de différencier in vitro les LB en CSA. Les détails de cette technique seront abordés dans la partie « Matériel et Méthodes » de l'axe 2 du chapitre « **RÉSULTATS** ».

3.2.3. Impact de l'infection par le VIH sur les populations de LB dans le sang

Les populations de LB du sang sont altérées lors de l'infection par le VIH (Moir and Fauci, 2013).

Globalement, les LB immatures/transitionnels, les plasmablastes, les LB AM et TLM sont augmentés dans le sang de patients VIH$^+$ non traités comparé à des donneurs sains. Au contraire, les LB RM, impliqués dans le maintien de la réponse humorale, sont diminués

(Moir and Fauci, 2013). Les contrôleurs du VIH présentent une proportion plus importante de LB RM et AM comparés aux patients VIH$^+$ non contrôleurs (Pensieroso et al., 2013).
L'augmentation des plasmablastes est liée à l'hypergammaglobulinémie largement observée chez les patients VIH$^+$. Avec les LB AM, les plasmablastes forment une population de LB fortement activés qui expriment notamment les marqueurs Ki-67 (plasmablastes) et CD95 (AM). Ces cellules sont particulièrement sujettes à la mort par apoptose.
Les LB TLM ont d'abord été identifiés dans les amygdales comme exprimant le récepteur inhibiteur FCRL4 puis une population similaire a été identifiée dans le sang de patients VIH$^+$ (Moir et al., 2008). Les LB TLM correspondent à une population de LB épuisés notamment en lien avec l'expression de FCRL4. Ce récepteur inhibiteur est d'ailleurs exprimé plus fortement sur les TLM de patients VIH$^+$ virémiques non traités comparés aux patients traités non virémiques en lien avec leur plus faible capacité à proliférer. L'augmentation des TLM touche particulièrement les patients VIH$^+$ virémiques et les LB anti-VIH sont principalement des TLM. L'initiation des ART permet de contrôler la virémie et de diminuer la proportion de TLM chez les patients, par contre ils ne permettent pas de restaurer totalement le compartiment RM (Moir and Fauci, 2013). Chez les patients VIH$^+$ contrôleurs, la proportion de LB TLM est similaire à celle observée chez des individus non infectés ou des patients VIH+ traités avirémiques (Buckner et al., 2016; Pensieroso et al., 2013). D'autre part, chez les contrôleurs, la proportion de LB TLM anti-VIH est réduite au profit du compartiment RM (Buckner et al., 2016).
Les patients non traités virémiques présentent également un défaut d'expression de molécules de co-stimulation telles que CD80/86 à la surface de leur LB totaux circulants pouvant altérer l'apport des signaux au LT CD4$^+$ (Malaspina et al., 2003).

Pour conclure, le défaut de maturation des LB dans les OLII lors de l'infection par le VIH se répercute sur les populations de LB du sang. Une perte des LB mémoires et une augmentation des plasmablastes peuvent expliquer les altérations de la réponse humorale chez les patients VIH$^+$. Au-delà de l'étude des LB dans leur globalité il paraît indispensable de s'intéresser particulièrement aux LB spécifiques du VIH à l'origine des anticorps anti-VIH. L'analyse de leur phénotype et de leur fréquence permettrait de comprendre la qualité de la réponse humorale anti-VIH qui en résulte, notamment chez les contrôleurs du VIH.

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE

Les individus infectés par le VIH présentent un défaut du compartiment B mémoire et des réponses humorales, en particulier des réponses anti-VIH. Les réponses humorales s'initient suite aux interactions entre les Tfh et les LB dans les OLII. Les Tfh sont infectés par le VIH mais, de façon paradoxale, leur proportion est augmentée dans les OLII des patients VIH^+. Certaines études suggèrent une altération des fonctions des Tfh lors de l'infection par le VIH. Cependant les mécanismes à l'origine de ce potentiel défaut restent mal compris. De plus, la majorité des études chez l'Homme se sont concentrées sur les Tfh des ganglions et des amygdales mais aucune ne décrit les Tfh de la rate chez des individus infectés par le VIH. La rate étant l'organe où les réponses immunitaires contre les agents infectieux circulant dans le sang s'initient, l'étude de cet organe semble pertinente dans le contexte de l'infection par le VIH.

Mon hypothèse de travail était que l'interaction entre les Tfh et les LB est altérée lors de l'infection par le VIH, ce qui pourrait être à l'origine du défaut des réponses B mémoires observé chez les patients VIH^+.

Un défaut d'interaction Tfh/LB pourrait s'expliquer par :

(a) des interactions entre les molécules de co-stimulation altérées ;

(b) un défaut de sécrétion des cytokines par les Tfh et/ou les LB ;

(c) une altération de l'interaction TCR/CMH-$II^{peptide}$.

Dans le premier axe de ma thèse, je me suis concentrée sur les points (a) et (b) en me plaçant du côté du Tfh, dans un organe particulier : la rate. Les objectifs ont été de :

- Caractériser les Tfh, les CG-Tfh et les Tfr dans des rates VIH^+ et des rates contrôles issus de donneurs non infectés par le VIH (VIH^-).
- Caractériser les populations de LB dans des rates VIH^+ et des rates VIH^-
- Analyser le profil transcriptionnel des Tfh et des CG-Tfh issus des rates VIH^+ comparées aux rates VIH^-
- Étudier le profil de production de cytokines des splénocytes issus de rates VIH^+ ou VIH^- après stimulation.

Cette première étude a permis de mettre en évidence le défaut fonctionnel des Tfh de la rate lors de l'infection par le VIH en lien avec un défaut de la maturation des LB.

Dans le second axe de ma thèse, je me suis intéressée aux réponses B mémoires anti-VIH dans différentes cohortes de patients infectés par le VIH : des contrôleurs non virémiques (EC), des contrôleurs virémiques (VC) et des patients sous ART (cART) ; comparés à des individus non infectés. Les premiers objectifs de cette seconde étude ont été de :

- Analyser les différentes populations de LB mémoires dans le sang de patients VIH^+ contrôleurs ou non contrôleurs comparés à des individus non infectés.
- Déterminer la fréquence des LB mémoires spécifiques du VIH dans les différents groupes de patients VIH^+.
- Caractériser les réponses B mémoires anti-VIH chez les contrôleurs : les antigènes du VIH reconnus et l'isotype (IgG1, IgG2, IgG3) des anticorps produits.
- Analyser les capacités neutralisantes des anticorps présents dans le sérum des EC.

Dans cette étude, la cohorte d'EC était divisée en 2 groupes : HLA-$B*57^+$ et HLA-$B*57^-$. Etant donné l'association entre l'expression de cet allèle, l'existence de fortes réponses CD8+ cytotoxiques et le contrôle de l'infection, il nous a semblé important de différencier ces 2 groupes. L'étude différentielle les EC HLA-$B*57^+$ et HLA-$B*57^-$ permet de poser des questions complémentaires, à savoir :

- Y a-t-il une différence au niveau des compartiments B mémoires entre les EC HLA-$B*57^+$ et HLA-$B*57^-$?
- La fréquence de LB mémoires anti-VIH est-elle différente entre les EC HLA-$B*57^+$ et HLA-$B*57^-$?
- La proportion d'EC HLA-$B*57^+$ présentant des réponses B mémoires anti-VIH est-elle la même que la proportion d'EC HLA-$B*57^-$?
- Y a-t-il une différence de la capacité de neutralisations des anticorps produits par les EC HLA-$B*57^+$ et HLA-$B*57^-$?

RÉSULTATS

AXE 1 DU TRAVAIL DE THÈSE :

Caractérisation des Populations de Tfh dans des rates de patients infectés par le VIH

RÉSUMÉ DE L'AXE 1

Les lymphocytes T folliculaires helper (Tfh) sont impliqués dans l'apport d'aide aux LB pour leur différenciation et la maturation de leurs anticorps. Plusieurs travaux ont déjà démontré l'altération de la différenciation des LB lors de l'infection par le VIH, suggérant un défaut des Tfh. En effet, *in vitro,* des Tfh issus de ganglions de personnes VIH^+ n'apportent pas l'aide nécessaire aux LB pour la production d'anticorps. Cependant peu d'éléments sont connus sur les mécanismes pouvant mener à un défaut fonctionnel des Tfh lors de l'infection par le VIH. De plus, la majorité des études se sont intéressées aux Tfh présents dans les ganglions et les amygdales.

La rate étant l'organe où les réponses immunitaires contre les pathogènes du sang sont initiées, j'ai d'abord étudié les Tfh spléniques lors de la phase chronique de l'infection par le VIH comparés aux Tfh issus de rates non infectées par le VIH.

J'ai identifié les populations de Tfh, Tfh du CG (CG-Tfh) et Tfh régulateurs (Tfr) issus de la rate par cytométrie de flux. Les populations de Tfh et CG-Tfh sont en proportions plus importantes dans les rates VIH^+ comparé aux rates VIH^-. Les Tfr sont également augmentés, suggérant une activité soutenue des CG dans la rate lors de l'infection par le VIH. L'analyse du profil d'expression des gènes dans les Tfh et les CG-Tfh a révélé une réduction de l'expression des ARNm codant pour des molécules de co-stimulation, de régulation et de transduction du signal. J'ai ensuite mis en évidence une diminution de la production d'IL-4 et d'IL-10 par les splénocytes VIH^+ comparé aux splénocytes VIH^-. Parallèlement, la maturation des LB est altérée dans les rates VIH^+ avec notamment une augmentation des CG-LB au détriment des LB mémoires.

Ces travaux soulignent un défaut fonctionnel des Tfh et des CG-Tfh dans la rate des patients chroniquement infectés par le VIH en lien avec le défaut de maturation des LB observé.

J'ai publié ces travaux en 1^{er} co-auteur dans le journal *Plos One* en 2015 (Colineau et al., 2015).

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

HIV-Infected Spleens Present Altered Follicular Helper T Cell (Tfh) Subsets and Skewed B Cell Maturation

Lucie Colineau[1,2,3☯¤a], Angeline Rouers[1,2,3☯], Takuya Yamamoto[4], Yin Xu[5], Alejandra Urrutia[1,2,3¤b], Hang-Phuong Pham[6,7,8], Sylvain Cardinaud[1,2,3¤c], Assia Samri[1,2,15], Karim Dorgham[1,2,15], Pierre-Grégoire Coulon[1,2,3], Rémi Cheynier[9,10,11], Anne Hosmalin[9,10,11,12], Eric Oksenhendler[13], Adrien Six[6,7,8], Anthony D. Kelleher[5], John Zaunders[14], Richard A. Koup[4], Brigitte Autran[1,2,15], Arnaud Moris[1,2,3,15], Stéphanie Graff-Dubois[1,2,3]*

1 Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, Center for Immunology and Microbial Infections—CIMI-Paris, Paris, France, **2** INSERM, U1135, Center for Immunology and Microbial Infections—CIMI-Paris, Paris, France, **3** CNRS, ERL 8255, Center for Immunology and Microbial Infections—CIMI-Paris, Paris, France, **4** Immunology Laboratory, Vaccine research center, National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), NIH, Bethesda, Maryland, United States of America, **5** The Kirby Institute for Infection and Immunity in Society, University of New South Wales, Sydney, Australia, **6** Sorbonne Universités UPMC Université Paris 06, UMRS 959, Immunology-Immunopathology-Immunotherapy (I3), Paris, France, **7** INSERM, UMRS 959, Immunology-Immunopathology-Immunotherapy (I3), Paris, France, **8** CNRS, FRE3632, Immunology-Immunopathology-Immunotherapy (I3), Paris, France, **9** INSERM, U1016, Institut Cochin, Paris, France, **10** CNRS, UMR8104, Paris, France, **11** Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France, **12** AP-HP, Hôpital Cochin, Paris, France, **13** Université Paris Diderot, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Département d'Immunologie Clinique, Hôpital Saint-Louis, Paris, France, **14** St. Vincent's Centre for Applied Medical Research, St. Vincent's Hospital, Sydney, Australia, **15** AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtière, Department of Immunology, Paris, France

☯ These authors contributed equally to this work.
¤a Current address: Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada
¤b Current address: Institut Pasteur, Centre d'Immunologie Humaine, F-75015, Paris, France
¤c Current address: INSERM, U955, IMRB, Vaccine Research Institute, F-94010, Creteil, France
* stephanie.graff-dubois@upmc.fr

CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Colineau L, Rouers A, Yamamoto T, Xu Y, Urrutia A, Pham H-P, et al. (2015) HIV-Infected Spleens Present Altered Follicular Helper T Cell (Tfh) Subsets and Skewed B Cell Maturation. PLoS ONE 10(10): e0140978. doi:10.1371/journal.pone.0140978

Editor: Derya Unutmaz, Jackson Laboratory, UNITED STATES

Received: July 9, 2015

Accepted: September 16, 2015

Published: October 26, 2015

Copyright: This is an open access article, free of all copyright, and may be freely reproduced, distributed, transmitted, modified, built upon, or otherwise used by anyone for any lawful purpose. The work is made available under the Creative Commons CC0 public domain dedication.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales (ANRS) and INSERM, by the French government's "Investissement d'Avenir" Program, Laboratoire d'excellence "Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases" (ANR-10-LABX-62-IBEID) and by the CutHIVac European consortium EU-FP7. A. Six and HPP contribution was partially sponsored by the LabEx Transimmunom (ANR-11-IDEX-0004-02). S. Cardinaud was supported by ANRS and Sidaction. A. Urrutia was supported by

Abstract

Follicular helper T (Tfh) cells within secondary lymphoid organs control multiple steps of B cell maturation and antibody (Ab) production. HIV-1 infection is associated with an altered B cell differentiation and Tfh isolated from lymph nodes of HIV-infected (HIV^+) individuals provide inadequate B cell help *in vitro*. However, the mechanisms underlying this impairment of Tfh function are not fully defined. Using a unique collection of splenocytes, we compared the frequency, phenotype and transcriptome of Tfh subsets in spleens from HIV negative (HIV^-) and HIV^+ subjects. We observed an increase of $CXCR5^+PD\text{-}1^{high}CD57^-$Tfh and germinal center (GC) CD57+ Tfh in HIV^+ spleens. Both subsets showed a reduced mRNA expression of the transcription factor STAT-3, co-stimulatory, regulatory and signal transduction molecules as compared to HIV^- spleens. Similarly, Foxp3 expressing follicular regulatory T (Tfr) cells were increased, suggesting sustained GC reactions in chronically HIV^+ spleens. As a consequence, GC B cell populations were expanded, however, complete maturation into memory B cells was reduced in HIV^+ spleens where we evidenced a

Sidaction. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

compromised production of B cell-activating cytokines such as IL-4 and IL-10. Collectively our data indicate that, although Tfh proliferation and GC reactions seem to be ongoing in HIV-infected spleens, Tfh "differentiation" and expression of costimulatory molecules is skewed with a profound effect on B cell maturation.

Introduction

T follicular helper cells (Tfh) are a specialized subset of CD4 T cells that support the multiple steps of B cell maturation and differentiation into long-lived plasma cells. Tfh cells are characterized by the expression of the chemokine (C-X-C motif) receptor (CXCR) 5 that allows their migration towards the chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL) 13, a chemokine strongly expressed in the follicles of the spleen, lymph nodes, and Peyer's Patches. In these follicles, Tfh cells provide cognate help to B cells, promoting germinal center (GC) B cell responses and long-term protective humoral immunity. Tfh cells are characterized by a very high expression of co-stimulatory molecules involved in B help such as Inducible T-cell Costimulator (ICOS), OX40 and CD40 ligand (CD40L) [1]. They also express high levels of Programmed Death-1 (PD-1). One functional feature of Tfh cells is their high capacity to secrete Interleukin-21 (IL-21) and IL-4, which are necessary for GC formation and B cell differentiation into long-lived plasma cells, respectively [2,3]. In addition to the lineage-specific transcriptional regulator B cell lymphoma-6 (Bcl6), transcription factor achaete-scute homologue 2 (ASCL2) is selectively upregulated in Tfh cells and initiates their development [4]. Tfh cell differentiation may be driven by ICOS [5] and CD28 [6] signals during the priming by dendritic cells (DCs) of CD4 T cells into Tfh and during Tfh expansion, particularly in response to infection. After priming, membrane expression of chemokine receptors CCR7 is down-regulated while CXCR5 is up-regulated thus allowing Tfh cells to migrate towards the follicle. The first antigen specific interaction between Tfh and B cells takes place at the T/B border in secondary lymphoid organs. The second interaction occurs within the germinal center between GCTfh and GC B cells. CD40L/CD40, OX40/OX40L, Signaling Lymphocyte Activation Molecule (SLAM) family members and adhesion molecules that strengthen GCTfh / GC B cell interaction are required for full B cell maturation. These interactions activate B cell somatic hyper-mutation of Ig variable regions and selection of high-affinity B cells. Of note, GCTfh cell maintenance requires sustained antigenic stimulation by GC B cells. Thus Tfh and GC B cell numbers are closely interrelated [7].

Recently, T follicular regulatory cells (Tfr) have been described as the regulatory counterpart of the Tfh population [8–11]. Tfr most probably derive from natural T regulatory cells that up-regulate Bcl6 and migrate into follicles after up-regulation of CXCR5 and PD-1 [9]. Hence, Tfr cells share features with both conventional Treg cells and Tfh cells. Similarly to Tregs, they express the typical markers Forkhead Box P3 (Foxp3) and CTLA-4. Tfr also produce high amounts of IL-10 and control the GC reaction to prevent the emergence of autoantibodies [9–12].

In lymph nodes, Tfh cells expand during the chronic phase of HIV infection [13,14]. The expansion of Tfh cells is highly associated with the viremia, along with increased GC B cell and plasma cell populations [14]. Similarly, in the non-human primate model of SIV-infection, Tfh accumulation is associated with increased frequency of GC B cells and SIV-specific antibodies [15,16]. Interestingly, when cocultured *in vitro* with autologous B cells, Tfh cells from HIV-infected subjects fail to provide adequate B cell help, which may be related to the increased

PD-L1 expression on B cells [17]. Tfh cells are also targets of HIV infection, replication and production [13]. Regarding humoral responses, HIV infection impairs B cell maturation causing a loss of memory B cells and an expansion of plasma cells [14,17–19]. It should be noted that most of these studies were restricted to lymph nodes.

Because spleen is the largest lymphoid organ and the place where immune responses against blood-borne pathogens are elicited, we decided to characterize splenic Tfh cell populations of HIV-infected individuals. During the 90s, before introduction of Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART), Autran and colleagues collected spleen samples from HIV^- donors and untreated $HIV\text{-}1^+$ individuals [20–24]. At that time, immune thrombocytopenic purpura (ITP) was a frequent complication of HIV infection. To resolve thrombocytopenia, splenectomy was proposed as treatment for HIV^+ patients who did not respond to standard therapy [25]. Studies of such clinical specimens led to important breakthroughs in the comprehension of HIV interference with immune system. One of the most important work performed on HIV-infected white pulps revealed for the first time, that infected CD4 T cells are present in lymphoid area where they might be eliminated by HIV-specific cytotoxic T lymphocytes infiltrated in the spleen [24]. Indeed, a topological study of the CTL response showed that HIV specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) co-localize with HIV-producing cells in germinal centers [26], suggesting an efficient CD8 priming *in vivo*. In line with this, antiviral CTL immune responses directed against Nef protein have been evidenced [27]. Taking advantage of this unique collection of splenocytes, we performed an extensive characterization of splenic Tfh and B cells from HIV^+ and HIV^- individuals.

Here, we uncover that Tfh, GCTfh and Tfr cells from the spleen of HIV-infected patients are expanded as compared to those of uninfected individuals. However, chronic HIV-infection severely impacts the transcription profiles of splenic Tfh and GCTfh, particularly affecting the expression of genes implicated in costimulation, inhibition and signal transductions. We show that splenocytes from HIV^+ individuals fail to produce IL-10 and IL-4 that are of particular importance for B cell maturation and the regulation of GC reaction. As a putative consequence of Tfh and Tfr dysfunctions, we evidenced a skewed B cell maturation towards an expansion of GC B cells population at the cost of memory B cells in HIV^+ spleens.

Materials and Methods

Samples

Spleens were obtained from organ transplant donors or from patients requiring therapeutic splenectomy. The spleen collection consists of 4 groups: HIV negative Immune Thrombocytopenic Purpura negative (HIV^-ITP^-) (n = 9), HIV^+ITP^- (n = 8), HIV^-ITP^+ (n = 4), HIV^+ITP^+ (n = 10). All spleen samples included in this study were collected following national ethical guidelines regulating the use of human tissues and have already been described in previous studies: HIV^-ITP^- [28], HIV^+ITP^- [29,30], HIV^-ITP^+ [31], HIV^+ITP^+ [23,26]. Note that HIV + spleens were isolated from individuals classified in chronic stage (from middle to late stage) of HIV infection and who did not receive any HAART [31].

Ethics statement

All samples included in this study were collected following national ethical guidelines regulating the use of human tissues. All adult subjects provided informed consent, and a parent or guardian of any child participant provided written informed consent on their behalf. Patient samples were collected according to French Ethical rules. Written informed consent and approval by Institutional Review Board at the Pitié-Salpêtrière Hospital were obtained for this study.

Splenocytes stimulation

Splenocytes from HIV^-ITP^- (n = 4), HIV^+ITP^- (n = 4), HIV^-ITP^+ (n = 3), HIV^+ITP^+ (n = 5) were cultured at 37°C in 6 well plates at a concentration of 1 X 10^6 cells/mL in complete RPMI medium containing 10% FBS containing IL-2 (0.2U/mL), Penicillin/streptomycin (Gibco) and when stated were activated for two days using PHA (PAA) (1μg/mL).

IL-10, IL-6, IL-1ß, IL-4 concentrations were evaluated in supernatants from PHA stimulated splenocytes by Cytometric Beads Array high sensitivity assay according to the manufacturer protocol (BD Biosciences).

Flow cytometry

Antibodies. Directly conjugated antibodies were purchased from BD Biosciences (San Jose, CA, USA): CCR7-PECy7 (3D12), CD3-PerCPCy5.5 and CD3-V500 (UCHT1), Foxp3-AF488 (259D/C7), CD25-AF700 (M-A251), CD4-APCH7 (RPA-T4), CXCR5-AF647 (RF8.B2), CD45RA-PECF594 (HI100), CD19-APCCy7 (SJ25C1), IgM-FITC (G20-127), IgD-PECF594 (IA6-2), CD38-V450 (HB7), CD138-PerCPCy5.5 (MI15), CD21-APC (B-LY4), CD27-PE (M-T271), IgG-BV605 (G18-145) or BioLegend (San Diego, CA, USA): PD1-PE (EH12.2H7), CD19-BV650 (HIB19), CD57-PB (HCD57), ICOS-FITC and ICOS-PerCPCy5.5 (C398.4A), OX40-PECy7 (BER-ACT35), CD40L-BV605 (24–31).

Membrane staining. Cells were washed twice with PBS1X containing 0.5% BSA and 2mM EDTA, pre-incubated 5 minutes at room temperature with anti-CXCR5 and anti-CCR7 antibodies and then stained for 20 minutes at room temperature with the corresponding mix of conjugated antibodies.

Intracellular Foxp3 staining. Cells were washed and permeabilized using Human Foxp3 Buffer Set (BD Biosciences) according to the manufacturer's recommendation and stained for 30 minutes at room temperature with antibody Foxp3-AF488 (259D/C7) from BD Biosciences.

Cell acquisition was performed with a Fortessa cytometer (BD Biosciences) and data was analyzed with BD FACSDiva software (BD Biosciences) or FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA).

Assessment of integrated proviral DNA using qRT-PCR

A fraction of the naive, memory, Tfh and GCTfh CD4 cells sorted from infected spleens were reserved and conserved at -80°C in RNA later (Qiagen). Proviral integration was assessed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) for HIV-gag DNA, as previously described [32].

Fluidigm Gene Expression analysis

Cell sorting and reverse transcription. Splenocytes from 5 HIV^+ITP^+ and 4 HIV^-ITP^- patients were thawed and stained with the "Tfh sorting" panel (**S2 Fig**).

One hundred cells of each population were collected by FACS sorting using a FACSAria II (BD Biosciences) in a RT-PreAmplification Reaction mix containing the pooled TaqMan primers (0.2X of each) and the SuperScriptIII Platinium Taq Polymerase from the CellDirect One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen). Reverse transcription and gene-specific pre-amplification were performed (18 cycles). cDNA was diluted 1/5 in DNA suspension buffer (Teknova), and stored at 4°C.

Fluidigm dynamic array. Samples and assays (primer pairs) were prepared for 96.96 Fluidigm Dynamic arrays (Fluidigm, San Fransisco, CA, USA) according to the manufacturer's recommendation. Briefly, assays were prepared by dispensing 20X Fluidigm Gene Expression assay Loading Reagent and the matching 20X TaqMan Gene Expression Assay into the wells of

a 10X Assay Plate. Samples were mixed with 20X Fluidigm Sample Loading Reagent and TaqMan Universal PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems). A 96.96 Dynamic Array primed chip was then loaded with assays and samples, and the real time-PCR was run on a Biomark System for Genetic Analysis according to the Fluidigm Protocol. All reactions were made in duplicate. Data were collected and analyzed using Fluidigm Real-Time PCR Analysis software.

Multivariate analysis. Multivariate analysis allows for the simultaneous consideration of all investigated genes, for the identification of genes that contributed most to the total variance between HIV+ and control samples. SAS-JMP software version 10.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used for multivariate analysis: Principal component Analysis and unsupervised hierarchical clustering (S3 Fig).

Statistics

Statistical significance (p-values) was obtained using the non parametric Mann-Whitney U test. $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.005$, $^{***}p<0.001$. Error bars depict mean +/- standard error of the mean (SEM) in all bar graphs shown. The GraphPad Prism statistical analysis program (Graph-Pad Software, version 5.0) was used throughout.

Results

Impact of chronic HIV infection on CD4 T and B cell distribution in the spleen

Using flow cytometry, we evaluated the impact of HIV infection on the distribution of CD4 T cell subsets and B cell maturation in splenocytes. Spleen samples consisted of 4 groups including HIV negative ITP negative ($HIV^{-}ITP^{-}$) (n = 7), $HIV^{-}ITP^{+}$ (n = 3), $HIV^{+}ITP^{-}$ (n = 4), $HIV^{+/-}ITP^{+}$ donors (n = 8). All HIV^{+} spleens came from individuals classified in the chronic stage (from middle to late stage) of HIV infection who did not receive HAART.

First, we investigated the distribution of CD4 T cells among naïve, central memory (TCM), effector memory (TEM), terminally differentiated effector memory cells with reacquired CD45RA (the marker of naïve cells) (TEMRA) and regulatory T cell (Treg) (Fig 1A). Proportions of naïve, TCM TEM and TEMRA CD4 T cell subsets were not affected by HIV infection. Interestingly, HIV^{+} spleens exhibited a slight increase of the Treg population, while this population was decreased ($p<0.05$) in $HIV^{-}ITP^{+}$ spleens, as compared to HIV^{-} ITP^{-} spleens (Fig 1A).

We then focused on the follicular helper T cell populations (Fig 1B **and** S1 Fig). We identified splenic Tfh cells as memory T helper cell expressing $CXCR5^{high}$ $PD\text{-}1^{high}$ but not CCR7. CD57 expression was used to characterize GCTfh [33] (S1 Fig**)**. We observed that the percentages of Tfh and GCTfh cells were significantly increased among memory CD4 T cells (Fig 1B). Overall, this increase is strictly restricted to HIV+ individuals independently of their ITP status. $HIV^{+}ITP^{-}$ samples exhibit a significant increase of Tfh cell ($p = 0.0141$) and of the GCTFh cell ($p = 0.0131$) frequencies, as compared to $HIV^{-}ITP^{-}$, whereas we observed no significant differences between $HIV^{-}ITP^{-}$ and $HIV^{-}ITP^{+}$ samples. Of note, Tfh and GCTfh cell frequencies were similar between $HIV^{+}ITP^{-}$ and $HIV^{+}ITP^{+}$ samples (not shown) confirming that the ITP status does not impact Tfh cells distribution in these samples.

We also analyzed the Tfr cell population, the regulatory counterpart of Tfh cells, within the spleens (Fig 1B). Tfr express all the characteristic markers of Tfh, as well as Foxp3 and CD25 markers (S1 Fig). Remarkably, the proportion of Tfr among memory CD4 T cells was significantly increased in HIV^{+} splenocytes as compared to $HIV^{-}ITP^{-}$ and $HIV^{-}ITP^{+}$ individuals (Fig 1B).

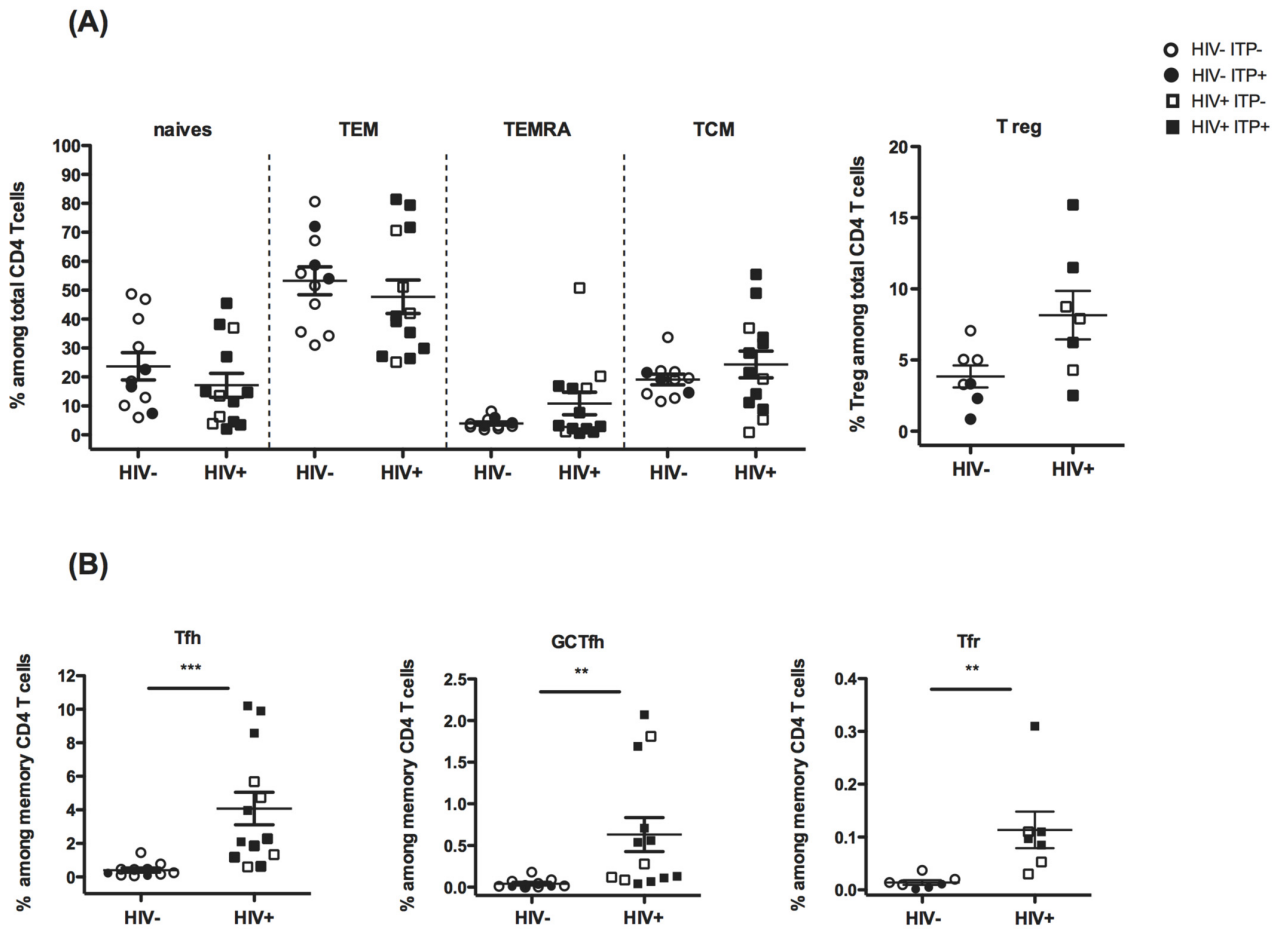


Fig 1. Tfh cell subsets, including Tfr, are present in greater proportions in HIV$^+$ spleens. (A) Splenocytes were stained for T helper cell markers and analyzed by flow cytometry: according to the expression of CD45RA and CCR7, CD4 T cells were subdivided into CD45RA$^+$CCR7$^+$ naïve, CD45RA$^-$CCR7$^-$ effector memory (TEM), CD45RA$^+$CCR7$^-$ terminally differentiated effector memory (TEMRA) and CD45RA$^-$CCR7$^+$ central memory (TCM) T cells. Regulatory T (Treg) cells were identified as CD4$^+$ CD45RA$^-$ Foxp3$^+$ CD25$^+$. HIV$^-$ITP$^-$ n = 8, HIV$^+$ITP$^-$ n = 4, HIV$^-$ITP$^+$ n = 3 and HIV$^+$ITP$^+$ n = 9. (B) Tfh cells were identified as CD3$^+$ CD4$^+$ CD45RA$^-$ CCR7$^-$ CXCR5$^+$, GCTfh are the CD57$^+$ subset of Tfh, and Tfr are Foxp3$^+$ Tfh cells (S1 Fig). The frequency of Tfh, GCTfh and Tfr cells is represented as the percentage of total memory CD4$^+$ T cells. HIV$^-$ITP$^-$ n = 8, HIV$^+$ITP$^-$ n = 4, HIV$^-$ITP$^+$ n = 3 and HIV$^+$ITP$^+$ n = 9. Frequency of Treg and Foxp3$^+$ Tfh (Tfr) were identified for HIV$^-$ITP$^-$ n = 4, HIV$^-$ITP$^+$ n = 3, HIV$^+$ITP$^-$ n = 3 and HIV$^+$ITP$^+$ n = 4. Statistics were obtained using the non parametric Mann-Whitney test *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.001.

doi:10.1371/journal.pone.0140978.g001

We then asked whether Tfh and Tfr cell expansions might be associated, in the spleens, with alterations of the B cell compartment. To this end we used flow cytometry, to characterize the different stages of differentiation from naïve B cells to memory B cells and antibody-secreting plasma cells [34] (S1 Fig). The percentage of naive B cells, defined as Bm1 and Bm2 populations among total B cells (S1 Fig), was comparable in HIV-infected spleens as compared with uninfected (Fig 2A). In contrast, the percentages of the pre-GC and GC B cells, defined as Bm2' and Bm3/4 respectively (S1 Fig) were significantly increased in both HIV$^+$ITP$^-$ and HIV$^+$ITP$^+$ samples (Fig 2A). In addition, in the context of HIV-infected spleens, the ratio of memory B cells, defined as early Bm5 and late Bm5 was decreased, independently of the ITP status

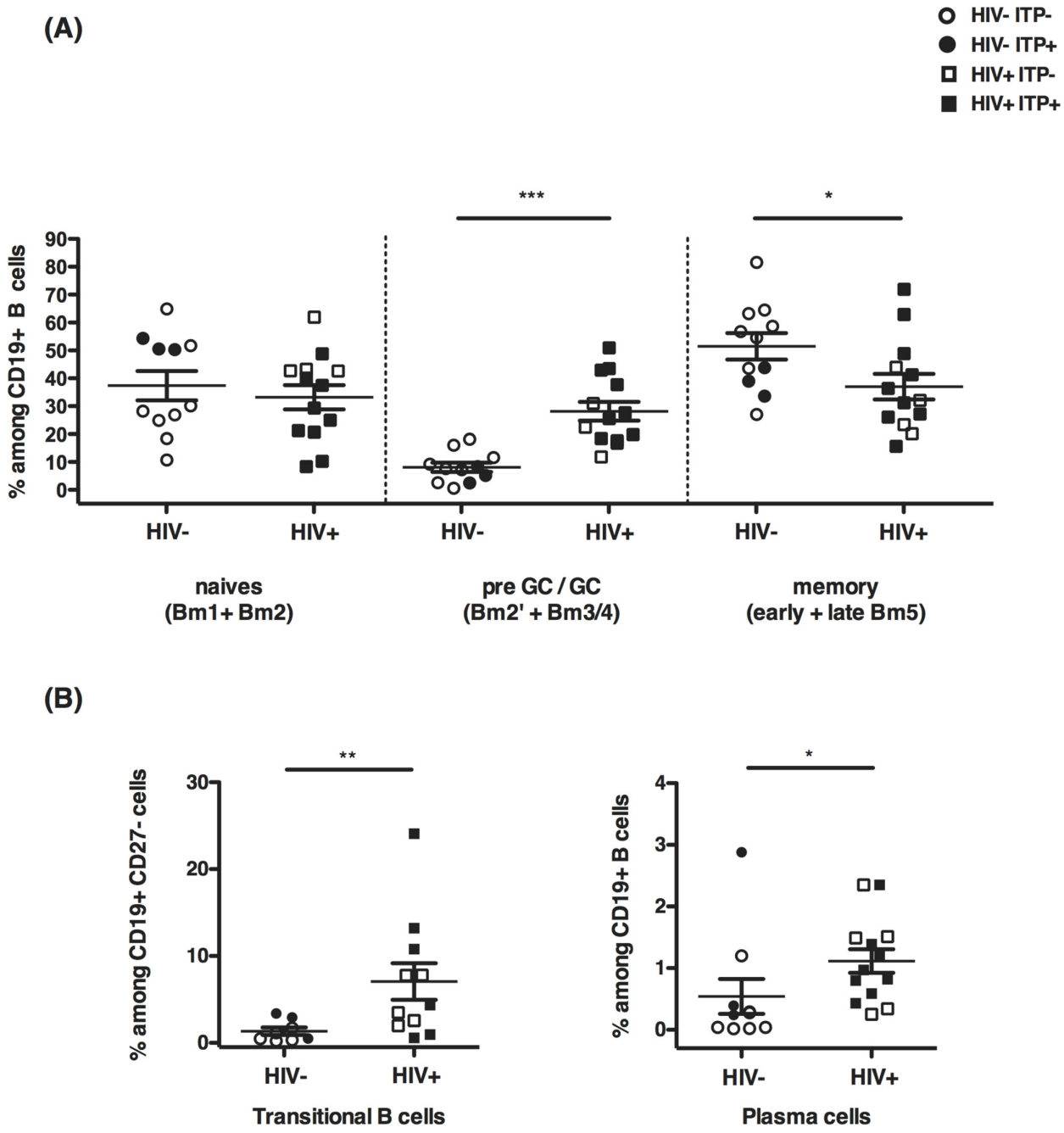


Fig 2. GC B cells accumulate whereas memory B cell compartment is reduced in HIV+ spleens. (A) Using flow cytometry, B cell maturation was assessed according to the expression of CD38 and IgD markers by $CD19^+$ cells (34). The gating strategy is presented in S1 Fig. In HIV chronically infected patients, B cell maturation is biased towards GC B cells and PC subsets as compared to HIV^- donors and ITP^+ patients. (B) The transitional B cell population was identified as $CD19^+CD38^{++}IgD^+CD27^-IgM^+$ and plasma cells as $CD19^+CD38^{++}IgD^-$. In the box-and-whiskers plot, box size represents the limits of data for the second and third quartiles, with medians shown as bars. Whiskers define the minimum and maximum of the data presented. HIV^-ITP^- n = 8, HIV^-ITP^+ n = 3, HIV^+ITP^- n = 5 and HIV^+ITP^+ n = 8. Statistics were obtained using the non parametric Mann-Whitney test *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.001.

doi:10.1371/journal.pone.0140978.g002

(Fig 2A). Remarkably, transitional B cells ($CD19^+CD38^{++}IgD^+CD27^-IgM^+$) were significantly increased in HIV^+ spleens as compared to HIV^-ITP^- and HIV^-ITP^+ samples (Fig 2B). Plasma cells ($CD19^+CD38^{++}IgD^-$) were also slightly increased in HIV^+ spleens (Fig 2B).

Altogether our data unravel that Tfh cell subsets, including Tfr, are present in greater proportions in HIV^+ spleens. Pre-GC and GC B cells also accumulate in the spleen while further differentiation is rerouted to plasma cells at the cost of memory B cell differentiation as already reported in lymph nodes by Lindqvist et al. [14].

Transcriptional profiles of splenic Tfh and GCTfh cells

Recent studies performed with the blood or lymph nodes of HIV-infected donors, suggested that Tfh cells might be functionally altered as compared to Tfh from uninfected individuals [13,14]. We therefore investigated some functional attributes of Tfh from the spleen. To this end, we performed a comparative transcription profile analysis between Tfh and GCTfh from chronically HIV^+ and HIV^- spleens. Expansion of splenic Tfh and GCTfh cells is restricted to HIV^+ individuals independently of their ITP status (Fig 1B). Thereafter and because of the scarcity of spleen samples from HIV^+ITP^- donors, we performed the transcriptome analysis on HIV+ITP+ samples. GCTfh and Tfh were isolated by cell sorting based on the expression of CXCR5 and PD-1 markers. GCTfh cells express the CD57 marker that allows their identification. S2 Fig shows the gating strategy used to sort splenic Tfh and GCTfh from 4 HIV^-ITP^- (A-D) and 5 HIV^+ITP^+ (F-J) donors. Sorted cells were used to perform high throughput gene expression measurement with real time PCR in a microfluidic dynamic array. Using this approach, we quantified the expression of 96 genes of interest in 100 cells. After cleansing and normalization, consistent data were used for statistical analysis. We focused on genes specifically implicated in T cell functions (S1 Table).

First, using JMP statistical software, we performed a principal component analysis (PCA) to reduce the multidimensional gene expression data set to lower dimensions for analysis, by retaining genes that contributed most to the total variance (Fig 3A). The projection of the data on the first component (38.3% variance explained) efficiently discriminated HIV^+ samples, suggesting that HIV infection deeply impacts gene expression profile of Tfh and GCTfh cells (Fig 3A, **Top panel**). Particularly, component 1 revealed a bias of Tfh from HIV^+ spleens to preferentially express genes implicated into Tfh cell differentiation and Th1 functions whereas Tfh from HIV^- spleens more highly expressed genes implicated in costimulation, inhibition and signal transduction functions (Fig 3A, **lower panel and** S1 Table).

Genes displaying significant differences in their expression levels between Tfh cells from HIV^+ and HIV^- donors are presented in Fig 3B. Gene expression levels between Tfh and GCTfh cells were similar except in two cases: in HIV^- samples, *CXCL13* gene expression was significantly enhanced in GCTfh samples as compared to Tfh and in HIV^+ samples, *IL-10* was greatly impaired in Tfh as compared to GCTfh. Remarkably, the expression levels of genes implicated in Tfh differentiation such as *BCL6*, *BATF*, and *MAF* were not affected by HIV infection, appearing slightly increased in Tfh and GCTfh from HIV^+ samples (Fig 3B), while *IL-21* and *CXCL13* expression, two key mediators of Tfh function, were increased in Tfh from HIV^+ spleens. In contrast, the expression level of signal transducer and activator of transcription (*STAT*)-3 gene, which is required for full Tfh differentiation [35] was significantly reduced in Tfh and GCTfh from HIV^+ spleens as compared to HIV^- samples. In addition, HIV infection significantly compromised the expression of the costimulatory molecules OX40 (TNFRSF4), CD40L and, to a lesser extent, ICOS encoding genes, in both Tfh and GCTfh. Very interestingly, the expression of genes encoding immune regulatory molecules such as IL-10, CTLA4 and PD-1 was also severely impacted by HIV infection in both Tfh and in GCTfh. Of note, the

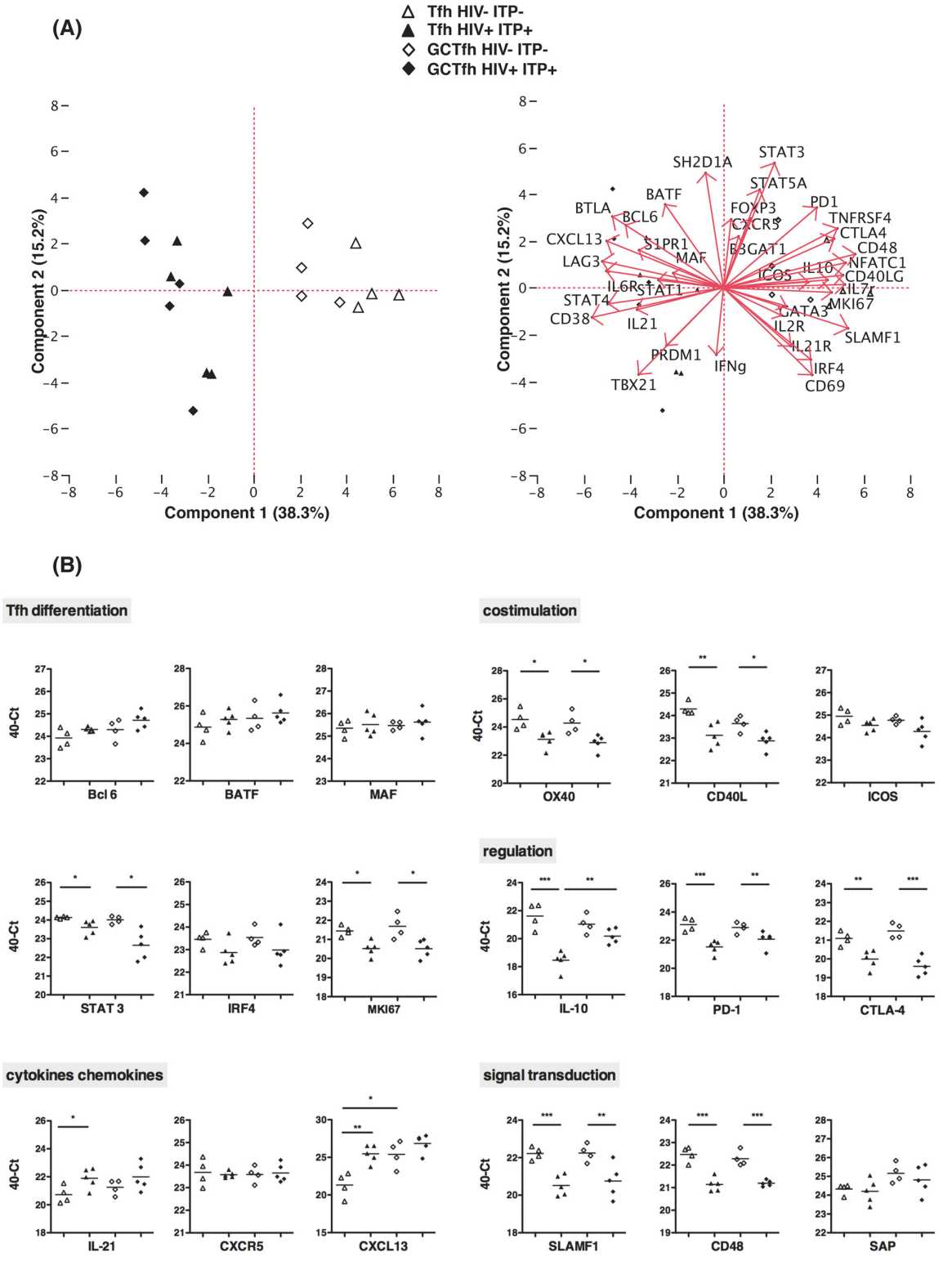

(A)
Tfh HIV- ITP-
Tfh HIV+ ITP+
GCTfh HIV- ITP-
GCTfh HIV+ ITP+
Component 2 (15.2%)
Component 1 (38.3%)
STAT3
SH2D1A
STAT5A
BATF
PD1
BTLA
FOXP3
BCL6
CXCR5
TNFRSF4
CXCL13
CTLA4
S1PR1
B3GAT1
CD48
LAG3
MAF
IL10
NFATC1
ICOS
CD40LG
IL6R
STAT1
IL7r
STAT4
MKI67
GATA3
CD38
IL21
IL2R
SLAMF1
IL21R
PRDM1
IFNg
IRF4
TBX21
CD69
(B)
Tfh differentiation
costimulation
regulation
cytokines chemokines
signal transduction
40-Ct
Bcl 6
BATF
MAF
OX40
CD40L
ICOS
STAT 3
IRF4
MKI67
IL-10
PD-1
CTLA-4
IL-21
CXCR5
CXCL13
SLAMF1
CD48
SAP

Fig 3. HIV infection severely impacts transcription profile of splenic Tfh and GCTfh cells. GCTfh and Tfh were sorted using flow cytometry based on the expression of CXCR5 and PD-1 associated or not with CD57 marker respectively (S2 Fig). Sorted cells were used to perform high throughput gene expression measurement with real time PCR in a microfluidic dynamic array. After cleansing and normalization, consistent data were used for statistical analysis. We focused on genes specifically implicated in T cell functions (S1 Table). (A) 2D Principal component analysis (PCA) plot representation of gene expression profile of Tfh (triangle) and GCTfh (diamond) cells from HIV^- ITP^- (n = 4, empty symbols) and HIV^+ ITP^+ (n = 5, filled symbols) spleens. The projection of the data on the first and second principal components efficiently discriminates HIV^+ samples, suggesting that HIV-infection deeply impacts gene expression profile of Tfh and GCTfh cells. (B) mRNA expression in Tfh and GCTfh sorted from splenocytes of uninfected (n = 4) and HIV^+ (n = 5) individuals. The data are expressed in 40-Ct where Ct represents the threshold cycle number and 40 is chosen because the PCR run stops after 40 cycles. This value is directly correlated with the initial amount of RNA and therefore allows a quantitative comparison for 18 genes encoding cytokines/chemokines and proteins implicated in Tfh differentiation, costimulation, immune regulation and signal transduction. Statistics were obtained using the non parametric Mann-Whitney test *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.001.

doi:10.1371/journal.pone.0140978.g003

expression of the proliferation marker Ki67 mRNA was also notably reduced. Finally, our results indicated that gene encoding SLAMF1 and CD48 receptors that belong to the family of the Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) are significantly impacted by HIV infection. Of note, SLAMF1 is specifically required for IL-4 production by GCTfh [36]. In contrast, the expression of SLAM-associated protein (SAP), known to play a critical role in the sustained adhesion between T and cognate B cell [37,38] is not compromised by HIV-infection. In conclusion in HIV+ spleens, the expression of most genes implicated in Tfh and GCTfh differentiation was not compromised with the notable exception of *STAT-3* suggesting that only the final stage of Tfh differentiation might be affected by HIV-infection. In contrast, the expression of genes implicated in Tfh function, such as costimulation, immune regulation or signal transduction were severely reduced in HIV-infected spleens.

Unsupervised hierarchical clustering grouped together GCTfh from HIV^+ samples (S3 Fig). Hence, *CXCL13*, *IL-21*, and *CXCR5* genes were highly expressed in GCTfh cells from HIV^+ samples as well as those encoding transcription factors implicated in Tfh differentiation (*MAF*, *BATF*, *Bcl6*). These observations might explain the higher proportion of GCTfh in HIV^+ spleens.

Ex-vivo cytokine production by splenocytes

To evaluate whether our observations on the skewed transcription profiles of Tfh cells might modulate the splenic microenvironment we analyzed *ex vivo* the capacity of activated splenocytes to secrete various cytokines. This question could not be addressed directly using Tfh cells since their low frequency in HIV^- spleens did not allow their sorting and assessement of functional properties such as cytokine secretions. Thereafter, cytokine secretion profiles were evaluated using whole splenocytes.

To this end, splenocytes from HIV^-ITP^- (n = 4), HIV^-ITP^+ (n = 3), HIV^+ITP^- (n = 4) and HIV^+ITP^+ (n = 5) were activated using PHA and secretion of IL-10, IL-4, Il-6 and IL-1ß were quantified (Fig 4).

We observed a profound defect of HIV^+ splenocytes to produce IL-10 and IL-4, two major cytokines produced by Tfh cells and related to B cell maturation. This observation is restricted to HIV^+ samples independently of the ITP status since no significant difference was observed when comparing ITP^- and ITP^+ samples (not shown). Strikingly, IL-6 and IL-1ß productions were not affected by HIV-infection (Fig 4). IL-6 secretion is classically linked to viral infection. However Shive et al. have demonstrated that IL-6 secretion is not correlated with HIV-RNA. Moreover, histoculture of HIV chronically infected lymph nodes as well as histoculture of HIV^- lymph nodes *in vitro* infected with HIV do not reveal any difference in the amount of IL-6 secretion as compared to control lymph nodes [39].

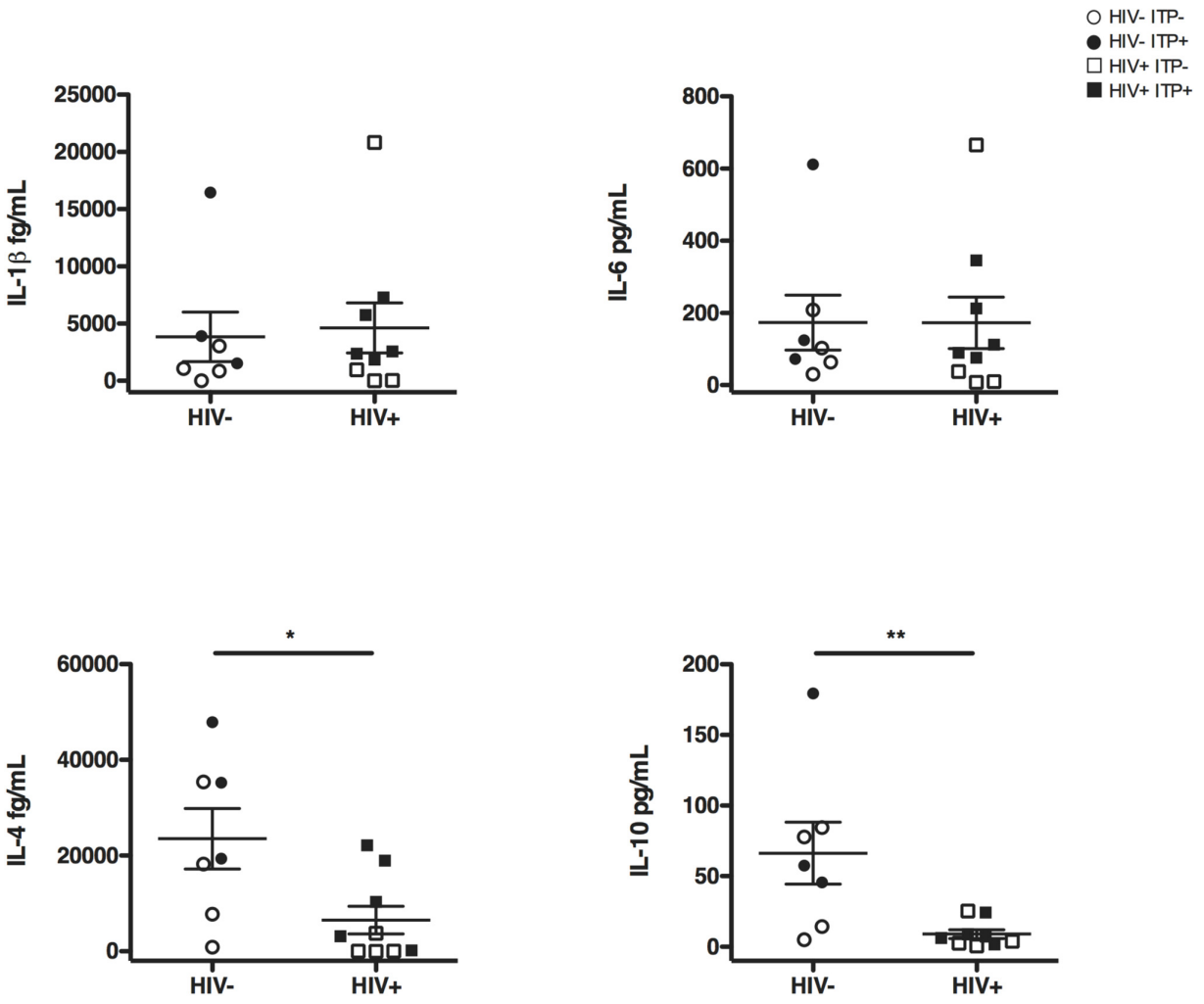


Fig 4. Activated HIV+ splenocytes fail to produce IL-4 and IL-10: Total splenocytes were stimulated with PHA for 2 days and culture supernatants were analyzed for IL-1ß, IL-6, Il-4 and IL-10 using enhanced sensitivity BD CBA flex set assay. Horizontal bars represent mean and error bars show SEM. HIV^-ITP^- n = 4, HIV^-ITP^+ n = 3, HIV^+ITP^- n = 4 and HIV^+ITP^+ n = 5. Statistics were obtained using the non parametric Mann-Whitney test *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.001.

doi:10.1371/journal.pone.0140978.g004

Thus, our results demonstrated a defective IL-10 and IL-4 production by activated splenocytes and provided new evidence to explain both defective B cell differentiation and Tfh cells abundance observed in HIV^+ individuals.

HIV-1 DNA integration in splenic Tfh cells

CD4+ T cells being the major target for HIV infection, we then asked whether HIV might infect splenic Tfh cells. To address this question, we sorted $CD3^+CD4^+CD45RA^+$ naïve, $CD3^+CD4^+CD45RA^-ICOS^-$ resting memory, and $CD3^+CD4^+CD45RA^-ICOS^+PD\text{-}1^{high}CXCR5^+$ total Tfh CD4 T cell populations from chronically HIV^+ subjects (HIV^+ITP^+ n = 5) and quantified

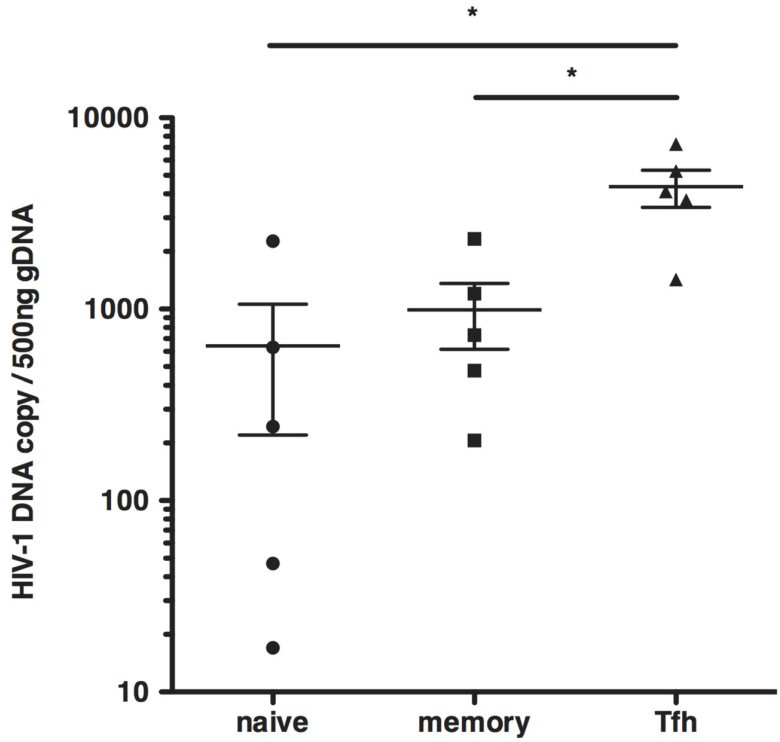


Fig 5. Splenic Tfh subset harbor high amount of HIV-1 DNA integration. qRT-PCR quantification of HIV proviral DNA levels in GCTfh, Tfh, memory and naïve $CD4^+$ T cell subsets isolated from splenocytes of five HIV^+ ITP^+ individuals as described in S1 Fig. Symbols represent individual samples: horizontal bars represent mean; and error bars show SEM. Statistics were obtained using the non parametric Mann-Whitney test *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.001.

doi:10.1371/journal.pone.0140978.g005

integrated HIV proviral genomes (Fig 5). HIV proviral DNA copy numbers were normalized to genomic DNA input (Fig 5).

Our results indicated that whereas resting memory CD4 T cell populations harbored only a slightly higher amount of HIV-DNA copies than naïve CD4T cells, the Tfh subset harbored a significantly higher amount of HIV DNA (more than 4-fold increase). Our data obtained using HIV-infected spleens are in accordance with observations using lymph nodes [13]. This raises an apparent paradox between the elevated proportions of Tfh cells population and their activated status and their higher susceptibility to HIV integration.

Discussion

The recent discovery of broad and potent HIV-1 neutralizing antibodies (bNAbs) has renewed optimism for developing an effective vaccine against HIV-1 [40]. The generation of bNAbs requires multiple rounds of B cell receptor (BcR) affinity maturation, suggesting a crucial role of Tfh in their generation [41]. However, less than 1% of HIV-infected patients develop bNAbs that arise late in the infection, 2 to 4 years after infection, indicating probable Tfh and B cell dysfunctions in HIV infection [42].

Until now, most studies have investigated human Tfh subsets in lymph nodes of HIV-infected patients [13,14,17]. However, spleen constitutes another major compartment for the induction of adaptive immunity against blood borne pathogens such as HIV. Here, using a unique collection of cryopreserved spleens cells from HIV-infected individuals, we performed an extensive characterization of Tfh, GCTfh and Tfr cells. Similar to what has been already reported in lymph nodes, the percentages of Tfh and GCTfh cells were significantly increased in HIV^+ spleens, while ITP status did not impact these populations. We also reported a slight increased $Foxp3^+$ Treg population in accordance with reports of highly elevated Treg levels in mucosa of untreated chronically HIV^+ patients [43]. For the first time we showed that Tfr proportions were significantly increased in HIV^+ spleens. These results suggest that the expansion of Tfh and GCTfh populations might not result from a scarcity in Tfr cells, as suggested in HIV^-ITP^+ spleen samples studies [44]. The question of Tfr suppressive functions would be very interesting to address in those samples. However due to the lack of specific cell surface markers identifying Tfr, splenic Tfr cells could not be sorted and tested for their suppressive function on Tfh proliferation. Moreover, since the development of Tfr cells kinetically follows Tfh amplification in order to regulate the GC reaction [10] one can hypothesize that the GC reaction is sustained but not completed in chronically HIV^+ spleens.

HIV infection impairs B cell maturation causing a loss of memory B cell and an expansion of plasma cells [13,14,18,19,45]. Of note, loss of memory B cells during HIV infection is also due to apoptosis [46]. Here, we reported a skewed B cell distribution in HIV^+ spleens: pre-GC and GC B cells accumulated while further differentiation was rerouted to plasma cells at the cost of memory B cell differentiation. The loss of memory B cells has already been noted in the spleens from SIV-infected macaques [47]. Hence, although increased in HIV^+ spleens, Tfh and GCTfh populations were not able to support complete B cell differentiation from naïve to memory phenotype. Remarkably, excessive numbers of Tfh cells can result in B cells losing their affinity for antigen or even becoming self-reactive [48]. In line with this, it has been shown that splenic Tfh expansion participates in anti-platelet-antibody production in ITP [49]. In our collection of HIV^- ITP^+ samples, we did not observe enrichment in Tfh cells as compared to HIV^- ITP^-, further highlighting that the increase of Tfh cells in HIV^+ samples is most likely a consequence of HIV-infection. Many autoimmune disorders, such as ITP, have been shown to have a higher incidence among HIV^+ individuals [50]. Of note, a recent study reported the characterization of an anti ds-DNA antibody that also broadly neutralizes HIV in a SLE/HIV individual [51].

Perreau et al. have already shown that Tfh cells serve as a major CD4 T cell compartment for HIV infection, replication and production in lymph nodes from viremic HIV^+ patients [13]. Consistent with their data, we reported a higher amount of HIV-1 DNA integration in total splenic Tfh cell populations than in naïve and resting memory CD4 T cells. However, according to the phenotypic characterization of *ex vivo* splenic CD4 T cell populations, Tfh cells were in higher proportion in HIV^+ individuals. This raises an apparent contradiction between the elevated proportions of Tfh cells and their higher susceptibility to HIV infection. One possible explanation is that antigen persistence could drive CD4 T cells away from antiviral Th1 toward Tfh differentiation [52]. Hence, one can hypothesize that untreated patients in chronic stage of HIV infection present high amounts of viral antigens leading to an exacerbated Tfh differentiation. Interestingly, HIV particles are associated to GC follicular dendritic cells in tonsils and lymph nodes from infected patients [53–55] and Cheynier et al. reported persistence of high level of HIV particles in GC of HIV^+ spleens from untreated subjects [24]. Thus, antigen persistence combined with immune activation could explain Tfh (and Tfr) expansion despite their higher susceptibility to HIV-integration. In contrast to what reported by Perreau et al. [13], we found that Ki67 mRNA expression was significantly lower in Tfh and GCTfh

from HIV^+ samples than in HIV^- samples. However, in accordance with our results, Petrovas et al. reported that higher Ki67 expression by Tfh cells is restricted to the acute phase and is not observed at the chronic stage of SIV infection [15].

This suggests that the higher proportion of Tfh cells was most likely due to a bias towards Tfh differentiation rather than to higher proliferative capacities. Another, non exclusive explanation is that Tfh cells may display restriction factors that are specific or more abundant than in other CD4+ T cells, allowing persistent HIV infection and integration with low proliferation.

The cytokine / chemokine environment might also promote Tfh cells differentiation and their homing into GC [1]. In this study, we showed that expression of IL-21 and CXCL13 encoding genes was enhanced in Tfh from HIV^+ samples, suggesting that Tfh cells differentiating during HIV infection can contribute to a suitable signaling milieu for GC development.

The key role of Tfh cells is to provide strong B cell helper signals and therefore promote their differentiation into memory B cell displaying high affinity for pathogens. This signal consists of cytokines such as IL-4 and IL-21 and of cell surface molecules such as ICOS and CD40L [1]. Despite the large proportion of follicular T cell subsets in HIV^+ spleens, gene expression profiling suggested that both Tfh and GCTfh cells were compromised in their capacity to provide strong co-stimulatory signals. CD40L down modulation as been described in total CD4T cell population in late stages of HIV infection [56]. Our transcriptome data using Tfh are in accordance with these observations.

The expression of SLAM molecules was also severely impacted. Combined together, these defects will impact the long lasting T cell / B cell cognate interaction required for the full B cell differentiation into long-lived plasma cells. Very interestingly, SLAMF1 is specifically required for IL-4 production by GCTfh [36], which underlines its major role in GC homeostasis. Hence, our data indicated a defect in *SLAMF1* gene expression that might explain the low level of IL-4 production observed in those spleens. Since IL-4 is one of the major cytokines secreted by Tfh [57] and is required for optimal humoral responses, low IL-4 production displayed by HIV^+ spleens might contribute to defective GC reaction.

As suggested by our gene expression analysis, IL-10 production was severely compromised in HIV^+ spleens. Considering that IL-10 is a potent B cell differentiation factor, low level of IL-10 production might contribute to the defective B cell maturation into memory B cells in HIV^+ spleens. Moreover, IL-10 is a key component of immune regulation in addition to PD-1 and CTLA-4. Here we identified an impaired expression of these inhibitory receptors in the total Tfh population. Interestingly, in addition to PD-1/PD-L1 interactions [17], recent studies reported the major role of the coinhibitory CTLA-4 receptor in the control of the GC reaction by modulating Tfh, Tfr and Treg [58–60]. Therefore, defective expression of IL-10, PD-1 and CTLA-4 might also lead to uncontrolled GC reaction and support Tfh and GCTfh cell differentiation observed in HIV^+ spleens.

In the context of HIV-infection, the defective STAT-3 encoding gene expression reported here is also of particular interest since it should impact on the full polarization of Tfh. Hence, following acute viral infection, STAT-3 has been reported to repress Type I interferons to promote Tfh cell differentiation, at the cost of Th1 polarization [61]. Therefore, defective STAT-3 expression might explain why Tfh from HIV^+ spleens harbored a transcription profile biased toward Th1 functions.

Some limitations of the present study should be addressed. First, most of our findings are based on transcriptome profile analysis of sorted Tfh and GCTFh cells and are not confirmed at the level of the protein expression because of the low numbers of cells. Of note, whereas Bcl6 mRNA quantification is not predictive for Bcl6 protein expression [62], STAT-3, CXCR5, CXCL13, IL-4, IL-21, CTLA4 and Il-10 mRNA quantifications have been reported to correlate

with the protein levels and most of theses transcripts are biomarkers of pathogenic processes in oncology and transplantation [63–68]. Second, the number of samples is relatively small, notably for HIV^+ITP^- samples. By comparing HIV^-ITP^- with HIV^-ITP^+ and HIV^+ITP^- with $HIV^{+-}ITP^+$, we found that ITP status does impact the frequency of Tfh and GCTfh cell populations (not shown). We also verify that IL-4 and IL-10 secretions are not driven by ITP status. These verifications allowed us to combine samples ITP^+ samples with ITP^- in our analysis and reach the sample size that allows statistical significance.

In sum, using unique samples obtained from chronically HIV-infected individuals, we characterized splenic Tfh, GCTfh, and Tfr cells subsets. To our knowledge, this study constitutes the first characterization of Tfh populations, including regulatory cells, in spleen that is the largest lymphoid organ and where the adaptive immune response against blood-borne antigens takes place. We observed that HIV infection leads to a higher proportion of Tfh cells in the spleen as well as a global increase of natural regulatory T and Tfr cells. Remarkably, chronic HIV-infection severely impacted the transcription profile of splenic Tfh and GCTfh, particularly affecting expression of genes implicated in costimulation, inhibition and signal transduction. Moreover, upon activation, the production of IL-4 and IL-10 was severely compromised in HIV^+ spleens. These multiple failures displayed by Tfh cells and splenocytes from HIV^+ individuals most likely contributed to impair B cell maturation and differentiation. Indeed in HIV-infected spleens, pre-GC and GC B cells accumulated while further differentiation was re-routed toward plasma cells at the cost of memory B cell differentiation. This skewed B cell differentiation might strongly impact the capacity of the immune system to generate bNAbs. Altogether, our work provides new insights in HIV pathogenesis and explains the global defective humoral responses observed in chronically HIV^+ patients.

Supporting Information

S1 Fig. Representative flow cytometry contour plots (A) Phenotypic analysis of $CXCR5^{high}$ $CCR7^{low}$ memory CD4 T cells in splenocytes from HIV-infected individuals. Gating strategy used to identify total Tfh, Tfh, GCTfh and Tfr is shown. (B) Representative flow cytometry contour plots showing the B cell maturation for HIV^- ITP^-, HIV^- ITP^+, HIV^+ ITP^- and HIV^+ ITP^+ individuals. Bm1 (naïve) CD38-IgD^+, Bm2 (activated naive) CD38-IgD^{++}, Bm2' (pregerminal center) $CD38^{++}IgD^+$, Bm3/4 (germinal center) $CD38^{++}$IgD-, early Bm5 CD38 +IgD^-, late Bm5 (CD38-IgD^-), and plasma cells (PC) $CD38^{+++}IgD^-$ proportions were determined among $CD19^+$ cells.
(TIF)

S2 Fig. Gating strategy used to sort Tfh and GCTfh from healthy (n = 4) and HIV^+ ITP^+ spleens (n = 5). Sorted cells were used for transcriptome profile analysis (Fluidigm assay).
(TIF)

S3 Fig. Unsupervised hierarchical clustering using ward clustering method of 17 selected genes reported to play key roles in Tfh functions: HIV^- ITP^- (n = 4, A-D) HIV^+ ITP^+ (n = 5, F-J). Gene expression has been quantified using the Fluidigm technology in Tfh and GCTfh populations. As compared to healthy controls (green square), Tfh and GCTfh from HIV^+ samples display a down-modulation of both costimulatory (TNFRSF4, ICOS, CD40LG) and regulatory molecules (CTLA-4, PD-1, IL-10). Expression of genes implicated in signal transduction (*CD48* and *SLAMF1*) is also impaired in HIV+ samples. Tfh and GCTfh cells from HIV^+ samples highly express genes implicated in Tfh associated functions (*CXCL13*, *IL-21*, *CXCR5*) and genes encoding transcription factors implicated in Tfh differentiation (*MAF*, *BATF*, *Bcl6*) (red

square).
(TIF)

S1 Table. Name and function of genes associated with T helper function and differentiation.
(TIF)

Acknowledgments

We thank Behazine Combadière, Nicolas Fazilleau and Olivier Thaunat for helpful discussions and suggestions and Yolande Richard for her kind advice on the manuscript. We also thank the core facility of the UPMC "Plateforme CyPS" for expertise in cytometry cell sorting.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: TY RAK BA JZ A. Six ADK AM SGD. Performed the experiments: LC AR AU TY YX HPP KD A. Samri PGC SC SGD. Analyzed the data: LC AR AU TY YX HPP KD SC AM SGD. Contributed reagents/materials/analysis tools: BA AH RC RAK EO A. Six. Wrote the paper: LC AM SGD.

References

1. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). Annu Rev Immunol. 2011; 29: 621–663. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101400 PMID: 21314428
2. Vogelzang A, McGuire HM, Yu D, Sprent J, Mackay CR, King C. A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells. Immunity. 2008; 29: 127–137. doi: 10.1016/j.immuni.2008.06.001 PMID: 18602282
3. Ohara J, Paul WE. Up-regulation of interleukin 4/B-cell stimulatory factor 1 receptor expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988; 85: 8221–8225. PMID: 3263648
4. Liu X, Chen X, Zhong B, Wang A, Wang X, Chu F, et al. Transcription factor achaete-scute homologue 2 initiates follicular T-helper-cell development. Nature. Nature Publishing Group; 2014; 507: 513–8. doi: 10.1038/nature12910 PMID: 24463518
5. Choi YS, Kageyama R, Eto D, Escobar TC, Robert J, Monticelli L, et al. ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. Immunity. 2011; 34: 932–946. doi: 10.1016/j.immuni.2011.03.023.Bcl6 PMID: 21636296
6. Linterman M, Denton AE, Divekar DP, Zvetkova I, Kane L, Ferreira C, et al. CD28 expression is required after T cell priming for helper T cell responses and protective immunity to infection. Elife. 2014; 3: 1–21. doi: 10.7554/eLife.03180
7. Baumjohann D, Preite S, Reboldi A, Ronchi F, Ansel KM, Lanzavecchia A, et al. Persistent antigen and germinal center B cells sustain T follicular helper cell responses and phenotype. Immunity. Elsevier Inc.; 2013; 38: 596–605. doi: 10.1016/j.immuni.2012.11.020 PMID: 23499493
8. Alexander C-M, Tygrett LT, Boyden AW, Wolniak KL, Legge KL, Waldschmidt TJ. T regulatory cells participate in the control of germinal centre reactions. Immunology. 2011; 133: 452–68. doi: 10.1111/j.1365-2567.2011.03456.x PMID: 21635248
9. Chung Y, Tanaka S, Chu F, Nurieva RI, Martinez GJ, Rawal S, et al. Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. Nat Med. 2011; 17: 983–988. doi: 10.1038/nm.2426 PMID: 21785430
10. Linterman M, Pierson W, Lee SK, Kallies A, Kawamoto S, Rayner TF, et al. Foxp3(+) follicular regulatory T cells control the germinal center response. Nat Med. Nature Publishing Group; 2011; 17: 975–982. doi: 10.1038/nm.2425 PMID: 21785433
11. Wollenberg I, Agua-Doce A, Hernández A, Almeida C, Oliveira VG, Faro J, et al. Regulation of the germinal center reaction by Foxp3+ follicular regulatory T cells. J Immunol. 2011; 187: 4553–4560. doi: 10.4049/jimmunol.1101328 PMID: 21984700
12. Vaeth M, Müller G, Stauss D, Dietz L, Klein-Hessling S, Serfling E, et al. Follicular regulatory T cells control humoral autoimmunity via NFAT2-regulated CXCR5 expression. J Exp Med. 2014; 211: 545–561. doi: 10.1084/jem.20130604 PMID: 24590764

13. Perreau M, Savoye A-L, De Crignis E, Corpataux J-M, Cubas R, Haddad EK, et al. Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. J Exp Med. 2013; 210: 143–156. doi: 10.1084/jem.20121932 PMID: 23254284

14. Lindqvist M, Lunzen J Van, Soghoian DZ, Kuhl BD, Ranasinghe S, Kranias G, et al. Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. J Clin Invest. 2012; 122: 3271–3280. doi: 10.1172/JCI64314.action PMID: 22922259

15. Petrovas C, Yamamoto T, Gerner MY, Boswell KL, Wloka K, Smith EC, et al. CD4 T follicular helper cell dynamics during SIV infection. J Clin Invest. 2012; 122: 3281–3294. doi: 10.1172/JCI63039.factors PMID: 22922258

16. Xu Y, Weatherall C, Bailey M, Alcantara S, De Rose R, Estaquier J, et al. Simian immunodeficiency virus infects follicular helper CD4 T cells in lymphoid tissues during pathogenic infection of pigtail macaques. J Virol. 2013; 87: 3760–3773. doi: 10.1128/JVI.02497-12 PMID: 23325697

17. Cubas R, Mudd JC, Savoye A-L, Perreau M, van Grevenynghe J, Metcalf T, et al. Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. Nat Med. Nature Publishing Group; 2013; 19: 494–499. doi: 10.1038/nm.3109 PMID: 23475201

18. De Milito A, Mörch C, Sönnerborg A, Chiodi F. Loss of memory (CD27) B lymphocytes in HIV-1 infection. AIDS. 2001; 15: 957–964. doi: 10.1097/00002030-200105250-00003 PMID: 11399977

19. Chong Y, Ikematsu H, Yamamoto M, Murata M, Yamaji K, Nishimura M, et al. Increased frequency of CD27- (naive) B cells and their phenotypic alteration in HIV type 1-infected patients. AIDS Res Hum Retroviruses. 2004; 20: 621–629. doi: 10.1089/0889222041217455 PMID: 15242538

20. Gratton S, Cheynier R, Dumaurier MJ, Oksenhendler E, Wain-Hobson S. Highly restricted spread of HIV-1 and multiply infected cells within splenic germinal centers. Proc Natl Acad Sci U S A. National Academy of Sciences; 2000; 97: 14566–14571. doi: 10.1073/pnas.97.26.14566 PMID: 11121058

21. McIlroy D, Autran B, Cheynier R, Clauvel JP, Oksenhendler E, Debré P, et al. Low infection frequency of macrophages in the spleens of HIV+ patients. Research in Virology. 1996. pp. 115–121. doi: 10.1016/0923-2516(96)80225-1 PMID: 8901430

22. Hosmalin A, Samri A, Dumaurier MJ, Dudoit Y, Oksenhendler E, Karmochkine M, et al. HIV-specific effector cytotoxic T lymphocytes and HIV-producing cells colocalize in white pulps and germinal centers from infected patients. Blood. 2001; 97: 2695–701. PMID: 11313260

23. McIlroy D, Autran B, Cheynier R, Wain-Hobson S, Clauvel JP, Oksenhendler E, et al. Infection frequency of dendritic cells and CD4+ T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients. J Virol. 1995; 69: 4737–4745. PMID: 7609039

24. Cheynier R, Henrichwark S, Hadida F, Pelletier E, Oksenhendler E, Autran B, et al. HIV and T cell expansion in splenic white pulps is accompanied by infiltration of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes. Cell. 1994; 78: 373–87. PMID: 7914835

25. Oksenhendler E, Bierling P, Chevret S, Delfraissy JF, Laurian Y, Clauvel JP, et al. Splenectomy is safe and effective in human immunodeficiency virus-related immune thrombocytopenia. Blood. 1993; 82: 29–32. PMID: 8324229

26. Hosmalin A, Samri A, Dumaurier MJ, Dudoit Y, Oksenhendler E, Karmochkine M, et al. HIV-specific effector cytotoxic T lymphocytes and HIV-producing cells colocalize in white pulps and germinal centers from infected patients. Blood. 2001; 97: 2695–2701. doi: 10.1182/blood.V97.9.2695 PMID: 11313260

27. Hadida F, Parrot A, Kieny M, Dadat-Sowti B, Mayaud C, Debré P, et al. Carboxyl-terminal and central regions of human immunodeficiency virus-1 NEF recognized by cytotoxic T lymphocytes from lymphoid organs. An in vitro limiting. J Clin Invest. 1992; 89: 53–60. PMID: 1370302

28. McIlroy D, Troadec C, Grassi F, Samri a, Barrou B, Autran B, et al. Investigation of human spleen dendritic cell phenotype and distribution reveals evidence of in vivo activation in a subset of organ donors. Blood. 2001; 97: 3470–7. PMID: 11369639

29. Gratton S, Cheynier R, Dumaurier MJ, Oksenhendler E, Wain-Hobson S. Highly restricted spread of HIV-1 and multiply infected cells within splenic germinal centers. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97: 14566–71. doi: 10.1073/pnas.97.26.14566 PMID: 11121058

30. Keréveur A, McIlroy D, Samri A, Oksenhendler E, Clauvel JP, Autran B. Up-regulation of adhesion and MHC molecules on splenic monocyte/macrophages in adult haemophagocytic syndrome. Br J Haematol. 1999; 104: 871–7. PMID: 10192453

31. Nascimbeni M, Perié L, Chorro L, Diocou S, Kreitmann L, Louis S, et al. Plasmacytoid dendritic cells accumulate in spleens from chronically HIV-infected patients but barely participate in interferon-alpha expression. Blood. 2009; 113: 6112–9. doi: 10.1182/blood-2008-07-170803 PMID: 19366987

32. Koelsch KK, Boesecke C, McBride K, Gelgor L, Fahey P, Natarajan V, et al. Impact of treatment with raltegravir during primary or chronic HIV infection on RNA decay characteristics and the HIV viral reservoir. AIDS. 2011; 25: 2069–2078. doi: 10.1097/QAD.0b013e32834b9658 PMID: 21860347

33. Hufert FT, van Lunzen J, Janossy G, Bertram S, Schmitz J, Haller O, et al. Germinal centre CD4+ T cells are an important site of HIV replication in vivo. AIDS. 1997; 11: 849–57. PMID: 9189209

34. Pascual V, Liu YJ, Magalski A. Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. J Exp Med. Rockefeller Univ Press; 1994; 180: 329. PMID: 8006591

35. Choi YS, Eto D, Yang J a, Lao C, Crotty S. Cutting edge: STAT1 is required for IL-6-mediated Bcl6 induction for early follicular helper cell differentiation. J Immunol. 2013; 190: 3049–3053. doi: 10.4049/jimmunol.1203032 PMID: 23447690

36. Yusuf I, Kageyama R, Monticelli L, Johnston RJ, Hansen K, Barnett B, et al. Germinal Center T Follicular Helper Cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150). J Immunol. 2010; 185: 190–202. doi: 10.4049/jimmunol.0903505.Germinal PMID: 20525889

37. Crotty S, Kersh EN, Cannons J, Schwartzberg PL, Ahmed R. SAP is required for generating long-term humoral immunity. Nature. 2003; 421: 2–7. doi: 10.1038/nature01338.Published

38. Qi H, Cannons JL, Klauschen F, Schwartzberg PL. SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. Nature. 2008; 455: 764–769. doi: 10.1038/nature07345.SAP-controlled PMID: 18843362

39. Shive CL, Biancotto A, Funderburg NT, Pilch-Cooper HA, Valdez H, Margolis L, et al. HIV-1 is not a major driver of increased plasma IL-6 levels in chronic HIV-1 disease. J Acquir Immune Defic Syndr. 2012; 61: 145–52. doi: 10.1097/QAI.0b013e31825ddbbf PMID: 22659649

40. Chiodi F, Weiss RA. Human immunodeficiency virus antibodies and the vaccine problem. Journal of Internal Medicine. 2014. pp. 444–455.

41. Derdeyn C, Moore PL, Morris L. Development of broadly neutralizing antibodies from autologous neutralizing antibody responses in HIV infection. Curr Opin HIV AIDS. 2014; 9: 210–216. doi: 10.1097/COH.0000000000000057 PMID: 24662931

42. Simek MD, Rida W, Priddy FH, Pung P, Carrow E, Laufer DS, et al. Human immunodeficiency virus type 1 elite neutralizers: individuals with broad and potent neutralizing activity identified by using a high-throughput neutralization assay together with an analytical selection algorithm. J Virol. 2009; 83: 7337–7348. doi: 10.1128/JVI.00110-09 PMID: 19439467

43. Epple H-J, Loddenkemper C, Kunkel D, Tröger H, Maul J, Moos V, et al. Mucosal but not peripheral FOXP3+ regulatory T cells are highly increased in untreated HIV infection and normalize after suppressive HAART. Blood. 2006; 108: 3072–3078. doi: 10.1182/blood-2006-04-016923 PMID: 16728694

44. Daridon C, Loddenkemper C, Spieckermann S, Kühl A a., Salama A, Burmester GR, et al. Splenic proliferative lymphoid nodules distinct from germinal centers are sites of autoantigen stimulation in immune thrombocytopenia. Blood. 2012; 120: 5021–5031. doi: 10.1182/blood-2012-04-424648 PMID: 22955923

45. Richard Y, Amiel C, Jeantils V, Mestivier D, Portier A, Dhello G, et al. Changes in blood B cell phenotypes and Epstein-Barr virus load in chronically human immunodeficiency virus–infected patients before and after antiretroviral therapy. J Infect Dis. 2010; 202: 1424–1434. doi: 10.1086/656479 PMID: 20874514

46. Van Grevenynghe J, Cubas RA, Noto A, DaFonseca S, He Z, Peretz Y, et al. Loss of memory B cells during chronic HIV infection is driven by Foxo3a- and TRAIL-mediated apoptosis. J Clin Invest. 2011; 121: 3877–3888. doi: 10.1172/JCI59211 PMID: 21926463

47. Perucheon S, Chaoul N, Burelout C, Delache B, Brochard P, Laurent P, et al. Tissue-specific B-cell dysfunction and generalized memory B-cell loss during acute SIV infection. PLoS One. 2009; 4.

48. Pratama A, Vinuesa CG. Control of TFH cell numbers: why and how? Immunol Cell Biol. 2014; 92: 40–8. doi: 10.1038/icb.2013.69 PMID: 24189162

49. Audia S, Rossato M, Santegoets K, Spijkers S, Wichers C, Bekker C, et al. Splenic TFH expansion participates in B-cell differentiation and antiplatelet-antibody production during immune thrombocytopenia. Blood. 2014; 124: 2858–66. doi: 10.1182/blood-2014-03-563445 PMID: 25232056

50. Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y. HIV and autoimmunity. Autoimmun Rev. 2002; 1: 329–337. doi: 10.1016/S1568-9972(02)00086-1 PMID: 12848988

51. Bonsignori M, Wiehe K, Grimm SK, Lynch R, Yang G, Kozink DM, et al. An autoreactive antibody from an SLE / HIV-1 individual broadly neutralizes HIV-1. J Clin Invest. 2014; 124: 1835–1843. doi: 10.1172/JCI73441DS1 PMID: 24614107

52. Fahey LM, Wilson EB, Elsaesser H, Fistonich CD, McGavern DB, Brooks DG. Viral persistence redirects CD4 T cell differentiation toward T follicular helper cells. J Exp Med. 2011; 208: 987–99. doi: 10.1084/jem.20101773 PMID: 21536743

53. Embretson J, Zupancic M, Ribas J, Burke A. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. Nature. 1993; 362.

54. Pantaleo G, Cohen OJ, Schacker T, Vaccarezza M, Graziosi C, Rizzardi GP, et al. Evolutionary pattern of human immunodeficiency virus (HIV) replication and distribution in lymph nodes following primary infection: implications for antiviral therapy. Nat Med. 1998; 4: 341–5. PMID: 9500610

55. Biberfeld P, Chayt KJ, Marselle LM, Biberfeld G, Gallo RC, Harper ME. HTLV-III expression in infected lymph nodes and relevance to pathogenesis of lymphadenopathy. Am J Pathol. 1986; 125: 436–442. PMID: 3642987

56. Vanham G, Penne L, Devalck J, Kestens L, Colebunders R, Bosmans E, et al. Decreased CD40 ligand induction in CD4 T cells and dysregulated IL-12 production during HIV infection. Clin Exp Immunol. 1999; 117: 335–342. doi: 10.1046/j.1365-2249.1999.00987.x PMID: 10444266

57. Reinhardt RL, Liang H-E, Locksley RM. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. Nat Immunol. 2009; 10: 385–93. doi: 10.1038/ni.1715 PMID: 19252490

58. Sage PT, Paterson AM, Lovitch SB, Sharpe AH. The coinhibitory receptor ctla-4 controls B cell responses by modulating T follicular helper, T follicular regulatory, and T regulatory cells. Immunity. Elsevier Inc.; 2014; 41: 1026–39. doi: 10.1016/j.immuni.2014.12.005 PMID: 25526313

59. Wing JB, Ise W, Kurosaki T, Sakaguchi S. Regulatory T Cells Control Antigen-Specific Expansion of Tfh Cell Number and Humoral Immune Responses via the Coreceptor CTLA-4. Immunity. Elsevier Inc.; 2014; 41: 1013–25. doi: 10.1016/j.immuni.2014.12.006 PMID: 25526312

60. Linterman MA, Denton AE. Treg Cells and CTLA-4: The Ball and Chain of the Germinal Center Response. Immunity. Elsevier Inc.; 2014; 41: 876–8. doi: 10.1016/j.immuni.2014.12.009 PMID: 25526300

61. Ray JP, Marshall HD, Laidlaw BJ, Staron MM, Kaech SM, Craft J. Transcription factor STAT3 and type I interferons are corepressive insulators for differentiation of follicular helper and T helper 1 cells. Immunity. 2014; 40: 367–377. doi: 10.1016/j.immuni.2014.02.005 PMID: 24631156

62. Allman D, Jain A, Dent A, Maile RR, Selvaggi T, Kehry MR, et al. BCL-6 expression during B-cell activation. Blood. 1996; 87: 5257–5268. PMID: 8652841

63. Huang X, Meng B, Iqbal J, Ding BB, Perry AM, Cao W, et al. Activation of the STAT3 signaling pathway is associated with poor survival in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. J Clin Oncol. 2013; 31: 4520–8. doi: 10.1200/JCO.2012.45.6004 PMID: 24220563

64. Biswas S, Sengupta S, Roy Chowdhury S, Jana S, Mandal G, Mandal PK, et al. CXCL13-CXCR5 co-expression regulates epithelial to mesenchymal transition of breast cancer cells during lymph node metastasis. Breast Cancer Res Treat. 2014; 143: 265–276. doi: 10.1007/s10549-013-2811-8 PMID: 24337540

65. Leiva LE, Butler B, Hempe J, Ortigas a P, Sorensen RU. Up-regulation of CD40 ligand and induction of a Th2 response in children immunized with pneumococcal polysaccharide vaccines. Clin Diagn Lab Immunol. 2001; 8: 233–240. doi: 10.1128/CDLI.8.2.233–240.2001 PMID: 11238201

66. Xie J, Cui D, Liu Y, Jin J, Tong H, Wang L, et al. Changes in Follicular Helper T Cells in Idiopathic Thrombocytopenic Purpura Patients. Int J Biol Sci. 2015; 11: 220–229. doi: 10.7150/ijbs.10178 PMID: 25561904

67. Karabon L, Markiewicz M, Kosmaczewska A, Partyka A, Pawlak-Adamska E, Tomkiewicz A, et al. Pre-transplant donor and recipient CTLA-4 mRNA and protein levels as a prognostic marker for aGvHD in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Immunol Lett. European Federation of Immunological Societies; 2015; 165: 52–59. doi: 10.1016/j.imlet.2015.03.011 PMID: 25841352

68. Stanilov NS, Miteva LD, Dobreva ZG, Jovchev JP, Cirovski GM, Stanilova S a. Monocytes expression of IL-12 related and IL-10 genes in association with development of colorectal cancer. Mol Biol Rep. 2012; 1–8.

Supplemental Data

Supplementary figure 1. Phenotypic analysis of CXCR5^{high} CCR7^{low} memory CD4 T cells in splenocytes from HIV-infected individuals. Gating strategy used to identify total Tfh, Tfh, GCTfh and Tfr is shown.

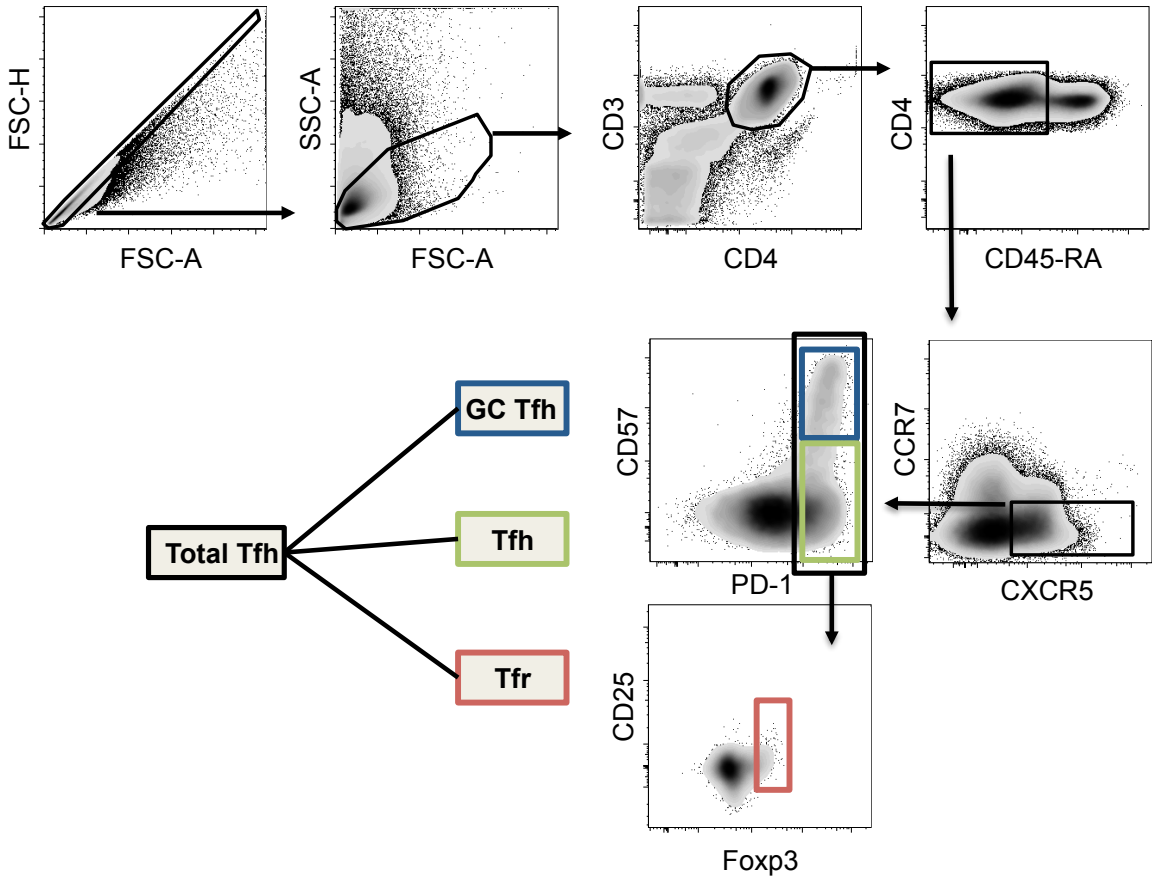
Supplementary figure 2. Representative flow cytometry contour plots showing the B cell maturation for HIV- ITP-, HIV- ITP+, HIV+ ITP- and HIV+ ITP+ individuals. Bm1 (naïve) CD38^{-}IgD^{+}, Bm2 (activated naive) CD38^{-}IgD^{++}, Bm2' (pregerminal center) CD38^{++}IgD^{+}, Bm3/4 (germinal center) CD38^{++}IgD^{-}, early Bm5 CD38^{+}IgD^{-}, late Bm5 (CD38^{-}IgD^{-}), and plasma cells (PC) CD38^{+++}IgD^{-} proportions were determined among CD19+ cells.

Supplementary figure 3. Gating strategy used to sort Tfh and GCTfh from healthy (n=4) and HIV+ ITP+ spleens (n=5). Sorted cells were used for transcriptome profile analysis (Fluidigm assay).

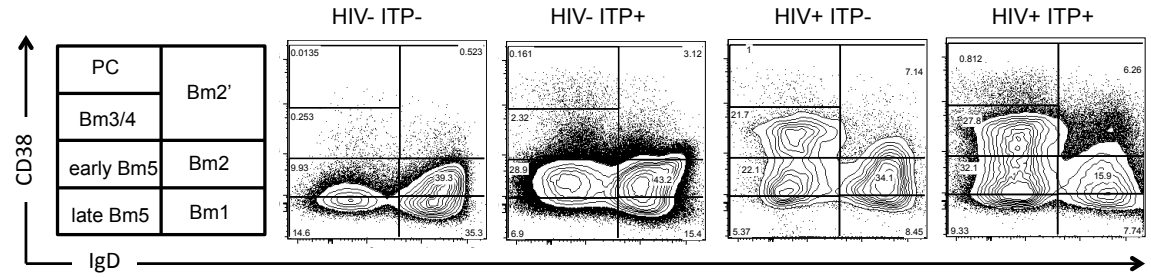
Supplementary figure 4. Unsupervised hierarchical clustering of 17 selected genes reported to play key roles in Tfh functions: HIV- ITP- (n = 4, A-D) HIV+ ITP+ (n = 5, F-J). Gene expression has been quantified using the Fluidigm technology in Tfh and GCTfh populations. As compared to healthy controls (green square), Tfh and GCTfh from HIV+ samples display a down modulation of both costimulatory (TNFRSF4, ICOS, CD40LG) and regulatory molecules (CTLA-4, PD-1, IL-10). Expression of genes implicated in signal transduction (CD48 and SLAMF1) is also impaired in HIV+ samples. Tfh and GCTfh cells from HIV+ samples highly express genes implicated in Tfh associated functions (CXCL13, IL-21, CXCR5) and genes encoding transcription factors implicated in Tfh differentiation (MAF, BATF, Bcl6) (red square).

Supplementary table 1. Name and function of genes tested for their expression in Tfh and GCTfh. These genes were included in PCA analysis and in unsupervised hierarchical clustering.

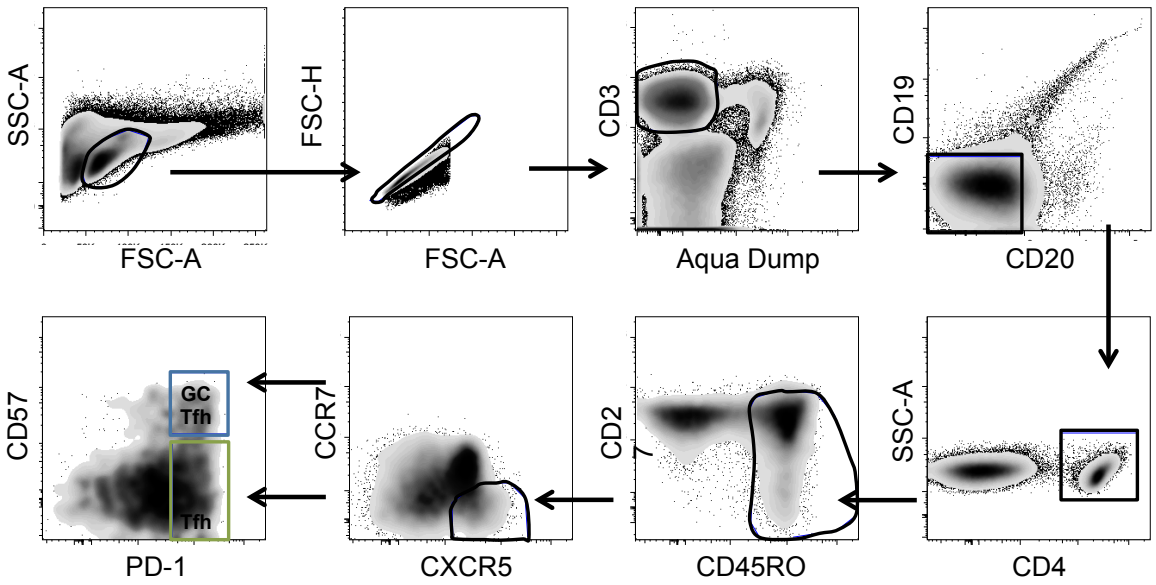
Supplementary figure 1



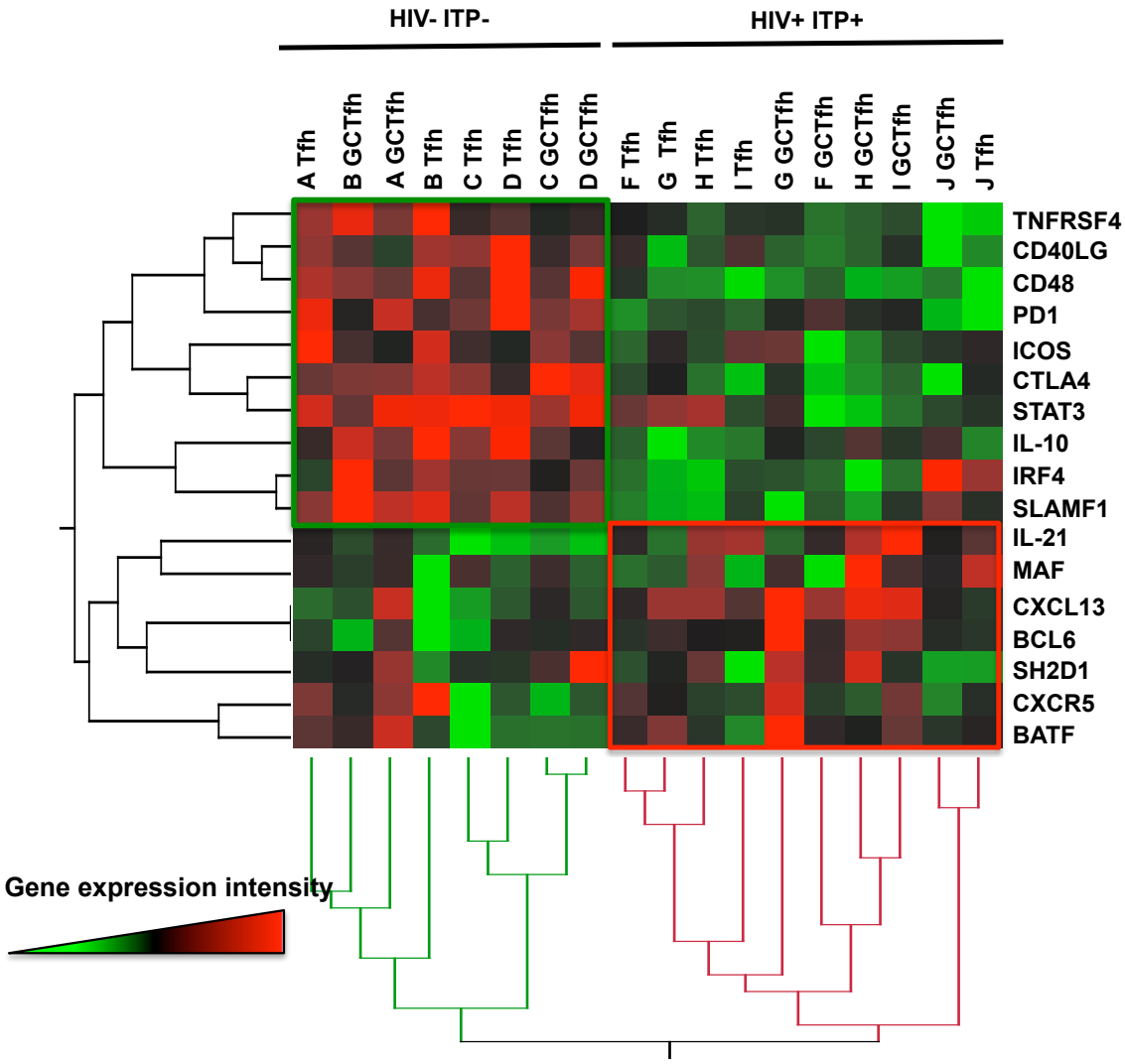
Supplementary figure 2



Supplementary figure 3



Supplementary figure 4



Supplementary table 1

Category	Genes name
Costimulatory molecules	*TNFRSF4* *CD40LG* *ICOS*
Immune regulators	*IL10* *PD1* *CTLA4* *FOXP3* *BTLA*
Localization regulating molecules	*CXCR5* *CXCL13* *IL21R* *IL6R* *IFNg* *S1PR1*
Cell activation	*MKI67* *IL2r* *CD38* *CD69* *LAG3* *CD48*
Tfh differentiation	*BCL6* *IL21* *B3GAT1 (CD57)* *IL7r* *MAF* *BATF* *IRF4*
Signalling	*SLAMF1* *SH2D1A (SAP)*
Transcription factors	*TBX21* *GATA3* *PRDM1* *STAT1* *STAT3* *STAT4* *STAT5A* *NFATC1*

AXE 2 DU TRAVAIL DE THÈSE :

Étude des réponses B mémoires dans le sang de patients infectés par le VIH

Cette étude s'inscrit dans un projet collaboratif financé par l'ANRS. Quatre autres équipes de recherche contribuent à ce projet : L'équipe de Christiane Moog (Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg), l'équipe de Christine Rouzioux (Hôpital Necker, Paris), l'équipe de Brigitte Autran (Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, Paris) et l'équipe d'Olivier Lambotte (Hôpital du Kremlin-Bicêtre).

RÉSUMÉ DE L'AXE 2

Dans le second axe de ma thèse, j'ai étudié les réponses B mémoires dans différentes cohortes : des patients VIH$^+$ *Elite Controller* (EC) et *Viremic Controller* (VC) qui contrôlent naturellement l'infection sans traitement antirétroviral, des patients VIH$^+$ sous traitement antirétroviral combiné (cART) et des donneurs non infectés par le VIH. Parmi le groupe d'EC, certains expriment la molécule HLA-B*57 associée à une meilleure réponse cytotoxique médiée par les lymphocytes T *ex vivo*.

J'ai d'abord réalisé un immuno-monitorage des différentes sous-populations de LB CD19$^+$ du sang. De façon intéressante, les EC HLA-B*57$^-$ présentent une altération de la répartition de ces sous populations de LB avec une proportion des LB *Tissue-like memory* (CD27$^-$CD21$^-$) augmentée comparé aux EC HLA-B*57$^+$ et aux donneurs sains. J'ai ensuite analysé par Elispot B la fréquence, l'isotype et la spécificité des LB mémoires circulants des patients EC et cART. Alors que 80% des EC présentent des réponses B mémoires spécifiques du VIH, ces réponses sont détectées chez moins de 10% des patients cART et chez les VC majoritairement avant l'initiation des traitements. D'autre part, une activité neutralisante des anticorps, notamment des souches Tier 2, a été détectée chez la plupart des EC. Cette capacité neutralisante corrèle positivement avec la fréquence de LB anti-VIH chez les EC HLA-B*57$^+$ probablement en lien avec une meilleure préservation globale du système immunitaire chez les EC HLA-B*57$^+$ permettant le contrôle de l'infection par le VIH.

La détection des réponses B mémoires anti-VIH chez la majorité des EC suggère une présence résiduelle du virus, indispensable au maintien de ces réponses. Les LB mémoires des EC produisent majoritairement des anticorps anti-VIH d'isotype IgG1 tandis que les anticorps anti-VIH d'isotypes IgG2 et IgG3 ont été détectés respectivement chez 35% et 25% des EC.

Ces travaux mettent en évidence le maintien des réponses B mémoires anti-VIH chez les EC indépendamment de l'expression de l'allèle HLA-B*57 et constituent la première caractérisation isotypique des anticorps sécrétés par les LB mémoires chez ces patients.

Le manuscrit ci-après sera bientôt soumis à publication et je suis 1er auteur pour ces travaux.

HIV-specific B cell frequency correlates with transmitted/founder virus neutralization in patients naturally controlling HIV-infection

Angeline Rouers[1], Bin Su[2], Jeromine Klingler[2], Assia Samri[3], Sophie Even[3], Veronique Avettand-Fenoel[4,5], Clemence Richetta[1], Faroudy Boufassa[6], Olivier Lambotte[7,8,9], Laurent Hocqueloux[10], Hugo Mouquet[11,12], Christine Rouzioux[4,5], Brigitte Autran[3,13], Stéphanie Graff-Dubois[1], Christiane Moog[2] and Arnaud Moris[1] for the ANRS CO21 Cohort*

*** Liste et ordre des auteurs non définitif**

Author affiliations:

[1] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM U1135, CNRS ERL 8255, Center for Immunology and Microbial Infections – CIMI-Paris, Paris, France

[2] INSERM UMRS-1109, Centre de Recherche en Immunologie et Hématologie, Faculté de Médecine, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France

[3] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM U1135, Center for Immunology and Microbial Infections – CIMI-Paris, Paris, France

[4] EA7327, Univ Paris Descartes, Sorbonne Paris-Cité, Faculté de Médecine, Paris, France

[5] APHP, Hôpital Necker Enfants-Malades, Laboratoire de Virologie, Paris, France

[6] INSERM, U1018, Faculté de Médecine Paris Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France

[7] Université Paris Sud, INSERM UMR-1184, Center for Immunology of Viral Infections and Autoimmune Diseases, Le Kremlin Bicêtre, France

[8] CEA, DSV/iMETI, Division of Immuno-Virology, IDMIT, Fontenay-aux-Roses, France

[9] AP-HP, Service de Médecine Interne-Immunologie Clinique, Hôpitaux Universitaires Paris Sud, Le Kremlin Bicêtre, France

[10] Service des Maladies Infectieuses/ Tropicales, Centre Hospitalier Régional, Orléans, France

[11] Laboratory of Humoral Response to Pathogens, Department of Immunology, Institut Pasteur, Paris, France

[12] CNRS-URA 1961, Paris, France

[13] AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtière, Department of Immunology, Paris, France

Present address: BS: Beijing Key Laboratory for HIV/AIDS Research, Center for Infectious Diseases, Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, N°8 Xitoutiao, Youanmenwai St., Feng Tai District, Beijing 100069, P.R. CHINA

Abstract (250 words)

Background: In the absence of antiretroviral therapy (ART), elite controllers (EC) naturally control HIV infection maintaining low to undetectable viral loads. Immune responses, in particular cytotoxic T cell responses, participate in the control of HIV. The impact of B cell antibody responses is less clear.

Objective: Understanding the mechanisms implicated in natural control of HIV infection will help in developing efficient HIV vaccines. In EC, we aimed at characterizing memory B cell compartments and determining the frequency, the specificity and the isotype of HIV-specific memory B cell responses. We asked whether the preservations of HIV-specific B cells could be associated with the capacity to neutralize HIV infection.

Methods: In EC expressing or not the protective HLA-B*57 allele, patients under combined ART and HIV-negative individuals, we characterized the memory B cell compartments and HIV-specific memory B cells responses using flow cytometry and B cell-Elispot, respectively. We analyzed the capacity the serum from EC to neutralize transmitted/founder (T/F) HIV strains.

Results: EC preserve memory B cell compartments and in contrast to treated patients, maintain HIV-specific responses. HIV-specific B cells mainly express IgG1+ antibody (Ab). However, some EC also secrete anti-HIV IgG2+ and IgG3+ Abs. Importantly, 27% of EC neutralized at least 40 % of T/F virus strains tested. The maintenance HIV-specific B cells, in particular in HLA-B*57+ EC, results in broader HIV neutralizing capacities of T/F viruses.

Conclusion: Preservation of HIV-specific B cells, in particular in HLA-B*57+ EC, is associated with potent neutralizing capacities. Memory B cell responses also contribute to natural control of HIV infection.

Key messages:

- In contrast to treated HIV-infected patients, elite controllers (EC) preserve memory B cell compartments and maintain HIV-specific responses.
- The maintenance HIV-specific B cells, in particular in HLA-B*57+ EC, is associated with an efficient humoral response against highly resistant heterologous HIV strains.
- Memory B cell responses contribute to natural control of HIV infection.

INTRODUCTION

HIV-1 (HIV) infection alters B cell differentiation resulting in spontaneous immunoglobulin secretion, hypergammaglobulinaemia [1] and decrease in memory B cells [2, 3, 4]. Antibodies (Abs) against HIV appear progressively after contamination but are inefficient in controlling viral replication during the early phase of infection [5]. HIV-specific Abs with neutralizing ability are detected after several month but are not proficient against heterogeneous strains [6, 7]. Cross-reactive Abs, are generally produced after 2 to 4 years [8]. Broadly neutralizing Abs (bnAbs) that block infection of multiple HIV strains have been identified [9, 10].

Some individuals naturally control HIV infection without combined antiretroviral therapy (cART) [11]. Among them, elite controllers (EC, less than 1% of HIV-infected individuals) maintain very low to undetectable viremia [12, 13]. Understanding the mechanisms implicated in this natural control could be helpful to design efficient anti-HIV vaccines. A fraction of EC exhibit potent cytotoxic CD8+ T cell responses against HIV [14-16], often associated with the expression of the HLA-B*57 allele [12, 15, 17]. In EC, HIV-specific CD4+ T cells also present high TCR avidies suggesting that helper responses contribute to HIV-control [18]. Whether humoral responses and, in particular, memory B cells might play a role in HIV control is not firmly established. Some groups detected bnAbs in EC and proposed that bnAbs might participate in controlling infection [9, 19] while others did not [20, 21]. The status of EC seems also associated with an increase capacity to mediate ADCC (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity), however, the presence of ADCC-mediating Abs is heterogeneous [19]. In fact in EC, the capacity of HIV-specific Abs to performed multiple effector functions (so called polyfunctionality) has been recently linked to HIV-control [22]. B cells, probably by their capacity to produce Ab, are implicated in HIV-control since their depletion in HIV-infected patients leads to a rise of viremia [23].

According to cell surface markers, memory B cells can be divided in 4 subpopulations: activated memory (AM, CD27+CD21-), resting memory (RM, CD27+CD21+), intermediate memory (IM, CD27-CD21+) and tissue like memory (TLM, CD27-CD21-) [2]. AM and TLM B cells, the latter correspond to anergic cells, are overrepresented in untreated HIV-infected patients. In contrast, RM cells that are considered as the B cell subset implicated in maintenance of humoral responses [24, 25] are decrease upon infection. Initiation of cART restores TLM and AM B cell proportions to levels observed in HIV-negative individuals but it does not completely restored the RM compartment [2, 26]. Remarkably, in the absence of treatment, HIV-specific B cells are enriched in TLM and AM B cell subsets but decreased in

RM [27]. In EC, RM and AM B cells are increased compared to treated HIV-infected patients but no differences were observed concerning the global proportion of TLM cells [28]. However, in EC, the frequency of HIV-specific TLM B cells is reduced as compared to treated HIV-infected patients [29]. Taken together these results suggest that the B cell compartment might be relatively preserved in EC but also exhibit features of viremic individuals (increased AM). In EC, whether this preservation of B cell phenotypes is associated with the capacity of B cells to secrete HIV-specific Abs has been barely studied. A potential correlation between HIV-specific B cell responses and Ab-mediated HIV neutralization has not been analyzed thus far.

The nature of secreted antibodies by HIV-specific B cells might also impact disease outcome. IgG are the predominant immunoglobulins secreted by antibody secreting cells (ASC). IgG are subdivided in 4 classes (IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4) with different abilities to bind Fc γ receptor and to activate complement cascade. In HIV infection, HIV-specific IgG detected in sera from untreated patients are mainly IgG1 [30]. Remarkably, the presence of HIV-specific IgG2 in the sera from viremic-controllers (VC) has been associated with lower viral load and slower disease progression [31]. In addition, HIV-specific IgG2 were mostly find in EC without expression of the HLA-B*57 protective allele, suggesting that HIV-specific IgG2 Abs provide an alternative for the control of HIV infection [32]. IgG2 production in EC was also linked with a higher secretion of IFN γ in VC [33]. More recently, Ackerman et al. showed that, in EC, IgG1/IgG3 rather than IgG2/IgG4 HIV-specific Abs mainly contribute to the polyfunctional activities associated with HIV control [22].

In the present study, we characterize memory B cell responses in a large cohort of EC expressing or not expressing the protective HLA-B*57 allele and asked whether a preservation of B cell compartments might be linked to the capacity of B cells to secrete HIV-specific Abs and of patient's sera to neutralize HIV. We used transmitted/founder (T/F) virus highly resistant to neutralization for this purpose. We compared HLA-B*57+ and HLA-B*57- EC with aviremic patient undergoing successful cART or HIV-negative individuals. We first analyzed the phenotype of total memory B cells by flow cytometry and then determined the frequency, specificity and isotype of HIV-specific memory B cell responses using B cell-Elispot assay. We evidenced a global preservation of memory B cell compartments in EC with a proportion of TLM comparable to what observed in cART and HIV-negative individuals. However, HLA-B*57- EC presented a slight but significant increase of TLM B cells compared to HLA-B*57+ EC and to HIV-negative individuals. Interestingly, HIV-specific B cells were detected in 80% of EC. In contrast, only 7% of cART patients presented

HIV-specific responses. All groups exhibited similar levels of Influenza-specific B cells responses. HIV-specific responses consisted mainly of IgG1 secreting B cells whereas HIV-specific IgG2 and IgG3 secreting B cells were detected in only few EC. Of note, HIV-specific Abs responses were also detected in untreated VC. These HIV-specific responses were lost after initiation of cART. Remarkably, 59% of serums from EC neutralized at least one HIV strain tested and 27% blocked infection at least 40 % neutralization resistant Tier-2 T/F virus. Tier-2 neutralization represents an effective anti-HIV humoral response [34]. Remarkably, in HLA-B*57+ EC, the frequency of HIV-specific B cells correlated with the capacity to neutralize a wider range of T/F HIV strains.

MATERIALS

Patients and Samples

EC (n=38) and VC (n=3) were recruited in the CO21 CODEX cohort implemented by ANRS (Agence nationale de recherches sur le SIDA et les hépatites virales). Ten to 15 million cells from EC or VC were available for this study. EC were defined as HIV-infected individuals maintaining viral loads under 400 copies of HIV RNA/mL without cART for more than 5 years. EC were divided in 2 groups: HLA-B*57+ (n=19) or HLA-B*57- (n=19). VC are HIV-infected individuals that maintained high CD4 counts (>400 mm3) without cART for more than 8 years. For some VC, cART has been initiated. HIV-infected efficiently treated patients (cART) (n=13) were recruited at Kremlin Bicêtre Hospital. They were treated for at least 1 year (mean of 10 years) and had a viral load undetectable by standard assays. HIV-negative individuals (n=12) are anonym blood donors (Établissement Français du sang). A detailed description of the patients is provided in Table 1, including the median and interquartile range for age (at the time of the study), CD4 T cell count and RNA load for each group.

Ethic statement.

All the subjects provided their written informed consent to participate in the study. The CO21 CODEX cohort and this sub-study were funded and sponsored by ANRS and approved by the Ile de France VII Ethics Committee. The study was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki.

Flow cytometry

Cell viability was evaluated using LIVE/DEAD® (ThermoFisher Scientific) and the following Abs were used: CD19-APCCy7 (SJ25C1), CD21-APC (B-ly4), CD27-PE (M-T271), IgD-PECF594 (IA6-2), IgG-BV605 (G18-145), CD38-V450 (HB7) (all from BD biosciences), IgM-AF700 (CH2, Exbio) and IgG2-AF488 (HP6002, Southern Biotech). Stainings were performed using standard procedures in PBS containing 0,5% BSA and 2mM EDTA (20 min at 4°C). Samples were processed on a Fortessa cytometer using FACSDiva software (BD Biosciences) and further analyzed using FlowJo2 software (Tree Star).

Differentiation of B cells into Antibody secreting cells (ASC)

PBMCs were thawed and cultured in Yssel medium supplemented with 1% human serum AB (Institut Jacque Boy), 0,5µg/mL of TLR7/8 ligand (R848, InVivoGen) and 100 U/mL rhIL-2

(Miltenyi Biotec). Cells were cultured at $1x10^6$ cells/mL. After 6 days, cells were harvested and the proportion of B cells evaluated by flow cytometry using anti-CD19 antibody.

B cell-Elispot assay

Elispot plates (Millipore MSIPN4550) were pre-wet with 35% ethanol (1 min), washed with PBS and coated overnight at 4°C with 15 µg/mL anti-IgG antibodies (Mabtech, MT91/145) or viral antigens diluted in PBS. HIV antigens included gp140Yu2b produced as in [9], gp41S30 and gp160THO and were coated at 10 µg/mL. Influenza antigens (5 µg/mL, 2015 VAXIGRIP vaccine, Sanofi Pasteur Msd) and keyhole limpet hemocyanin (KLH, 10 µg/mL, Sigma-Aldrich) were used as positive and negative controls, respectively. Plates were washed with PBS and saturated with RPMI containing 10% FBS. Six days post activation, 1500 to 3000 or $1.5x10^5$ to $3x10^5$ ASC/well were plated for total IgG or antigen-specific detections, respectively, and incubated overnight at 37°C in RPMI+10% FBS. Plates were then washed in PBS+0,05% Tween-20 prior incubation with biotinylated anti-IgG (1 µg/ml, MT78/145, Mabtech), anti-IgG1 (1 µg/ml, G17-1, BD), anti-IgG2 (0.2 µg/mL, HP6200, Mabtech) or anti-IgG3 (0.2 µg/mL, HP6050, Southern Biotech) (2h, RT). Spots were revealed using alkaline-phosphatase coupled streptavidin (0,5 U/mL, Roche Diagnostics, 1h RT) and 50 µL BCIP/NBT substrate (15min, Sigma). The reaction was stopped using water. The number of spots was counted using AID reader (Autoimmun Diagnostika GmbH). Frequency of antigen-specific ASC was calculated taking account the number of CD19+ B cells plated.

TZM-bl neutralization assays

Sera were tested for their ability to neutralize HIV-1 Env-containing pseudo-viruses using TZM-bl neutralization as described previously [35]. Two standard Tier-1 reference strains (SF162.LS and BaL.26), seven Tier-2 strains (QH0692.42, CH058, CH077, CH106, RHPA, THRO4156.18 and REJO 4541.67) and one Tier-3 strain (TRJO4551.58) were used. The 50% inhibitory dose (IC50) was defined as the sample concentration that caused a 50% reduction in relative luminescence units (RLU) [35].

Statistics

Statistical significance (p-values) were determined using Mann-Whitney test (*$p<0.05$, **$p<0.005$, ***$p<0.001$) and Association between continuous variables were evaluated by Spearman rank order correlation using Graph-Pad software.

RESULTS

Memory B cell compartments are preserved in EC

Using flow cytometry, we first analyzed the peripheral memory B cell compartments in EC, cART and HIV-negative individuals (gatings as shown in Supplemental Fig 1). The proportion of CD19+ B cells was slightly higher in EC as compared to HIV-negative donors (Fig 1A). EC, cART and HIV-negative donors presented no significant differences concerning the proportion of AM, IM and RM B cells (Fig 1B) and other populations studied (total memory B cells, naïve B cells, IgG+ and IgG2+ B cells and plasmablasts) (Supplemental Fig 2 A-F). We observed a slight, but not significant, increase of RM B cells in EC as compared to cART patients (median 16% among B cells vs 10% respectively) (Fig 1B). This expansion seems more marked in HLA-B*57- EC (median 19% among B cells). However, we noticed a significant increase of TLM B cell proportion in HLA-B*57- EC as compared to HLA-B*57+ EC and HIV-negative individuals (Fig 1B). Concerning plasmablasts and MZ-like B cells, we did not observe significant difference in EC compared to the 2 other groups (Supplemental Fig 2 E-F). However, EC presented a higher proportion of IgG+ memory B cells as compared to HIV-negative individuals mostly due to HLA-B*57- EC (Supplemental Fig 2 C).

Overall, with the exception of the TLM B cell population expended in HLA-B57- EC, the B cell compartments seem preserved in EC. We next analyzed the frequency and isotype of HIV-specific memory B cell responses.

B cells from EC display a better expansion after in vitro stimulation

The B-cell Elispot assay requires differentiating B cells into antibody secreting cells (ASC). PBMCs were treated with (R848+IL-2) [36] and 6 days post treatment, the frequency and expansion of CD19+ B cells assessed. Interestingly, B cells from EC presented a better capacity to expand as compared to cells from cART patients (4 and 1.5 fold increase, respectively) (Supplemental Fig 3). Of note, ex vivo, no difference was observed between these 2 groups concerning the proportion of TLM B cells (Fig 1B). In contrast, ex vivo, TLM proportion was increased in HLA-B*57- EC as compared to HLA-B*57+ EC (Fig 1B) and we found a trend to a reduced expansion of B cells in HLA-B*57- EC as compared to HLA-B*57+ EC (Supplemental Fig 3).

EC maintain HIV-specific memory B cell responses

We then evaluated the frequency of HIV-specific ASC using Elispot (Fig 2 and Supplemental Fig 4). As immunogens, we used different HIV envelope (HIV Env): gp140Yu2b, gp41S30, gp160THO and Influenza antigens or KLH as positive and negative controls, respectively. The frequencies of ASC secreting IgG, IgG1 or IgG3 were not significantly different between the 3 groups (Supplemental Fig 4). In contrast, we noticed a reduced frequency of IgG2 secreting ASC in EC as compared to HIV-negative donors (Supplemental Fig 4C).

Strikingly, 82% of EC (28/34 EC tested) but only 7% of cART patients (1/13) exhibited a positive response against HIV Envs (Fig 2A). This difference is strictly specific to HIV antigens since both groups reacted to Influenza antigens (63% and 75% reacting EC and cART-patients, respectively) (Fig 2B). Thereafter, although EC and cART patients have an undetectable viral load, only EC maintain HIV-specific memory B cell responses.

HIV-specific memory B cell responses are mainly of the IgG1 isotype

We next analyzed the specificity and isotype of HIV-specific secreted Abs in EC (Fig 3). Generally, patients with detectable antibody responses to gp140 also reacted against gp41 and gp160 (Fig 3A). In EC, IgG+ ASC specific for gp140, gp41 and gp160 represented respectively 0.24, 0.20 and 0,13 mean % of IgG+ B cells (Fig 3A). The frequency of IgG+ Influenza-specific ASC in EC was similar to the frequency of HIV Env-specific ASC (Fig 3A) and in the same order of magnitude than described in literature [36]. Note that, comparing EC, cART and HIV-negative donors, we did not evidence a significant difference in the frequency of Influenza-specific ASC (Supplemental Fig 5).

HIV Env- and Flu-specific B cell responses in EC were mainly mediated by IgG1 Abs, which represented nearly 50% of responses (Fig 3B). In addition, all patients reacting to HIV Env antigens exhibited an HIV-specific IgG1 response. In contrast, only 35% and 26% of EC showed gp140-specific IgG2+ or IgG3+ B cell responses, respectively (Fig 3C-D). Note that IgG2+ and IgG3+ responses were not necessarily detected in the same patients (Fig 3C-D).

Finally, whatever the targeted antigens, the proportion of HLA-B*57- or HLA-B*57+ EC presenting IgG, IgG1 and IgG2 memory B cell responses (Fig 4A-C) and the magnitude B cells (Fig 3A-C) were similar. However, there is a tendency towards a higher proportion of HLA-B*57+ EC presenting IgG3+ HIV Env-specific responses as compared to HLA-B*57- EC (17.6% vs 8.8% for gp140; 14.7% vs 11.8% for gp41; 7.7% vs 3.8% for gp160, for HLA-B*57+ and HLA-B*57- EC, respectively) (Fig 3D and 4D).

HIV-specific memory B cell responses are lost in VC following cART initiation.

The absence of HIV Env-specific B cell responses in cART patients might be due to complete suppression of viral replication under cART. To assess this issue, we explored HIV-specific memory B cell responses in a group of viremic controllers (VC) before and after cART initiation (Fig 5). Two of the 3 VC (patients VC39 and VC41), tested before initiation of cART, showed gp140-specific B cell responses (Fig 5A). Remarkably, upon treatment VC41 lost HIV-specific Ab responses (Fig 5A) while VC39 reduced the frequency of responding B cells, most likely due to the residual viral replication observed in this patient (Fig 5A and Table-1). B cell responses to Influenza antigens were maintained after ART initiation (Fig 5B). These observations suggest that the presence of the virus is required to maintain circulating HIV-specific memory B cell responses in HIV infected individuals including EC.

In HLA-B*57+ EC, the frequency of HIV-specific B cells correlates with the neutralization of Tier-2 T/F virus

We then asked whether HIV-specific B cell memory responses might be associated with the capacity of EC to neutralize HIV infection. To this end, we tested the ability of the serum from EC in neutralizing two lab strains (Tier-1) and 8 neutralization resistant transmitted/founder (T/F) HIV strains (7 Tier-2 and one Tier-3 strains) (Fig 6). 59% of EC neutralized at least one HIV strain tested. Among them, with 27% of EC neutralizing at least 40% of HIV strains (Fig 6B). Remarkably, 44% of EC blocked infection of at least one resistant Tier-2 T/F virus and 27% of EC blocked at least 40 % of Tier-2 T/F virus tested (Fig 6B). Tier-2 neutralization represents an effective anti-HIV humoral response [34]. To further analyze the nAb responses, we calculated breadth scores that account for the sensitivities of each HIV strain (Fig 6A). This reported breadth score represents the number of viruses that a given serum sample neutralized at an IC50 that is higher than the median IC50 for that virus across all samples [37]. The average neutralization score for all strains and Tier-2 T/F virus were not significantly different comparing HLA-B*57+ and HLA-B*57- EC (Fig 6A). However, in HLA-B*57+ EC, the frequency of HIV-specific B cells, evaluated in Elispot, correlated with the capacity to neutralize a wider range of Tier-2 T/F HIV strains (Fig 7). These results suggest that a fraction of EC exhibit an effective anti-HIV humoral response and that it might contribute to HIV control. In addition, the maintenance HIV-specific B cells, in particular in HLA-B*57+ EC, results in stronger neutralizing capacities.

DISCUSSION

In this study, we show that, in contrast to treated patients, EC naturally preserve their memory B cell compartments and maintain HIV-specific memory B cell responses. HIV-specific B cells largely express IgG1+ Ab isotype however, some EC also secrete anti-HIV IgG2 and IgG3 Abs. In addition, sera from a large fraction of EC exhibit an effective anti-HIV humoral response. The maintenance HIV-specific B cells, in particular in HLA-B*57+ EC, results in broader neutralizing capacities. Overall, these results strongly suggest that, in EC, memory B cell responses contribute to the natural control of HIV infection.

We first analyzed ex vivo B cell compartments in EC, cART and HIV-negative donors. RM B cell fractions were slightly increased in EC as compared to cART patients. As RM B cells are mostly implicated in maintenance of humoral responses [25], this might be linked to the maintenance of HIV-specific memory B cell responses observed in the majority of EC. Indeed, Buckner et al. recently showed that HIV Env-specific B cells are mainly contained in RM B cells [29].

The proportion of TLM B cells were comparable in cART and HIV-negative donors, probably reflecting that cART allows a restoration of TLM in treated patients [2, 28]. We noticed a clear increase of TLM B cell proportion in HLA-B*57- as compared to HLA-B*57+ EC. This might reflect a better preservation of the immune system, in HLA-B*57+ EC, thanks to their potent anti-HIV CTL responses [11]. Alternatively, this expansion of TLM B cells might be linked to a higher residual replication in HLA-B*57- EC than in HLA-B*57+ individuals. However, the DNA viral loads between the two groups are not significantly different (Table 1). In addition DNA viral loads do not correlate with TLM proportions (not shown). Interestingly, TLM B cells exhibit lower proliferative capacities compared to other memory B cell populations when cultured with different stimuli [2]. In HLA-B*57- EC, we did not observe a significant impact of increase TLM B cell fraction on the proportion of responders and on the frequency of HIV-specific memory B cell responses, as compared to HLA-B*57+ EC. In addition, both group of EC exhibited similar B cell responses against Influenza.

Remarkably, HIV Env-specific memory B cell responses were detected in the majority of EC tested (28/34) but in only 1 out 13 cART patients. Note that we obtained very similar results using HIV-Gagp24 as immunogens (**not shown***). In contrast, a similar proportion of EC, cART and HIV-negative donors reacted to Influenza vaccine antigens. Our results are consistent with Bussmann et al, that studied HIV-specific B cells responses during disease progression [38]. The expression of the protective HLA-B*57 allele did impact the proportion of

***Figure disponible en annexe 2 du manuscrit de thèse**

patients reacting to HIV Env or the frequency of HIV-specific B cell responses. Antiviral memory B cell responses were mainly mediated by IgG1 Abs while only few EC presented IgG2+ or IgG3+ responses. The frequency of HIV Env-specific memory B cells secreting IgG2 or IgG3 did not correlate with a higher proportion of total memory B cells secreting IgG2 or IgG3 (not shown). In the future, it will be of importance to characterize the antiviral functions of IgG2 and IgG3 Abs secreted by EC. Indeed a recent study revealed a major contribution of IgG3 in the polyfunctional activity of Abs probably linked with HIV-control in EC [22], and anti-HIV IgG2 production has been previously associated with HIV-control and slow progression in viremic controllers [31, 33].

The absence of HIV Env-specific B cell responses in cART patients might be due to the suppression of viral replication. To answer this question, we explored HIV-specific memory B cell responses in a group of HIV controllers (VC) that do not progress to disease and maintain high CD4 counts despite a high viremia. Indeed, 2 out of 3 VC exhibited HIV-specific responses prior ART initiation and in contrast these responses were diminished after ART initiation. Buckner et al. also recently addressed this issue studying HIV-specific responses in six EC prior and after initiation of cART. Remarkably, in EC under cART, HIV-specific memory B cell responses dropped as well as their DNA viral loads [29]. Thereafter, in EC, a very low undetectable viremia, is probably sufficient to maintain a pool of memory B cells directed against HIV, which might be linked with HIV controller status. Indeed, several studies evidence the persistence of a residual viral replication in EC [39, 40].

We demonstrate that at least in HLA-B*57+ EC, the maintenance HIV-specific B cells results in stronger neutralizing capacities. We tested the ability of EC's sera in neutralizing Tier-2 resistant transmitted/founder (T/F) HIV strains. As Doria-Rose et al that analyzed the neutralization potential of various HIV groups [41], we observed that a quarter of EC exhibit a very potent anti-HIV humoral response. In our study, 27% of EC neutralized at least 40 % of Tier-2 T/F virus tested. In HLA-B*57+ EC, there is an apparent association between the frequency of HIV-specific B cells, evaluated in Elispot, and the capacity to neutralize a broad range of Tier-2 T/F HIV strains. It is interesting to note that in our study and another [42], this association is lost when considering the global EC population. The status of HLA-B*57+ EC confers additional benefit that are not limited to CTL responses. HIV-control in HLA-B*57+ EC is probably the result of a balance between viral replication and immune responses including HIV-specific memory B cell responses.

Ab functions are not limited to neutralization. In fact, the capacity to mediate multiple functions such as ADCC and recruitment of immune cells, has been associated with HIV

control [22]. Our work further highlights that a fraction of EC exhibit effective anti-HIV humoral responses that contribute in reducing viral replication to low undetectable levels. EC, despite their undetectable viremia, maintain HIV-specific memory B cell responses that are associated with effective humoral responses, in some EC. We are proposing that increasing HIV-specific B cell responses by vaccination in cART patients might help in reducing drug regimens.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Camille Lécuroux and Francoise Churaqui for help and assistance. We thank all participants of the ANRS CODEX cohort.

REFERENCES

1. HC L, H M, LC E, G W, AH R, AS. F. Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. The New England Journal Of Medicine 1983; 309:453-8.
2. Moir S, Ho J, Malaspina A, Wang W, DiPoto AC, O'Shea MA, et al. Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. The Journal of experimental medicine 2008; 205:1797-805.
3. Hu Z, Luo Z, Wan Z, Wu H, Li W, Zhang T, et al. HIV-associated memory B cell perturbations. Vaccine 2015; 33:2524-9.
4. Buckner CM, Moir S, Ho J, Wang W, Posada JG, Kardava L, et al. Characterization of plasmablasts in the blood of HIV-infected viremic individuals: evidence for nonspecific immune activation. Journal of virology 2013; 87:5800-11.
5. Tomaras GD, Yates NL, Liu P, Qin L, Fouda GG, Chavez LL, et al. Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. Journal of virology 2008; 82:12449-63.
6. Moog C, Fleury HJA, Pellegrin I, Kirn A, Aubertin AM. Autologous and heterologous neutralizing antibody responses following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. Journal of Virology 1997; 71:3734-41.
7. Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. Nature 2003; 422:307-12.
8. Gray ES, Madiga MC, Hermanus T, Moore PL, Wibmer CK, Tumba NL, et al. The neutralization breadth of HIV-1 develops incrementally over four years and is associated with CD4+ T cell decline and high viral load during acute infection. Journal of virology 2011; 85:4828-40.
9. Scheid JF, Mouquet H, Feldhahn N, Seaman MS, Velinzon K, Pietzsch J, et al. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. Nature 2009; 458:636-40.
10. Kwong PD, Mascola JR. Human antibodies that neutralize HIV-1: identification, structures, and B cell ontogenies. Immunity 2012; 37:412-25.
11. Saez-Cirion A, Pancino G. HIV controllers: a genetically determined or inducible phenotype? Immunol Rev 2013; 254:281-94.
12. Lambotte O, Delfraissy J-F. HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1 infected patients with a spontaneous control of viral replication. Clinical Infectious Diseases 2005; 41:1053-6.
13. Grabar S, Selinger-Leneman H, Abgrall S, Pialoux G, Weiss L, Costagliola D. Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV. AIDS 2009; 23:1163-9.
14. Sáez-Cirión A, Lacabaratz C, Lambotte O, Versmisse P, Urrutia A, Boufassa F, et al. 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 2007; 104:6776-81.
15. Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. Blood 2006; 107:4781-9.
16. Hersperger AR, Migueles SA, Betts MR, Connors M. Qualitative features of the HIV-specific CD8+ T-cell response associated with immunologic control. Current opinion in HIV and AIDS 2011; 6:169-73.
17. Migueles SA, Sabbaghian MS, Shupert WL, Bettinotti MP, Marincola FM, Martino L, et al. HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97:2709-14.
18. Vingert B, Perez-Patrigeon S, Jeannin P, Lambotte O, Boufassa F, Lemaître F, et al. HIV controller CD4+ T cells respond to minimal amounts of Gag antigen due to high TCR avidity. PLoS Pathogens 2010; 6.
19. Lambotte O, Ferrari G, Moog C, Yates NL, Liao H-X, Parks RJ, et al. Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. AIDS (London, England) 2009; 23:897-906.
20. Pereyra F, Addo MM, Kaufmann DE, Liu Y, Miura T, Rathod A, et al. Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. The Journal of infectious diseases 2008; 197:563-71.

21. Gray ES, Moore PL, Choge IA, Decker JM, Bibollet-Ruche F, Li H, et al. Neutralizing antibody responses in acute human immunodeficiency virus type 1 subtype C infection. Journal of virology 2007; 81:6187-96.
22. Ackerman ME, Mikhailova A, Brown EP, Dowell KG, Walker BD, Bailey-Kellogg C, et al. Polyfunctional HIV-Specific Antibody Responses Are Associated with Spontaneous HIV Control. PLOS Pathogens 2016; 12:e1005315.
23. Huang K-HG, Bonsall D, Katzourakis A, Thomson EC, Fidler SJ, Main J, et al. B-cell depletion reveals a role for antibodies in the control of chronic HIV-1 infection. Nature communications 2010; 1:102.
24. Good KL, Avery DT, Tangye SG. Resting Human Memory B Cells Are Intrinsically Programmed for Enhanced Survival and Responsiveness to Diverse Stimuli Compared to Naive B Cells. The Journal of Immunology 2009; 182:890-901.
25. Moir S, Fauci AS. Insights into B cells and HIV-specific B-cell responses in HIV-infected individuals. Immunological reviews 2013; 254:207-24.
26. Moir S, Buckner CM, Ho J, Wang W, Chen J, Waldner AJ, et al. B cells in early and chronic HIV infection : evidence for preservation of immune function associated with early initiation of antiretroviral therapy. Blood 2010; 116:5571-9.
27. Kardava L, Moir S, Shah N, Wang W, Wilson R, Buckner CM, et al. Abnormal B cell memory subsets dominate HIV-specific responses in infected individuals. The Journal of clinical investigation 2014; 124:3252-62.
28. Pensieroso S, Galli L, Nozza S, Ruffin N, Castagna A, Tambussi G, et al. B-cell subset alterations and correlated factors in HIV-1 infection. AIDS (London, England) 2013; 27:1209-17.
29. Buckner CM, Kardava L, Zhang X, Gittens K, Justement JS, Kovacs C, et al. Maintenance of HIV-Specific Memory B-Cell Responses in Elite Controllers Despite Low Viral Burden. Journal of Infectious Diseases 2016:jiw163.
30. Banerjee K, Klasse PJ, Sanders RW, Pereyra F, Michael E, Lu M, et al. IgG subclass profiles in infected HIV type 1 controllers and chronic progressors and in uninfected recipients of Env vaccines. AIDS research and human retroviruses 2010; 26:445-58.
31. Ngo-Giang-Huong N, Candotti D, Goubar a, Autran B, Maynart M, Sicard D, et al. HIV type 1-specific IgG2 antibodies: markers of helper T cell type 1 response and prognostic marker of long-term nonprogression. AIDS research and human retroviruses 2001; 17:1435-46.
32. French Ma, Center RJ, Wilson KM, Fleyfel I, Fernandez S, Schorcht A, et al. Isotype-switched immunoglobulin G antibodies to HIV Gag proteins may provide alternative or additional immune responses to 'protective' human leukocyte antigen-B alleles in HIV controllers. AIDS (London, England) 2013; 27:519-28.
33. Martinez V, Costagliola D, Bonduelle O, N'Go N, Schnuriger A, Théodorou I, et al. Combinaison of HIV-1- specific CD4 Th1 cell reponses and IgG2 antibodies is the best predictor for persistence of long-term non progression. J Infect Dis;. Journal of infectious disease 2005; 191:191:2053-63.
34. Seaman MS, Janes H, Hawkins N, Grandpre LE, Devoy C, Giri A, et al. Tiered categorization of a diverse panel of HIV-1 Env pseudoviruses for assessment of neutralizing antibodies. J Virol 2010; 84:1439-52.
35. Li M, Gao F, Mascola JR, Stamatatos L, Polonis VR, Koutsoukos M, et al. Human immunodeficiency virus type 1 env clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. J Virol 2005; 79:10108-25.
36. Pinna D, Corti D, Jarrossay D, Sallusto F, Lanzavecchia A. Clonal dissection of the human memory B-cell repertoire following infection and vaccination. European Journal of Immunology 2009; 39:1260-70.
37. Piantadosi A, Panteleeff D, Blish CA, Baeten JM, Jaoko W, McClelland RS, et al. Breadth of neutralizing antibody response to human immunodeficiency virus type 1 is affected by factors early in infection but does not influence disease progression. J Virol 2009; 83:10269-74.
38. Bussmann BM, Reiche S, Bieniek B, Krznaric I, Ackermann F, Jassoy C. Loss of HIV-specific memory B-cells as a potential mechanism for the dysfunction of the humoral immune response against HIV. Virology 2010; 397:7-13.
39. Hatano H, Delwart EL, Norris PJ, Lee T-H, Dunn-Williams J, Hunt PW, et al. Evidence for persistent low-level viremia in individuals who control human immunodeficiency virus in the absence of antiretroviral therapy. Journal of virology 2009; 83:329-35.
40. Pereyra F, Palmer S, Miura T, Block BL, Wiegand A, Rothchild AC, et al. Persistent low-level viremia in HIV-1 elite controllers and relationship to immunologic parameters. The Journal of infectious diseases 2009; 200:984-90.

41. Doria-Rose NA, Klein RM, Manion MM, O'Dell S, Phogat A, Chakrabarti B, et al. Frequency and phenotype of human immunodeficiency virus envelope-specific B cells from patients with broadly cross-neutralizing antibodies. J Virol 2009; 83:188-99.
42. Guan Y, Sajadi MM, Kamin-Lewis R, Fouts TR, Dimitrov A, Zhang Z, et al. Discordant memory B cell and circulating anti-Env antibody responses in HIV-1 infection. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106:3952-7.

Table 1: Clinical and epidemiological characteristics of the study groups.

		#	ID	Sex	Age	Infection (Years)	HLA-B(1)	HLA-B(2)	VL RNA (copies/mL)	Proviral DNA (copies/ 10^6 PBMC)	CD4 count (cells/mm3)	Nadir CD4 (cells/mm3)	cART	cART (years)	Treatment	Color code
EC Median (IQR)					49 (33-63)	17 (6-29)				15 (2-351)	826 (279-1400)					
	*B*57+ Median (IQR)*				50 (40-63)	20 (8-29)				9 (4-351)	851 (279-1400)					
Elite Controllers (EC)	HLA-B*57+	1	15003	F	41	11	18	57	43	4	702	-	NO	-	-	
		2	18006	M	48	8	53	57	< 40	351	801	-	NO	-	-	
		3	19001	F	56	18	44	57	< 10	4	1400	-	NO	-	-	
		4	19007	F	63	10	52	57	< 10	15	630	-	NO	-	-	
		5	23001	F	57	17	57	NA	20	7	999	-	NO	-	-	
		6	23002	F	55	26	18	57	< 20	4	770	-	NO	-	-	
		7	30006	M	51	26	51	57	42	24	824	-	NO	-	-	
		8	34010	F	44	25	57	70(71)	240	33	826	-	NO	-	-	
		9	44001	M	50	26	44	57	< 20	NA	1201	-	NO	-	-	
		10	34011	NA	NA	NA	42	57	98	10	840	-	NO	-	-	
		11	48004	M	63	27	7	57	60	213	1022	-	NO	-	-	
		12	51001	F	49	29	8	57	< 40	4	512	-	NO	-	-	
		13	57002	M	51	24	7	57	47	4	1020	-	NO	-	-	
		14	62002	F	43	10	53	57	166	27	862	-	NO	-	-	
		15	73004	M	44	9	27	57	23	4	979	-	NO	-	-	
		16	73009	F	40	20	57	NA	< 20	16	880	-	NO	-	-	
		17	34015	M	62	27	7	57	< 40	NA	1074	-	NO	-	-	
		18	44002	F	48	19	14(65)	57	< 20	4	279	-	NO	-	-	
		19	34003				5703	15(63)				-	NO	-	-	
	*B*57- Median (IQR)*				48 (33-59)	13 (6-27)				23 (2-159)	723 (432-1311)					
	HLA-B*57-	20	18002	F	34	13	40(60)	15(62)	< 40	3	1078	-	NO	-	-	
		21	18009	F	53	6	35	52	< 40	4	694	-	NO	-	-	
		22	19006	F	40	6	18	NA	< 10	83	1130	-	NO	-	-	
		23	23004	F	37	12	8	76	168	159	529	-	NO	-	-	
		24	45005	F	36	6	72		153	10	432	-	NO	-	-	
		25	56004	F	48	24	27/81	71	61	46	823	-	NO	-	-	
		26	56009	M	40	23	27	45	< 40	13	585	-	NO	-	-	
		27	57001	F	57	26	27	51	< 40	43	1060	-	NO	-	-	
		28	62003	F	49	8	44	NA	< 20	126	853	-	NO	-	-	
		29	62004	M	59	11	40(60)	15(62)	71	26	519	-	NO	-	-	
		30	62007	F	50	13	44	45	50	19	723	-	NO	-	-	
		31	62009	M	50	21	39	41	103	109	504	-	NO	-	-	
		32	62013	F	50	26	51	41	< 20	4	1311	-	NO	-	-	
		33	73003	F	37	14	44	82	62	3	500	-	NO	-	-	
		34	73010	M	33	7	49	50	413	42	600	-	NO	-	-	
		35	114006	M	38	7	18	44	90	127	1122	-	NO	-	-	
		36	143001	M	52	10	35	40(60)	< 50	2	1234	-	NO	-	-	
		37	171002	M	50	16	13	14	32	3	1085	-	NO	-	-	
		38	63005	M	48	27	27	51	< 20	23	561	-	NO	-	-	
Viremic controllers (VC)		39	04.008	M	51	10	35	35	1000000	2006	320	-	NO	-	-	
					58	17			212000	NA	NA	-	YES	3	AZT+3TC+EFV	
		40	04.062	M	37	9	14	41	340 000	1937	471	-	NO	-	-	
					42	16			310	75	752	-	YES	4	D4T+DDI+Indinavir	
		41	09.004	F	54	10	44	38	6 600	385	591	-	NO	-	-	
					62	18			<40	47	749	-	YES	6	AZT+3TC+Indinavir	
cART Median (IQR)					50 (31-66)	16 (2-30)					570 (288-787)	219 (24-592)		12 (1-17)		
Aviremic treated HIV-infected patients (cART)		42	-	M	66	25	NA	NA	undetect.	NA	561	50	YES	15	Isentress+Norvir+Prezista	
		43	-	F	58	27	NA	NA	undetect.	NA	448	24	YES	17	Kivexa+Viramune	
		44	-	F	31	2	NA	NA	undetect.	NA	570	369	YES	2	Kivexa+Norvir+Reyataz	
		45	-	M	54	17	NA	NA	undetect.	NA	787	251	YES	16	Invitress+Kaletra	
		46	-	M	50	16	NA	NA	undetect.	NA	572	222	YES	16	Isentress+Truvada	
		47	-	M	58	9	NA	NA	undetect.	NA	580	342	YES	1	Isentress+Kivexa	
		48	-	M	42	30	NA	NA	undetect.	NA	415	173	YES	9	Isentress+Truvada	
		49	-	F	35	4	NA	NA	undetect.	NA	288	149	YES	4	Atripla	
		50	-	M	49	21	NA	NA	undetect.	NA	609	219	YES	12	Kivexa+Viramune	
		51	-	M	51	14	NA	NA	undetect.	NA	330	193	YES	13	Atripla	
		52	-	M	57	27	NA	NA	undetect.	1740	335	172	YES	17	Kivexa+Viramune	
		53	-	F	42	13	NA	NA	undetect.	NA	587	537	YES	5	Atripla	
		54	-	M	46	10	7	56	undetect.	290	765	592	YES	10	Truvada+Reyataz	

[a] NA, data not available; M, male; F, female; VL, viral load; (-) not applicable.

Figure 1

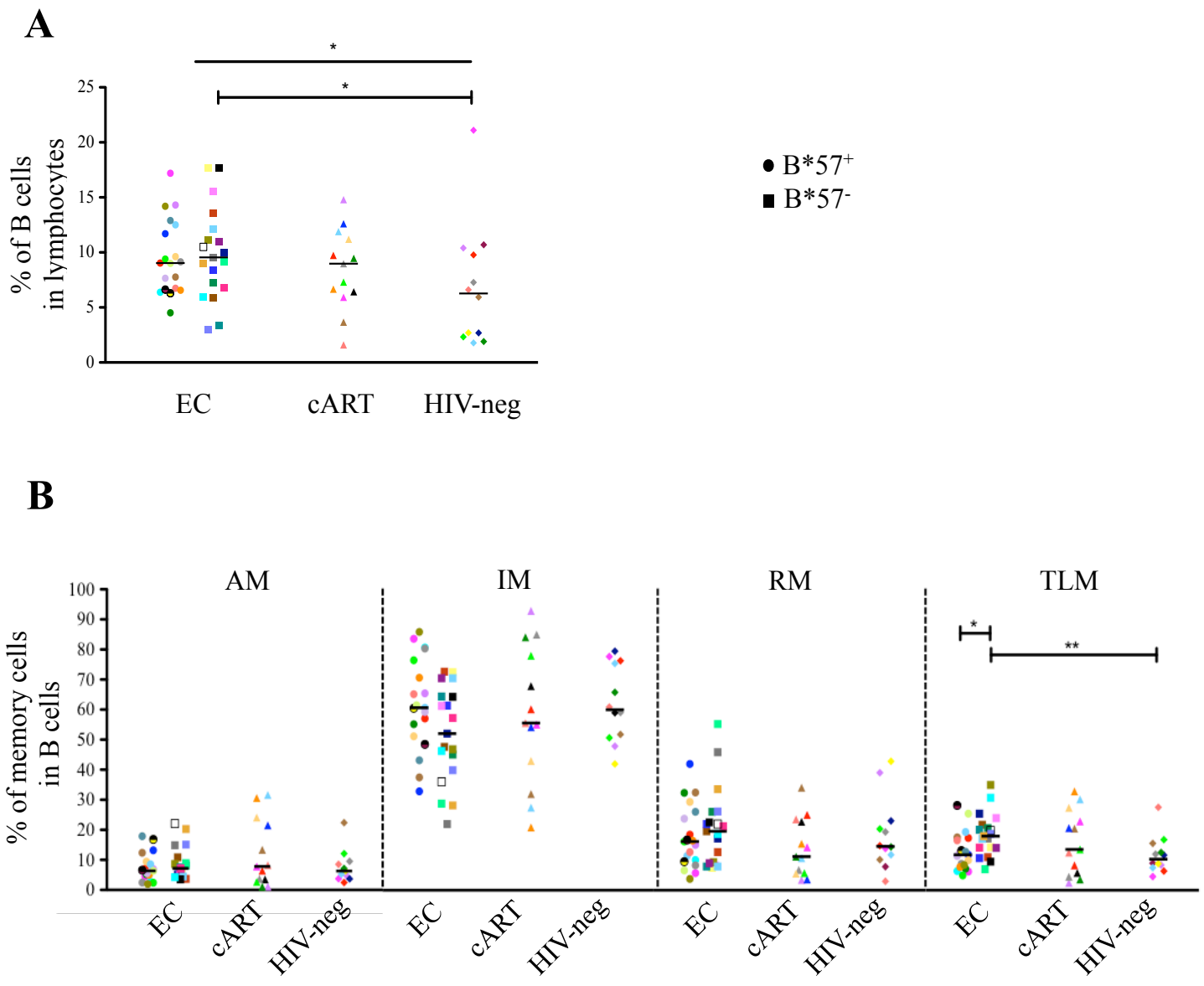


Figure 1: Memory B cell compartments are preserved in EC.
In EC (n=38), cART (n=13) and HIV-negative donors (n=12): **(A)** frequency of CD19+ B cells among lymphocytes and **(B)** frequencies of AM (CD27+CD21-), RM (CD27+CD21+), IM (CD27-CD21+) and TLM (CD27-CD21-) B cells among CD19+ B cells. Each individual is represented by a specific dot on each graph (shape and color). Circle: HLA-B*57+ EC; Square: HLA-B*57- EC. *p<0.05, **p<0.005. Bars represent median.

Figure 2

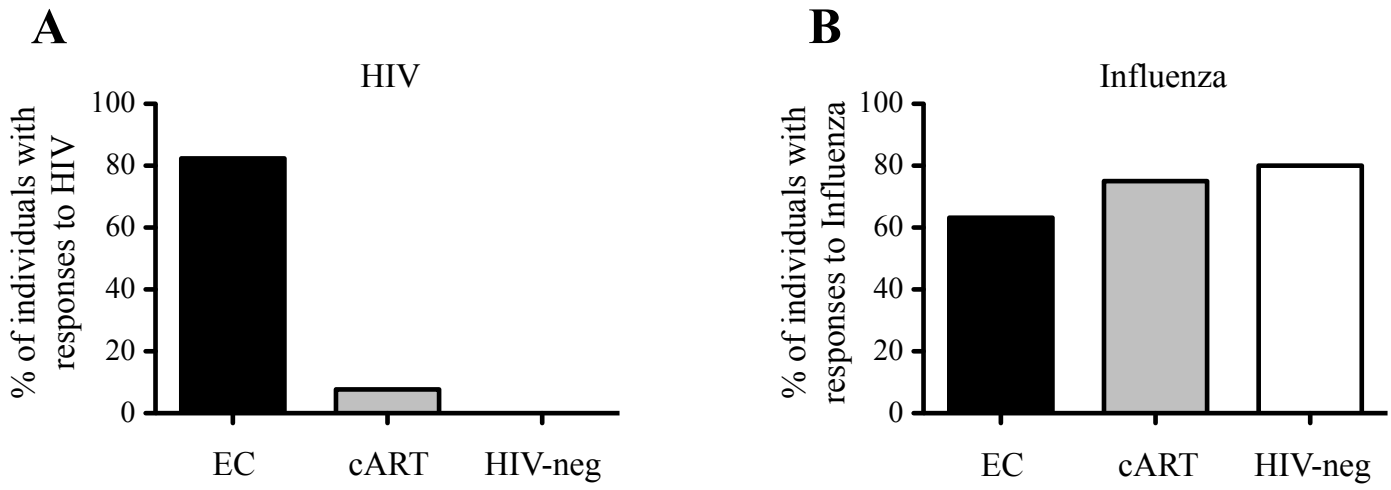


Figure 2: EC maintain HIV-specific memory B cell responses.
Percentage of EC (n=34), cART (n=13) and HIV-negative (n=6) donors presenting memory B cell responses against **(A)** HIV antigens ($gp140_{Yu2b}$, $gp41_{S30}$ or $gp160_{THO}$) and **(B)** Influenza vaccine antigens (2015 VAXIGRIP vaccine).

Figure 3

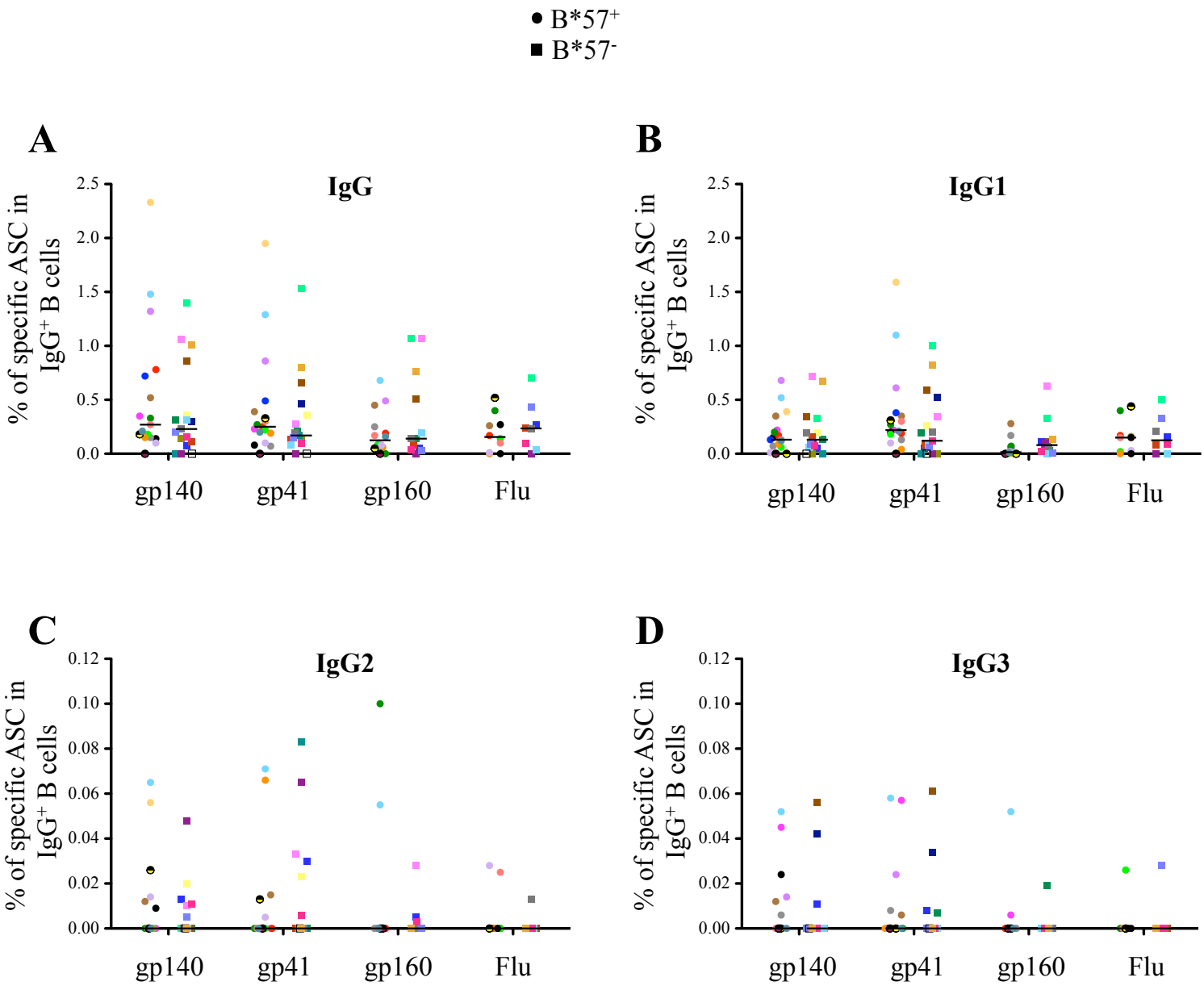


Figure 3: HIV-specific memory B cell responses are mainly of the IgG1 isotype. Percentage of antibody secreting cells (ASC) specific for HIV-Env antigens (gp140Yu2b, gp41S30 or gp160THO) and Influenza vaccine antigen (Flu, 2015 VAXIGRIP vaccine) presented according to the Ab isotype: **(A)** total IgG+, (B) IgG1+, (C) IgG2+ and (D) IgG3+ antigen-specific ASC. Each individual is represented by a specific dot on each graph (shape and color). Bars represent median.

Figure 4

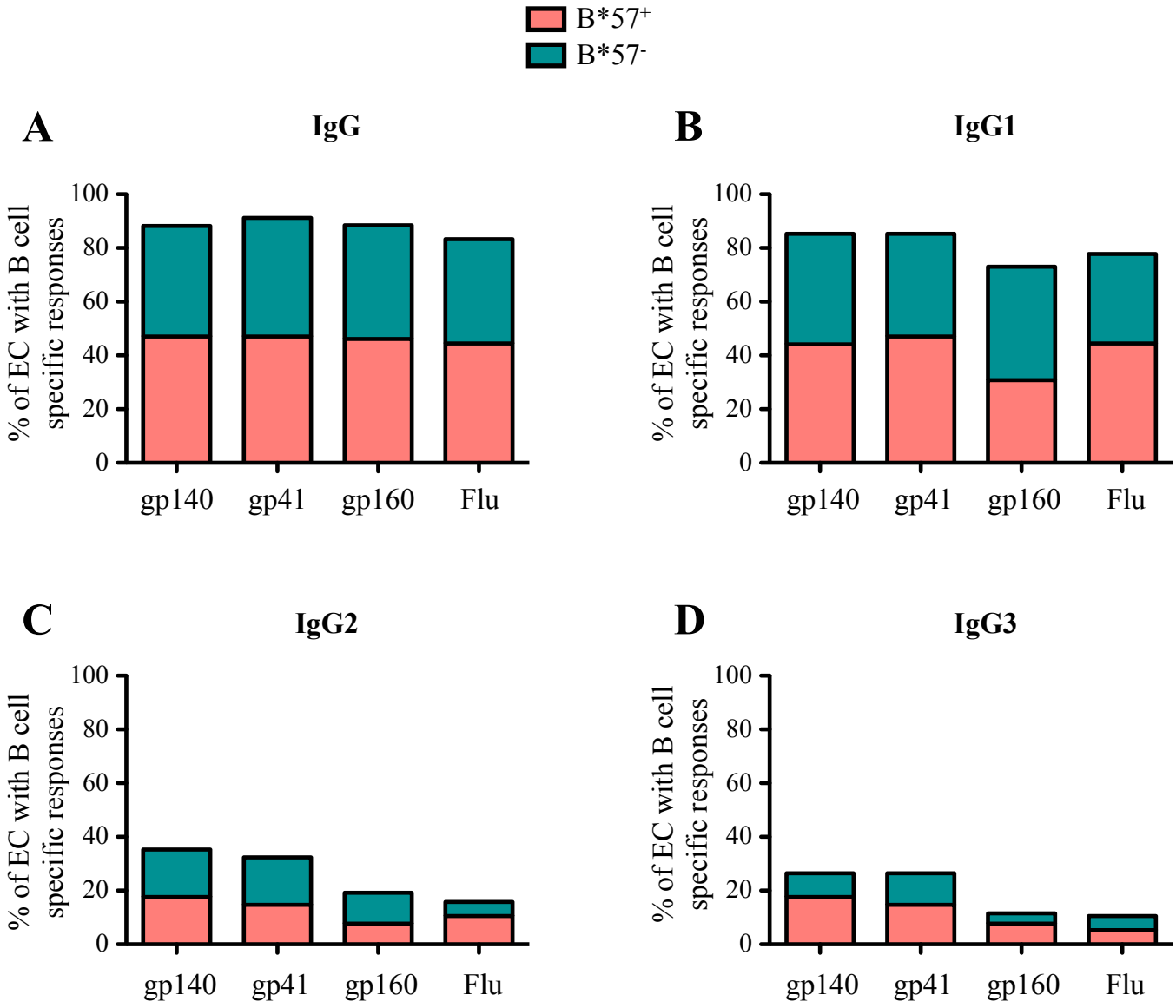


Figure 4: Proportion of HLA-B57+ and HLA-B57- EC responding to viral antigens.
HLA-B57+ EC (n=17) are represented in green and HLA-B*57- (n=17) in orange. Proportions of patient presenting **(A)** IgG+, **(B)** IgG1+, **(C)** IgG2+ and **(D)** IgG3+ B cell responses against HIV-Env antigens (gp140Yu2b, gp41S30 or gp160THO) and Influenza vaccine antigens (Flu, VAXIGRIP vaccine).

Figure 5

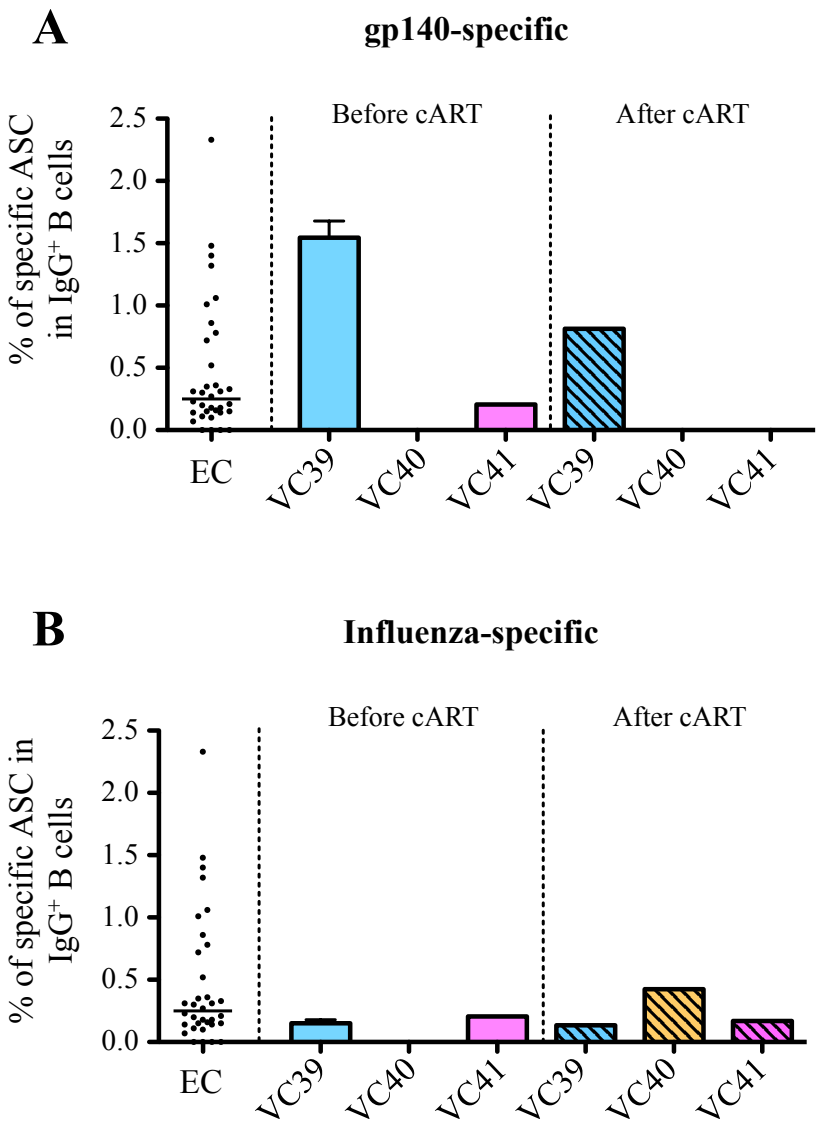


Figure 5: **HIV-specific memory B cell responses are lost in VC following cART initiation.** Frequency of IgG+ ASC specific for **(A)** gp140Yu2b and **(B)** Influenza (2015 VAXIGRIP vaccine) in EC (left panel) and VC prior (central panel) or after initiation (right panel) of cART. ND, non determined.

Figure 6

A

		Tier 1		Tier 2							Tier 3				
	ID	SF162	BaL	QHO	CH058	CH077	CH106	RHPA	REJO	THRO	TRJO	Neutralized strains (/10)	Breadth score (/10)	Average	Breadth score Tier 2 (/7)	Average
HLA-B*57+	1	300										1	0		0	
	2	1000										1	1		0	
	3				1	1	1	1				0	0		0	
	4	500	1		1	1						1	0		0	
	5	1000	30	30	1	1		40				4	3		1	
	6	1000	90									2	1		0	
	7	1000	200		1	40	1	80	20			5	4		3	
	8	1000	150			90	1	1	80			4	4		2	
	9	1000	200	80			1	20				4	4		2	
	10	400	200	100								3	3	2	1	1
	11	1000	200	200	1	1	20	150	40			6	6		4	
	12	80										1	0		2	
	13	1000	200	90				1	40			4	4		2	
	14	120										1	0		0	
	15											0	0		0	
	16	500										1	0		0	
	17	1000	750	150	1	1	1	20				4	4		2	
	18	1000	750			1						2	2		0	
HLA-B*57-	19	1										0	0		0	
	20	1										0	0		0	
	21	1										0	0		0	
	22	1000	450	30	1	1	1	1				3	2		0	
	23	400					1	1				1	0		0	
	24	1000	100	100	100	1	1	100				5	4		3	
	25	1000	170	30		20	1	70				5	5		2	
	26	1000	150	40			1	1				3	3		1	
	27	500	90	110	60	60		110				6	4		4	
	28	500	130	1								2	0	1.5	0	0.7
	29	400		30	1	1	1	20				3	1		1	
	30	500	30	30	1	1						3	0		0	
	31	1000	60									2	1		0	
	32	1000	30	30			1	1				3	1		0	
	33	1000	90	1			1	1				2	1		0	
	34	500	1	1								1	0		0	
	35	20					1					1	0		0	
	36	1000	90	90			1	1				3	2		1	
	37	1000	150	150		20			1			4	4		2	
	Median IC50	1000	140	40	1	1	1	11	40							

IC50 < 20
20 ≤ IC50 < 100
100 ≤ IC50 < 300
300 ≤ IC50 < 900
IC50 ≥ 1000

B

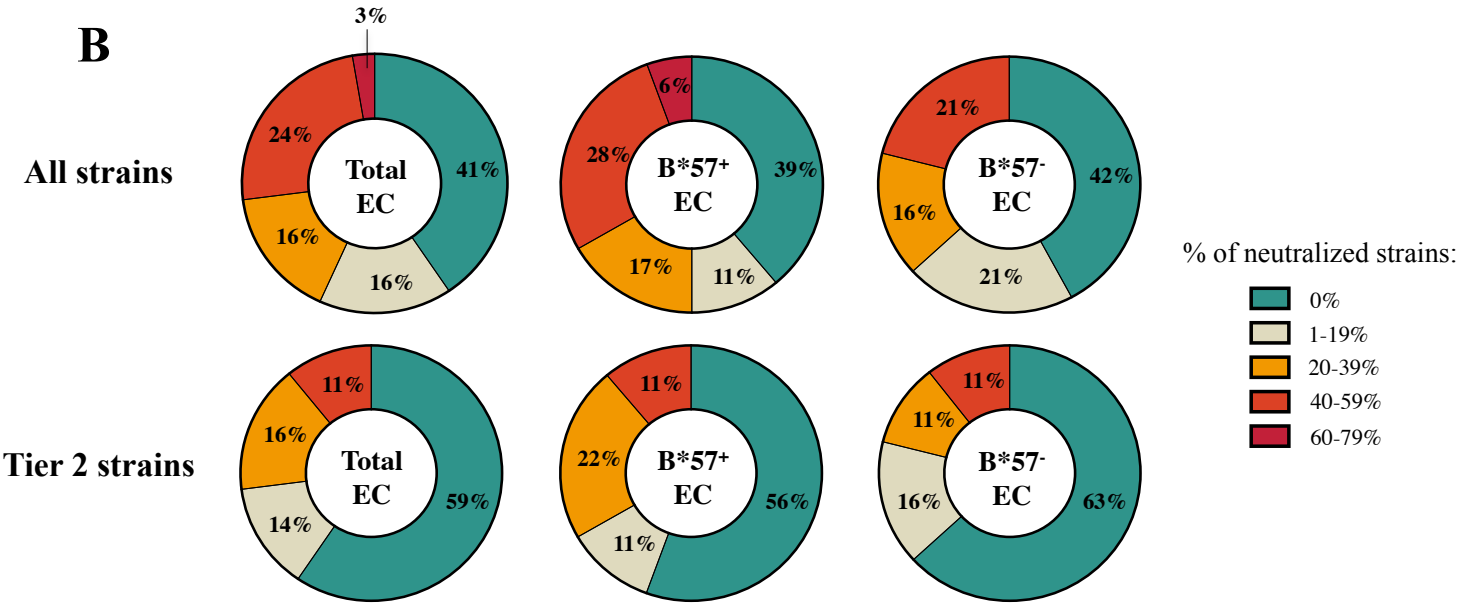


Figure 6: Capacity of EC to neutralize resistant Tier-2 T/F HIV strains in the TZM-bl assay.
Sera from EC (n=37) were tested against two lab and 8 neutralization resistant T/F HIV strains. **(A)** Neutralization data are shown as the serum dilution that neutralized 50% of the viruses (IC50) tested. Breadth scores that account for virus sensitivities were determined as described previously [37]. **(B)** Neutralization breadth expressed as percentage of neutralized strains. nb: % of patients for each fraction.

Figure 7

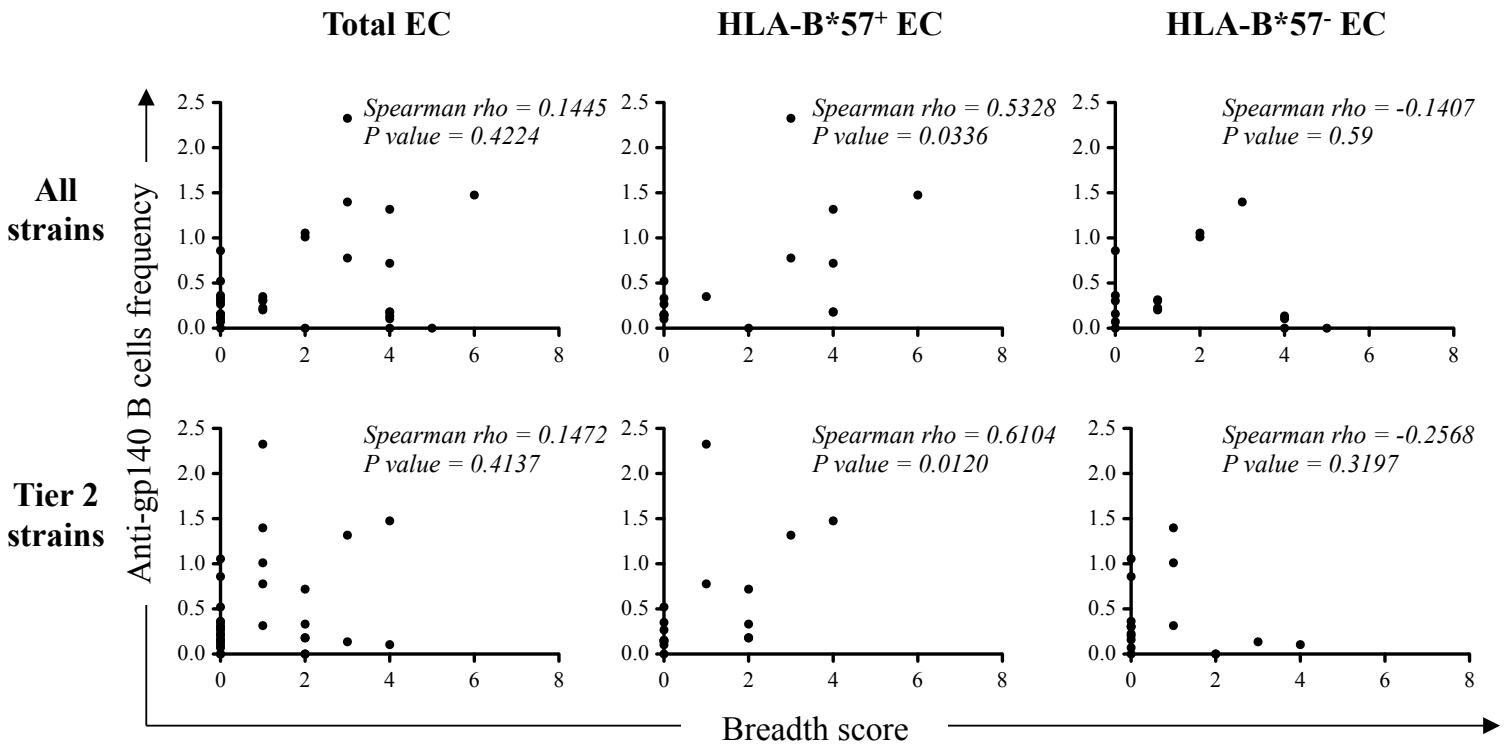
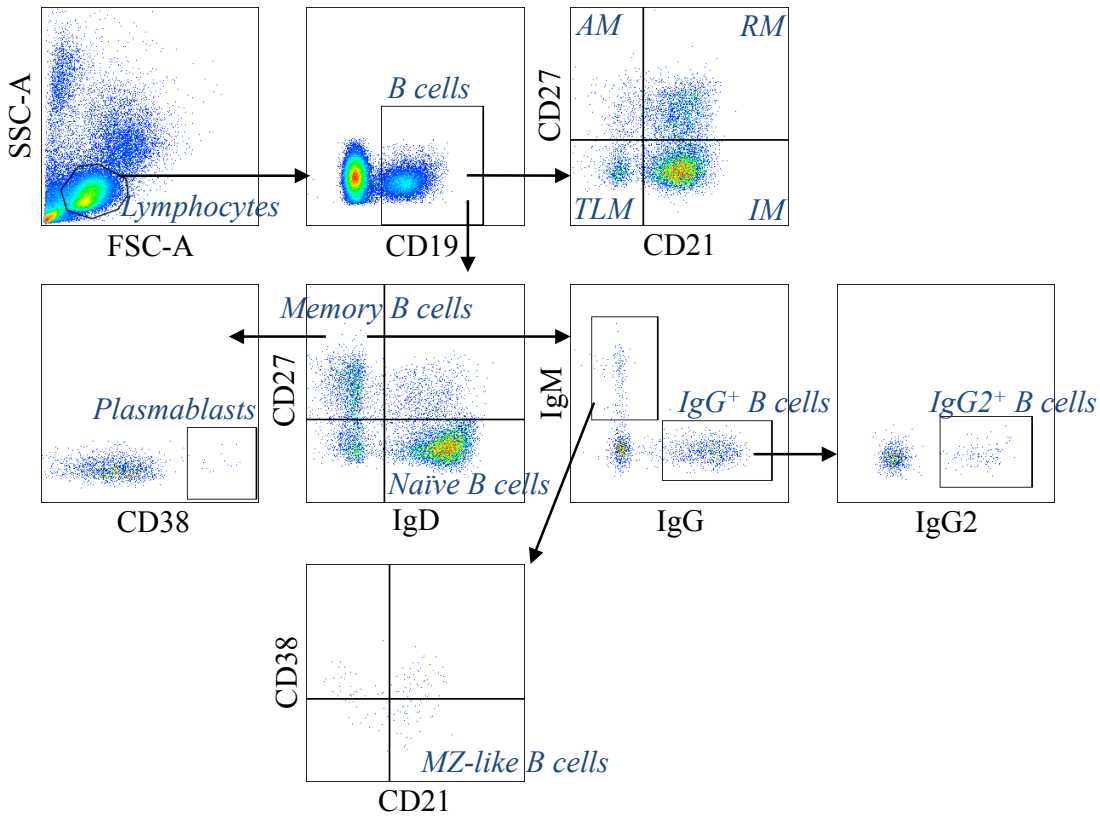


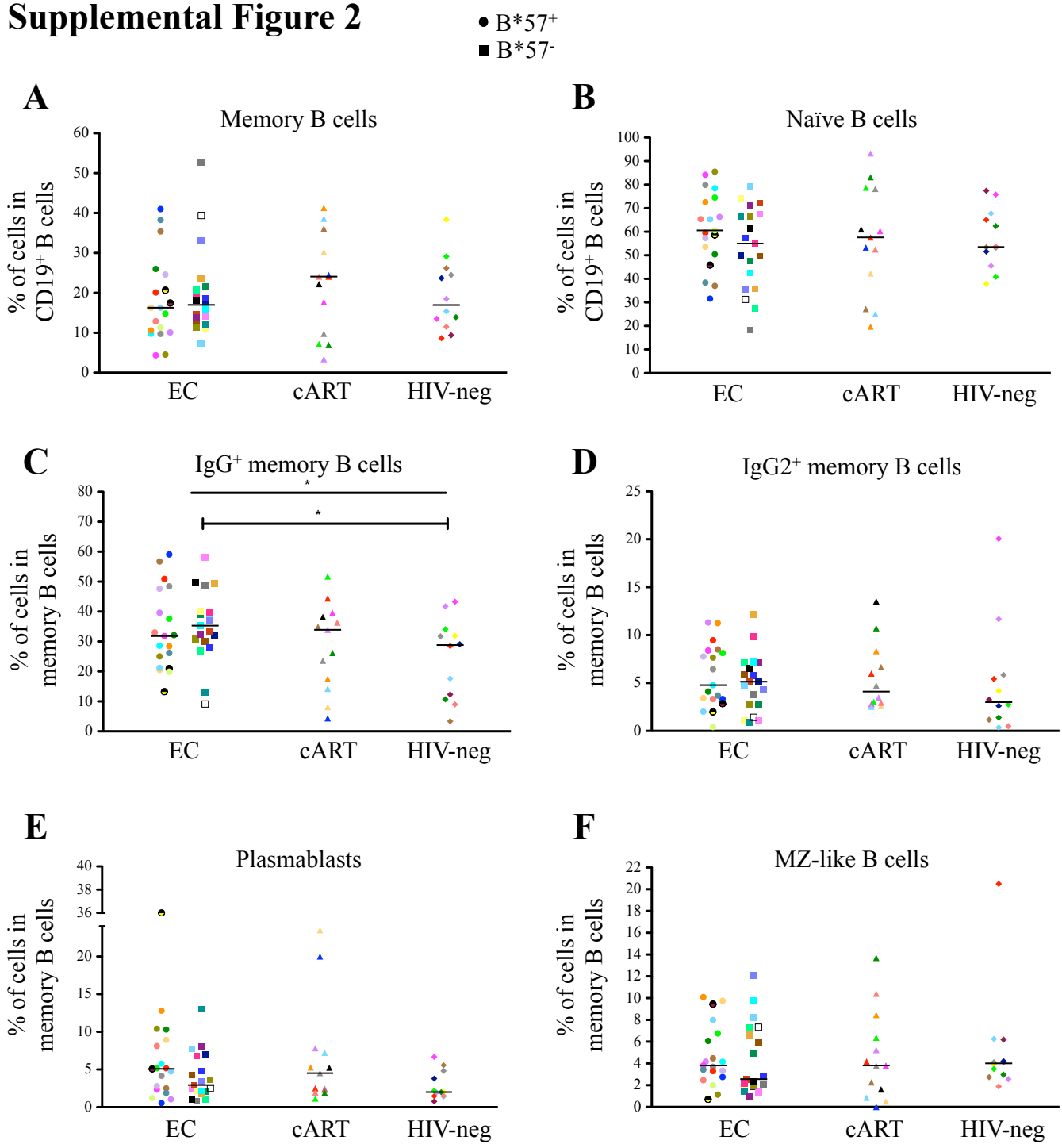
Figure 7: In HLA-B*57+ EC, the frequency of HIV-specific B cells correlates with the neutralization of Tier-2 T/F virus.
In EC groups (as indicated) association of HIV gp140-specific B cell frequency or and the neutralization breadth for all HIV strain tested (top panel) or only Tier-2 resistant T/F HIV strains. Statistic: Spearman correlation.

Supplemental Figure 1



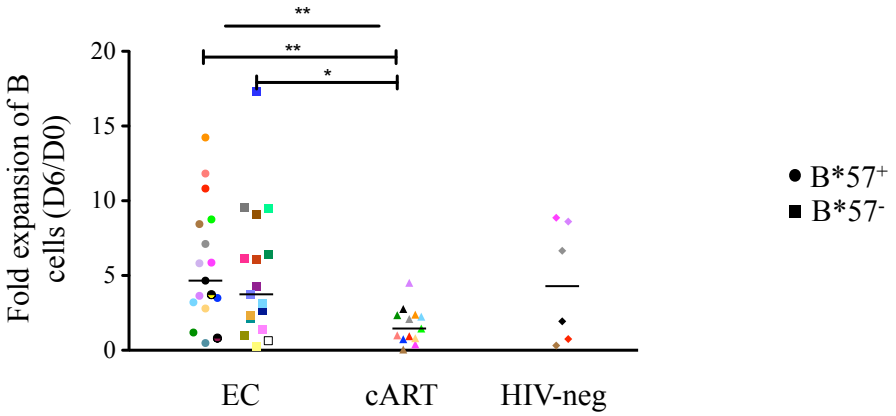
Supplemental Figure 1: Phenotypic analysis of circulating B cell populations using flow cytometry. B cells were identified using CD19, and further subdivided in naïve ($CD27^{-}IgD^{+}$), total memory B cells ($CD27^{+}$ IgD^{-}), activated memory (AM, $CD27^{+}CD21^{-}$), resting memory (RM, $CD27^{+}CD21^{+}$), intermediate memory (IM, $CD27^{-}CD21^{+}$), tissue-like memory (TLM, $CD27^{-}CD21^{-}$), plasmablasts ($CD27^{+}IgD^{-}CD38^{hig}$) and marginal zone-like B cells (MZ-B cells, $CD27^{+}IgD^{-}IgM^{+}CD38^{-}CD21^{+}$). IgG^{+} and $IgG2^{+}$ memory B cells were also identified.

Supplemental Figure 2



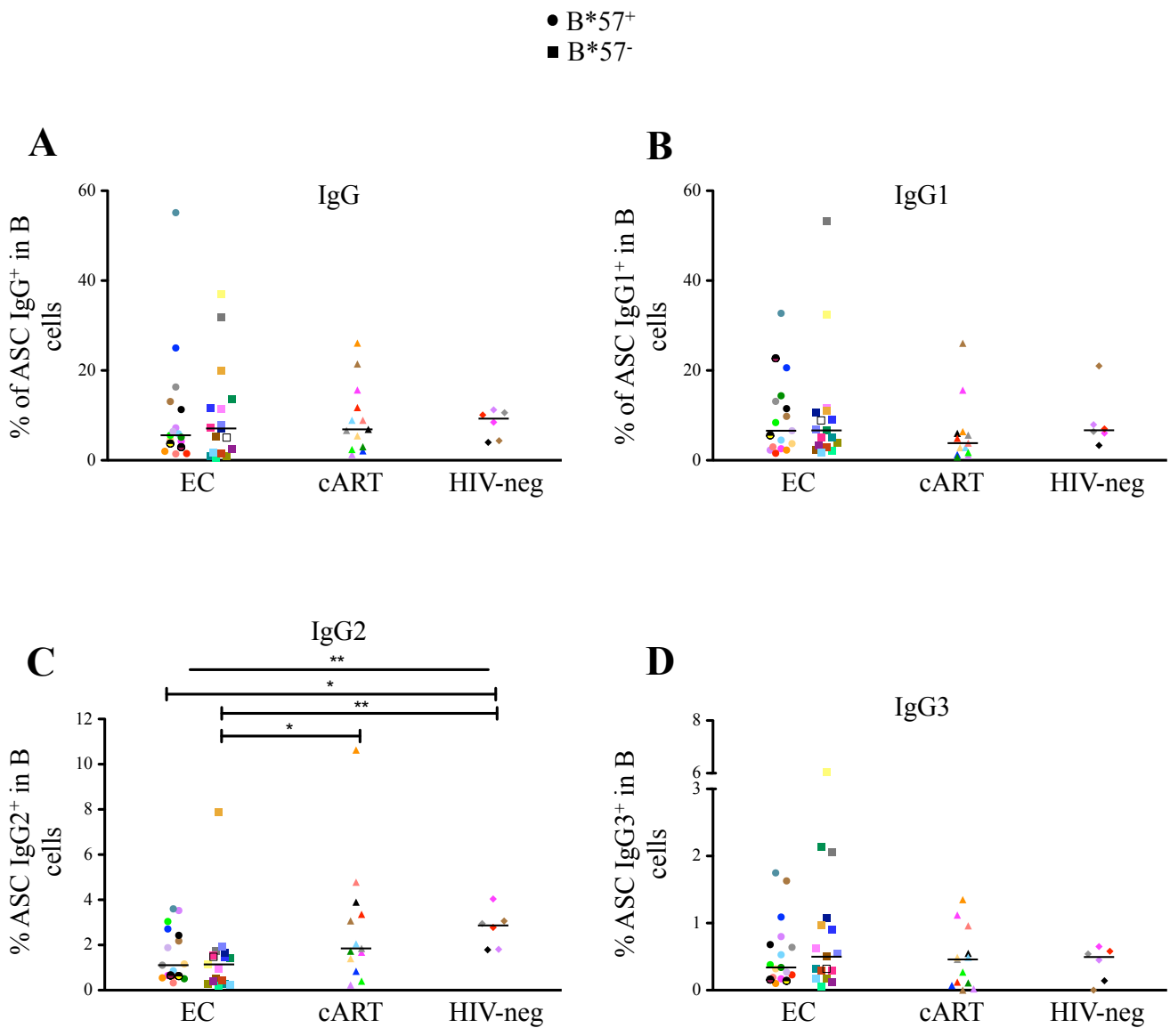
Supplemental Figure 2: Proportions of memory B cell populations in HIV$^+$ patients and HIV$^-$ donors. **(A)** Frequency of total memory B cells (CD27$^+$IgD$^-$) among CD19$^+$ B cells. **(B)** Frequency of naïve B cells (CD27$^-$IgD$^+$) among CD19$^+$ B cells. **(C)** Frequency of IgG$^+$ cells among memory B cells. **(D)** Frequency of IgG2$^+$ cells among memory B cells. **(E)** Frequency of CD38^{hi} plasmablasts among memory B cells. **(F)** Frequency of IgM$^+$CD38$^-$CD21$^+$ MZ-like B cells among memory B cells. Each individual is represented by a specific dot on each graph (shape and color). *p<0.05. Bars represent median; HIV-neg: HIV-negative donors.

Supplemental Figure 3



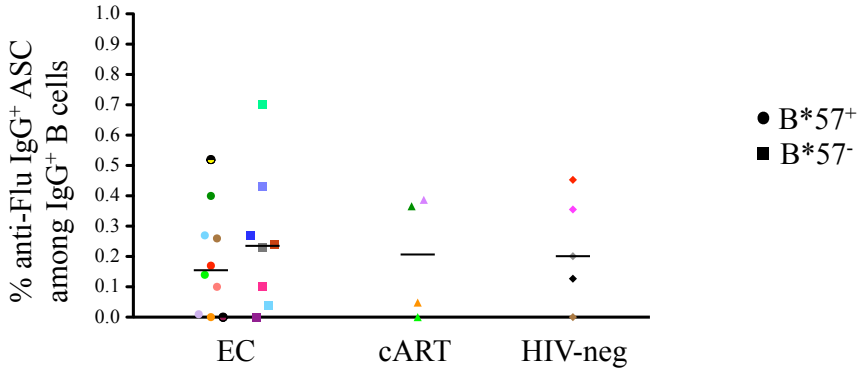
Supplemental Figure 3: B cells from EC expand more after *in vitro* stimulation. Expansion of B cells in (R848+IL-2)-activated PBMC cultures from EC, cART and HIV-negative donors presented as a fold change (B cell numbers at day 6 divided by B cells numbers at day 0). Each individual is represented by a specific dot on each graph (shape and color). Circle: HLA-B*57^{+} EC; Square: HLA-B*57^{-}EC. *p>0.05, **p>0,005. Bars represent median.

Supplemental Figure 4



Supplemental Figure 4: Distribution and frequency of ASC according to their Ab isotype in HIV$^+$ and HIV$^-$ donors. Frequencies of ASC secreting IgG (A), IgG1 (B), IgG2 (C) or IgG3 (D) among B cells in EC (circle: HLA-B*57$^+$ or square: HLA-B*57$^-$), cART and HIV-negative donors. Each individual is represented by a specific dot on each graph (shape and color). *p<0.05, **p<0.005. Bars represent median.

Supplemental Figure 5



Supplemental Figure 5: Memory B cell responses against Influenza vaccine antigens. Frequency of Flu-specific IgG^+ ASC in EC, cART and HIV-negative donors. Each individual isrepresented by a specific dot on each graph (shape and color). circle: HLA-$B*57^+$ EC; square: HLA-$B*57^-$ EC. Bars represent median.

CONCLUSIONS ET DISCUSSION

CONCLUSIONS ET DISCUSSION DE L'AXE 1

J'ai d'abord caractérisé les populations de Tfh et de LB dans des rates de patients VIH^+ et de donneurs VIH^-.

Dynamique des populations de Tfh dans la rate de patients infectés par le VIH

Les proportions de Tfh, CG-Tfh et Tfr sont augmentées dans les rates des patients chroniquement infectés par le VIH et non traités comparées à celles observées dans les rates de patients non infectés. Ces résultats concordent avec les observations faites dans les ganglions et les amygdales (Lindqvist et al., 2012; Perreau et al., 2013). Cette différence est bien due à l'infection par le VIH et non pas au syndrome auto-immun PTI puisque nous n'avons pas observé de différence concernant les proportions de Tfh entre les rates PTI^+ et PTI^-. Parallèlement, nous avons observé, tout comme dans les ganglions dans d'autres études, que les Tfh de la rate sont infectés par le VIH et présentent même une intégration d'ADN du VIH supérieure aux autres LT $CD4^+$ mémoires. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce paradoxe entre une proportion de Tfh plus élevée et leur infection préférentielle par le virus : (a) Les Tfh pourraient avoir une capacité de survie ou de prolifération plus importante ; (b) l'infection pourrait favoriser la différenciation des LT $CD4^+$ en Tfh ; (c) les mécanismes de régulation de l'interaction Tfh/LB pourraient être altérés ; (d) la balance d'expression de facteurs pro et anti-viraux dans les Tfh pourrait soutenir une forte intégration du virus et une faible réplication virale.

(a) Prolifération / Survie

Dans la rate, le marqueur de prolifération KI67 est sous exprimé par les Tfh de patients infectés par le VIH comparé aux donneurs sains. Une meilleure capacité de prolifération des Tfh lors de l'infection par le VIH ne semble donc pas être une hypothèse à retenir. En revanche, dans les ganglions, des lymphocytes $CXCR5^+$ infectés par le VIH expriment plus fortement le marqueur anti-apoptotique Bcl2 comparé aux mêmes cellules chez des donneurs sains (Haas et al., 2014). Associée à celle de Bcl6, une surexpression de Bcl2 par le Tfh leur confèrerait une meilleure survie. Cependant, la dynamique des Tfh dans les OLII

peut varier en fonction du stade de l'infection et des capacités du patient à contrôler l'infection (voir **Tableau 2** dans le chapitre « **État de l'art** »). Ainsi, une perte des CG-Tfh est observée chez des macaques au stade SIDA. Dans ce contexte, les CG-Tfh semblent particulièrement sensibles à l'apoptose, probablement en lien avec une expression accrue du ligand PD-L2 par les LB (Xu et al., 2015b).

(b) Différenciation vers un profil Tfh

L'augmentation des Tfh dans les OLII des patients VIH$^+$ pourrait s'expliquer par une différenciation des LT CD4$^+$ polarisée vers un profil Tfh. En effet, nos résultats montrent une forte expression des gènes codant pour CXCL13 et IL-21 dans les Tfh des rates VIH$^+$, suggérant un environnement propice à une différenciation soutenue en Tfh. La persistance du virus dans la rate pourrait être à l'origine de cette différenciation polarisée vers un profil Tfh. Chez la souris, lors d'une infection par le LCMV, la persistance du virus dans la rate redirige la différenciation des Th1 en Tfh (Fahey et al., 2011). Dans ce sens, plusieurs études démontrent une forte concentration de particules du VIH, associées aux cellules dendritiques folliculaires, dans la rate et les ganglions de patients infectés par le VIH (Cheynier et al., 1994; Embretson et al., 1993; Pantaleo et al., 1998). Plus récemment, une étude sur le macaque a montré que les CG étaient des sanctuaires inaccessibles aux LT CD8$^+$ anti-SIV cytotoxiques renforçant l'idée d'une forte concentration d'antigènes viraux dans ces zones (Fukazawa et al., 2015). Cependant, il faut noter l'identification récente d'une population de LT CD8$^+$ cytotoxiques CXCR5$^+$ (Tfc) présente dans les follicules des OLII (Leong et al., 2016) (voir paragraphe 1.4.5. de l'état de l'art). Dans cette étude, des Tfc ont été observés dans les ganglions de personnes infectées par le VIH. Cependant la réelle activité suppressive des Tfc dans ce contexte reste à démontrer. Nous pouvons supposer que, tout comme les Tfh, les Tfc pourraient avoir une fonctionnalité altérée lors de l'infection par le VIH. Dans ce cas, il pourrait s'agir d'un impact indirect de l'infection, les LT CD8$^+$ n'étant pas une cible du virus.

L'IL-6 est particulièrement impliquée dans la différenciation en Tfh via l'initiation de l'expression de Bcl-6 (Nurieva et al., 2010). Bien que l'IL-6 soit une cytokine présente en forte quantité dans le plasma des patients VIH$^+$, nous n'avons pas observé de sécrétion plus importante d'IL-6 par les splénocytes VIH$^+$ après stimulation. Une autre étude met d'ailleurs

en évidence que l'augmentation de l'IL-6 dans le plasma des patients VIH$^+$ n'est pas en lien direct avec la réplication du virus (Shive et al., 2012). De la même façon, ils n'observent pas de différence de sécrétion d'IL-6 dans des histocultures de ganglions VIH$^+$ comparés à des ganglions VIH$^-$ (Shive et al., 2012). En plus de l'analyse transcriptionnelle des Tfh et des CG-Tfh issus des rates VIH$^+$ et VIH$^-$, nous nous sommes également intéressés au profil transcriptionnel des LT CD4$^+$ naïfs (non publiés). Les LT CD4$^+$ naïfs non stimulés issus des rates VIH$^+$ expriment plus fortement le gène codant pour le récepteur à l'IL-6. Ainsi, une sensibilité accrue des LT CD4$^+$ naïfs à l'IL-6, due à une plus forte expression du récepteur, pourrait favoriser la différenciation en Tfh.

(c) Contrôle du CG

Une augmentation de la proportion des Tfh pourrait également être le résultat d'un défaut du contrôle de leur nombre par les cellules régulatrices dans les CG. Un défaut des Tfr pourrait par exemple expliquer un manque de régulation des Tfh. Récemment, Chowdhury et al. ont observé chez le macaques une expansion des Tfr plus modérée comparée aux Tfh lors de l'infection par le SIV, menant à une diminution du ratio Tfr/Tfh chez les macaques infectés (Chowdhury et al., 2015). Dans ce contexte, il est supposé que les Tfr ne sont pas en nombre suffisant pour contrôler la réaction du CG. Au contraire, dans notre étude, nous avons montré une expansion équivalente des Tfh et des Tfr dans les rates de patients infectés par le VIH.

Cependant, le défaut de régulation par les Tfr pourrait être non pas quantitatif mais qualitatif. Dans notre étude, l'analyse du profil transcriptionnel des Tfh spléniques inclut la population de Tfr. Ainsi, la diminution de l'expression des gènes codant pour l'IL-10 et CTLA-4 observée pourrait très bien concerner les Tfr. La sécrétion d'IL-10 et l'expression de CTLA-4 sont 2 paramètres important dans la fonction suppressive des Tfr (Sage and Sharpe, 2015). De plus, nous avons observé une diminution de la sécrétion d'IL-10 par les splénocytes issus des rates VIH$^+$. D'autres travaux se sont intéressés au profil transcriptionnel des Tfr et montrent une diminution de l'expression du gène codant pour le récepteur à l'IL-2, impliqué dans les fonctions des Treg (Chowdhury et al., 2015). Lors de l'infection par le VIH, l'hypothèse d'un défaut fonctionnel des Tfr pouvant mener à une expansion incontrôlée des Tfh semble donc possible au vu de ces éléments. L'étude des fonctions suppressives des Tfr

nécessite l'identification de nouveaux marqueurs phénotypiques permettant leur identification sans marquage intracellulaire. Il serait alors possible de les trier et réaliser des tests de suppression *in vitro* comme couramment réalisé pour les Treg. Dans leur étude Chowdhury et al. se basent sur la non expression du marqueur CD127 (comme établi pour les Treg) pour trier les Tfr (Chowdhury et al., 2015). Pourtant, il n'est pas formellement démontré que la population de LT $CD4^+CXCR5^+PD^{hi}CD127^-CD25^+$ corresponde bien aux Tfr.

(d) Expression des facteurs de restrictions et co-facteurs

Enfin, nos résultats non publiés portant sur l'expression de gènes codant pour les facteurs de restriction et les co-facteurs du VIH dans les Tfh et les CG-Tfh de la rate nous apportent des pistes supplémentaires qui pourraient expliquer l'expansion des Tfh malgré leur infection par le VIH. Nous observons que les Tfh et CG-Tfh des rates VIH^+ expriment préférentiellement le co-facteur LEDGF/p75 et les facteurs de restriction BST2/tetherin et TRIM5. A noter, cependant, que le facteur de restriction TRIM5 humain n'inhibe que faiblement certaines souches du VIH (Luban, 2012). LEDGF/p75 est associé à la survie cellulaire, notamment en inhibant l'apoptose (Ganapathy et al., 2003). Cette protéine interagit également avec les intégrases du VIH, permettant alors une meilleure intégration du virus dans le génome de la cellule hôte (Sambasivarao, 2008). La balance entre l'expression de LEDGF/p75 (favorisant la survie cellulaire et la réplication du virus) et l'expression des facteurs de restriction BST2/tetherin et TRIM5 (limitant cette réplication), pourrait expliquer le paradoxe entre l'expansion des Tfh et l'intégration d'ADN viral plus importante dans ces cellules. En effet, dans les LT $CD4^+$ naïfs et mémoires, nous n'observons pas cette balance d'expression entre co-facteur et facteur de restriction mais plutôt une expression préférentielle des facteurs de restriction APOBEC3G dans les LT CD4 naïfs et SAMHD1/cyclophiline A dans les LT $CD4^+$ mémoires.

L'expansion des Tfh dans la rate des patients infectés par le VIH s'explique probablement par une association de ces différents mécanismes. Ainsi, le VIH pourrait avoir un impact direct sur les Tfh en initiant l'expression de facteurs favorables à la survie cellulaire tout en permettant l'intégration du virus. De plus, le VIH pourrait agir de façon indirecte en

participant à l'établissement d'un microenvironnement favorable à la différenciation des LT $CD4^+$ en Tfh.

Altération des fonctions des Tfh lors de l'infection par le VIH

Dans les rates des patients VIH^+ non traités, nous avons observé un défaut de la maturation des LB. En effet, les proportions de plasmablastes, CG-LB et LB transitionnels étaient augmentées au détriment des LB mémoires. Cette altération du compartiment B dans la rate suggère un défaut fonctionnel des Tfh. L'analyse du profil transcriptionnel des Tfh et des CG-Tfh nous a apporté des éléments dans ce sens. En effet, les gènes codant pour les molécules de co-stimulation (OX40, ICOS et CD40L) sont moins exprimés dans les Tfh et les CG-Tfh issus des rates VIH^+ comparés aux rates VIH^-. Une diminution de l'expression des molécules de co-stimulation par les Tfh a probablement un impact sur l'apport d'aide du Tfh au LB et pourrait donc expliquer le défaut de maturation des LB observé dans les rates des patients VIH^+. C'est notamment le cas d'OX40 dont la mutation est connue comme étant liée à une perte des LB mémoires circulant (Byun et al., 2013). Une diminution de l'expression de CD40L avait déjà été rapportée dans la population totale de LT $CD4^+$ circulants lors de l'infection par le VIH (Vanham et al., 1999). Il faut d'ailleurs noter que la rate étant un organe fortement vascularisé, la population de Tfh observée dans notre étude contient probablement une proportion de pTfh que nous ne pouvons pas différencier. Il aurait été intéressant, chez ces patients, d'analyser le profil transcriptionnel des pTfh du sang. Ces échantillons sont malheureusement inexistants pour les patients inclus dans l'étude. D'autres travaux se sont intéressés à la fonctionnalité des pTfh lors de l'infection par le VIH et montrent une diminution de l'expression des gènes codant pour l'IL-21 et l'IL-4 toutes deux impliquées dans la fonction des Tfh (Boswell et al., 2014). Cependant, dans cette étude, l'expression du gène codant pour ICOS est plus forte dans les pTfh des patients VIH^+ à l'inverse de la tendance à une diminution que nous avons observé dans la rate. Cependant, nos résultats concernant ICOS ne sont pas statistiquement significatifs et les travaux de Boswell et al. se limitent au compartiment périphérique sans étudier les OLII (Boswell et al., 2014).

En plus des molécules de co-stimulation, des gènes codant pour des molécules impliquées dans la transduction du signal (SLAMF1 et CD48) sont sous-exprimés dans les Tfh et les CG-

Tfh des rates VIH$^+$. D'autre part, nous avons observé que les splénocytes VIH$^+$ sécrétaient une quantité moins importante d'IL-4 comparée aux splénocytes VIH$^-$. L'expression de SLAMF1 est requise pour la sécrétion d'IL-4 et d'IL-21 par les CG-Tfh (Yusuf et al., 2010). Une expression réduite de SLAMF1 par les CG-Tfh pourrait donc conduire à une réduction de leur capacité à sécréter l'IL-4 et pourrait donc expliquer la diminution de sécrétion d'IL-4 par les splénocytes totaux issus des rates VIH$^+$.

Une diminution de la sécrétion d'IL-10, en plus de l'IL-4, a été détectée dans les cultures de splénocytes VIH$^+$. Nous avons précédemment discuté la possibilité que ce défaut touche particulièrement les Tfr étant donné le rôle de l'IL-10 dans les fonctions régulatrices des Tfr. Cependant, l'IL-10 est également une cytokine impliquée dans la différenciation des LB (Arpin et al., 1997), ainsi une diminution de sa sécrétion par les splénocytes VIH$^+$ pourrait également refléter une altération des fonctions d'aide aux LB des Tfh.

Notre étude est la première à s'intéresser à la fonctionnalité et la dynamique des Tfh dans la rate lors de l'infection par le VIH chez des patients non traités au stade chronique. Nous montrons que les populations de Tfh sont en proportions plus importantes dans les rates infectées et que leurs fonctions sont altérées, pouvant expliquer le défaut de maturation des LB dans la rate. Nos travaux sur la fonctionnalité des Tfh reposent principalement sur des analyses transcriptionnelles et non sur l'expression protéique. Il faudrait confirmer ces observations au niveau protéique. Plusieurs études ont déjà rapporté une corrélation entre expression génique et protéique pour certaines des molécules que nous avons étudiées. D'autre part, concernant l'IL-10, nous avons observé un défaut d'expression du gène codant pour cette cytokine en parallèle d'une diminution de sa sécrétion par les splénocytes.
Les expériences de « *Cytometric Beads Array* » ont été réalisées à partir de splénocytes totaux pour étudier la sécrétion des cytokines IL-6, Il-4, IL1β et IL-10. En effet, étant donné la fréquence très basse des Tfh parmi les LT CD4$^+$, en particulier dans les rates non infectées, et la rareté des échantillons de rates, il était techniquement impossible de réaliser cette technique à partir de Tfh triés. Il est important de noter que les Tfh sont en proportion plus importante dans les rates VIH$^+$ et donc obligatoirement plus représentés dans les cultures de splénocytes totaux VIH$^+$ (pour une même quantité de splénocytes mis en culture). Il aurait donc été difficile d'interpréter une augmentation de la sécrétion d'une des cytokines par les

splénocytes totaux puisque nous n'aurions pas pu déterminer s'il s'agissait d'une meilleure capacité de sécrétion ou simplement d'une proportion plus importante de cellules sécrétrices. Cependant, dans notre cas, nous avons observé une diminution de la sécrétion d'IL-4 et d'IL-10 par les splénocytes VIH^+. Étant donné la quantité plus importante de Tfh dans la culture, une diminution de la sécrétion de ces cytokines renforce l'idée d'un défaut fonctionnel de ces cellules.

CONCLUSIONS ET DISCUSSION DE L'AXE 2

Dans le second axe de mon travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux réponses B mémoires anti VIH dans le sang de patients VIH^+ *elite controller* (EC), *viremic controller* (VC) et non contrôleurs sous ART (cART) et dans le sang de donneurs VIH^- (VIH^-).

Préservation du compartiment B mémoire chez les *Elite Controller*

L'analyse des populations de LB circulantes nous montre que les EC préservent naturellement leur compartiment B mémoire. En effet, les proportions de LB mémoires et LB naïfs sont inchangées entre les groupes EC, cART et VIH^-. De la même façon, aucune différence statistiquement significative n'est observée concernant les proportions de LB AM, RM, IM et TLM entre les 3 groupes. Dans le groupe cART, le compartiment B mémoire est probablement rétabli par l'initiation des ART. En effet, il est décrit que les patients VIH^+ virémiques non traités présentent une augmentation des LB TLM et AM et une diminution des LB RM (Moir et al., 2008). L'initiation d'ART chez ces patients permet de rétablir les proportions de LB AM et TLM mais ne permet pas de récupérer entièrement les LB RM (Moir et al., 2010). Bien que statistiquement non significative, nous observons une tendance à l'augmentation des LB RM chez les EC comparés aux cART. Les LB RM sont majoritairement impliqués dans le maintien des réponses humorales (Moir and Fauci, 2013). Une augmentation de cette population chez les EC pourrait prédire une meilleure réponse B mémoire, notamment anti-VIH, dans ce groupe comparé au groupe cART. Cependant, notre étude ne permet pas de déterminer si les LB anti-VIH chez les EC font partie de la population RM. Une étude récente répond à cette question en associant une sonde gp140 à leurs marqueurs de phénotypage des LB (Buckner et al., 2016). Ainsi, Buckner et al. montrent que chez les EC les LB anti-gp140 sont majoritairement RM. Les échantillons de sang mis à notre disposition ne nous permettaient pas d'avoir recours à cette méthode car une large quantité de sang est nécessaire pour pouvoir détecter une population significative de LB anti-gp140. En effet, les LB anti-gp140 représentent généralement moins de 0.2% des LB dans le sang des patients VIH^+.

De façon intéressante, nous avons observé une proportion plus importante de LB TLM dans le groupe EC HLA-B*57^- comparé au groupe EC HLA-B*57^+ et au groupe HIV^-. Étant donné le

lien suggéré entre une virémie élevée et l'augmentation des LB TLM, nous pourrions penser que les EC HLA-B*57$^-$ présentent une virémie, bien que basse, plus élevée que celle des EC HLA-B*57$^+$. Nous n'observons cependant pas de différence statistiquement significative des charges virales d'ADN entre ces 2 groupes d'EC bien qu'une tendance à l'augmentation chez les EC HLA-B*57$^-$ soit suggérée. Il faut également noter que la charge virale est mesurée à un temps donné et que des variations rapides de ce paramètre n'ont pas forcément des répercussions aussi rapides sur le compartiment B. Ainsi, nous ne pouvons pas totalement exclure qu'à un moment donné, la charge virale des EC HLA-B*57$^-$ ait été plus haute favorisant ainsi l'expansion des LB TLM. L'hypothèse d'une virémie plus basse chez les EC HLA-B*57$^+$ comparés aux HLA-B*57$^-$ est probable puisqu'il est clairement établi que les EC HLA-B*57$^+$ présentent une réponse CD8$^+$ cytotoxique anti-VIH plus importante, permettant une élimination plus efficace du virus (Migueles et al., 2000). Il est cependant important de noter que cette différence de la proportion de TLM entre les 2 groupes d'EC, bien que très claire, n'est que de à peine 10%, ce qui pose la question de la relevance biologique d'une telle différence. En effet, comme nous le discuterons plus loin, aucune différence concernant la fréquence de LB anti-VIH n'a été observée entre les EC HLA-B*57$^-$ et HLA-B*57$^+$.

De la même façon, nous avons détecté une proportion plus importante de LB mémoires IgG$^+$ dans le groupe EC comparé au groupe HIV$^-$. Cette différence est majoritairement apportée par le groupe d'EC HLA-B*57$^-$. A nouveau, cette différence est d'environ 5% et soulève la question d'une réelle relevance biologique. La proportion de LB mémoires IgG$^+$ dans le groupe cART présente également une tendance à l'augmentation comparée au groupe HIV$^-$. On peut donc supposer que cette augmentation dans les groupes de patients VIH$^+$ est due à l'infection et n'est pas propre à des caractéristiques du groupe d'EC HLA-B*57$^-$.

Finalement, mis à part l'augmentation des LB TLM dans le sous-groupe d'EC HLA-B*57$^-$, le groupe d'EC présente la capacité à maintenir, sans ART, un compartiment B mémoire semblable à celui observé dans les groupes HAART et VIH$^-$, suggérant une préservation naturelle de leur système immunitaire probablement en lien avec leur capacité à contrôler l'infection par le VIH. Cependant, cette analyse par cytométrie de flux nous permet seulement d'avoir un aperçu global des populations de LB mémoires et n'informe pas sur les réponses anti-HIV. Dans notre étude, les réponses B mémoires anti-VIH ont pu être analysées par la technique d'Elispot B.

Détection des réponses B mémoires anti-VIH par la technique d'Elispot B

La technique d'Elispot B nécessite une période de pré-culture permettant de différencier les LB en CSA et d'augmenter leur proportion dans la culture. Nous ne pouvons pas assurer que les proportions de LB anti VIH soient strictement conservées avant et après la culture. Cependant, les récents travaux de Buckner et al. montrent qu'il existe bien une corrélation entre la fréquence de LB anti-gp140 détectée *ex vivo* par cytométrie de flux et la fréquence détectée par Elispot B (Buckner et al., 2016). Ainsi, l'Elispot B permet d'obtenir une fréquence relative de LB anti-VIH dans le sang des patients.

Par Elispot B, nous avons analysé les réponses B mémoires IgG^+ spécifiques de différentes glycoprotéines de l'enveloppe du VIH ($gp140_{Yu2b}$, $gp41_{S30}$ et $gp160_{THO}$) et de la capside du VIH (p24). Les Ag de l'enveloppe du VIH ne provenant pas de la même souche, il est difficile de comparer les réponses B mémoires contre ces différents Ag chez un même patient. La gp140 utilisée est cependant la même que celle dont nous disposons pour les marquages en cytométrie de flux. Étant donné la corrélation entre les fréquences de LB anti-VIH détectées par ces deux techniques, les expériences d'Elispot B nous permettent de prédire les patients ayant les fréquences de LB anti-VIH les plus élevées. Ces informations seront utiles pour, plus tard, obtenir de large quantité de sang et trier les LB anti-VIH et étudier leurs fonctions (voir plus loin le paragraphe « Perspectives »).

La technique d'Elispot B est utilisée depuis les années 1990 pour étudier les réponses B IgG^+ anti-VIH (Shirai et al., 1992). A notre connaissance, notre étude est la première à s'intéresser aux sous-types d'IgG (IgG1, IgG2 et IgG3) anti-VIH sécrétés par les LB mémoires. Classiquement les IgG2 et IgG3 anti-VIH sont étudiées par Elisa dans le sérum des patients VIH^+, cependant cette technique n'informe pas sur la présence des LB spécifiques du VIH dans le sang des patients. De la même façon, nous n'avons pas connaissance de l'utilisation de cette technique pour détecter les réponses B mémoires $IgG2^+$ ou $IgG3^+$ spécifiques d'autres Ag viraux, bactériens ou vaccinal chez l'Homme. Pour cette étude, de nombreuses mises au point ont donc été nécessaires. Il est important de noter qu'en fonction de la protéine fixée au fond des puits (antigène ou anticorps) et de l'anticorps de détection utilisé, les spots ont des morphologies différentes ce qui rend difficile leur comptage automatisé (voir annexe 3).

Maintien des réponses B mémoires anti-VIH chez les EC

De façon intéressante, nous avons détecté des réponses B mémoires anti-VIH chez 80% des EC contre seulement 7% des cART. Lors de la pré-culture, permettant d'amplifier et de différencier les LB avant les Elispots B, les LB des EC se sont mieux amplifiés que les LB des patients cART. Cependant, cette différence d'amplification ne nous a pas empêché d'observer des réponses B mémoires anti-influenza aussi bien chez les EC que chez les patients cART. L'absence de réponses chez les patients cART ne semble donc pas être liée à cette différence d'amplification des LB pendant la pré-culture mais bien liée à la capacité des patients à maintenir ou non des réponses B mémoires anti-VIH. La différence d'amplification des LB entre les EC et les patients cART reflète plutôt de meilleures capacités fonctionnelles des populations de LB chez les EC. Ainsi, bien que l'initiation des traitements permette aux patients VIH^+ de globalement restaurer les proportions des différentes populations de LB, il est probable que ces traitements ne permettent pas aux LB de retrouver pleinement leurs fonctions notamment au niveau de leur capacité à s'amplifier. Cependant les réponses B mémoires anti-Influenza ne sont pas impactées chez les patients cART. L'initiation des ART permet de contrôler la réplication virale et d'amener la charge virale des patients à un niveau indétectable. Nous suggérons que l'absence de réplication du virus dans le groupe cART pourrait expliquer l'absence de réponses B mémoires anti-VIH chez ces patients. D'autre travaux ont déjà montré que les réponses B mémoires anti-VIH sont plus largement détectées dans le sang de patients VIH^+ non traités (Fondere et al., 2003). Ainsi, les EC présenteraient une charge virale résiduelle, due à un contrôle naturel de la réplication virale, nécessaire au maintien des réponses B mémoires anti-VIH. D'autres travaux récents proposent la même hypothèse (Buckner et al., 2016), bien que cette étude porte sur seulement 9 EC. Des expériences préliminaires sur quelques patients contrôleurs virémiques (VC) nous ont permis de conforter cette hypothèse. En effet, chez un patient VC non traités les réponses B mémoires anti-VIH étaient détectables, en lien avec une charge virale haute. Chez ce même patient, l'initiation des ART a abaissé la charge virale a un niveau indétectable mais est également associée à la non-détection de réponses B mémoires anti-VIH. Il sera cependant nécessaire de répéter ces expériences avec un plus grand nombre de VC : non traités d'une part pour établir un lien éventuel entre charge virale et amplitude des réponses

B mémoires anti-VIH et si possible chez des VC avant et après initiation des ART pour conforter notre observation préliminaire.

Dans notre étude, nous avons majoritairement détecté des LB IgG1$^+$ anti-VIH dans le sang des EC. Les réponses IgG2$^+$ et IgG3$^+$ spécifiques du virus ont été observées chez moins de la moitié des EC et lorsqu'elles ont été détectées, elles ne représentaient qu'une minorité des réponses anti-VIH IgG$^+$. D'autre part, une fréquence plus importante de LB IgG2$^+$ ou d'IgG3$^+$ ne prédispose pas à une plus forte réponse IgG2$^+$ ou IgG3$^+$ anti-VIH. De précédents travaux suggéraient un lien entre la quantité d'IgG2 anti-VIH dans le sérum de patients contrôleurs et une charge virale basse (Ngo-Giang-Huong et al., 2001). La faible détection des réponses IgG2$^+$ anti-VIH dans le sang des EC ne remet pas en cause la réelle implication des IgG2 dans le contrôle naturel de l'infection. En effet, il est important de noter que les IgG2 détectées dans le sérum et les LB IgG2$^+$ détectés dans le sang sont deux choses bien distinctes. En effet, les fréquences de LB IgG2$^+$ totaux ou anti-VIH ne semblent pas corréler avec les quantités d'IgG2 totales ou anti-VIH détectées dans le sérum des EC par l'équipe de Christiane Moog. Cette observation n'est pas étonnante puisque les Ig présentes dans le sérum ne sont pas sécrétées uniquement par les LB circulants mais également par les LB présents dans les OLII et la MO. Les plasmocytes à longue durée de vie se localisent dans la MO et sont rapidement mobilisables en cas de réexposition à l'Ag. Les LB circulants témoignent d'une réaction du CG active probablement en lien avec la présence de l'Ag. Ainsi, l'hypothèse d'une persistance de l'Ag chez les EC, permettant le maintien des réponses B mémoires anti-VIH, est renforcée. Chez les patients HAART, les LB anti-VIH se situeraient principalement dans la MO mais non dans la circulation en lien avec le contrôle de la réplication virale par les traitements.

Les IgG3, par leur polyfonctionnalité, ont également étaient décrites comme impliquées dans le contrôle de l'infection par le VIH (Ackerman et al., 2016). A nouveau, malgré la faible détection de réponses B mémoires IgG3$^+$ anti-VIH dans notre cohorte d'EC, nos résultats ne remettent pas en cause le rôle des IgG3 dans le contrôle de l'infection. L'étude de la fonctionnalité des IgG3 anti-VIH, tout comme celle des autres classes d'IgG, sera nécessaire dans notre étude.

Les réponses B mémoires anti-p24 ont été détectées dans le sang de 50% des EC et leur amplitude était moins importante comparée aux réponses anti-enveloppe (voir annexe 2). La

protéine p24 constitue la capside du virus et n'est donc pas directement exposée à la surface du virus entier, tandis que les protéines d'enveloppe sont bien exposées à la surface. Les LB sont donc probablement plus exposés aux protéines de l'enveloppe, ce qui pourrait expliquer la fréquence plus élevée des LB anti-enveloppe (gp140, gp41 et gp160). D'autres études ont également montré une présence plus importante de LB anti-enveloppe dans le sang ou d'Ig anti-enveloppe dans le sérum de patients VIH$^+$ comparé aux LB ou Ig anti-p24 (Binley et al., 1997; Fondere et al., 2004). De façon intéressante, Binley et al. soulèvent le fait que les réponses anti-p24 sont principalement T dépendantes tandis que les réponses anti-enveloppe sont à la fois T dépendantes et T indépendantes (Binley et al., 1997). Leurs travaux montrent également que, dans le sérum des patients VIH$^+$ non contrôleurs non traités, les quantités d'Ig anti-p24 et anti-enveloppe sont plus basses comparées à celles des patients VIH$^+$ contrôleurs et qu'en plus cette diminution touche davantage les Ig anti-p24. A l'époque, ces travaux mettaient déjà en lumière un potentiel défaut de l'apport d'aide des LT aux LB chez les patients VIH$^+$.

Capacité de neutralisation des anticorps présents dans le sérum des EC

De façon intéressante, la plupart des EC présente des anticorps neutralisants dans leur sérum. De plus, ¼ d'entre eux ont fait preuve de capacité neutralisante contre au moins 40% de souches résistantes Tier2 testées. Cette observation est en accord avec les travaux de Doria-rose et al. portant sur l'analyse des capacités neutralisantes des anticorps dans différentes populations de patients VIH$^+$ (Doria-Rose et al., 2009).

D'autre part, nous avons observé que le score de neutralisation des anticorps présents dans le sérum corrèle positivement avec la fréquence de LB mémoires anti-VIH chez les EC HLA-B*57$^+$. Nous pouvons donc supposer que le contrôle de l'infection chez les EC HLA-B*57$^+$ ne résulterait pas uniquement d'une meilleure réponse cytotoxique dirigée contre le virus mais pourrait être associée à une meilleure capacité neutralisante des anticorps en lien avec le maintien d'une fréquence élevée de LB mémoires anti-VIH.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES DES TRAVAUX DE THÈSE ET PERSPECTIVES

Mes travaux de thèse ont dans un premier temps démontré une augmentation de la proportion des Tfh et une altération de leurs fonctions dans la rate de patients VIH^+ non traités en lien avec un défaut des LB. La dynamique des Tfh reste mal comprise lors de l'infection par le VIH. Nous avons largement discuté de la possibilité d'une différenciation polarisée vers un profil Tfh lors de l'infection par le VIH. Cette hypothèse doit être plus précisément étudiée et pourra notamment se baser sur une partie de nos données transcriptionnelles non publiées.

En parallèle, j'ai pu mettre en évidence que les réponses B mémoires anti-VIH étaient maintenues dans le sang de patients capables de contrôler naturellement l'infection par le VIH. De façon évidente, nous pouvons poser la question de la fonctionnalité des Tfh chez les contrôleurs du VIH. Des travaux menés dans les années 1990 suggéraient un défaut de l'apport d'aide des LT aux LB notamment pour initier les réponses B anti-p24 chez des patients VIH^+ non traités tandis que les contrôleurs maintenaient cette réponse (Binley et al., 1997). Il serait donc intéressant de caractériser les populations de Tfh dans la cohorte d'EC étudiée au cours du second axe de mes travaux de thèse. Les OLII étant difficile d'accès, cette étude pourrait porter sur les pTfh dans le sang. Dans ce sens, de récentes travaux ont montré que le gène codant pour l'IL-21 est surexprimé par les pTfh issus du sang de patients contrôleurs comparé à des patients non contrôleurs (Cubas et al., 2015). Ce résultat suggère une meilleure fonctionnalité des Tfh chez les contrôleurs du VIH.

Les résultats de mes travaux de thèse permettent donc d'enrichir les connaissances sur la physiopathologie de l'infection par le VIH. Les interactions Tfh/LB sont primordiales pour la production des anticorps et notamment pour leur maturation. En impactant directement ces interactions cellulaires, le VIH échappe au processus de neutralisation et persiste dans l'organisme. Les traitements permettent, en partie, de restaurer les interactions Tfh/LB mais ne sont pas suffisants à l'éradication complète du virus. Notre revue en cours de révision dans le journal *Frontiers in Immunology* (voir **annexe 6**) détaille l'impact de l'infection par le VIH sur la fonctionnalité des Tfh et aborde l'importance de l'initiation précoce des cART. La **Figure 16** résume mes travaux de thèse et inclut certaines données de la littérature, permettant d'avoir une vue globale des interactions Tfh/LB lors de l'infection par le VIH (avec ou sans cART et dans le contexte d'un contrôle naturel de l'infection).

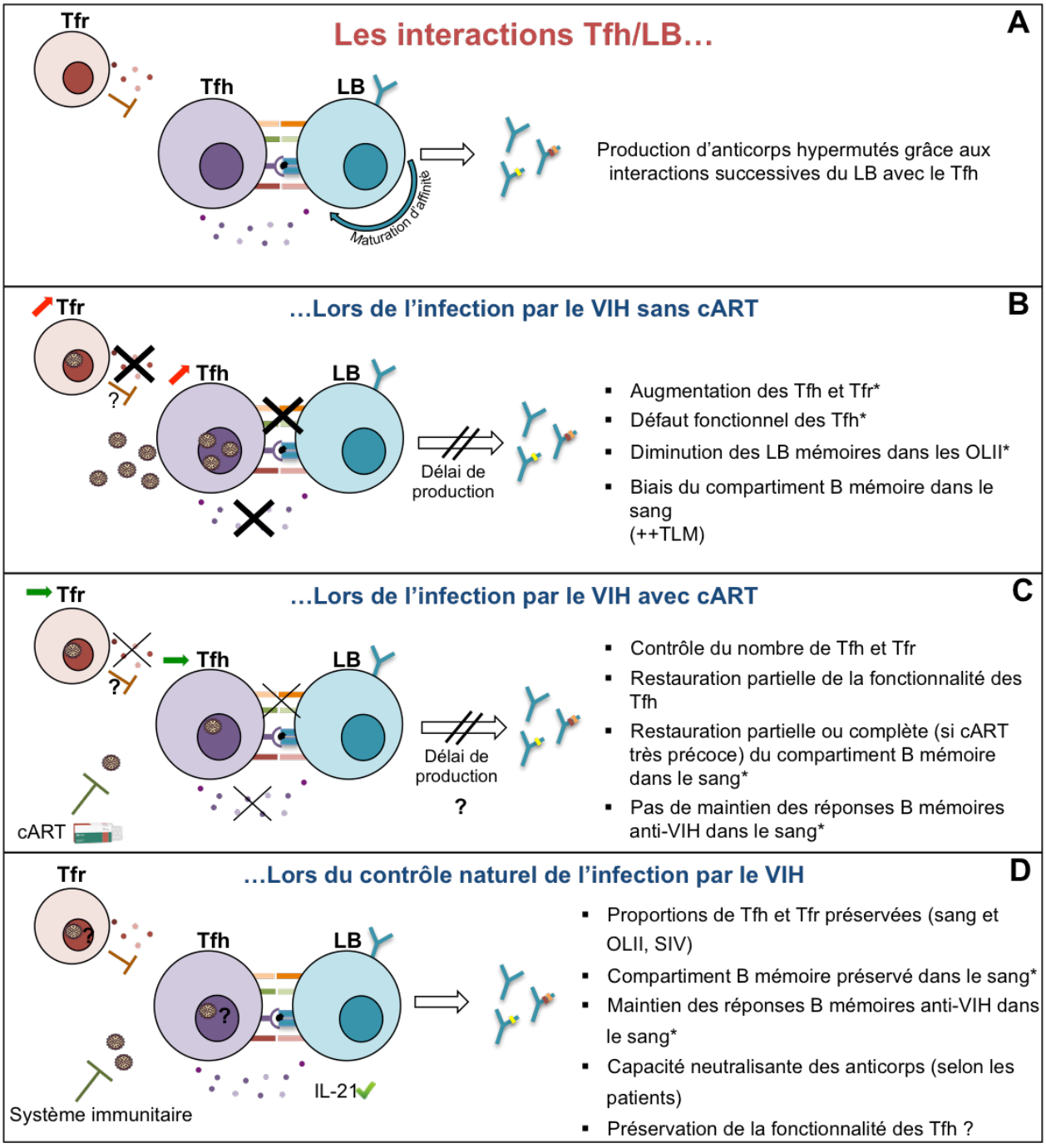


Figure 16 *: Résumé des connaissances sur les interactions Tfh/LB lors de l'infection par le VIH. Les caractéristiques des interactions Tfh/LB sont représentées dans 4 contextes : sans VIH (**A**), avec VIH sans cART (**B**) avec VIH + cART (**C**) et enfin lors d'un contrôle naturel de l'infection par le VIH (**D**). Les points issus des résultats de mes travaux de thèses sont indiqués par une étoile (*). Les autres points sont issus de la littérature. Les croix noires dans les cadres B et C illustrent une altération des fonctions plus ou moins marquée en fonction de l'épaisseur de la croix. Les cadres **C et D** s'appuient principalement sur des observations faites dans le sang et parfois dans le cas de l'infection par le SIV.*

Dans ce contexte, il est important de noter que les LB peuvent participer à l'émergence de réservoirs. En effet, nous avons déjà abordé la capacité du VIH opsonisé à se fixer à la molécule CD21 sur les LB (Moir et al., 2000). Le VIH peut également se lier à l'intégrine α4β7 via la gp120. De façon intéressante, les patients VIH^+ présentent une proportion plus importante de LB $\alpha4\beta7^+$. Il a été suggéré que les LB mémoires $\alpha4\beta7^+$ pourraient participer au transfert et à la constitution des réservoirs particulièrement au niveau des muqueuses (Girard et al., 2016).

D'autre part, les interactions entre les Tfh et les LB, en plus des molécules de co-stimulation et des cytokines, nécessitent la présentation des Ag du VIH sur les molécules du CMH-II par le LB. Il serait donc intéressant d'étudier les mécanismes de cette présentation. Dans ce sens, nous développons actuellement au laboratoire les outils nécessaires à cette étude. Les LB reconnaissent puis internalisent le virus via leur BCR. L'implication du BCR dans ce processus nécessite d'isoler des LB spécifiques du VIH et de les maintenir en culture. Dans un premier temps, de façon à s'affranchir de la spécificité du LB, nous avons développé une lignée de LB exprimant la molécule DC-SIGN, permettant l'internalisation et la présentation du virus sans passer par le BCR. Dans la même idée, nous pourrions utiliser des billes recouvertes d'anticorps ciblant la chaîne κ du BCR et d'Ag du VIH de façon à forcer l'internalisation des Ag du VIH par le LB. Cette technique présente l'avantage d'initier la signalisation par le BCR. Nous avons d'ailleurs déjà utilisé ce système dans le cadre d'une étude en collaboration avec l'équipe d'Olivier Thaunat (Sicard et al., 2015) (voir annexe 4). Enfin, nous envisageons de trier des LB anti-VIH à partir du sang de patients VIH^+ et de les immortaliser par transduction avec des vecteurs lentiviraux codant pour Bcl-6 et Bcl-XL comme précédemment décrit (Kwakkenbos et al., 2010). Pour apprécier la présentation des Ag du VIH par les LB, nous les mettrons en contact avec des LT $CD4^+$ spécifiques du VIH. Plusieurs clones, spécifiques de gag et env, sont déjà disponibles au laboratoire. L'étude de la différenciation des Tfh, menée en parallèle, permettra de générer des clones $CD4^+$ spécifiques du VIH et de leur conférer un profil Tfh, de façon à mettre en place un modèle *in vitro* pour étudier les mécanismes d'interaction entre les Tfh et les LB lors de l'infection par le VIH. Étant donné le rôle crucial de l'interaction Tfh/LB dans la génération d'anticorps neutralisants, une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait permettre d'élaborer de nouvelles stratégies de vaccination anti-VIH.

BIBLIOGRAPHIE

Ackerman, M.E., Dugast, A.-S., McAndrew, E.G., Tsoukas, S., Licht, A.F., Irvine, D.J., and Alter, G. (2013). Enhanced phagocytic activity of HIV-specific antibodies correlates with natural production of immunoglobulins with skewed affinity for FcγR2a and FcγR2b. J. Virol. *87*, 5468–5476.

Ackerman, M.E., Mikhailova, A., Brown, E.P., Dowell, K.G., Walker, B.D., Bailey-Kellogg, C., Suscovich, T.J., and Alter, G. (2016). Polyfunctional HIV-Specific Antibody Responses Are Associated with Spontaneous HIV Control. PLOS Pathog. *12*, e1005315.

Alam, S.M., McAdams, M., Boren, D., Rak, M., Scearce, R.M., Gao, F., Camacho, Z.T., Gewirth, D., Kelsoe, G., Chen, P., et al. (2007). The role of antibody polyspecificity and lipid reactivity in binding of broadly neutralizing anti-HIV-1 envelope human monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 to glycoprotein 41 membrane proximal envelope epitopes. J. Immunol. *178*, 4424–4435.

Alfsen, A., Iniguez, P., Bouguyon, E., and Bomsel, M. (2001). Secretory IgA Specific for a Conserved Epitope on gp41 Envelope Glycoprotein Inhibits Epithelial Transcytosis of HIV-1. J. Immunol. *166*, 6257–6265.

Allen, C.D.C., Ansel, K.M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N., and Cyster, J.G. (2004). Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. Nat. Immunol. *5*, 943–952.

Allen, C.D.C., Okada, T., and Cyster, J.G. (2007). Germinal-Center Organization and Cellular Dynamics. Immunity *27*, 190–202.

Allen, R.C., Armitage, R.J., Conley, M.E., Rosenblatt, H., Jenkins, N. a, Copeland, N.G., Bedell, M. a, Edelhoff, S., Disteche, C.M., and Simoneaux, D.K. (1993). CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. Science *259*, 990–993.

Alugupalli, K.R., Akira, S., Lien, E., and Leong, J.M. (2007). MyD88- and Bruton's tyrosine kinase-mediated signals are essential for T cell-independent pathogen-specific IgM responses. J Immunol *178*, 3740–3749.

Arnold, J.N., Wormald, M.R., Sim, R.B., Rudd, P.M., and Dwek, R. a (2007). The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. Annu. Rev. Immunol. *25*, 21–50.

Arpin, B.C., Banchereau, J., and Liu, Y. (1997). Memory B cells Are Biased Towards Terminal Differentiation : A Strategy That May Prevent Repertoire Freezing. J. Exp. Med. *186*.

Attanavanich, K., and Kearney, J.F. (2004). Marginal Zone, but Not Follicular B Cells, Are Potent Activators of Naive CD4 T Cells. J. Immunol. *172*, 803–811.

Baecher-Allan, C., Brown, J.A., Freeman, G.J., and Hafler, D.A. (2001). CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. J. Immunol. *167*, 1245–1253.

Ballesteros-Tato, A., and Randall, T.D. (2014). Priming of T follicular helper cells by dendritic cells. Immunol. Cell Biol. *92*, 22–27.

Ballesteros-tato, A., León, B., Graf, B.A., Moquin, A., Scott, P., Lund, F.E., and Randall, T.D. (2012). Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper differentiation. Immunity *36*, 847–856.

Banerjee, K., Klasse, P.J., Sanders, R.W., Pereyra, F., Michael, E., Lu, M., Walker, B.D., and Moore, J.P. (2010). IgG subclass profiles in infected HIV type 1 controllers and chronic progressors and in uninfected recipients of Env vaccines. AIDS Res. Hum. Retroviruses *26*, 445–458.

Barker, E., Martinson, J., Brooks, C., Landay, A., and Deeks, S.G. (2007). Dysfunctional natural killer cells, in vivo, are

governed by HIV viremia regardless of whether the infected individual is on antiretroviral therapy. AIDS *21*, 2363–2365.

Barre-Sinoussi, F., Ross, A.L., and Delfraissy, J.-F. (2013). Past, present and future: 30 years of HIV research. Nat Rev Micro *11*, 877–883.

Barré-Sinoussi, F., Cherman, J., Rey, F., Nugeyre, M., Chamaret, S., Gruest, J., Dauget, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). Science (80-.). *220*.

Barrett, D.J., and Ayoub, E.M. (1986). IgG2 subclass restriction of antibody to pneumococcal polysaccharides. Clin. Exp. Immunol. *63*, 127–134.

Barrington, R.A., Pozdnyakova, O., Zafari, M.R., Benjamin, C.D., and Carroll, M.C. (2002). B Lymphocyte Memory: Role of Stromal Cell Complement abd FcgRIIB Receptors. J. Exp. Med. *196*, 1189–1200.

Basso, K., Saito, M., Sumazin, P., Margolin, A. a, Wang, K., Lim, W., Kitagawa, Y., Schneider, C., Alvarez, M.J., Califano, A., et al. (2010). Integrated biochemical and computational approach identifies BCL6 direct target genes controlling multiple pathways in normal germinal center B cells. Immunobiology *115*, 975–984.

Batista, F., and Harwood, N. (2009). The who, how and where of antigen presentation to B cells. Nat. Rev. Immunol. *9*, 15–27.

Baumjohann, D., Okada, T., and Ansel, K.M. (2011). Cutting Edge: Distinct Waves of BCL6 Expression during T Follicular Helper Cell Development. J. Immunol. *187*, 2089–2092.

Baumjohann, D., Kageyama, R., Clingan, J.M., Morar, M.M., Patel, S., de Kouchkovsky, D., Bannard, O., Bluestone, J. a, Matloubian, M., Ansel, K.M., et al. (2013a). The microRNA cluster miR-17∼92 promotes TFH cell differentiation and represses subset-inappropriate gene expression. Nat. Immunol. *14*, 840–848.

Baumjohann, D., Preite, S., Reboldi, A., Ronchi, F., Ansel, K.M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2013b). Persistent antigen and germinal center B cells sustain T follicular helper cell responses and phenotype. Immunity *38*, 596–605.

Bauquet, A.T., Jin, H., Paterson, A.M., Mitsdoerffer, M., Ho, I.-C., Sharpe, A.H., and Kuchroo, V.K. (2009). The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. Nat. Immunol. *10*, 167–175.

Bekele, Y., Amu, S., Bobosha, K., Lantto, R., Nilsson, A., Endale, B., Gebre, M., Aseffa, A., Rethi, B., Howe, R., et al. (2015). Impaired Phenotype and Function of T Follicular Helper Cells in HIV-1-Infected Children Receiving ART. Medicine (Baltimore). *94*, e1125.

Benati, D., Galperin, M., Lambotte, O., Gras, S., Lim, A., Mukhopadhyay, M., Nouël, A., Campbell, K., Lemercier, B., Claireaux, M., et al. (2016). Public T cell receptors confer high-avidity CD4 responses to HIV controllers. J. Clin. Invest. 1–16.

Benjelloun, F., Oruc, Z., Thielens, N., Verrier, B., Champier, G., Vincent, N., Rochereau, N., Girard, A., Jospin, F., Chanut, B., et al. (2016). First Membrane Proximal External Region-Specific Anti-HIV1 Broadly Neutralizing Monoclonal IgA1 Presenting Short CDRH3 and Low Somatic Mutations. J. Immunol. *197*, 1979–1988.

Bentebibel, S., Lopez, S., Obermoser, G., Schmitt, N., Mueller, C., Harrod, C., Flano, E., Mejias, A., Albrecht, R.A., Blankenship, D., et al. (2013). Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH Cells Correlates with Antibody Responses to Influenza Vaccination. Sci. Transl. Med. *5*, 1–19.

Betts, M.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., et al. (2006). HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. Blood *107*, 4781–4789.

Binley, J.M., Klasse, P.J., Cao, Y., Jones, I., Markowitz, M., Ho, D.D., and Moore, J.P. (1997). Differential regulation of the antibody responses to Gag and Env proteins of human immunodeficiency virus type 1. J. Virol. *71*, 2799–2809.

Blackburn, M.J., Zhong-Min, M., Caccuri, F., McKinnon, K., Schifanella, L., Guan, Y., Gorini, G., Venzon, D., Fenizia, C., Binello, N., et al. (2015). Regulatory and Helper Follicular T Cells and Antibody Avidity to Simian Immunodeficiency Virus Glycoprotein 120. J. Immunol. *195*, 3227–3236.

Blum, J.S., Wearsch, P.A., and Cresswell, P. (2013). Pathways of Antigen Processing.

Boise, L.H., Minn, A.J., Noel, P.J., June, C.H., Accavitti, M.A., Lindsten, T., and Thompson, C.B. (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-xL. Immunity *3*, 87–98.

Bonsignori, M., Wiehe, K., Grimm, S.K., Lynch, R., Yang, G., Kozink, D.M., Perrin, F., Cooper, A.J., Hwang, K., Chen, X., et al. (2014). An autoreactive antibody from an SLE / HIV-1 individual broadly neutralizes HIV-1. J. Clin. Invest. *124*, 1835–1843.

Boritz, E.A., Darko, S., Swaszek, L., Wolf, G., Wells, D., Wu, X., Henry, A.R., Laboune, F., Hu, J., Ambrozak, D., et al. (2016). Multiple Origins of Virus Persistence during Natural Control of HIV Infection. Cell *166*, 1004–1015.

Bossaller, L., Burger, J., Draeger, R., Grimbacher, B., Knoth, R., Plebani, A., Durandy, A., Baumann, U., Schlesier, M., Welcher, A. a, et al. (2006). ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5+CD4 germinal center Th cells. J. Immunol. *177*, 4927–4932.

Boswell, K.L., Paris, R., Boritz, E., Ambrozak, D., Yamamoto, T., Darko, S., Wloka, K., Wheatley, A., Narpala, S., McDermott, A., et al. (2014). Loss of Circulating CD4 T Cells with B Cell Helper Function during Chronic HIV Infection. PLoS Pathog. *10*, e1003853.

Boyd, J.E., and James, K. (1992). B cell responses to HIV and the development of human monoclonal antibodies. Clin. Exp. Immunol. *88*, 189–202.

Brenchley, J.M., Vinton, C., Tabb, B., Hao, X.P., Connick, E., Paiardini, M., Lifson, J.D., Silvestri, G., and Estes, J.D. (2012). Differential infection patterns of CD4+ T cells and lymphoid tissue viral burden distinguish progressive and nonprogressive lentiviral infections. Blood *120*, 4172–4181.

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

Buckner, C.M., Kardava, L., Zhang, X., Gittens, K., Justement, J.S., Kovacs, C., McDermott, A.B., Li, Y., Sajadi, M.M., Chun, T.-W., et al. (2016). Maintenance of HIV-Specific Memory B-Cell Responses in Elite Controllers Despite Low Viral Burden. J. Infect. Dis. jiw163.

Byun, M., Ma, C.S., Akçay, A., Pedergnana, V., Palendira, U., Myoung, J., Avery, D.T., Liu, Y., Abhyankar, A., Lorenzo, L., et al. (2013). Inherited human OX40 deficiency underlying classic Kaposi sarcoma of childhood. J. Exp. Med. *210*, 1743–1759.

Casamayor-Palleja M, Feuillard J, Ball J, Drew M, M.I. (1996). Centrocytes rapidly adopt a memory B cell phenotype on co-culture with autologous germinal centre T cell-enriched preparations. Int. Immunol. *8*, 737–744.

Cesta, M. (2006). Normal Structure, Function, and Histology of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. Toxicol. Pathol. *34*, 599–608.

Chen, H., Ndhlovu, Z.M., Liu, D., Porter, L.C., Fang, J.W., Darko, S., Brockman, M. a, Miura, T., Brumme, Z.L., Schneidewind,

A., et al. (2012). TCR clonotypes modulate the protective effect of HLA class I molecules in HIV-1 infection. Nat. Immunol. *13*, 691–700.

Chevalier, N., Jarrossay, D., Ho, E., Avery, D.T., Ma, C.S., Yu, D., Sallusto, F., Tangye, S.G., and Mackay, C.R. (2011). CXCR5 expressing human central memory CD4 T cells and their relevance for humoral immune responses. J. Immunol. *186*, 5556–5568.

Cheynier, R., Henrichwark, S., Hadida, F., Pelletier, E., Oksenhendler, E., Autran, B., and Wain-Hobson, S. (1994). HIV and T cell expansion in splenic white pulps is accompanied by infiltration of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes. Cell *78*, 373–387.

Choi, Y.S., Kageyama, R., Eto, D., Escobar, T.C., Robert, J., Monticelli, L., Lao, C., and Crotty, S. (2011). ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. Immunity *34*, 932–946.

Choi, Y.S., Eto, D., Yang, J. a, Lao, C., and Crotty, S. (2013). Cutting edge: STAT1 is required for IL-6-mediated Bcl6 induction for early follicular helper cell differentiation. J. Immunol. *190*, 3049–3053.

Chowdhury, a., Del Rio, P.M.E., Tharp, G.K., Trible, R.P., Amara, R.R., Chahroudi, a., Reyes-Teran, G., Bosinger, S.E., and Silvestri, G. (2015). Decreased T Follicular Regulatory Cell/T Follicular Helper Cell (TFH) in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Rhesus Macaques May Contribute to Accumulation of TFH in Chronic Infection. J. Immunol.

Chtanova, T., Tangye, S.G., Newton, R., Frank, N., Hodge, M.R., Rolph, M.S., and Mackay, C.R. (2004). T Follicular Helper Cells Express a Distinctive Transcriptional Profile, Reflecting Their Role as Non-Th1/Th2 Effector Cells That Provide Help for B Cells. J. Immunol. *173*, 68–78.

Clark, E.A., and Ledbetter, J.A. (1986). Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *83*, 4494–4498.

Clatza, A., Bonifaz, L.C., Vignali, D. a a, and Moreno, J. (2003). CD40-induced aggregation of MHC class II and CD80 on the cell surface leads to an early enhancement in antigen presentation. J. Immunol. *171*, 6478–6487.

Clavel, F., Guyader, M., Guétard, D., Sallé, M., Montagnier, L., and Alizon, M. (1986a). Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. Nature. *324*, 691–5.

Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M., Santos-Ferreira, M., Laurent, a., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., et al. (1986b). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science (80-.). *233*, 343–346.

Cohen, K., Altfeld, M., Alter, G., and Stamatatos, L. (2014). Early Preservation of CXCR5+ PD-1+ Helper T Cells and B Cell Activation Predict the Breadth of Neutralizing Antibody Responses in Chronic HIV-1 Infection. J. Virol. *88*, 13310–13321.

Colineau, L., Rouers, A., Yamamoto, T., Xu, Y., Urrutia, A., Pham, H.-P., Cardinaud, S., Samri, A., Dorgham, K., Coulon, P.-G., et al. (2015). HIV-Infected Spleens Present Altered Follicular Helper T Cell (Tfh) Subsets and Skewed B Cell Maturation. PLoS One *10*, e0140978.

Coulon, P., Richetta, C., Rouers, A., Blanchet, F.P., Urrutia, A., Guerbois, M., Piguet, V., Theodorou, I., Bet, A., Schwartz, O., et al. (2016). HIV-Infected Dendritic Cells Present Endogenous MHC Class II − Restricted Antigens to HIV-Specific CD4 + T Cells. J. Immunol. *197*, 517–532.

Crawford, A., MacLeod, M., Schumacher, T., Corlett, L., and Gray, D. (2006). Primary T Cell Expansion and Differentiation In

Vivo Requires Antigen Presentation by B Cells. J. Immunol. *176*, 3498–3506.

Croft, M. (2010). Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134). Annu. Rev. Immunol. *28*, 57–78.

Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). Annu. Rev. Immunol. *29*, 621–663.

Crotty, S., Kersh, E.N., Cannons, J., Schwartzberg, P.L., and Ahmed, R. (2003). SAP is required for generating long-term humoral immunity. Nature *421*, 2–7.

Cubas, R., and Perreau, M. (2014). The dysfunction of T follicular helper cells. Curr. Opin. HIV AIDS.

Cubas, R., van Grevenynghe, J., Wills, S., Kardava, L., Santich, B.H., Buckner, C.M., Muir, R., Tardif, V., Nichols, C., Procopio, F., et al. (2015). Reversible Reprogramming of Circulating Memory T Follicular Helper Cell Function during Chronic HIV Infection. J. Immunol.

Cubas, R. a, Mudd, J.C., Savoye, A.-L., Perreau, M., van Grevenynghe, J., Metcalf, T., Connick, E., Meditz, A., Freeman, G.J., Abesada-Terk, G., et al. (2013). Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. Nat. Med. *19*, 494–499.

Cunningham, A.F., Serre, K., Toellner, K.M., Khan, M., Alexander, J., Brombacher, F., and MacLennan, I.C.M. (2004). Pinpointing IL-4-independent acquisition and IL-4-influenced maintenance of Th2 activity of CD4 T cells. Eur. J. Immunol. *34*, 686–694.

D'Amico, A., and Wu, L. (2003). The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. J. Exp. Med. *198*, 293–303.

Defrance, T., Casamayor-Palleja M, and Krammer, P.H. (2002). The life and death of a B cell. Cancer Res. *86*, 195–225.

Depoil, D., Zaru, R., Guiraud, M., Chauveau, A., Harriague, J., Bismuth, G., Utzny, C., Müller, S., and Valitutti, S. (2005). Immunological synapses are versatile structures enabling selective T cell polarization. Immunity *22*, 185–194.

Dogan, I., Bertocci, B., Vilmont, V., Delbos, F., Mégret, J., Storck, S., Reynaud, C.-A., and Weill, J.-C. (2009). Multiple layers of B cell memory with different effector functions. Nat. Immunol. *10*, 1292–1299.

Doria-Rose, N.A., Klein, R.M., Manion, M.M., O'Dell, S., Phogat, A., Chakrabarti, B., Hallahan, C.W., Migueles, S.A., Wrammert, J., Ahmed, R., et al. (2009). Frequency and phenotype of human immunodeficiency virus envelope-specific B cells from patients with broadly cross-neutralizing antibodies. J. Virol. *83*, 188–199.

Douek, D.C., Picker, L.J., and Koup, R. a (2003). T cell dynamics in HIV-1 infection. Annu. Rev. Immunol. *21*, 265–304.

Eibel, H., Kraus, H., Sic, H., Kienzler, A.-K., and Rizzi, M. (2014). B cell biology: an overview. Curr. Allergy Asthma Rep. *14*, 434.

Eisenlohr, L.C., Luckashenak, N., Apcher, S., Miller, M. a, and Sinnathamby, G. (2011). Beyond the classical: influenza virus and the elucidation of alternative MHC class II-restricted antigen processing pathways. Immunol. Res. *51*, 237–248.

Embretson, J., Zupancic, M., Ribas, J.L., Burke, A., Racz, P., Tenner-Racz, K., and Haase, A.T. (1993). Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. Nature *362*, 359–362.

Ettinger, R., Sims, G.P., Fairhurst, A.-M., Robbins, R., da Silva, Y.S., Spolski, R., Leonard, W.J., and Lipsky, P.E. (2005). IL-21 Induces Differentiation of Human Naive and Memory B Cells into Antibody-Secreting Plasma Cells. J. Immunol. *175*, 7867–7879.

Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., Cianfarani, F., Odorisio, T., Traidl-hoffmann, C.,

Behrendt, H., et al. (2009). Journal of Clinical Investigation -- Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *119*, 3573–3585.

Fagarasan, S., and Honjo, T. (2000). T-Independent immune response: new aspects of B cell biology. Science *290*, 89–92.

Fahey, L.M., Wilson, E.B., Elsaesser, H., Fistonich, C.D., McGavern, D.B., and Brooks, D.G. (2011). Viral persistence redirects CD4 T cell differentiation toward T follicular helper cells. J. Exp. Med. *208*, 987–999.

Fauci, A.S., Mavilio, D., Kottilil, S., Fauci AS, Mavilio D, and Kottilil S (2005). NK cells in HIV infection: paradigm for protection or targets for ambush. Nat. Rev. Immunol. *5*, 835–843.

Fazilleau, N., Mcheyzer-williams, L.J., Rosen, H., and Mcheyzer-, M.G. (2009). The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. Nat. Immunol. *10*, 375–384.

Ferrante, A., Beard, L., and Feldman, R. (1990). IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens. Pediatr Infect Dis J 16–24.

Ferrari, S., Giliani, S., Insalaco, a, Al-Ghonaium, a, Soresina, a R., Loubser, M., Avanzini, M. a, Marconi, M., Badolato, R., Ugazio, a G., et al. (2001). Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 12614–12619.

Fischl, M.A., Richman, D., Grieco, M.H., Gottlieb, M.S., Volberding, P.A., Laskin, O.L., Leedom, J.M., Groopman, J.E., Mildvan, D., Schooley, R.., et al. (1987). The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. N Engl J Med *317*, 185–191.

Flores-Borja, F., Bosma, A., Ng, D., Reddy, V., Ehrenstein, M.R., Isenberg, D.A., and Mauri, C. (2013). CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. Sci. Transl. Med. *5*, 173ra23.

Fondere, J.-M., Huguet, M.-F., Yssel, H., Baillat, V., Reynes, J., van de Perre, P., and Vendrell, J.-P. (2003). Detection of peripheral HIV-1-specific memory B cells in patients untreated or receiving highly active antiretroviral therapy. Aids *17*, 2323–2330.

Fondere, J.-M., Huguet, M.-F., Macura-Biegun, A., Baillat, V., Ohayon, V., Reynes, J., and Vendrell, J.-P. (2004). Detection and enumeration of circulating HIV-1-specific memory B cells in HIV-1-infected patients. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. *35*, 114–119.

Fukazawa, Y., Lum, R., Okoye, A. a, Park, H., Matsuda, K., Bae, J.Y., Hagen, S.I., Shoemaker, R., Deleage, C., Lucero, C., et al. (2015). B cell follicle sanctuary permits persistent productive simian immunodeficiency virus infection in elite controllers. Nat. Med.

Ganapathy, V., Daniels, T., and Casiano, C.A. (2003). LEDGF/p75: A novel nuclear autoantigen at the crossroads of cell survival and apoptosis. Autoimmun. Rev. *2*, 290–297.

Gaspal, F.M.C., Kim, M.-Y., McConnell, F.M., Raykundalia, C., Bekiaris, V., and Lane, P.J.L. (2005). Mice Deficient in OX40 and CD30 Signals Lack Memory Antibody Responses because of Deficient CD4 T Cell Memory. J. Immunol. *174*, 3891–3896.

Gasteiger G, Ataide M, and Kastenmuller W (2016). Lymph Node – An Organ for T cell Activation and Pathogen Defense. Immunol Rev *271*, 200–220.

Gatto, D., Paus, D., Basten, A., Mackay, C.R., and Brink, R. (2009). Guidance of B Cells by the Orphan G Protein-Coupled Receptor EBI2 Shapes Humoral Immune Responses. Immunity *31*, 259–269.

Geisberger, R., Lamers, M., and Achatz, G. (2006). The riddle of the dual expression of IgM and IgD. Immunology *118*, 429–

437.

Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H., and Stein, H. (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int. J. Cancer *31*, 13–20.

Girard, A., Vergnon-miszczycha, D., Depincé-Berger, A.-E., Roblin, X., Lutch, F., Lambert, C., Rochereau, N., Bourlet, T., Genin, C., and Paul, S. (2016). A High Rate of b7 + Gut-Homing Lymphocytes in HIV-Infected Immunological Nonresponders is Associated With Poor CD4 T-Cell Recovery During Suppressive HAART. J Acquir Immune Defic Syndr *72*, 259–265.

Gitlin, A., Shulman, Z., and Nussenzweig, M.C. (2014). Clonal selection in the germinal center by regulated proliferation and hypermutation. Nature *509*, 637–640.

Goenka, R., Barnett, L.G., Silver, J.S., O'Neill, P.J., Hunter, C. a, Cancro, M.P., and Laufer, T.M. (2011). Cutting edge: dendritic cell-restricted antigen presentation initiates the follicular helper T cell program but cannot complete ultimate effector differentiation. J. Immunol. *187*, 1091–1095.

Good-Jacobson, K.L., Szumilas, C.G., Chen, L., Sharpe, A.H., Tomayko, M.M., and Shlomchik, M.J. (2010). PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. Nat. Immunol. *11*, 535–542.

Grabar, S., Selinger-Leneman, H., Abgrall, S., Pialoux, G., Weiss, L., and Costagliola, D. (2009). Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV. AIDS *23*, 1163–1169.

Gratton, S., Cheynier, R., Dumaurier, M.J., Oksenhendler, E., and Wain-Hobson, S. (2000). Highly restricted spread of HIV-1 and multiply infected cells within splenic germinal centers. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 14566–14571.

Gray, E.S., Moore, P.L., Choge, I.A., Decker, J.M., Bibollet-Ruche, F., Li, H., Leseka, N., Treurnicht, F., Mlisana, K., Shaw, G.M., et al. (2007). Neutralizing antibody responses in acute human immunodeficiency virus type 1 subtype C infection. J. Virol. *81*, 6187–6196.

Gray, E.S., Madiga, M.C., Hermanus, T., Moore, P.L., Wibmer, C.K., Tumba, N.L., Werner, L., Mlisana, K., Sibeko, S., Williamson, C., et al. (2011). The neutralization breadth of HIV-1 develops incrementally over four years and is associated with CD4+ T cell decline and high viral load during acute infection. J. Virol. *85*, 4828–4840.

Grimbacher, B., Hutloff, A., Schlesier, M., Glocker, E., Warnatz, K., Dräger, R., Eibel, H., Fischer, B., Schäffer, A. a, Mages, H.W., et al. (2003). Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. Nat. Immunol. *4*, 261–268.

Gringhuis, S.I., Kaptein, T.M., Wevers, B. a, van der Vlist, M., Klaver, E.J., van Die, I., Vriend, L.E.M., de Jong, M. a W.P., and Geijtenbeek, T.B.H. (2014). Fucose-based PAMPs prime dendritic cells for follicular T helper cell polarization via DC-SIGN-dependent IL-27 production. Nat. Commun. *5*, 5074.

Grouard, G., Durand, I., Filgueira, L., Banchereau, J., and Liu, Y. (1996). Dendrtitic cells capable of stimulating T cells in germinal centres. Nature *384*, 364–367.

Haas, M.K., Levy, D.N., Folkvord, J.M., and Connick, E. (2014). Distinct Patterns of Bcl-2 Expression Occur in R5- and X4-Tropic HIV-1-Producing Lymphoid Tissue Cells Infected Ex Vivo. AIDS Res. Hum. Retroviruses *30*, 1–7.

Hale, J.S., and Ahmed, R. (2015). Memory T Follicular Helper CD4 T Cells. Front. Immunol. *6*, 1–9.

Han S, Hathcock K, Zheng B, Kepler TB, Hodes R, and Kelsoe G (1995). Cellular Interaction in Germinal Centers. J. Immunol. *155*, 556–567.

Haniffa, M., Collin, M., and Ginhoux, F. (2013). Ontogeny and Functional Specialization of Dendritic Cells in Human and Mouse (Elsevier Inc.).

Haynes, N.M., Allen, C.D.C., Lesley, R., Ansel, K.M., Killeen, N., and Cyster, J.G. (2007). Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation. J. Immunol. *179*, 5099–5108.

He, J., Tsai, L.M., Leong, Y.A., Hu, X., Ma, C.S., Chevalier, N., Sun, X., Vandenberg, K., Rockman, S., Ding, Y., et al. (2013). Circulating Precursor CCR7loPD-1hi CXCR5+ CD4+ T Cells Indicate Tfh Cell Activity and Promote Antibody Responses upon Antigen Reexposure. Immunity *39*, 770–781.

Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2009). Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. Nat. Immunol. *10*, 1237–1244.

Heissmeyer, V., and Vogel, K.U. (2013). Molecular control of Tfh-cell differentiation by Roquin family proteins. Immunol. Rev. *253*, 273–289.

Hemelaar, J. (2012). The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. Trends Mol. Med. *18*, 182–192.

Herati, R.S., Reuter, M. a., Dolfi, D. V., Mansfield, K.D., Aung, H., Badwan, O.Z., Kurupati, R.K., Kannan, S., Ertl, H., Schmader, K.E., et al. (2014). Circulating CXCR5+PD-1+ Response Predicts Influenza Vaccine Antibody Responses in Young Adults but not Elderly Adults. J. Immunol. *193*, 3528–3537.

Hersperger, A.R., Migueles, S.A., Betts, M.R., and Connors, M. (2011). Qualitative features of the HIV-specific CD8+ T-cell response associated with immunologic control. Curr. Opin. HIV AIDS *6*, 169–173.

Ho, F., Lortan, J.E., MacLennan, I.C., and Khan, M. (1986). Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations. Eur. J. Immunol. *16*, 1297–1301.

Hong, J.J., Amancha, P.K., Rogers, K., Ansari, A.A., and Villinger, F. (2012). Spatial Alterations between CD4+ T Follicular Helper, B, and CD8+ T Cells during Simian Immunodeficiency Virus Infection: T/B Cell Homeostasis, Activation, and Potential Mechanism for Viral Escape. J. Immunol. *188*, 3247–3256.

Hong, J.J., Amancha, P.K., Rogers, K.A., Courtney, C.L., Havenar-Daughton, C., Crotty, S., Ansari, A.A., and Villinger, F. (2014). Early lymphoid responses and germinal center formation correlate with lower viral load set points and better prognosis of simian immunodeficiency virus infection. J. Immunol. *193*, 797–806.

Hosmalin A, Samri A, Dumaurier MJ, Dudoit Y, Oksenhendler E, Karmochkine M, Autran B, Wain-Hobson S, and Cheynier R. (2001). HIV-specific effector cytotoxic T lymphocytes and HIV-producing cells colocalize in white pulps and germinal centers from infected patients. Blood *97*, 2695–2701.

Hou, B., Saudan, P., Ott, G., Wheeler, M.L., Ji, M., Kuzmich, L., Lee, L.M., Coffman, R.L., Bachmann, M.F., and DeFranco, A.L. (2011). Selective utilization of toll-like receptor and Myd88 signaling in B cells for enhancement of the antiviral germinal center response. Immunity *34*, 375–384.

Hufert, F.T., van Lunzen, J., Janossy, G., Bertram, S., Schmitz, J., Haller, O., Racz, P., and von Laer, D. (1997). Germinal centre CD4+ T cells are an important site of HIV replication in vivo. AIDS *11*, 849–857.

Hughes, A., and Corrah, T. (1990). Human immunodeficiency virus type 2 (HIV2). Blood Rev. *4*, 158–164.

Jardine, J.G., Ota, T., Sok, D., Pauthner, M., Daniel, W., Kalyuzhniy, O., Skog, P.D., Thinnes, T.C., Briney, B., Menis, S., et al. (2015). Priming a broadly neutralizing antibody response to HIV-1 using a germline-targeting immunogen. Science (80-.).

349, 156–161.

Jiang, H., Canfield, S.M., Gallagher, M.P., Jiang, H.H., Jiang, Y., Zheng, Z., and Chess, L. (2010). HLA-E–restricted regulatory CD8+ T cells are involved in development and control of human autoimmune type 1 diabetes. J. Clin. Invest. *120*, 3641–3650.

Jin, X., Bauer, D.E., Tuttleton, S.E., Lewin, S., Gettie, A., Blanchard, J., Irwin, C.E., Safrit, J.T., Mittler, J., Weinberger, L., et al. (1999). Dramatic Rise in Plasma Viremia after CD8 ? T Cell Depletion in Simian Immunodeficiency Virus–infected Macaques. J. Exp. Med. *189*, 991–998.

Jin, X., Wu, H., and Smith, H. (2007). APOBEC3G levels predict rates of progression to AIDS. Retrovirology *4*, 20.

Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., and Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. Nat. Rev. Immunol. *12*, 557–569.

Johnston, R.J., Poholek, A.C., DiToro, D., Yusuf, I., Eto, D., Barnett, B., Dent, A.L., Craft, J., and Crotty, S. (2009). Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. Science *325*, 1006–1010.

Johnston, R.J., Choi, Y.S., Diamond, J. a., Yang, J. a., and Crotty, S. (2012). STAT5 is a potent negative regulator of TFH cell differentiation. J. Exp. Med. *209*, 243–250.

Jutel, M., and Akdis, C.A. (2011). Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol. *66*, 725–732.

Kaminski, D. a, Wei, C., Qian, Y., Rosenberg, A.F., and Sanz, I. (2012). Advances in human B cell phenotypic profiling. Front. Immunol. *3*, 302.

Kelsoe, G. (1996). The germinal center: a crucible for lymphocyte selection. Semin. Immunol. *8*, 179–184.

Kerfoot, S.M., Yaari, G., Patel, J.R., Johnson, K.L., Gonzalez, D.G., Kleinstein, S.H., and Haberman, A.M. (2011). Germinal Center B Cell and T Follicular Helper Cell Development Initiates in the Interfollicular Zone. Immunity *34*, 947–960.

Kiepiela, P., Ngumbela, K., Thobakgale, C., Ramduth, D., Honeyborne, I., Moodley, E., Reddy, S., de Pierres, C., Mncube, Z., Mkhwanazi, N., et al. (2007). CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. Nat. Med. *13*, 46–53.

Kim, H.-P. (2005). Calcium-dependent Activation of Interleukin-21 Gene Expression in T Cells. J. Biol. Chem. *280*, 25291–25297.

Kim, C.H., Rott, L.S., Clark-Lewis, I., Campbell, D.J., Wu, L., and Butcher, E.C. (2001). Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. J. Exp. Med. *193*, 1373–1381.

Kim, H., Verbinnen, B., Tang, X., Lu, L., and Cantor, H. (2010). Inhibition of follicular T helper cells by CD8+ Treg is essential for self tolerance. Nature *467*, 328–332.

Kim, Y., Liu, X., Tanaka, S., Tran, D., and Chung, Y. (2013). Regulation of Germinal Center Reactions by B and T Cells. Antibodies *2*, 554–586.

Kitano, M., Moriyama, S., Ando, Y., Hikida, M., Mori, Y., Kurosaki, T., and Okada, T. (2011). Bcl6 Protein Expression Shapes Pre-Germinal Center B Cell Dynamics and Follicular Helper T Cell Heterogeneity. Immunity *34*, 961–972.

Klasse, P.J. (2014). Neutralization of Virus Infectivity by Antibodies: Old Problems in New Perspectives. Adv. Biol. *2014*, 1–24.

Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., and Kyewski, B. (2009). Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. Nat. Rev. Immunol. *9*, 833–844.

Koch, U., and Radtke, F. (2011). Mechanisms of T Cell Development and Transformation. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *27*, 539–562.

Kohler, S.L., Pham, M.N., Folkvord, J.M., Arends, T., Miller, S.M., Miles, B., Meditz, A.L., McCarter, M., Levy, D.N., and Connick, E. (2016). Germinal Center T Follicular Helper Cells Are Highly Permissive to HIV-1 and Alter Their Phenotype during Virus Replication. J. Immunol.

Kometani, K., and Kurosaki, T. (2015). Differentiation and maintenance of long-lived plasma cells. Curr. Opin. Immunol. *33*, 64–69.

Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. Annu. Rev. Immunol. *27*, 485–517.

Krakower, D.S., and Mayer, K.H. (2015). Pre-Exposure Prophylaxis to Prevent HIV Infection: Current Status, Future Opportunities and Challenges. Drugs *75*, 243–251.

Kroenke, M. a, Eto, D., Locci, M., Cho, M., Davidson, T., Haddad, E.K., and Crotty, S. (2012). Bcl6 and Maf cooperate to instruct human follicular helper CD4 T cell differentiation. J. Immunol. *188*, 3734–3744.

Kuang, X.T., Li, X., Anmole, G., Mwimanzi, P., Shahid, A., Le, A.Q., Chong, L., Qian, H., Miura, T., Markle, T., et al. (2014). Impaired Nef function is associated with early control of HIV-1 viremia. J. Virol. *88*, 10200–10213.

Kurosaki, T., Kometani, K., and Ise, W. (2015). Memory B cells. Nat. Rev. Immunol. *15*, 149–159.

Kwakkenbos, M.J., Diehl, S. a, Yasuda, E., Bakker, A.Q., van Geelen, C.M.M., Lukens, M. V, van Bleek, G.M., Widjojoatmodjo, M.N., Bogers, W.M.J.M., Mei, H., et al. (2010). Generation of stable monoclonal antibody-producing B cell receptor-positive human memory B cells by genetic programming. Nat. Med. *16*, 123–128.

Lambotte, O., and Delfraissy, J.-F. (2005). HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1 infected patients with a spontaneous control of viral replication. Clin. Infect. Dis. *41*, 1053–1056.

Lambotte, O., Ferrari, G., Moog, C., Yates, N.L., Liao, H.-X., Parks, R.J., Hicks, C.B., Owzar, K., Tomaras, G.D., Montefiori, D.C., et al. (2009). Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. AIDS *23*, 897–906.

Lane HC, Masur H, Edgar LC, Whalen G, Rook AH, and Fauci AS. (1983). Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. N. Engl. J. Med. *309*, 453–458.

Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2002). Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. Nat. Rev. Immunol. *2*, 982–987.

Lanzavecchia, A., Ferrarini, M., and Celada, F. (1982). Human {T} cell lines with antigen specificity and helper activity. Eur J Immunol *12*, 468–474.

Laskey, S.B., and Siliciano, R.F. (2014). A mechanistic theory to explain the efficacy of antiretroviral therapy. Nat Rev Micro *12*, 772–780.

Lemoine, S., Morva, A., Youinou, P., and Jamin, C. (2009). Regulatory B cells in autoimmune diseases: How do they work. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1173*, 260–267.

Leong, Y.A., Chen, Y., Ong, H.S., Wu, D., Man, K., Deleage, C., Minnich, M., Meckiff, B.J., Wei, Y., Hou, Z., et al. (2016). CXCR5

+ follicular cytotoxic T cells control viral infection in B cell follicles.

Lindquist, R.L., Shakhar, G., Dudziak, D., Wardemann, H., Eisenreich, T., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C. (2004). Visualizing dendritic cell networks in vivo. Nat. Immunol. *5*, 1243–1250.

Lindqvist, M., Lunzen, J. Van, Soghoian, D.Z., Kuhl, B.D., Ranasinghe, S., Kranias, G., Flanders, M.D., Cutler, S., Yudanin, N., Muller, M.I., et al. (2012). Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. J. Clin. Invest. *122*, 3271–3280.

Linterman, M.A., Beaton, L., Yu, D., Ramiscal, R.R., Srivastava, M., Hogan, J.J., Verma, N.K., Smyth, M.J., Rigby, R.J., and Vinuesa, C.G. (2010). IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. J. Exp. Med. *207*, 353–363.

Linterman, M.A., Pierson, W., Lee, S.K., Kallies, A., Kawamoto, S., Rayner, T.F., Srivastava, M., Divekar, D.P., Beaton, L., Hogan, J.J., et al. (2011). Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. Nat. Med. *17*, 975–82linterm.

Linton, P.-J., Bautista, B., Biederman, E., Bradley, E.S., Harbertson, J., Kondrack, R.M., Padrick, R.C., and Bradley, L.M. (2003). Costimulation via OX40L expressed by B cells is sufficient to determine the extent of primary CD4 cell expansion and Th2 cytokine secretion in vivo. J. Exp. Med. *197*, 875–883.

Little, S.J., McLean, a R., Spina, C. a, Richman, D.D., and Havlir, D. V (1999). Viral dynamics of acute HIV-1 infection. J. Exp. Med. *190*, 841–850.

Liu, D., Xu, H., Shih, C., Wan, Z., Ma, X., Ma, W., Luo, D., and Qi, H. (2015). T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction. Nature *517*, 214–218.

Liu, X., Nurieva, R.I., and Dong, C. (2013). Transcriptional regulation of follicular T-helper (Tfh) cells. Immunol. Rev. *252*, 139–145.

Locci, M., Havenar-daughton, C., Landais, E., Wu, J., Mark, A., Arlehamn, C.L., Su, L.F., Cubas, R., and Davis, M.M. (2013). Human Circulating PD-1+CXCR3−CXCR5+ Memory Tfh Cells Are Highly Functional and Correlate with Broadly Neutralizing HIV Antibody Responses. Immunity *39*, 758–769.

Loder, F., Mutschler, B., Ray, R.J., Paige, C.J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M.C., and Carsetti, R. (1999). B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. J. Exp. Med. *190*, 75–89.

Luban, J. (2012). TRIM5 and the Regulation of HIV-1 Infectivity. Mol. Biol. Int. 426840.

Mackay, F., Schneider, P., Rennert, P., and Browning, J. (2003). BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. Annu. Rev. Immunol. *21*, 231–264.

MacLennan, I.C.M. (1994). Germinal centers. Annu. Rev. Immunol *12*, 117–139.

Madec, Y., Boufassa, F., Porter, K., Prins, M., Sabin, C., d'Arminio Monforte, A., Amornkul, P., Bartmeyer, B., Sannes, M., Venet, A., et al. (2013). Natural history of HIV-control since seroconversion. AIDS *27*, 2451–2460.

Malaspina, A., Moir, S., Kottilil, S., Hallahan, C.W., Ehler, L. a, Liu, S., Planta, M. a, Chun, T.-W., and Fauci, A.S. (2003). Deleterious effect of HIV-1 plasma viremia on B cell costimulatory function. J. Immunol. *170*, 5965–5972.

Van Manen, D., Rits, M.A.N., Beugeling, C., Van Dort, K., Schuitemaker, H., and Kootstra, N.A. (2008). The effect of Trim5 polymorphisms on the clinical course of HIV-1 infection. PLoS Pathog. *4*.

Marinova, E., Han, S., and Zheng, B. (2006). Human germinal center T cells are unique Th cells with high propensity for apoptosis induction. Int. Immunol. *18*, 1337–1345.

Martin, F., and Kearney, J.F. (2002). Marginal-zone B cells. Nat. Rev. Immunol. *2*, 323–335.

Martin, M.P., Gao, X., Lee, J.-H., Nelson, G.W., Detels, R., Goedert, J.J., Buchbinder, S., Hoots, K., Vlahov, D., Trowsdale, J., et al. (2002). Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. Nat. Genet. *31*, 429–434.

Martinez, V., Costagliola, D., Bonduelle, O., N'Go, N., Schnuriger, A., Théodorou, I., Clauvel, J.P., Sicard, D., Agut, H., Debré, P., et al. (2005). Combinaison of HIV-1- specific CD4 Th1 cell reponses and IgG2 antibodies is the best predictor for persistence of long-term non progression. J Infect Dis; J. Infect. Dis. *191*, 191:2053-63.

Martinez-Maza, O., Crabb, E., Mitsuyasu, R.T., Fahey, J.L., and Giorgi, J. V (1987). Infection with the human immunodeficiency virus (HIV) is associated with an in vivo increase in B lymphocyte activation and immaturity. J. Immunol. *138*, 3720–3724.

McGuire, H.M., Vogelzang, A., Warren, J., Loetsch, C., Natividad, K.D., Chan, T.D., Brink, R., Batten, M., and King, C. (2015). IL-21 and IL-4 Collaborate To Shape T-Dependent Antibody Responses. J. Immunol.

McIlroy, D., Autran, B., Cheynier, R., Wain-Hobson, S., Clauvel, J.P., Oksenhendler, E., Debré, P., and Hosmalin, A. (1995). Infection frequency of dendritic cells and CD4+ T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients. J. Virol. *69*, 4737–4745.

McIlroy, D., Troadec, C., Grassi, F., Samri, a, Barrou, B., Autran, B., Debré, P., Feuillard, J., and Hosmalin, a (2001). Investigation of human spleen dendritic cell phenotype and distribution reveals evidence of in vivo activation in a subset of organ donors. Blood *97*, 3470–3477.

Mebius, R.E., and Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. Nat. Rev. Immunol. *5*, 606–616.

Melis, J.P.M., Strumane, K., Ruuls, S.R., Beurskens, F.J., Schuurman, J., and Parren, P.W.H.I. (2015). Complement in therapy and disease. Regulating the complement system with antibody-based therapeutics. Mol. Immunol. *67*, 117–130.

Mendoza, D., Royce, C., Ruff, L.E., Ambrozak, D.R., Quigley, M.F., Dang, T., Venturi, V., Price, D.A., Douek, D.C., Migueles, S.A., et al. (2012). HLA B*5701-positive long-term nonprogressors/elite controllers are not distinguished from progressors by the clonal composition of HIV-specific CD8+ T cells. J. Virol. *86*, 4014–4018.

Meyer-Bahlburg, A., Khim, S., and Rawlings, D.J. (2007). B cell intrinsic TLR signals amplify but are not required for humoral immunity. J. Exp. Med. *204*, 3095–3101.

Migueles, S.A., Sabbaghian, M.S., Shupert, W.L., Bettinotti, M.P., Marincola, F.M., Martino, L., Hallahan, C.W., Selig, S.M., Schwartz, D., Sullivan, J., et al. (2000). HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 2709–2714.

Migueles, S.A., Osborne, C.M., Royce, C., Compton, A.A., Joshi, R.P., Weeks, K.A., Rood, J.E., Berkley, A.M., Sacha, J.B., Cogliano-Shutta, N.A., et al. (2008). Lytic Granule Loading of CD8+ T Cells Is Required for HIV-Infected Cell Elimination Associated with Immune Control. Immunity *29*, 1009–1021.

Mildner, A., and Jung, S. (2014). Development and function of dendritic cell subsets. Immunity *40*, 642–656.

Miles, B., Miller, S.M., Folkvord, J.M., Kimball, A., Chamanian, M., Meditz, A.L., Arends, T., McCarter, M.D., Levy, D.N., Rakasz, E.G., et al. (2015). Follicular regulatory T cells impair follicular T helper cells in HIV and SIV infection. Nat. Commun. *6*, 8608.

De Milito, A., Nilsson, A., Titanji, K., Thorstensson, R., Reizenstein, E., Narita, M., Sönnerborg, A., and Chiodi, F. (2004). Mechanisms of hypergammaglobulinemia and impaired antigen-specific. Blood *103*, 2180–2186.

Miller, J., De Burg, P., and Grant, G. (1965). Thymus and the production of antibody-plaque-forming cells. Nature *208*, 1332–1334.

Mitchison, N.A. (1971). The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates. II. cellular cooperation. 1European J. Immunol. *1*, 18–27.

Moir, S., and Fauci, A.S. (2013). Insights into B cells and HIV-specific B-cell responses in HIV-infected individuals. Immunol. Rev. *254*, 207–224.

Moir, S., Malaspina, A., Li, Y., Chun, T.W., Lowe, T., Adelsberger, J., Baseler, M., Ehler, L.A., Liu, S., Davey, R.T., et al. (2000). B cells of HIV-1-infected patients bind virions through CD21-complement interactions and transmit infectious virus to activated T cells. J. Exp. Med. *192*, 637–646.

Moir, S., Ho, J., Malaspina, A., Wang, W., DiPoto, A.C., O'Shea, M.A., Roby, G., Kottilil, S., Arthos, J., Proschan, M.A., et al. (2008). Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. J. Exp. Med. *205*, 1797–1805.

Moir, S., Buckner, C.M., Ho, J., Wang, W., Chen, J., Waldner, A.J., Posada, J.G., Kardava, L., Shea, M. a O., Kottilil, S., et al. (2010). B cells in early and chronic HIV infection : evidence for preservation of immune function associated with early initiation of antiretroviral therapy. Blood *116*, 5571–5579.

Moir, S., Chun, T.W., and Fauci, A.S. (2011). Pathogenic mechanisms of HIV disease. Annu Rev Pathol *6*, 223–248.

Mombaerts, P., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannouo, V.E. (1992). RAG-l-Deficient M ice Have No Mature 8 and T Lymphocytes. Cell *68*, 869–877.

Moog, C., Fleury, H.J.A., Pellegrin, I., Kirn, A., and Aubertin, A.M. (1997). Autologous and heterologous neutralizing antibody responses following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. J. Virol. *71*, 3734–3741.

Morimoto, S., Kanno, Y., Tanaka, Y., Hashimoto, H., Jacquot, S., Schlossman, S.F., and Yagita, H. (2000). CD134L engagement enhances human B cell Ig production. J. Immunol. *164*, 4097–4104.

Morita, R., Schmitt, N., Bentebibel, S.-E., Ranganathan, R., Bourdery, L., Zurawski, G., Foucat, E., Dullaers, M., Oh, S., Sabzghabaei, N., et al. (2011). Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. Immunity *34*, 108–121.

Morris, L., Distenfeld, A., Amorosi, E., and Karpatkin, S. (1982). Autoimmune thrombocytopenic purpura in homosexual men. Ann Intern Med *96*, 714–717.

Mosmann, T., and Coffman, R. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu. Rev. Immunol. *7*, 145–173.

Moukambi, F., Rabezanahary, H., Rodrigues, V., Racine, G., Robitaille, L., Krust, B., Andreani, G., Soundaramourty, C., Silvestre, R., Laforge, M., et al. (2015). Early Loss of Splenic Tfh Cells in SIV-Infected Rhesus Macaques. PLOS Pathog. *11*, e1005287.

Mouquet, H. (2014). Antibody B cell responses in HIV-1 infection. Trends Immunol. *35*, 549–561.

Mouquet, H., and Nussenzweig, M.C. (2012). Polyreactive antibodies in adaptive immune responses to viruses. Cell. Mol.

Life Sci. *69*, 1435–1445.

Müller, F., Frøland, S.S., and Brandtzaeg, P. (1989). Altered IgG-subclass distribution in lymph node cells and serum of adults infected with human immunodeficiency virus (HIV). Clin. Exp. Immunol. *78*, 153–158.

Ng, W.F., Duggan, P.J., Ponchel, F., Matarese, G., Lombardi, G., David Edwards, a., Isaacs, J.D., and Lechler, R.I. (2001). Human CD4+CD25+ cells: A naturally occurring population of regulatory T cells. Blood *98*, 2736–2744.

Ngo-Giang-Huong, N., Candotti, D., Goubar, a, Autran, B., Maynart, M., Sicard, D., Clauvel, J.P., Agut, H., Costagliola, D., and Rouzioux, C. (2001). HIV type 1-specific IgG2 antibodies: markers of helper T cell type 1 response and prognostic marker of long-term nonprogression. AIDS Res. Hum. Retroviruses *17*, 1435–1446.

Nurieva, R.I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X.O., Kang, H.S., Ma, L., Wang, Y., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., et al. (2008). Generation of T Follicular Helper Cells Is Mediated by Interleukin-21 but Independent of T Helper 1, 2, or 17 Cell Lineages. Immunity *29*, 138–149.

Nurieva, R.I., Chung, Y., Martinez, G.J., Yang, X.O., Tanaka, S., Matskevitch, T.D., Wang, Y., and Dong, C. (2010). Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *325*, 1001–1005.

Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., and Corcoran, L.M. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. Nat. Rev. Immunol. *15*, 160–171.

O'Connell, K.A., Bailey, J.R., and Blankson, J.N. (2009). Elucidating the elite: mechanisms of control in HIV-1 infection. Trends Pharmacol. Sci. *30*, 631–637.

O'Connor, B.P., Vogel, L. a, Zhang, W., Loo, W., Shnider, D., Lind, E.F., Ratliff, M., Noelle, R.J., and Erickson, L.D. (2006). Imprinting the fate of antigen-reactive B cells through the affinity of the B cell receptor. J. Immunol. *177*, 7723–7732.

Okazaki, T., and Honjo, T. (2006). The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. Trends Immunol. *27*, 195–201.

Oksenhendler, E., Bierling, P., Chevret, S., Delfraissy, J.F., Laurian, Y., Clauvel, J.P., and Seligmann, M. (1993). Splenectomy is safe and effective in human immunodeficiency virus-related immune thrombocytopenia. Blood *82*, 29–32.

Palanichamy, A., Barnard, J., Zheng, B., Owen, T., Quach, T., Wei, C., Looney, R.J., Sanz, I., and Anolik, J.H. (2009). Novel Human Transitional B Cell Populations Revealed by B Cell Depletion Therapy. J. Immunol. *182*, 5982–5993.

Pallikkuth, S., Parmigiani, A., Silva, S.Y., George, V.K., Fischl, M., Pahwa, R., and Pahwa, S. (2012). Impaired peripheral blood T-follicular helper cell function in HIV-infected nonresponders to the 2009 H1N1/09 vaccine. Blood *120*, 985–993.

Pallikkuth, S., Sharkey, M., Babic, D.Z., Gupta, S., Stone, G.W., Fischl, M.A., Stevenson, M., and Pahwa, S. (2015). Peripheral T Follicular Helper Cells Are the Major HIV Reservoir Within Central Memory CD4 T Cells in Peripheral Blood from chronic HIV infected individuals on cART. J. Virol. JVI.02883-15.

Panhuys, N. Van (2016). TCR Signal Strength Alters T – DC Activation and Interaction Times and Directs the Outcome of Differentiation. Front. Immunol. *7*, 1–14.

Pantaleo, G., Graziosi, C., Demarest, J.F., Butini, L., Montroni, M., Fox, C.H., Orenstein, J.M., Kotler, D.P., and Fauci, A.S. (1993). HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. Nature *362*, 355–358.

Pantaleo, G., Menzo, S., Vaccarezza, M., Graziosi, C., Cohen, O.J., Demarest, J.F., Montefiori, D., Orenstein, J.M., Fox, C., and Schrager, L.K. (1995). Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. N. Engl. J. Med. *332*, 209–216.

Pantaleo, G., Cohen, O.J., Schacker, T., Vaccarezza, M., Graziosi, C., Rizzardi, G.P., Kahn, J., Fox, C.H., Schnittman, S.M., Schwartz, D.H., et al. (1998). Evolutionary pattern of human immunodeficiency virus (HIV) replication and distribution in lymph nodes following primary infection: implications for antiviral therapy. Nat. Med. *4*, 341–345.

Pape, K. a, Taylor, J., Maul, R., Gearhart, P., and Jenkins, M.K. (2011). Different B Cell Populations Mediate Early and Late Memory During an Endogenous Immune Response. Science (80-.). *331*, 1203–1207.

Park, H.-J., Kim, D.-H., Lim, S.-H., Kim, W.-J., Youn, J., Choi, Y.-S., and Choi, J.-M. (2014). Insights into the role of follicular helper T cells in autoimmunity. Immune Netw. *14*, 21–29.

Pascual, V., Liu, Y., Magalski, A., Bouteiller, O. De, Banchereau, J., and Capra, J.D. (1994). Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. J. Exp. Med. *180*.

Paus, D., Phan, T.G., Chan, T.D., Gardam, S., Basten, A., and Brink, R. (2006). Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. J. Exp. Med. *203*, 1081–1091.

Peeters, M., D'Arc, M., and Delaporte, E. (2014). Origin and diversity of human retroviruses. AIDS Rev. *16*, 23–34.

Pensieroso, S., Galli, L., Nozza, S., Ruffin, N., Castagna, A., Tambussi, G., Hejdeman, B., Misciagna, D., Riva, A., Malnati, M., et al. (2013). B-cell subset alterations and correlated factors in HIV-1 infection. AIDS *27*, 1209–1217.

Pereira, J., Kelly, L., Xu, Y., and Cyster, J. (2009). EBV induced molecule-2 mediates B cell segregation between outer and center follicle. Nature *460*, 1122–1126.

Peressin, M., Holl, V., and Moog, C. (2014). Les anticorps De multiples activités antivirales. 69–75.

Pereyra, F., Addo, M.M., Kaufmann, D.E., Liu, Y., Miura, T., Rathod, A., Baker, B., Trocha, A., Rosenberg, R., Mackey, E., et al. (2008). Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. J. Infect. Dis. *197*, 563–571.

Pernas, M., Sanchez-Merino, V., Casado, C., Merino-Mansilla, A., Olivares, I., Yuste, E., and Lopez-Galindez, C. (2015). HIV-1 dual infected LTNP-EC patients developed an unexpected antibody cross-neutralizing activity. PLoS One *10*, 1–10.

Perreau, M., Savoye, A.-L., De Crignis, E., Corpataux, J.-M., Cubas, R., Haddad, E.K., De Leval, L., Graziosi, C., and Pantaleo, G. (2013). Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. J. Exp. Med. *210*, 143–156.

Petrovas, C., Yamamoto, T., Gerner, M.Y., Boswell, K.L., Wloka, K., Smith, E.C., Ambrozak, D.R., Sandler, N.G., Timmer, K.J., Sun, X., et al. (2012). CD4 T follicular helper cell dynamics during SIV infection. J. Clin. Invest. *122*, 3281–3294.

Pieper, K., Grimbacher, B., and Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. J. Allergy Clin. Immunol. *131*, 959–971.

Pierson, T., Mcarthur, J., and Siliciano, R.F. (2000). Reservoirs For HIV-1 : Mechanisms for Viral Persistence in the Presence of Antiviral Immune Responses and Antiretroviral Therapy. Annu Rev Immunol *18*, 665–708.

Pissani, F., and Streeck, H. (2014). Emerging concepts on T follicular helper cell dynamics in HIV infection. Trends Immunol. 1–9.

Pone EJ, Zan H, Zhang J, Al-Qahtani A, Xu Z, and Casali P (2010). Toll-like receptors and B-cell receptors synergize to induce immunoglobulin class-switch DNA recombination: relevance to microbial antibody responses. Crit. Rev. Immunol. *30*, 1–29.

Poropatich, K., and Sullivan, D.J. (2011). Human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors: The viral, genetic and immunological basis for disease non-progression. J. Gen. Virol. *92*, 247–268.

Pratama, A., and Vinuesa, C.G. (2014). Control of TFH cell numbers: why and how? Immunol. Cell Biol. *92*, 40–48.

Pratama, A., Srivastava, M., Williams, N.J., Papa, I., Lee, S.K., Dinh, X.T., Hutloff, A., Jordan, M. a, Zhao, J.L., Casellas, R., et al. (2015). MicroRNA-146a regulates ICOS-ICOSL signalling to limit accumulation of T follicular helper cells and germinal centres. Nat. Commun. *6*, 6436.

Qi, H., Cannons, J.L., Klauschen, F., and Schwartzberg, P.L. (2008). SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. Nature *455*, 764–769.

Rajewsky, K., Schirrmacher, V., and Jerne, N.K. (1969). The requirement of more than one antigenic determinant for immunogenicity. J. Exp. Med. 1131–1143.

Rasheed, A.U., Rahn, H.P., Sallusto, F., Lipp, M., and Müller, G. (2006). Follicular B helper T cell activity is confined to CXCR5hiICOShi CD4 T cells and is independent of CD57 expression. Eur. J. Immunol. *36*, 1892–1903.

Ray, J.P., Staron, M.M., Shyer, J.A., Ahmed, R., Kaech, S.M., Craft, J., Ray, J.P., Staron, M.M., Shyer, J.A., Ho, P., et al. (2015). The Interleukin-2-mTORc1 Kinase Axis Defines the Signaling , Differentiation , and Metabolism of T Helper 1 and Follicular B Helper T Cells Article The Interleukin-2-mTORc1 Kinase Axis Defines the Signaling , Differentiation , and Metabolism of T Helper 1. Immunity *43*, 1–13.

Reinhardt, R.L., Liang, H.-E., and Locksley, R.M. (2009). Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. Nat. Immunol. *10*, 385–393.

Riesbeck, K., and Nordstrom, T. (2006). Structure and Immunological Action of the Human Pathogen Moraxella catarrhalis IgD-Binding Protein. Crit. Rev. Immunol. *26*, 353–376.

Robert-Guroff, M., Brown, M., and Gallo, R.C. (1985). HTLV-III-neutralizing antibodies in patients with AIDS and AIDS-related complex. Nature *316*, 72–74.

Robinson, H.L. (2002). New Hope for an Aids Vaccine. Nat. Rev. Immunol. *2*.

Rogers, P.R., Song, J., Gramaglia, I., Killeen, N., and Croft, M. (2001). OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. Immunity *15*, 445–455.

Rosenthal, S., and Shevach, M. (1973). Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes. J. Exp. Med. *138*, 1194–1212.

Rosser, E.C., and Mauri, C. (2015). Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function. Immunity *42*, 607–612.

Rosser, E.C., Blair, P.A., and Mauri, C. (2014). Cellular targets of regulatory B cell-mediated suppression. Mol. Immunol. *62*, 296–304.

Ruffin, N., Brezar, V., Ayinde, D., Lefebvre, C., Wiesch, J.S. Zur, van Lunzen, J., Bockhorn, M., Schwartz, O., Hocini, H., Lelievre, J.-D., et al. (2015). Low SAMHD1 expression following T-cell activation and proliferation renders CD4+ T cells susceptible to HIV-1. Aids 1.

Saez-Cirion, A., Jacquelin, B., Barré-Sinoussi, F., and Müller-Trutwin, M. (2014). Immune responses during spontaneous control of HIV and AIDS: what is the hope for a cure? Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. *369*, 20130436.

Sáez-Cirión, A., Lacabaratz, C., Lambotte, O., Versmisse, P., Urrutia, A., Boufassa, F., Barré-Sinoussi, F., Delfraissy, J.-F., Sinet, M., Pancino, G., et al. (2007). HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 6776–6781.

Sáez-Cirión, A., Sinet, M., Shin, S.Y., Urrutia, A., Versmisse, P., Lacabaratz, C., Boufassa, F., Avettand-Fènoël, V., Rouzioux, C., Delfraissy, J.-F., et al. (2009). Heterogeneity in HIV suppression by CD8 T cells from HIV controllers: association with Gag-specific CD8 T cell responses. J. Immunol. *182*, 7828–7837.

Sage, P.T., and Sharpe, A.H. (2015). T follicular regulatory cells in the regulation of B cell responses. Trends Immunol. *36*, 410–418.

Sage, P.T., Paterson, A.M., Lovitch, S.B., and Sharpe, A.H. (2014). The coinhibitory receptor CTLA-4 controls B cell responses by modulating T follicular helper, T follicular regulatory, and T regulatory cells. Immunity *41*, 1026–1039.

Salgado, M., Swanson, M.D., Pohlmeyer, C.W., Buckheit, R.W., Wu, J., Archin, N.M., Williams, T.M., Margolis, D.M., Siliciano, R.F., Garcia, J.V., et al. (2014). HLA-B*57 elite suppressor and chronic progressor HIV-1 isolates replicate vigorously and cause CD4+ T cell depletion in humanized BLT mice. J. Virol. *88*, 3340–3352.

Sambasivarao, S. V (2008). Integrase, LEDGF/p75 and HIV Replication. Cell Mol Life Sci. *65*, 1403–1424.

Schacker, T., Collier, A.C., Hughes, J., Shea, T., and Corey, L. (1996). Clinical and Epidemiologic Features of Primary HIV Infection. Ann. Intern. Med. *125*, 257–264.

Schaerli, P., Willimann, K., Lang, a B., Lipp, M., Loetscher, P., and Moser, B. (2000). CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. J. Exp. Med. *192*, 1553–1562.

Scheid, J.F., Mouquet, H., Feldhahn, N., Seaman, M.S., Velinzon, K., Pietzsch, J., Ott, R.G., Anthony, R.M., Zebroski, H., Hurley, A., et al. (2009a). Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. Nature *458*, 636–640.

Scheid, J.F., Mouquet, H., Feldhahn, N., Walker, B.D., Pereyra, F., Cutrell, E., Seaman, M.S., Mascola, J.R., Wyatt, R.T., Wardemann, H., et al. (2009b). A method for identification of HIV gp140 binding memory B cells in human blood. J. Immunol. Methods *343*, 65–67.

Schroeder, H.W.J., and Cavacini, L. (2010). Structure and Function of Immunoglobulins (author manuscript). J. Allergy Clin. Immunol. *125*, S41–S52.

Schultz, B.T., Teigler, J.E., Pissani, F., Oster, A.F., Kranias, G., Alter, G., Marovich, M., Eller, M.A., Dittmer, U., Robb, M.L., et al. (2016). Circulating HIV-Specific Interleukin-21+CD4+ T Cells Represent Peripheral Tfh Cells with Antigen-Dependent Helper Functions. Immunity *44*, 167–178.

Schwartz, R.H. (2003). T cell anergy. Annu. Rev. Immunol. *21*, 305–334.

Schwickert, T.A., Lindquist, R.L., Shakhar, G., Livshits, G., Skokos, D., Kosco-Vilbois, M.H., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C. (2007). In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure. Nature *446*, 83–87.

Shapiro-Shelef, M., and Calame, K. (2005). Regulation of plasma-cell development. Nat. Rev. Immunol. *5*, 230–242.

Shapiro-Shelef, M., Lin, K.-I., Savitsky, D., Liao, J., and Calame, K. (2005). Blimp-1 is required for maintenance of long-lived plasma cells in the bone marrow. J. Exp. Med. *202*, 1471–1476.

Shinkai, Y., Rathbun, G., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A.M., and Alt, F.W. (1992). RAG-2-Deficient Mice Lack Mature Lymphocytes Owing to Inability to Initiate V (D) J Rearrangement. Cell *68*, 855–867.

Shirai, A., Cosentino, M., Leitman-Klinman, S.F., and Klinman, D.M. (1992). Human immunodeficiency virus infection induces both polyclonal and virus-specific B cell activation. J. Clin. Invest. *89*, 561–566.

Shive, C.L., Biancotto, A., Funderburg, N.T., Pilch-, H.A., Valdez, H., Margolis, L., Sieg, S.F., Mccomsey, G.A., Rodriguez, B., and Lederman, M.M. (2012). HIV-1 is not a major driver of increased plasma IL-6 levels in chronic HIV-1 disease. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. *61*, 145–152.

Sicard, A., Koenig, A., Graff-Dubois, S., Dussurgey, S., Rouers, A., Dubois, V., Blanc, P., Chartoire, D., Errazuriz-Cerda, E., Paidassi, H., et al. (2015). B Cells Loaded with Synthetic Particulate Antigens: A Versatile Platform to Generate Antigen-Specific Helper T Cells for Cell Therapy. Nano Lett. *13*, 297–308.

De Silva, N.S., and Klein, U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. Nat. Rev. Immunol. *15*, 137–148.

Simek, M.D., Rida, W., Priddy, F.H., Pung, P., Carrow, E., Laufer, D.S., Lehrman, J.K., Boaz, M., Tarragona-Fiol, T., Miiro, G., et al. (2009). Human immunodeficiency virus type 1 elite neutralizers: individuals with broad and potent neutralizing activity identified by using a high-throughput neutralization assay together with an analytical selection algorithm. J. Virol. *83*, 7337–7348.

Simpson, N., Gatenby, P. a., Wilson, A., Malik, S., Fulcher, D. a., Tangye, S.G., Manku, H., Vyse, T.J., Roncador, G., Huttley, G. a., et al. (2010). Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. *62*, 234–244.

Smith, K.G.C., Hewitson, T.D., Nossal, G.J. V, and Tarlinton, D.M. (1996). The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. Eur. J. Immunol. *26*, 444–448.

Sondermann, P., Pincetic, A., Maamary, J., Lammens, K., and Ravetch, J. V (2013). General mechanism for modulating immunoglobulin effector function. Proc. Natl. Acad. Sci. *110*, 9868–9872.

Spensieri, F., Borgogni, E., Zedda, L., Bardelli, M., Buricchi, F., and Volpini, G. (2013). T cells expand after vaccination , exert helper function , and predict antibody responses. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2–7.

Stauss, D., Brunner, C., Berberich-siebelt, F., Höpken, U.E., and Lipp, M. (2016). The transcriptional coactivator Bob 1 promotes the development of follicular T helper cells via Bcl 6. EMBO J. *35*, 1–18.

Supachai Rerks-Ngarm, Punnee Pitisuttithum, S.N., Jaranit Kaewkungwal, Joseph Chiu, Robert Paris, Nakorn Premsri, Chawetsan Namwat, Mark de Souza, Elizabeth Adams, Michael Benenson, Sanjay Gurunathan, J.T., and John G. McNeil, Donald P. Francis, Donald Stablein, Deborah L. Birx, Supamit Chunsuttiwat, Chirasak Khamboonruang, Prasert Thongcharoen, Merlin L. Robb, Nelson L. Michael, Prayura Kunasol, and J.H.K. (2009). Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. N. Engl. J. Med. *361*, 2209–2220.

Swingler, S., Zhou, J., Swingler, C., Dauphin, A., Greenough, T., Jolicoeur, P., and Stevenson, M. (2008). Evidence for a pathogenic determinant in HIV-1 Nef involved in B cell dysfunction in HIV/AIDS. Cell Host Microbe *4*, 63–76.

Tangye, S.G., Deenick, E.K., Palendira, U., and Ma, C.S. (2012). T cell-B cell interactions in primary immunodeficiencies. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1250*, 1–13.

Teillaud, J.L. (2012). Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC). eLS.

Tomaras, G.D., Yates, N.L., Liu, P., Qin, L., Fouda, G.G., Chavez, L.L., Decamp, A.C., Parks, R.J., Ashley, V.C., Lucas, J.T., et al. (2008). Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. J. Virol. *82*, 12449–12463.

Turner, B.G., and Summers, M.F. (1999). Structural biology of HIV. J. Mol. Biol. *285*, 1–32.

Vanham, G., Penne, L., Devalck, J., Kestens, L., Colebunders, R., Bosmans, E., Thielemans, K., and Ceuppens, J.L. (1999). Decreased CD40 ligand induction in CD4 T cells and dysregulated IL-12 production during HIV infection. Clin. Exp. Immunol. *117*, 335–342.

Vargas-inchaustegui, D.A., Demers, A., Julia, M., Kang, G., Ball, D., Tuero, I., Mohanram, V., Demberg, T., Karpova, T.S., Li, Q., et al. (2016). Vaccine Induction of Lymph Node − Resident Simian Immunodeficiency Virus Env-Specific T Follicular Helper Cells in Rhesus Macaques. J. Immunol. *196*, 1700–1710.

Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., and Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor-beta "reprograms" the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. Nat. Immunol. *9*, 1341–1346.

Victora, G.D., and Nussenzweig, M.C. (2012). Germinal centers. Annu. Rev. Immunol. *30*, 429–457.

Vidarsson, G., Dekkers, G., and Rispens, T. (2014). IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. Front. Immunol. *5*, 1–17.

Vieira, P., and Rajewsky, K. (1990). Persistence of memory B cells in mice deprived of T cell help. Int. Immunol. *2*, 487–494.

Villadangos, J. a, and Schnorrer, P. (2007). Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. Nat. Rev. Immunol. *7*, 543–555.

Vingert, B., Perez-Patrigeon, S., Jeannin, P., Lambotte, O., Boufassa, F., Lemaître, F., Kwok, W.W., Theodorou, I., Delfraissy, J.F., Théze, J., et al. (2010). HIV controller CD4+ T cells respond to minimal amounts of Gag antigen due to high TCR avidity. PLoS Pathog. *6*.

Vinuesa, C.G., Cook, M.C., Angelucci, C., Athanasopoulos, V., Rui, L., Hill, K.M., Yu, D., Domaschenz, H., Whittle, B., Lambe, T., et al. (2005). A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. Nature *435*, 452–458.

Vinuesa, C.G., Linterman, M.A., Yu, D., and MacLennan, I.C.M. (2016). Follicular Helper T Cells. Annu. Rev. Immunol. *34*, annurev-immunol-041015-055605.

Vogelzang, A., McGuire, H.M., Yu, D., Sprent, J., Mackay, C.R., and King, C. (2008). A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells. Immunity *29*, 127–137.

Warnatz, K., Bossaller, L., Salzer, U., Skrabl-Baumgartner, A., Schwinger, W., Van Der Burg, M., Van Dongen, J.J.M., Orlowska-Volk, M., Knoth, R., Durandy, A., et al. (2006). Human ICOS deficiency abrogates the germinal center reaction and provides a monogenic model for common variable immunodeficiency. Blood *107*, 3045–3052.

We Paul, J.O. (1987). B-cell stimulatory factor-1/Interleukin 4. Annu. Rev. Immunol. *5*, 429–459.

Weinstein, J.S., Herman, E.I., Lainez, B., Licona-Limón, P., Esplugues, E., Flavell, R., and Craft, J. (2016). TFH cells progressively differentiate to regulate the germinal center response. Nat. Immunol.

Weiss, R.A., Clapham, P.R., Cheingsong-Popov, R., Dalgleish, A.G., Carne, C.A., Weller, I. V, and Tedder, R.S. (1985). Neutralization of human T-lymphotropic virus type III by sera of AIDS and AIDS-risk patients. Nature *316*, 69–72.

Weller, S., Braun, M.C., Tan, B.K., Rosenwald, A., Cordier, C., Ellen, M., Plebani, A., Kumararatne, D.S., Bonnet, D., Tournilhac, O., et al. (2004). Human blood IgM memory B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire Human blood IgM " memory " B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobu. Blood *104*, 3647–3654.

William, J., Euler, C., Christensen, S., and Shlomchik, M.J. (2002). Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers. Science (80-.). *297*, 2066–2070.

Wilson, N.S., El-Sukkari, D., Belz, G.T., Smith, C.M., Steptoe, R.J., Heath, W.R., Shortman, K., and Villadangos, J.A. (2003). Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. Blood *102*, 2187–2194.

Woof, J.M., and Ken, M. a. (2006). The function of immunoglobulin A in immunity. J. Pathol. *208*, 270–282.

Wurster, A.L., Rodgers, V.L., White, M.F., Rothstein, T.L., and Grusby, M.J. (2002). Interleukin-4-mediated protection of primary B cells from apoptosis through Stat6-dependent up-regulation of Bcl-xL. J. Biol. Chem. *277*, 27169–27175.

Xie, J., Lu, W., Samri, A., Costagliola, D., Schnuriger, A., da Silva, B., Blanc, C., Larsen, M., Theodorou, I., Rouzioux, C., et al. (2010). Distinct differentiation profiles of HIV-Gag and Nef-specific central memory CD8+ T cells associated with HLA-B57/5801 and virus control. AIDS *24*, 2323–2329.

Xu, H., Wang, X., Malam, N., Aye, P.P., Alvarez, X., Lackner, A.A., and Veazey, R.S. (2015a). Persistent SIV infection drives differentiation, aberrant accumulation, and latent infection of germinal center follicular T helper cells. J. Virol. *90*, JVI.02471-15.

Xu, H., Wang, X., Malam, N., Lackner, A. a, and Veazey, R.S. (2015b). Persistent Simian Immunodeficiency Virus Infection Causes Ultimate Depletion of Follicular Th Cells in AIDS. J. Immunol. *195*, 4351–4357.

Xu, W., Santini, P.A., Sullivan, J.S., He, B., Shan, M., Susan, C., Dyer, W.B., Ketas, T.J., Chadburn, A., Cohen-gould, L., et al. (2009). HIV-1 evades virus-specific IgG2 and IgA class switching by targeting systemic and intestinal B cells via long-range intercellular conduits. Nat. Immunol. *10*, 1008–1017.

Yusuf, I., Kageyama, R., Monticelli, L., Johnston, R.J., Hansen, K., Barnett, B., and Crotty, S. (2010). Germinal Center T Follicular Helper Cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150). J. Immunol. *185*, 190–202.

Zandman-Goddard, G., and Shoenfeld, Y. (2002). HIV and autoimmunity. Autoimmun. Rev. *1*, 329–337.

Zhang, X., Ing, S., Fraser, A., Chen, M., Khan, O., Zakem, J., Davis, W., and Quinet, R. (2013). Follicular helper T cells: new insights into mechanisms of autoimmune diseases. Ochsner J. *13*, 131–139.

Zhou, M., and Ruprecht, R.M. (2014). Are anti-HIV IgAs good guys or bad guys? Retrovirology *11*, 1–11.

Zolla-Pazner, S. (2004). Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. Nat. Rev. Immunol. *4*, 199–210.

Zotos, D., Coquet, J.M., Zhang, Y., Light, A., D'Costa, K., Kallies, A., Corcoran, L.M., Godfrey, D.I., Toellner, K.-M., Smyth, M.J., et al. (2010). IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. J. Exp. Med. *207*, 365–378.

ANNEXES

1- Description de la cohorte CODEX……..211
2- Morphologie des spots obtenus par la technique d'Elispot B……213
3- Réponses B mémoires anti-p24 chez les EC……215
4- Article publié en 2015 dans le journal « *Nano letters* »……217
5- Article publié en 2016 dans le journal « *Journal of Immunology* »……229
6- Revue en révision au journal « *Frontiers in Immunology* »……246
7- Article en révision au journal « *European Journal of Immunology* »……..274

Cohortes dans l'infection par le VIH et hépatites, Co-Infection menées sous l'égide de l'ANRS (Octobre 2015)*

CO21 « Cohorte des extrêmes »

« Cohorte multicentrique des patients VIH ayant un profil d'évolution extrême : CODEX »

Début des inclusions	**06/02/2012**
Situation	**En cours d'inclusion**
Équipe de coordination	
Investigateurs coordonnateurs	Pr. O. Lambotte (Service de Médecine Interne, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre) Pr. B. Autran (Laboratoire d'Immunologie Cellulaire, Hôpital Pitié-Salpétrière, Paris) Virologie Pr. C. Rouzioux (Hôpital Necker, Paris) Immunologie A. Saez-Cirion (Institut Pasteur, Paris), B. Autran (Hôpital Pitié Salpétrière, Paris) & A. Venet (Inserm U1012, Bicêtre)
Méthodologie et gestion	Pr. L. Meyer, F Boufassa (INSERM 1018, Le Kremlin Bicêtre)
Promoteur	Inserm-ANRS
Objectif	Chez les patients VIH-1 positif asymptomatiques depuis au moins 5 ans après infection par le VIH en absence de traitement antirétroviral, qu'ils répondent aux définitions de patients ALT et/ou HIC ainsi que chez les patients sous traitement antirétroviral et en « contrôle après arrêt de traitement antirétroviral », étudier leur évolution clinique et immuno-virologique et définir les paramètres du virus et de l'hôte associés à la non-progression de l'infection.
Méthodologie	Cohorte ouverte prospective multicentrique nationale de sujets infectés par le VIH-1
Durée de l'étude	6 ans, éventuellement renouvelables Inclusions : 5 ans
Sujets à inclure	Des sujets « ALT » : sujets Asymptomatiques à Long Terme : sujets VIH-1-séropositifs depuis au moins 8 ans ayant un taux de lymphocytes CD4+ supérieur à 600/mm^3 et stable ou en augmentation (pente positive ou nulle) sur au minimum 3 examens consécutifs réalisés durant les 5 dernières années quelle que soit la charge virale en absence de traitement antirétroviral. Des sujets « HIC (HIV Controllers) » : sujets séropositifs pour le VIH-1 depuis au moins 5 ans, asymptomatiques, avec les 5 dernières charges virales en ARN-VIH plasmatique consécutives < 400 copies/mL quel que soit le taux de CD4 + en absence de traitement antirétroviral. Des sujets « ALT-HIC » : sujets répondant à la double définition ALT et HIC c'est à dire des sujets VIH-1 séropositifs depuis au moins 8 ans et taux de lymphocytes CD4+ supérieur à 600/mm^3 avec un taux stable ou en augmentation (pente positive ou nulle) sur au minimum 3 examens consécutifs réalisés durant les 5 dernières années et avec les 5 dernières charges virales en ARN-VIH plasmatique consécutives < 400 copies/mL. Des sujets en « contrôleurs post-traitement » (ou post-treatment controllers, PTC) : sujets ayant eu une charge virale en ARN-VIH plasmatique > 2000 copies/mL avant l'initiation d'un traitement antirétroviral que ce soit en primo-infection ou en phase chronique et dont le traitement a été maintenu pendant au moins 12 mois; chez qui, une fois le traitement antirétroviral arrêté, la charge virale est restée < 400 copies/mL pendant plus de 12 mois avec une exception pour un blip (une charge virale plasmatique au-dessus de 400 copies/mL) encadré par deux charges virales < 400 copies/mL. La dernière charge virale plasmatique au moment de l'inclusion devra, dans tous les cas, être < 400 copies/mL.
Critères d'évaluation	Survenue d'évènements cliniques, étude des paramètres virologiques, génétiques et immunologiques associés à la non-progression
Sujets inclus/nbre espéré	271/300
Dernière version du protocole	6.0 du 24/11/2014

Pour information Pr Olivier LAMBOTTE
Service de médecine interne du CHU Bicêtre
Laboratoire Inserm U1012
Faculté de Médecine Paris Sud
Université Paris 11
63 rue Gabriel Péri
94276 Le Kremlin Bicêtre
Tél : 01 45 21 27 83
Fax : 01 49 59 67 53

Courriel: olivier.lambotte@bct.aphp.fr

Pr Brigitte AUTRAN
Laboratoire d'Immunologie Cellulaire
Hôpital Pitié-Salpêtrière
UMR-S945
UPMC Université Paris 06
83 boulevard de l'Hôpital
75013 Paris

Tél : 01 42 17 74 81
Fax : 01 42 17 74 90
Courriel: brigitte.autran@psl.aphp.fr

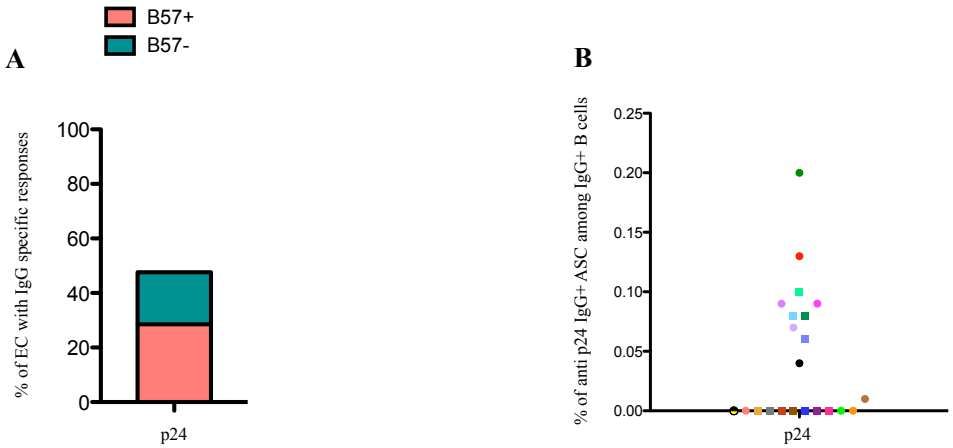
Publications :

Boufassa F, Lechenadec J, Meyer L, Costagliola D, Hunt PW, Pereyra F, Deeks S, Pancino G, Taulera O, Lichterfeld M, Delobel P, Saez-Cirion A, Lambotte O; ANRS CO18 HIV Controllers Cohort, the Cascade Collaboration in Eurocoord, the SCOPE Cohort and the International HIV Controllers Study. Blunted Response to Combination Antiretroviral Therapy in HIV Elite Controllers: An International HIV Controller Collaboration. PLoS One. 2014 Jan 17;9(1):e85516. doi: 10.1371/journal.pone.0085516

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; and the ANRS CO21 CODEX Study Group. Elevated IP10 levels are associated with immune activation and low CD4+ T-cell counts in HIV controller patients. AIDS. 2013 Dec 29.

Document en lien avec les résultats de l'axe 2.

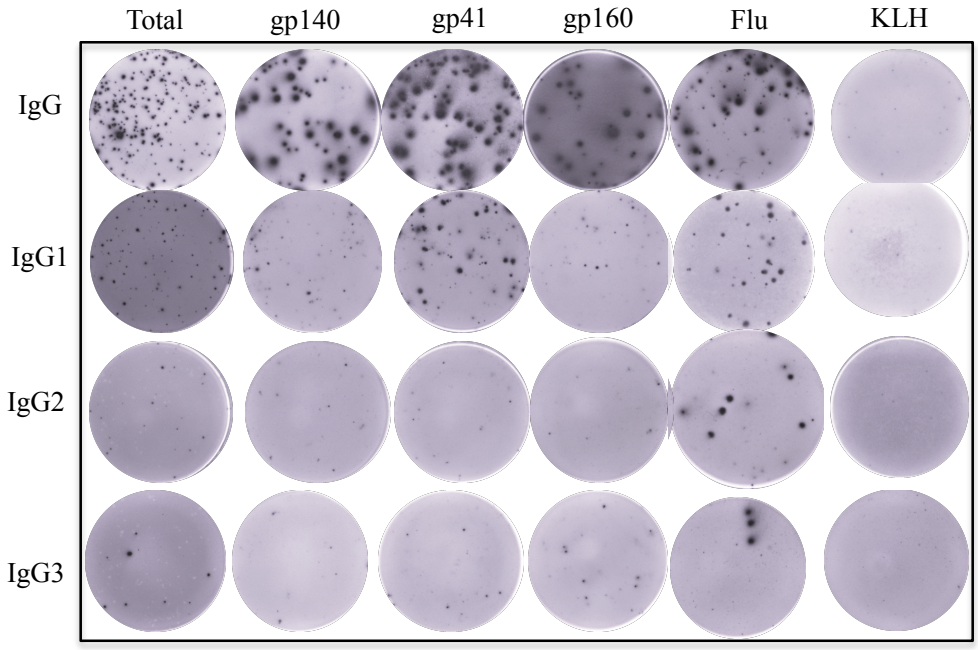
Représentation des réponses B mémoires dirigées contre un antigène de la capside du VIH (p24) chez les EC.



EC present memory B cell responses against HIV capsid antigen. (A) Proportion of EC (HLA-B57^{+} EC in green and HLA-B*57^{-} in orange) secreting anti-p24 IgG^{+} ASC. **(B)** Frequency of anti-p24 IgG^{+} ASC for each EC. Each individual has been represented by a specific dot on each graph (shape and color).

Document en lien avec les résultats de l'axe 2.

La morphologie et la taille des spots obtenus par la technique d'Elispot B varient selon l'antigène ou l'anticorps coaté et l'anticorps de révélation utilisé.



Examples of spots according to coated antigen and revelation Abs. For total Ig detection, anti-IgG Abs were coated and 1500 cells (IgG, IgG1) or 3000 cells (IgG2, IgG3) were plated. For specific Ig detection HIV-envelope antigen ($gp140_{Yu2b}$, $gp41_{S30}$ or $gp160_{THO}$), Influenza antigen (Flu from the 2015 VAXIGRIP vaccine) or KLH (negative control) were coated and 150 000 cells (IgG, IgG1) or 300 000 cells were plated (IgG2, IgG3). Spots presented are not from the same donor.

NANO LETTERS

Letter

pubs.acs.org/NanoLett

B Cells Loaded with Synthetic Particulate Antigens: A Versatile Platform To Generate Antigen-Specific Helper T Cells for Cell Therapy

Antoine Sicard,[†,‡] Alice Koenig,[†,‡] Stéphanie Graff-Dubois,[§] Sébastien Dussurgey,[∥] Angéline Rouers,[§] Valérie Dubois,[⊥] Pascal Blanc,[†] Dimitri Chartoire,[†] Elisabeth Errazuriz-Cerda,[▽] Helena Paidassi,[†] Morgan Taillardet,[†] Emmanuel Morelon,[†,‡] Arnaud Moris,[§] Thierry Defrance,[†] and Olivier Thaunat*[,†,‡]

[†]International Center for Infectiology Research (CIRI); French National Institute of Health and Medical Research (INSERM) Unit 1111, Claude Bernard Lyon 1 University; Ecole Normale Supérieure de Lyon, CNRS, UMR 5308, 69007 Lyon, France

[‡]Edouard Herriot Hospital, Transplantation, Nephrology and Clinical Immunology Department, 69003 Lyon, France

[§]Sorbonne University, UPMC Univ Paris 06, INSERM U1135, CNRS ERL 8255, Center for Immunology and Microbial Infections – CIMI-Paris, F-75013, Paris, France

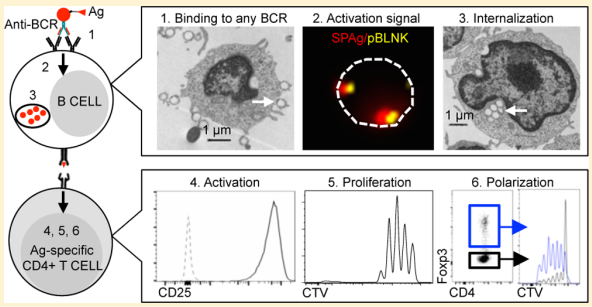
[∥]SFR Biosciences, UMS344/US8, Inserm, CNRS, Claude Bernard Lyon-1 University, Ecole Normale Supérieure, 69007 Lyon, France

[⊥]French National Blood Service (EFS), 69007 Lyon, France

[▽]Center for Quantitative imaging (CIQLE), SFR Santé Lyon-Est, Lyon 1 University, 69372 Lyon, France

Supporting Information

ABSTRACT: Adoptive cell therapy represents a promising approach for several chronic diseases. This study describes an innovative strategy for biofunctionalization of nanoparticles, allowing the generation of synthetic particulate antigens (SPAg). SPAg activate polyclonal B cells and vectorize noncognate proteins into their endosomes, generating highly efficient stimulators for ex vivo expansion of antigen-specific CD4+ T cells. This method also allows harnessing the ability of B cells to polarize CD4+ T cells into effectors or regulators.



KEYWORDS: *bioengineered nanoparticle, biomimetic, B cell, antigen-presenting cell, CD4+ T cell, cell therapy*

For decades, immunotherapy has exclusively relied on in vivo administration of pharmacological preparations aiming at either stimulating (i.e., vaccines) or dampening (i.e., immunosuppressive drugs) patients' immune responses. On the basis of promising results obtained in animals models, the concept of ex vivo manipulation of immune cells for retransfer as cell therapy: "adoptive cell therapy" (ACT), has progressively emerged.[1,2] The demonstration in the late 80s that the transfer of ex vivo expanded tumor-infiltrating T lymphocytes to patients with melanoma could lead to cancer regression paved the way for the translation of ACT to the clinic.[3] ACT is currently considered as a central strategy to treat severe chronic conditions as diverse as viral infections, cancers, autoimmune diseases, allograft rejection, or graft versus host disease (218 clinical studies currently registered in https://clinicaltrials.gov/).

Much of initial experimental and clinical studies in ACT have focused on cytotoxic CD8+ T cells because of their remarkable ability to kill tumors or virus-infected cells.[2,4−7] However, attention has progressively shifted to helper CD4+ T cells, which are endowed with a much wider spectrum of functions.[2,8,9] Indeed, CD4+ T cells are not only very efficient for tumor and virus destruction through direct cytotoxicity and promotion of cytotoxic CD8+ T cells responses[10−14] but also necessary for the generation of protective antibody-responses.[15] Besides the promotion of effector responses, CD4+ T cells are also endowed with unique immune regulatory properties.[16] The versatility of CD4+ T cells is due to their plasticity, which allows them to differentiate into various functional subsets according to the microenvironment in which they are activated.[16]

Importantly, several experimental studies have illustrated that ACT was more efficient and associated with fewer side effects when antigen-specific CD4+ T cells were used instead of polyclonal CD4+ T cells.[2,8,9,17] Two recent studies have validated this concept in the clinic. First, ex-vivo-expanded

Received: September 19, 2015
Revised: December 8, 2015
Published: December 9, 2015

ACS Publications © 2015 American Chemical Society

DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b03801
Nano Lett. 2016, 16, 297−308

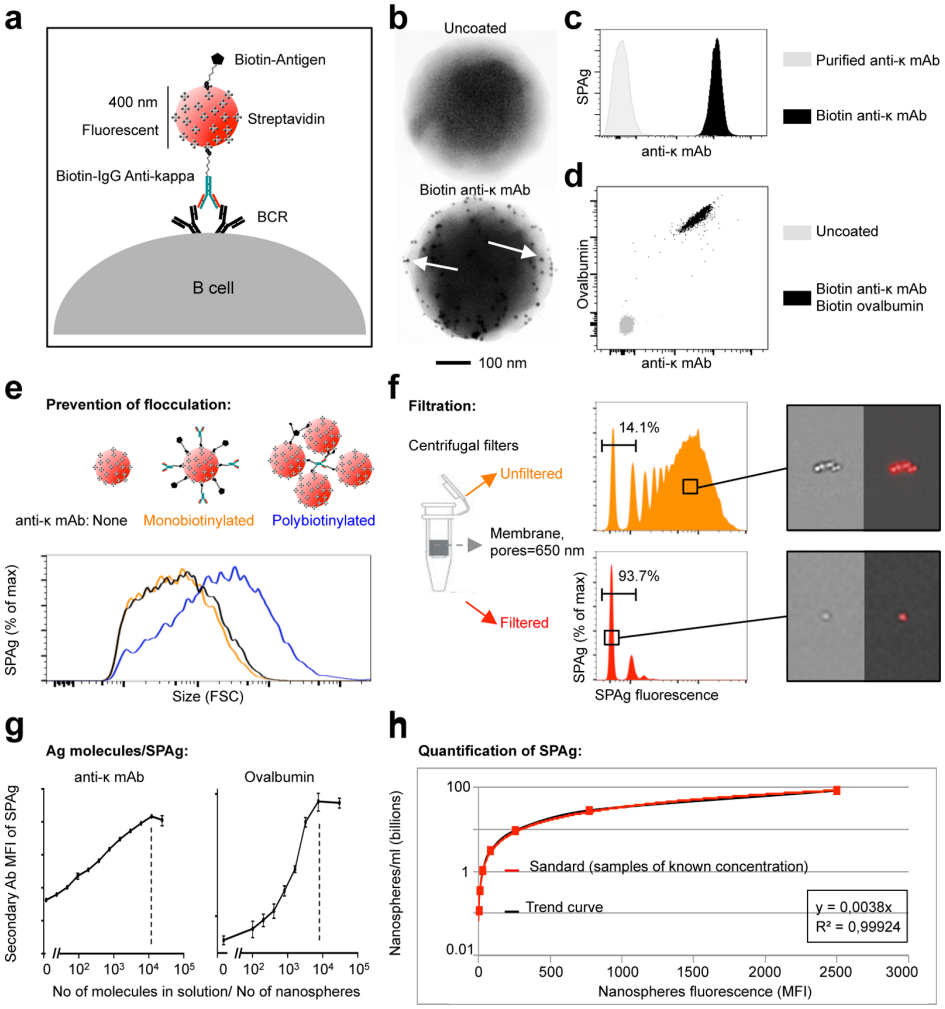


Figure 1. Biofunctionalization of nanospheres to generate synthetic particulate antigens (SPAg). (a) Schematic representation of the system used to vectorize chosen antigen into noncognate B cell; 400 nm fluorescent streptavidin-coated nanospheres are decorated with biotinylated-antigens and biotinylated-monoclonal antibody (mAb) directed against a framework region of B cell receptor's κ light chains (anti-κ mAb). (b) Verification of nanospheres coating with anti-κ mAb by electron microscopy (EM) using gold-particle-coupled anti-IgG secondary antibody. (c) Coating efficiency using biotinylated (bonds; black histogram) versus purified (adsorption; gray histogram) anti-κ mAb was compared in flow cytometry using a PE-conjugated anti-IgG secondary antibody. (d) Verification of double coating with biotinylated anti-κ mAb and biotinylated ovalbumin by flow cytometry using a PE-conjugated anti-IgG secondary antibody and a FITC-conjugated antiovalbumin mAb. (e) Impact of polybiotinylation (blue histogram) vs monobiotinylation (orange histogram) of the proteins used for coating on nanospheres flocculation assessed by flow cytometry analysis of the particle size (the forward-scattered light parameter (FSC) is proportional to the size of the analyzed event). (f) After coating of nanospheres with monobiotinylated proteins, aggregates were excluded by filtration through a low-binding membrane with a pore size of 650 nm. Histogramms and representative images of the SPAg fluorescence analyzed by imaging flow cytometry in the upper (orange) and lower (red) chambers of centrifugal devices. (g) Estimation of the number of molecules coated on each nanosphere by the saturation curve method. Nanospheres were incubated with increasing amounts of biotinylated ovalbumin or anti-κ mAb. Ovalbumin and anti-κ mAb binding was measured by flow cytometry with a FITC-conjugated antiovalbumin mAb or a PE-conjugated anti-IgG mAb, respectively. (h) Numeration of SPAg by spectrophotometry using the standard curve method. Uncoated nanospheres samples of known concentrations are used as standards. For all panels, data are representative of more than three independent experiments.

autologous CD4+ T-cell clones specific for a given melanoma-associated antigen were able to induce durable clinical remission in a patient with refractory metastatic melanoma.[18] Second, adoptive transfer of CD4+ T cells recognizing a unique tumor epitope could mediate regression of a metastatic epithelial cancer.[19] Such antigen-specific CD4+ T cells are however rare and need to be specifically expanded for ACT.[20] Nanobiotechnology represents a powerful tool to reach this crucial objective.[21−28]

Physiologically, clonal expansion of antigen-specific CD4+ T cells requires engagement of the T cell antigen-specific receptor (TCR) by the antigen-class II major histocompatibility complex (MHC-II) on the surface of antigen-presenting cells (APCs). Although reports have shown that it was possible to expand antigen-specific T cells ex vivo with artificial antigen presentation by cell-free substitutes, these emerging technologies still warrant preclinical and clinical validations.[21,29] Current clinical approaches aiming at expanding CD4+ T cells clones

DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b03801
Nano Lett. 2016, 16, 297−308

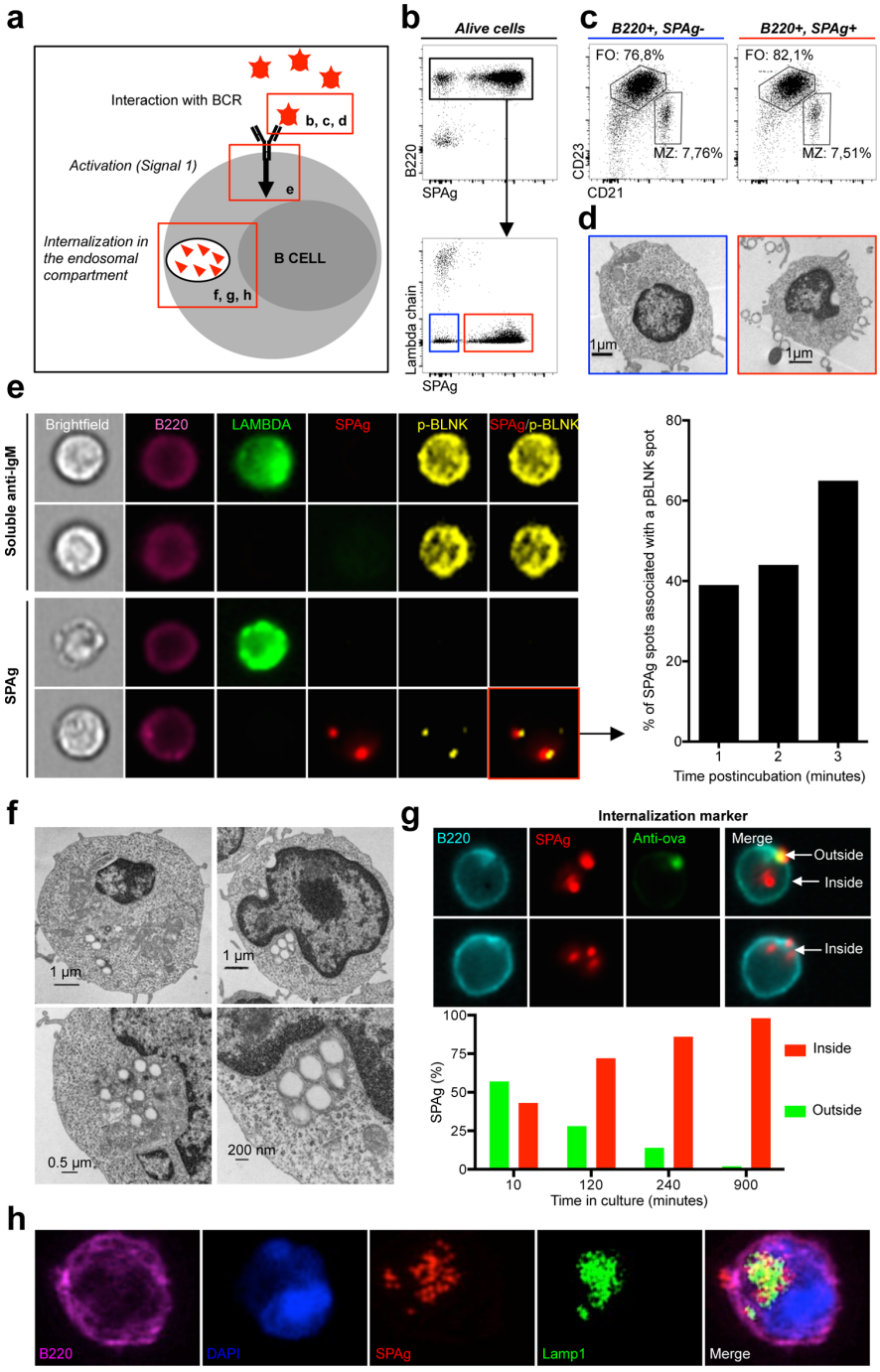


Figure 2. SPAg behave like genuine particulate antigen. (a) Scheme representing the first steps of B cell activation by a particulate antigen. The binding of cognate epitope to B cell receptors (BCR) provides the first signal of activation (signal 1) to B cells and leads to the internalization of the antigen in the endosomal compartment where antigen is then processed and loaded onto MHC class II molecules. (b) B cells from wild type mice were incubated with 400 nm SPAg and washed. Flow cytometry dot plots showing SPAg fluorescence according to B220 and λ-chain expression. B cells are identified based on anti-B220 staining. κ chain-expressing B cells are identified based on anti-λ chain staining and correspond to the negative fraction. (c) Flow cytometry dot plots showing the percentages of follicular (FO: $CD21^{int}CD23^{high}$) and marginal zone (MZ: $CD21^{high}CD23^{low}$) subsets among κ-chain-expressing B cells without (left, blue) and with (right, red) SPAg. (d) EM images of B cell without (left, blue) or with (right, red) 400 nm SPAg bound to the surface. (e) SPAg triggers BCR signaling cascade. B cells from wild type mice were incubated 1, 2, or 3 min at 37 °C with either anti-IgM soluble F(ab′)2 (positive control, 5×10^5 anti-IgM molecules/B cell) or 400 nm SPAg (3750 anti-κ molecules/SPAg). Imaging flow cytometer was used to detect the phosphorylated form of the B cell linker protein (p-BLNK). (Left) Representative images showing p-BLNK staining in λ positive and λ negative B220+ B cells after anti-IgM or SPAg stimulation. (Right) The percentage of SPAg that have triggered BCR signaling at 1, 2, and 3 min is shown. (f) B cells from wild type mice were incubated 10 min at 37 °C with 400 nm SPAg and then cultured 15 h.

DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b03801
Nano Lett. 2016, 16, 297−308

Figure 2. continued

Representative EM images showing SPAg internalized in B cells. (g) Kinetic of 400 nm SPAg internalization was defined by imaging flow cytometry. Nonpermeabilized B cells incubated with SPAg were cultured and stained at various time points with a fluorescent antiovalbumin mab. Only noninternalized SPAg were accessible to staining (see representative images). Percentages of SPAg internalized (red only) or bound to B cell surface (red+green) are shown at various time points. (h) Representative image of confocal microscopy analysis showing colocalization of 400 nm SPAg with a marker of late endosomes (Lamp1) in B cells.

for ACT rather rely on autologous APCs that can be reliably used to confer optimal therapeutic features to T cells before infusion.[18,19] Dendritic cells (DCs) are professional APCs that can be readily pulsed with any antigen and used as stimulators of antigen-specific CD4+ T cells.[30] Yet, implementation in practice is difficult because DCs are too rare to be directly purified from peripheral blood. Instead, bone marrow or blood progenitors must be matured in culture during several days before being used as T cell activators. This procedure increases the costs and leads to inconstant yields.[31−34] Furthermore, the number of DCs that can be obtained from these cultures is limited, as mature DCs stop dividing and become less effective at presenting antigen after 2 to 3 weeks in culture (in fact, it is generally accepted that the final number of DCs cannot be expanded beyond the number of starting progenitors).[33,34] In contrast, B cells are "ready to use" APCs, which are abundant in the circulation (up to 0.5×10^6 cells/mL) and can be further exponentially expanded in vitro without loss of antigen-presenting functions.[31−33] B cells therefore represent an unrestricted source of autologous APCs for ACT.[31,32] However, the use of B cells as stimulators of antigen-specific CD4+ T cells is made problematic due to their inability to present noncognate antigens.[35] In contrast with DCs, which can engulf any antigen by phagocytosis, B cells can only internalize a cognate antigen.[36−38] It is indeed the binding of the specific antigen to B cell's surface immunoglobulins (B cell receptor, BCR) that triggers: (i) the activation signal required for the acquisition of potent antigen-presenting functions and (ii) the antigen internalization in endosomes where antigen is processed and loaded onto MHC-II for presentation to CD4+ T cells. Antigen-specific B cells are too rare to be used in ACT. To overcome this obstacle, we have developed an innovative strategy for biofunctionalization of nanoparticles. Bioengineered nanospheres were specifically designed to simultaneously (i) provide BCR-dependent activation signal and (ii) deliver noncognate antigens to endosomes of B cells. Using these synthetic particulate antigens (SPAg), we were able to turn resting polyclonal B cells into potent stimulators of antigen-specific CD4+ T cells.

To generate SPAg, proteins of interest were biotinylated and immobilized on fluorescent streptavidin-coated polystyrene nanospheres of 400 nm in diameter, a size comparable to that of a typical pathogen. These nanospheres (Bangs Laboratories, Indiana, U.S.A.) were generated by an emulsion polymerization synthesis using a sulfate-based initiator. To optimize the tracking of nanospheres, the fluorescent dye was embedded within the core of the nanospheres to ensure the protection of fluorescent molecules from proteolysis processes that take place within some cellular compartments. Following synthesis, streptavidin was covalently bound on nanospheres surface and a blocker was applied (for more detail please refer to online Supporting Information). The streptavidin/biotin system was chosen to coat proteins of interest in nanospheres because it provides interactions that have similar strength than covalent bonds ($K_d \approx 10^{-14}$ mol/L) while remaining simple to manipulate. Another advantage of this system is that it allows using spacer arms that, by separating the biotinylated ligand from the surface of the nanospheres, reduce the steric hindrance. Nevertheless, other coupling strategies could have been chosen. For instance, we successfully generated SPAg by coating purified proteins on carboxyl-modified nanospheres using carbodiimide as cross-linking reagent but the yields and the quality of the final product were consistently lower (data not shown).

BCR is composed of two pairs of polypeptides chains: two heavy chains and two light chains. Light chains can be of two types: λ or κ. More than 90% of murine B cells express κ light chains. Each chain comprises both a constant domain, which is a shared framework independent of the antigenic specificity, and a highly variable domain, which is specific to each B cell clone and involved in the recognition of antigenic epitopes. We reasoned that coating the nanospheres with a biotinylated monoclonal antibody directed against a framework region of κ light chain (anti-κ mAb) would confer them the capacity to target any noncognate κ positive BCR while behaving like genuine particulate antigens (Figure 1a). The coating of nanospheres with anti-κ mAb was verified by electron microscopy (EM) using gold particle-coupled anti-IgG secondary antibody (Figure 1b). To ensure that anti-κ mAb were attached to nanospheres by streptavidin−biotin solid bonds rather than unspecific adsorption, coating efficiency using biotinylated versus purified anti-κ mAb was compared in flow cytometry with a PE-conjugated anti-IgG antibody (Figure 1c). The successful double coating of nanospheres with biotinylated anti-κ mAb and biotinylated ovalbumin, which was used herein as model antigen, was verified by flow cytometry (Figure 1d). To limit flocculation of nanospheres caused by the coating procedure, anti-κ mAb and ovalbumin had to be monobiotinylated rather than polybiotinylated. This was objectified by the analysis of the particles size in flow cytometry (Figure 1e). A final filtration of coated particles allowed to obtain a solution with more than 90% of mono- or bidispersed SPAg, as shown by the analysis in imaging flow-cytometry of SPAg fluorescence before and after filtration (Figure 1f). An estimation of the mean number of proteins that can be coated on each nanosphere was obtained by incubating nanospheres with increasing amounts of monobiotinylated ovalbumin or anti-κ mAb and quantifying the binding by flow cytometry with antiovalbumin or anti-IgG mAbs (Figure 1g). On the basis of the saturation curves obtained using this method, we evaluated that the maximum number of ovalbumin and anti-κ mAb molecules than can be coated on each SPAg was approaching 1×10^4 and 1.5×10^4, respectively (Figure 1g). The final concentration of SPAg after filtration was measured by spectrophotometry using the standard curve method (Figure 1h).

To test the hypothesis that SPAg would bind to any noncognate κ positive BCR and behave like genuine antigens, 400 nm diameter SPAg were incubated in vitro with B cells purified from the spleen of a wild type mice at a 100:1 SPAg to

DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b03801
Nano Lett. 2016, 16, 297−308

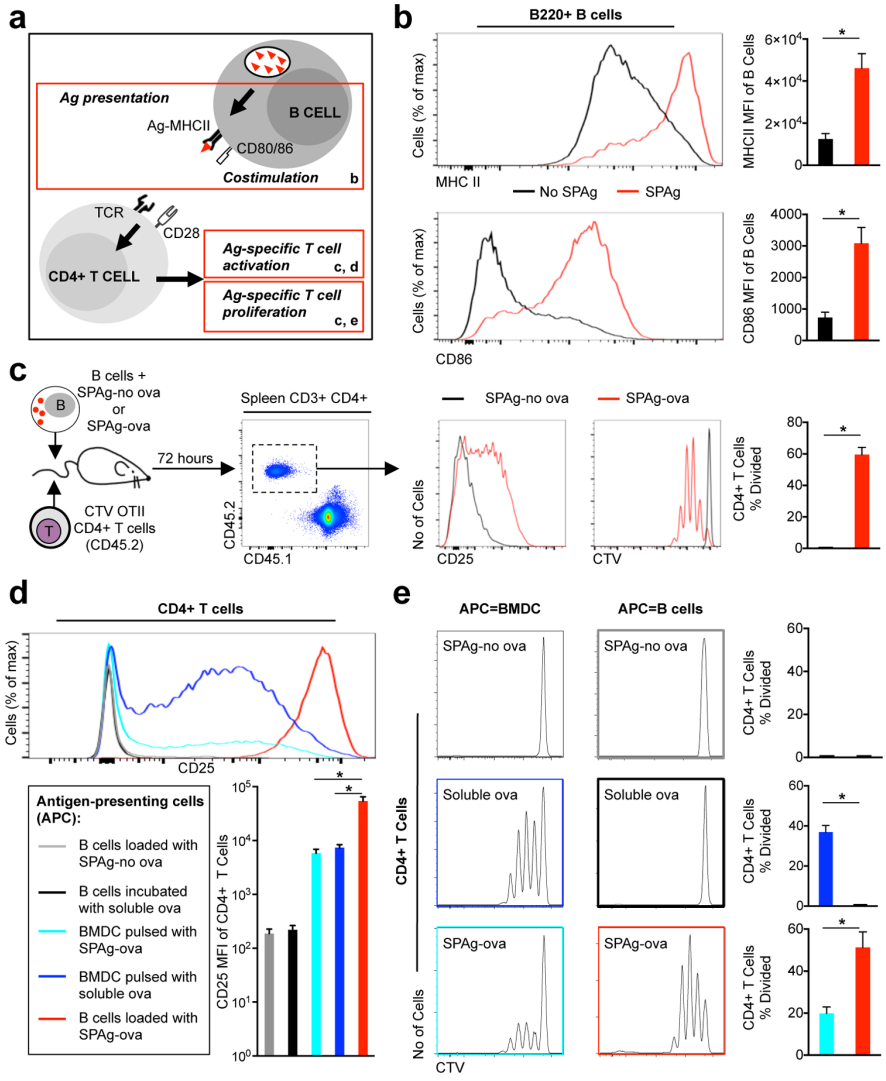


Figure 3. SPAg-loaded B cells induce activation and proliferation of antigen-specific T cells. (a) Schematic illustration of B cell presenting the antigen to CD4+ T cell. Internalized antigen is processed in late endosomal compartment, where it is loaded onto MHC class II molecules and presented on B cell surface. Together with the expression of costimulation molecules (CD80/86), antigen presentation leads to activation and proliferation of cognate CD4+ T cells. (b) SPAg-induced MHC class II and CD86 upregulation. B cells from wild type mice were incubated (red histogram) or not (black histogram) with SPAg and cultured overnight. MHC class II (upper) and CD86 (lower) expression was assessed by flow cytometry. (c) Polyclonal B cells loaded with SPAg (coated or not with ovalbumin) and CTV-labeled CD4+ T cells from CD45.2 OTII transgenic mice (ovalbumin-specific) were cotransferred intravenously to CD45.1 wild type recipients. After 72 h, spleens of recipients were harvested. The expression of CD25 and the proliferation profile of CD45.2 CD4+ T cells were analyzed by flow cytometry. (d) Bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) or B cells from wild type mice were incubated 4 h with soluble ovalbumin or with SPAg before being cocultured 72 h at a 1:1 ratio with CTV-labeled ova-specific CD4+ T cells from OTII transgenic mice. Expression of the activation marker CD25 by OTII CD4+ T cells was assessed at 72 h by flow cytometry. (e) OTII CD4+ T cell proliferation was measured at 72 h by flow cytometry in the various culture conditions. Data are representative of two independent experiments. Bar graphs represent mean values ± SD, * represents p values <0.05.

B cell ratio. Each of the steps necessary for antigen-presentation by B cells were analyzed: (i) attachment to surface BCR, (ii) triggering of activation signal, and (iii) internalization in late endosomal compartment[37] (Figure 2a). Flow cytometry analysis showed that SPAg bound exclusively to B220$^+$ λ chain$^-$ B cells, confirming that SPAg interaction with B cells was dependent upon anti-κ mAb (Figure 2b). Noteworthy, SPAg were able to bind with equal efficiency to the two main subsets of mature splenic B cells (follicular (FO) and marginal zone (MZ); Figure 2c). Flow cytometry results were confirmed by EM analyses (Figure 2d). To assess whether SPAg were able to trigger BCR signaling cascade, as would cognate Ag, imaging flow cytometry was used to detect the phosphorylated form of the B cell linker protein (p-BLNK), an adaptor protein that is phosphorylated upon BCR cross-linking[39] (Figure 2e). A diffuse p-BLNK signal was detected in both λ and κ positive B lymphocytes, when the cells were activated with soluble anti-IgM (Fab')2 (positive control). In contrast, incubation of B lymphocytes with SPAg resulted in a punctiform p-BLNK signal, which colocalized with SPAg fluorescence and was only

DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b03801
Nano Lett. 2016, 16, 297−308

detected in κ-positive B cells. More than 60% of SPAg bound to B cell surface had triggered BCR signaling 3 min postincubation (Figure 2e, right). It has been demonstrated that because multivalent antigens are able to bring several BCRs complex in close apposition, they are far more potent B cells stimulators than monovalent antigens.[37,40] We reasoned that nanospheres might allow exploiting this specificity of BCR-mediated B cell activation (Supporting Information Figure 1a). Consistent with this hypothesis, a similar level of p-BLNK was obtained with ∼4 times less anti-κ mAbs when using nanoparticles (Supporting Information Figure 1b). By reducing the number of anti-κ mAb molecules required to trigger BCR signaling, a nanosphere platform allows maximizing the amount of antigen vectorized in B cells. This is important because we have shown previously that the ability of B cells to activate antigen-specific CD4+ T cells directly correlates with the amount of internalized antigen.[41]

The internalization of SPAg, which is compulsory for antigen presentation, was analyzed by EM and quantified overtime with imaging flow cytometry. Nanospheres with diameters of 3 μm, 400 or 110 nm were coated using the same solutions of monobiotinylated anti-κ mAb and ovalbumin and compared. Attachment to B cell surface was observed with the 3 sizes of SPAg (Figure 2d and Supporting Information Figure 2a) but only 110 and 400 nm SPAg were internalized by B cells (Figure 2f and Supporting Information Figure 2b). After 15 hours in culture, 98% of 400 nm SPAg had been internalized in B cells (Figure 2g). A confocal microscopy analysis revealed the colocalization of 400 nm SPAg with a marker of late endosomes (Lamp1) and showed that internalized SPAg were situated in the late endosomal compartment, where antigens are processed and loaded onto MHC-II (Figure 2h).

In ordinary conditions, the subsequent migration of antigen-MHC-II complexes at the surface of B cells and the expression of costimulation molecules (CD80/86) lead to the activation and proliferation of cognate CD4+ T cell clones (Figure 3a). Consistently, flow cytometry analyses after overnight culture showed a higher expression of MHC-II and CD86 in B cells that had internalized 400 nm SPAg, as compared with controls (Figure 3b, 46113 ± 6888 vs 12504 ± 2577 and 3084 ± 505 vs 730 ± 169, respectively, $p < 0.05$). The ability of SPAg-loaded B cells to activate antigen-specific T cells was first assessed in vivo (Figure 3c). Briefly, 5×10^6 polyclonal CD45.1 B cells loaded with 400 nm SPAg (coated or not with ovalbumin) were cotransferred intravenously in CD45.1 wild type recipients with 5×10^6 ovalbumin-specific CD4+ T cells from CD45.2 OTII transgenic mice (Figure 3c). After 72 h, spleens of recipients were analyzed by flow cytometry. As expected, only B cells loaded with SPAg containing ovalbumin were able to trigger the expression of the activation marker CD25 and the proliferation of OTII CD4+ T cells. We then determined whether SPAg-loaded B cells could also be used to activate antigen-specific T cells in vitro. The expression of CD25 by OTII CD4+ T cells was assessed after 72 h of coculture at a 1:1 B cell to T cell ratio (Figure 3d). B cells loaded with 400 nm SPAg without ova (B cells-SPAg-no ova) and B cells preincubated with soluble ova (B cells-soluble ova) were used as negative controls whereas bone marrow-derived dendritic cells pulsed with 400 nm SPAg (BMDC-SPAg-ova) or with soluble ovalbumin (BMDC-soluble ova) were used as positive controls. In contrast with negative controls, B cells-SPAg-ova did activate OTII CD4+ T cells. Importantly, CD25 expression by OTII CD4+ T cells was higher when B cells-SPAg-ova were used as APCs than when BMDC-SPAg-ova or BMDC-soluble ova were used (CD25 MFI = 54063 ± 11061 vs 5864 ± 1038 and 7401 ± 1000, respectively, $p < 0.05$, Figure 3d). B cell-SPAg-ova also induced a higher OTII CD4+ T cells proliferation than BMDC-SPAg-ova or BMDC-soluble ova did (Figure 3e, percent of divided T cells at 72 h: 51.3 ± 7.4 versus 19.3 ± 3.0 and 36.9 ± 3.3, respectively, $p < 0.05$). As expected, B cells-SPAg-no ova or B cells-soluble ova did not induce CD4+ T cell proliferation (Figure 3e). Interestingly, when comparing 110 and 400 nm SPAg, we observed that although the surface of 110 nm SPAg is ∼13 times lower than the surface of 400 nm SPAg, 25 times more 110 nm SPAg were required to trigger the same level of cognate T cell proliferation (Supporting Information Figure 2c). To explain this discrepancy, we compared the fate of 110 and 400 nm SPAg following internalization. B cells were incubated for 10 min at 37 °C in a mixture of dragon green fluorescent 110 nm SPAg (SPAg to B cell ratio: 2500:1) and flash red fluorescent 400 nm SPAg (SPAg to B cell ratio: 100:1), washed, and cultured overnight at 37 °C before analysis. Although 110 and 400 nm SPAg were internalized with similar efficiency (Supporting Information Figure 2d,e), 400 nm SPAg localized more frequently in the Lamp-1 positive endosomal compartment of B cells where antigen is loaded onto MHCII molecules (Supporting Information Figure 2f). On the basis of these results, we decided to use 400 nm SPAg in the rest of the study.

To test the applicability of our approach to humans, B cells purified from the peripheral blood of an healthy volunteer were incubated for 30 min at 37 °C with SPAg coated with antihuman κ-light chain mAbs (hSPAg). Flow cytometry analysis revealed that hSPAg bound exclusively to $CD19^+$ λ $chain^-$ B cells, showing that the interaction of hSPAg with B cells was dependent upon anti-κ mAb (Figure 4a). The internalization of hSPAg by humans B cells was verified by EM (Figure 4b) and quantified by imaging flow cytometry (Figure 4c). After 12 h in culture, the proportion of B cells with internalized hSPAg was 38.5% (93.9% of hSPAg-positive B cells). This relatively low percentage, as compared with murine experiments, is explained by the fact that the proportion of κ-positive B cells is lower in humans than in mice (50% versus 90%, respectively). Optimizing the efficiency of human B cells loading with hSPAg would require to replace antihuman κ-light chain mAbs with mAbs targeting a framework region present on heavy chains (for example, clone G20−127) or to add antiλ mAb (for example, clone 1−155−2) in addition to anti-κ mAb.

HIV alters CD4+ T cell compartment of patients, hampering the development of neutralizing antibodies.[42] Because educating HIV-specific CD4+ T cells seems particularly relevant in the clinic, we decided to use HIV-GAG protein antigen to test the ability of polyclonal human B cells loaded with hSPAg to present internalized antigen (Figure 4d). B cells purified from the peripheral blood of a HLA-DR01/01 healthy volunteer were incubated 30 min at 37 °C with hSPAg coated with either ovalbumin (use here as negative control, hSPAg-ova) or a peptide made of 3 repetitions of a sequence of HIV-GAG protein (hSPAg-GAGpep). B cells were then rested 12 h at 37 °C to allow time for antigen presentation and cocultured for 6 h with HLA-DR01-restricted CD4+ T cell clones specific for the HIV-GAGpep.[43] CD4+ T cell clones activation was assessed by flow-cytometry measurement of the intracellular cytokine MIP-1β. The percentage of B cells loaded with hSPAg-ova and hSPAg-GAGpep were comparable (44.8% and 39.1%, respectively). As expected, unloaded B cells and B cells loaded

DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b03801
Nano Lett. 2016, 16, 297−308

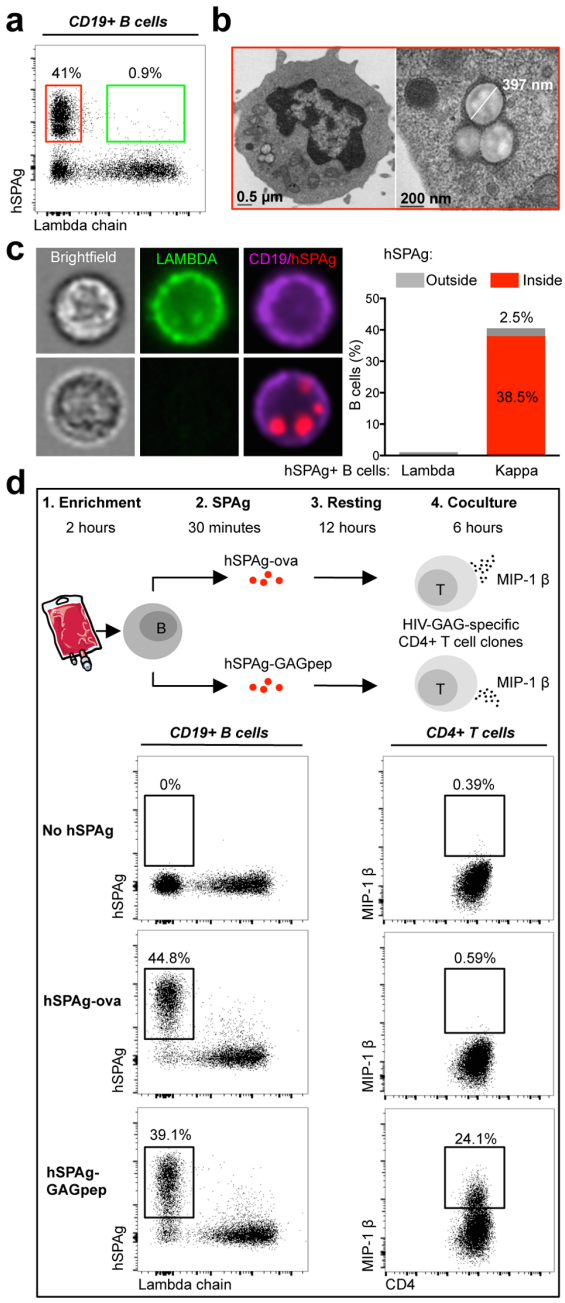


Figure 4. SPAg-based approach is applicable to humans. Purified B cells from a healthy volunteer were incubated 30 min at 37 °C with SPAg coated with antihuman κ-light chain mAbs (hSPAg) and washed. (a) Flow cytometry dot plots showing hSPAg fluorescence according to λ-chain expression by B cells. B cells are identified based on anti-CD19 staining. Kappa chain-expressing B cells are identified based on antiλ chain staining and correspond to the negative fraction. (b) Representative EM images showing hSPAg internalized in B cells after 12 h culture. (c) Image flow cytometer was used to evaluate hSPAg internalization after 12 h culture. (Left) Representative images showing hSPAg internalized in CD19+ B cells. (Right) Quantification of cells that have internalized hSPAg among λ+ and κ+ B cells. (d) (Top) Schematic representation of the experimental procedure. Purified B cells from an HLA-DR01/01 healthy volunteer were incubated 30 min with hSPAg coated with either ovalbumin (negative control, hSPAg-ova) or a peptide made of three repetitions of a sequence of HIV-GAG protein (hSPAg-GAGpep). After washing, B cells were rested 12 h and then cocultured 6 h with HLA-DR1-restricted CD4+ T cell clones specific for the HIV-GAGpep. Clones activation was assessed by flow-cytometry measurement of the intracellular cytokine MIP-1β. (Bottom) Flow cytometry dot plots showing hSPAg fluorescence according to λ-chain expression by B cells (left) and MIP-1β staining in CD4+ T cells clones (right) under three different experimental conditions (from top to bottom: clones cocultured with B cells without hSPAg, with B cells-hSPAg-ova and with B cells-hSPAg-GAGpep).

with hSPAg-ova did not induce production of MIP-1β by CD4+ T cell clones (0.39% and 0.59% of positive clones, respectively). In contrast, 24.1% of clones did produce MIP-1β when cocultured with B cells loaded with hSPAg-GAGpep. This result demonstrates that SPAg can be used to induce efficient antigen presentation by human polyclonal B cells to cognate CD4+ T cells.

Because CD4+ T cells specific for a given epitope are rare in the general CD4+ T cell population (as low as 1/100 in the memory compartment and below 1/10000 in the naïve repertoire[20]), the capacity of SPAg-loaded B cells to expand rare antigen-specific T cells populations was tested in our murine experimental setting (Figure 5). B cells-SPAg-no ova and B cells-SPAg-ova were cultured 72 h with a mix of cognate OTII CD4+ T cells (CD45.2) and polyclonal CD4+ T cells (CD45.1). Various cognate to polyclonal T cells ratios were tested: 1/100 (Figure 5a), 1/1000 (Figure 5b), or 1/10000 (Figure 5c). At any ratios, B cells-SPAg-ova, but not B cells-SPAg-no ova, induced specific proliferation of cognate T cells. CD45.2/CD45.1 ratios increased more than two times during the 72 h of cocultures. Thus, SPAg-loaded B cells can induce proliferation and expansion of rare cognate CD4+ T cells.

As discussed above, CD4+ T cells exert different roles according to the pathophysiological context. Upon TCR-mediated activation, the nature of the microenvironment guides them toward specialized functions, a process called polarization (for recent review see:[16]). Beyond the classical Th1 and Th2 subsets, there are compelling evidence in the literature that Th17 effector CD4+ T cells, which produce high levels of the proinflammatory cytokine IL17, are highly efficient in promoting immune responses against cancers.[44] In contrast, regulatory CD4+ T cells (CD4+Treg), which are characterized by the expression of the transcription factor forkhead box p3 (foxp3),[45] are specialized in promoting the tolerance toward the auto- and alloantigens for which they are specific.[46,47] Being able to polarize antigen-specific CD4+ T cells toward the adequate profile is therefore essential for the success of ACT. Even if adequate polarization can generally be obtained by adding exogenous cytokines to the culture medium, it is likely that this method does not entirely reproduce the complexity of the polarization process that takes place in vivo, which depends not only on the nature of cytokines present in the microenvironment but also on the type of costimulation signals delivered by APCs.[16] In this regard, several studies have documented the versatility of Janus-faced B cells, which are able to play both pathogenic and regulatory activities in immunopathogenesis.[48] Indeed, in addition to their ability to promote the generation of effector T cells, B cells are also endowed with unique regulatory functions.[48−51] Regulatory B

DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b03801
Nano Lett. 2016, 16, 297−308

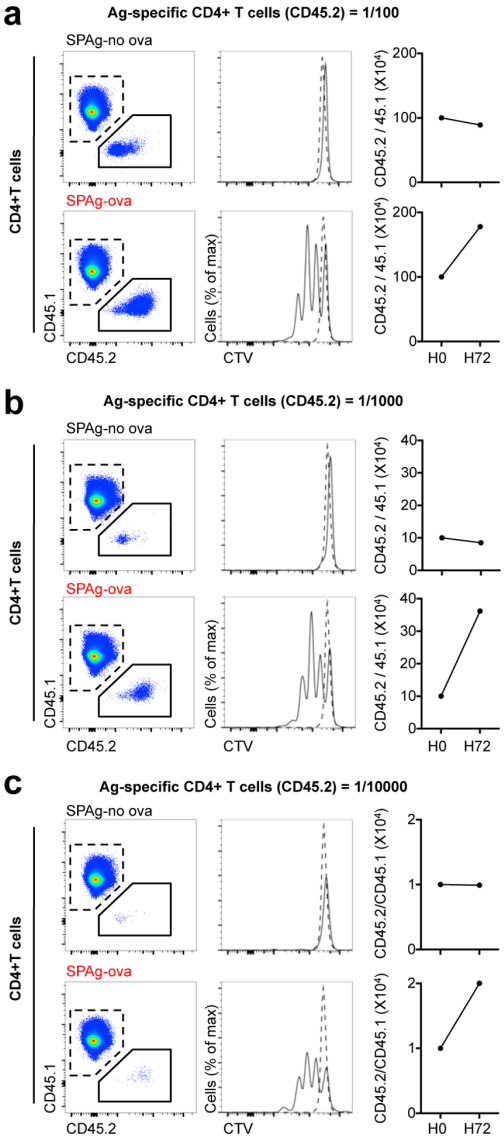


Figure 5. SPAg-loaded B cells can be used to expand rare cognate CD4+ T cells. SPAg-loaded B cells from wild type mice were cocultured 72 h at a 1:2 ratio with a mix of cognate OTII CD4+ T cells (CD45.2) and polyclonal T cells (CD45.1). CD45.2/CD45.1 ratios were (a) 1/100, (b) 1/1000, or (c) 1/10000. Flow cytometry pseudocolor plots show CD45.1 and CD45.2 staining of CD4+ T cells at 72 h and histograms show their respective proliferation profiles assessed by CTV staining. Graphs represent CD45.2/CD45.1 ratios at the beginning (H0) and at the end (72 h) of the coculture.

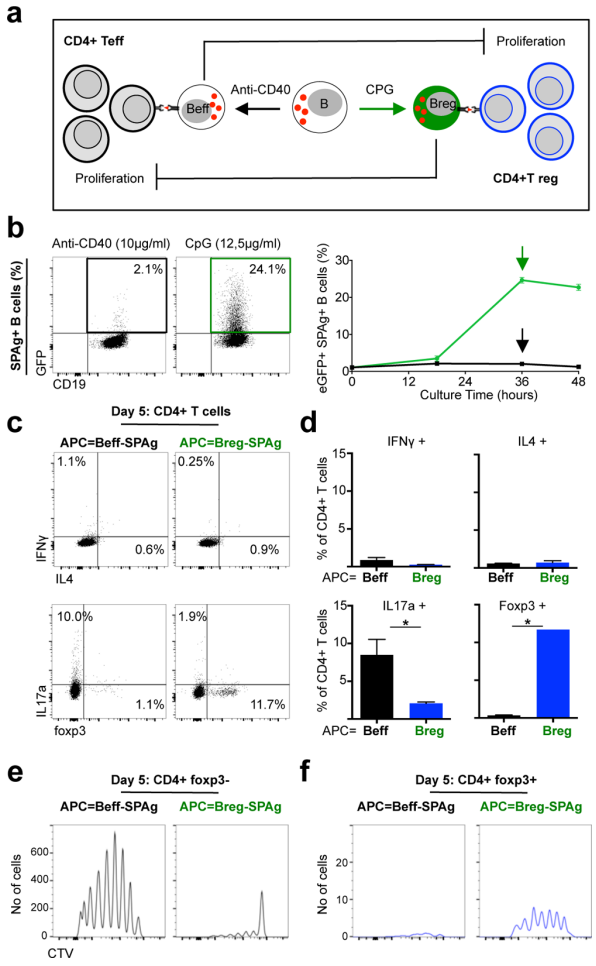


Figure 6. SPAg-loaded B cells can be used to polarize cognate CD4+ T cells. (a) A scheme describing how regulatory properties can be conferred to SPAg-loaded B cells. B cells are loaded with SPAg and cultured with CpG. SPAg-loaded B reg do not induce significant proliferation of antigen-specific Foxp3- effector T cells (Teff) but rather promote the proliferation of antigen-specific Foxp3+ regulatory T cells (Treg). (b) B cells from IL-10-eGFP reporter mice were incubated with SPAg 10 min at 37 °C and cultured 48 h in medium supplemented with either anti-CD40 agonist (10 μg/mL; black curve) or with CpG (12.5 μg/mL; green curve). The proportion of eGFP-positive IL10-producing SPAg-positive B cells was measured by flow cytometry at various time points. Data on graph are expressed as mean ± SD and representative of two independent experiments. (c, d, e, f) B cells from wild type mice were incubated with SPAg 10 min at 37 °C and cultured 36 h in medium supplemented with either anti-CD40 agonist (Beff) or with CpG (Breg). Sorted SPAg-positive B cells were cocultured 5 days at a 1:1 ratio with naïve CTV-labeled OTII CD4+ T cells. (c, d) The proportion of CD4+ T cells subsets was assessed by flow cytometry. Treg, Th1, Th2, and Th17 subsets were identified by the expression of, respectively, foxp3, IFNγ, IL4, and IL17. Proliferation profiles of (e) effector (Foxp3^{neg}) and (f) regulatory (Foxp3^{pos}) CD4+ T cells were determined by flow cytometry at 5 days of coculture in the different culture conditions. Data are representative of two independent experiments.

cells (Breg) inhibit effector CD4+ T cell (Teff) responses and promote Treg differentiation through the production of suppressive cytokines (in particular IL-10) and cell-to-cell crosstalk[49,51,52] (Figure 6a). Importantly, it has been shown that B cells stimulated in vitro with high doses of toll like receptor (TLR) ligands acquire regulatory properties.[53,54] On the basis of these observations, we reasoned that regulatory properties could be conferred to SPAg-loaded B cells by adding CpG (the ligand of TLR9) to the culture. We hypothesized that Bregs loaded with SPAg (Breg-SPAg) would generate antigen-specific Tregs ex vivo without the need for addition of exogenous cytokines (Figure 6a). This approach would allow harnessing all the physiological mechanisms used by Breg to inhibit Teff and induce Treg. To determine whether SPAg-loaded B cells secrete IL-10 upon CpG stimulation, B cells-SPAg from IL-10-

DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b03801
Nano Lett. 2016, 16, 297−308

reporter mice (IL-10-IRES-eGFP transgenic mice[55]) were cultured for 48 h in medium supplemented with either anti-CD40 agonist (negative control, Beff-SPAg) or CpG (B reg-SPAg) (Figure 6b). The proportion of SPAg-positive B cells expressing eGFP was measured overtime by flow cytometry. In contrast with anti-CD40 stimulation, CpG stimulation resulted in IL-10 production by B cells-SPAg (Figure 6b, black and green curves, respectively). The number of eGFP+ SPAg+ B cells peaked at 36 h of culture (24.6%). We next analyzed whether Beff-SPAg and Breg-SPAg could be used to promote the expansion of antigen-specific Teff and Treg, respectively. OTII CD4+ T cells were cultured with sorted B cells-SPAg that had been prestimulated 36 h with CpG (Breg-SPAg) or anti-CD40 (Beff-SPAg). The proportion of the four distinct subsets of CD4+ T cells was assessed by flow cytometry after 5 days of coculture (Figure 6c). Briefly, Treg were identified by the expression of the transcription factor foxp3, whereas the 3 Teff subsets were identified according to their characteristic cytokinic profile (respectively, IFNγ for Th1, IL4 for Th2, and IL17 for Th17). Neither Beff-SPAg nor Breg-SPAg induce a Th1 or Th2 polarization (Figure 6c,d, upper panels). In contrast, Beff-SPAg generated Th17 effectors while Breg-SPAg generated Treg (Figure 6c,d, lower panels). Furthermore, analyzing the proliferation profiles, we observed that Breg-SPAg did not induce a significant proliferation of Teff but promoted instead the proliferation of antigen-specific Treg (Figure 6e and 6f). To the contrary, Beff-SPAg induced the proliferation of Teff but not of Treg (Figure 6e,f).

In this study, we present a novel versatile approach to expand and polarize antigen-specific CD4+ T cells that could be used in ACT. Our work indeed demonstrates that nanospheres can be easily biofunctionalized to behave like synthetic particulate antigens (SPAg) able to simultaneously (i) activate polyclonal B lymphocytes through BCR and (ii) deliver any antigen of interest into the endosomal compartment of these B lymphocytes, thus turning noncognate B cells into highly efficient stimulators of antigen-specific CD4+ T cells. Furthermore, this technique offers the possibility to harness the ability of B cells to polarize CD4+ T cells into either effectors or regulators of the immune response.

In contrast with DCs, which currently represent the gold standard for ex vivo stimulation of antigen-specific CD4+ T cells, B cells are readily accessible in peripheral blood and can be expanded by logs in vitro, offering an almost inexhaustible fresh source of highly pure autologous APCs.[31,32] These decisive advantages had led several groups to explore the possibility of exploiting the antigen presentation function of B cells for purpose of cell therapy.[31−33,56−67] In organ transplantation, donor's B cells have been shown to be more efficient than donor's DCs to expand ex vivo graft-specific Tregs.[68] Because donor's HLAs (which are the molecular targets in rejection) are expressed on the surface of donor's B lymphocytes, these cells can be directly used to expand graft-specific CD4+Treg.[56,57] However, in all other pathophysiological situations, B cells must first be loaded with the chosen exogenous antigen before being able to interact with CD4+ T cells. This point is challenging because cognate interactions of antigen with the BCR are required for effective internalization, processing and presentation of the antigen by B cells.[36−38] Several strategies have been tested to overcome this limitation. The group of Dr. Scott pioneered this field and showed that cloning the target protein in frame with an immunoglobulin heavy chain and delivering it via retrovirus to an activated B cell could be a strategy to induce tolerance to multiple epitopes.[58−60] This strategy has however some drawbacks that limit its translation in the clinic. The generation of vectors can be technically challenging, the size of the insets coding for the antigenic sequences is limited, and long-term gene transfer into primary human B cells is known to be notoriously difficult.[69−71] Finally, this approach lacks versatility since the whole process needs to be set up again each time the antigen is changed. More recently, Lee Szeto et al. have used a microfluidic device to deliver antigens in solution to polyclonal B cells via mechano-poration.[63] With this method, whole proteins cross the plasma membrane through transient pores without any selective uptake by BCR. As a result, the antigen, which is not vectorized in the endosomal compartment of B cells, is exclusively loaded into the MHC-I, limiting the technique to the generation of antigen-specific cytotoxic CD8+ T cells. SPAg offer several advantages: (i) thousands molecules of antigens are delivered to polyclonal B cells through the BCR, that is, the physiological route of antigen uptake, (ii) antigens can be delivered to B cells in their native form without any important engineering, and (iii) SPAg-loaded B cells process the whole antigens, ensuring a natural and exhaustive generation of distinct antigenic peptides. As a result, SPAg-based technology is cheap, fast (<1 h) and accessible to all biologists (no need for specialized skills or equipment) while remaining highly efficient to promote the presentation of any antigen in the MHC-II of polyclonal B cells.

Finally, although the present work only details the use of SPAg to generate antigen-specific CD4+ T cell ex vivo, the possibility to directly use SPAg-loaded B cells in vivo to treat patients should not be ignored. B cells have indeed the ability to home to patient's secondary lymphoid organs.[72] There, SPAg-loaded B cells could act as a cellular vaccine to promote the development of an endogenous response against cancers or persistent virus infections. Alternatively, the transfer of SPAg-loaded regulatory B cells could promote tolerance in transplant recipients or patients with autoimmune diseases. Further studies in animal models are warranted to assess the therapeutic potentials and risks of such strategies.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b03801.

Comparison of B cell activation by soluble versus bound anti-k mAbs, impact of SPAg size on their fate in B cell, additional materials and methods. (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +33 4 72 11 02 29. Fax: +33 4 72 11 02 71. E-mail: olivier.thaunat@inserm.fr.

Author Contributions

A.S., A.K., S.G.D., A.M., and O.T. conceived and designed the experiments. A.S., A.K., S.G.D., A.R., D.C., and P.B. performed the experiments. H.P. and M.T. provided reagents and technical expertise. A.S., A.K., S.D., M.T., E.E.S., and O.T. analyzed the data. A.S., A.K., S.G.D., S.D., A.R., V.D., P.B., D.C., E.E.C., H.P., M.T., E.M., A.M., T.D., and O.T. contributed to scientific discussion. A.S. and O.T. wrote the paper. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b03801
Nano Lett. 2016, 16, 297−308

Funding

This work was supported by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-12-PDOC-0019.01). A.S. was supported by grants from the Société de Néphrologie and the Société Francophone de Transplantation, A.K. by the Hospices Civils de Lyon and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. O.T. and E.M. are members of the CENTAURE Transplantation Research Network.

Notes

The authors declare no competing financial interest. The results reported in the present study have been the subject of a patent application (no. EP15306506).

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank Paul Mondière (INSERM unit U1111, Lyon, France) and Christophe Chamot (Plateau Technique Imagerie/Microcopie [PLATIM], Ecole Normale Supérieure de Lyon, France) for technical assistance, Christelle Rousseau (Etablissement Français du Sang, Lyon, France) for organization of healthy volunteers blood collection, and Laurent Genestier for fruitful scientific discussions.

■ ABBREVIATIONS

ACT, adoptive cell therapy; TCR, T cell receptor; MHC-II, major histocompatibility complex; APC, antigen-presenting cell; DC, dendritic cell; BCR, B cell receptor; EM, electron microscopy; SPAg, synthetic particulate antigen; p-BLNK, B cell linker protein; CTV, cell trace violet; BMDC, bone marrow-derived dendritic cell; HIV, human immunodeficiency virus; Breg, regulatory B cells; Teff, effector CD4+ T cells; TLR, toll like receptor; Treg, regulatory CD4+ T cells

■ REFERENCES

(1) Eberlein, T. J.; Rosenstein, M.; Rosenberg, S. A. Regression of a disseminated syngeneic solid tumor by systemic transfer of lymphoid cells expanded in interleukin 2. *J. Exp. Med.* **1982**, *156* (2), 385−397.

(2) Rosenberg, S. A.; Restifo, N. P. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* **2015**, *348* (6230), 62−68.

(3) Rosenberg, S. A.; Packard, B. S.; Aebersold, P. M.; Solomon, D.; Topalian, S. L.; Toy, S. T.; Simon, P.; Lotze, M. T.; Yang, J. C.; Seipp, C. A.; et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* **1988**, *319* (25), 1676−1680.

(4) Walter, E. A.; Greenberg, P. D.; Gilbert, M. J.; Finch, R. J.; Watanabe, K. S.; Thomas, E. D.; Riddell, S. R. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N. Engl. J. Med.* **1995**, *333* (16), 1038−1044.

(5) Brodie, S. J.; Lewinsohn, D. A.; Patterson, B. K.; Jiyamapa, D.; Krieger, J.; Corey, L.; Greenberg, P. D.; Riddell, S. R. In vivo migration and function of transferred HIV-1-specific cytotoxic T cells. *Nat. Med.* **1999**, *5* (1), 34−41.

(6) Mackensen, A.; Meidenbauer, N.; Vogl, S.; Laumer, M.; Berger, J.; Andreesen, R. Phase I study of adoptive T-cell therapy using antigen-specific CD8+ T cells for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24* (31), 5060−5069.

(7) Yee, C.; Thompson, J. A.; Byrd, D.; Riddell, S. R.; Roche, P.; Celis, E.; Greenberg, P. D. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99* (25), 16168−16173.

(8) Muranski, P.; Restifo, N. P. Adoptive immunotherapy of cancer using CD4(+) T cells. *Curr. Opin. Immunol.* **2009**, *21* (2), 200−208.

(9) Kamphorst, A. O.; Ahmed, R. CD4 T-cell immunotherapy for chronic viral infections and cancer. *Immunotherapy* **2013**, *5* (9), 975−987.

(10) Swain, S. L.; McKinstry, K. K.; Strutt, T. M. Expanding roles for CD4+ T cells in immunity to viruses. *Nat. Rev. Immunol.* **2012**, *12* (2), 136−148.

(11) Kennedy, R.; Celis, E. Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol. Rev.* **2008**, *222* (1), 129−144.

(12) Heller, K. N.; Gurer, C.; Münz, C. Virus-specific CD4+ T cells: ready for direct attack. *J. Exp. Med.* **2006**, *203* (4), 805−808.

(13) Nakanishi, Y.; Lu, B.; Gerard, C.; Iwasaki, A. CD8+ T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4+ T-cell help. *Nature* **2009**, *462* (7272), 510−513.

(14) Sun, J. C. Defective CD8 T Cell Memory Following Acute Infection Without CD4 T Cell Help. *Science* **2003**, *300* (5617), 339−342.

(15) Tangye, S. G.; Ma, C. S.; Brink, R.; Deenick, E. K. The good, the bad and the ugly - TFH cells in human health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13* (6), 412−426.

(16) Geginat, J.; Paroni, M.; Maglie, S.; Alfen, J. S.; Kastirr, I.; Gruarin, P.; De Simone, M.; Pagani, M.; Abrignani, S. Plasticity of human CD4 T cell subsets. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 630.

(17) Sagoo, P.; Ali, N.; Garg, G.; Nestle, F. O.; Lechler, R. I.; Lombardi, G. Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells. *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3* (83), 83ra42−83ra42.

(18) Hunder, N. N.; Wallen, H.; Cao, J.; Hendricks, D. W.; Reilly, J. Z.; Rodmyre, R.; Jungbluth, A.; Gnjatic, S.; Thompson, J. A.; Yee, C. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358* (25), 2698−2703.

(19) Tran, E.; Turcotte, S.; Gros, A.; Robbins, P. F.; Lu, Y.-C.; Dudley, M. E.; Wunderlich, J. R.; Somerville, R. P.; Hogan, K.; Hinrichs, C. S.; et al. Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer. *Science* **2014**, *344* (6184), 641−645.

(20) Geiger, R.; Duhen, T.; Lanzavecchia, A.; Sallusto, F. Human naive and memory CD4+ T cell repertoires specific for naturally processed antigens analyzed using libraries of amplified T cells. *J. Exp. Med.* **2009**, *206* (7), 1525−1534.

(21) Kim, J. V.; Latouche, J.-B.; Rivière, I.; Sadelain, M. The ABCs of artificial antigen presentation. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22* (4), 403−410.

(22) Perica, K.; Tu, A.; Richter, A.; Bieler, J. G.; Edidin, M.; Schneck, J. P. Magnetic field-induced T cell receptor clustering by nanoparticles enhances T cell activation and stimulates antitumor activity. *ACS Nano* **2014**, *8* (3), 2252−2260.

(23) Molino, N. M.; Anderson, A. K. L.; Nelson, E. L.; Wang, S.-W. Biomimetic protein nanoparticles facilitate enhanced dendritic cell activation and cross-presentation. *ACS Nano* **2013**, *7* (11), 9743−9752.

(24) Fadel, T. R.; Steenblock, E. R.; Stern, E.; Li, N.; Wang, X.; Haller, G. L.; Pfefferle, L. D.; Fahmy, T. M. Enhanced cellular activation with single walled carbon nanotube bundles presenting antibody stimuli. *Nano Lett.* **2008**, *8* (7), 2070−2076.

(25) Matic, J.; Deeg, J.; Scheffold, A.; Goldstein, I.; Spatz, J. P. Fine Tuning and Efficient T Cell Activation with Stimulatory aCD3 Nanoarrays. *Nano Lett.* **2013**, *13* (11), 5090−5097.

(26) Delcassian, D.; Depoil, D.; Rudnicka, D.; Liu, M.; Davis, D. M.; Dustin, M. L.; Dunlop, I. E. Nanoscale ligand spacing influences receptor triggering in T cells and NK cells. *Nano Lett.* **2013**, *13* (11), 5608−5614.

(27) Fadel, T. R.; Sharp, F. A.; Vudattu, N.; Ragheb, R.; Garyu, J.; Kim, D.; Hong, E.; Li, N.; Haller, G. L.; Pfefferle, L. D.; et al. A carbon nanotube-polymer composite for T-cell therapy. *Nat. Nanotechnol.* **2014**, *9* (8), 639−647.

(28) Ataman-Onal, Y.; Munier, S.; Ganée, A.; Terrat, C.; Durand, P.-Y.; Battail, N.; Martinon, F.; Le Grand, R.; Charles, M.-H.; Delair, T.; et al. Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated with HIV-1 p24

DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b03801
Nano Lett. 2016, 16, 297−308

protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models. *J. Controlled Release* **2006**, *112* (2), 175−185.
(29) Eggermont, L. J.; Paulis, L. E.; Tel, J.; Figdor, C. G. Towards efficient cancer immunotherapy: advances in developing artificial antigen-presenting cells. *Trends Biotechnol.* **2014**, *32* (9), 456−465.
(30) Schlienger, K.; Craighead, N.; Lee, K. P.; Levine, B. L.; June, C. H. Efficient priming of protein antigen-specific human CD4(+) T cells by monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **2000**, *96* (10), 3490−3498.
(31) Wennhold, K.; Shimabukuro-Vornhagen, A.; Theurich, S.; von Bergwelt-Baildon, M. CD40-activated B cells as antigen-presenting cells: the final sprint toward clinical application. *Expert Rev. Vaccines* **2013**, *12* (6), 631−637.
(32) Kondo, E.; Gryschok, L.; Klein-Gonzalez, N.; Rademacher, S.; Weihrauch, M. R.; Liebig, T.; Shimabukuro-Vornhagen, A.; Kochanek, M.; Draube, A.; von Bergwelt-Baildon, M. S. CD40-activated B cells can be generated in high number and purity in cancer patients: analysis of immunogenicity and homing potential. *Clin. Exp. Immunol.* **2009**, *155* (2), 249−256.
(33) Schultze, J. L.; Michalak, S.; Seamon, M. J.; Dranoff, G.; Jung, K.; Daley, J.; Delgado, J. C.; Gribben, J. G.; Nadler, L. M. CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J. Clin. Invest.* **1997**, *100* (11), 2757−2765.
(34) Cavanagh, L. L.; Saal, R. J.; Grimmett, K. L.; Thomas, R. Proliferation in monocyte-derived dendritic cell cultures is caused by progenitor cells capable of myeloid differentiation. *Blood* **1998**, *92* (5), 1598−1607.
(35) Trombetta, E. S.; Mellman, I. CELL BIOLOGY OF ANTIGEN PROCESSING IN VITRO AND IN VIVO. *Annu. Rev. Immunol.* **2005**, *23* (1), 975−1028.
(36) Harwood, N. E.; Batista, F. D. Early Events in B Cell Activation. *Annu. Rev. Immunol.* **2010**, *28* (1), 185−210.
(37) Avalos, A. M.; Ploegh, H. L. Early BCR Events and Antigen Capture, Processing, and Loading on MHC Class II on B Cells. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 92.
(38) Depoil, D.; Weber, M.; Treanor, B.; Fleire, S. J.; Carrasco, Y. R.; Harwood, N. E.; Batista, F. D. Early events of B cell activation by antigen. *Sci. Signaling* **2009**, *2* (63), pt1−pt1.
(39) Wienands, J.; Schweikert, J.; Wollscheid, B.; Jumaa, H.; Nielsen, P. J.; Reth, M. SLP-65: a new signaling component in B lymphocytes which requires expression of the antigen receptor for phosphorylation. *J. Exp. Med.* **1998**, *188* (4), 791−795.
(40) Dougan, S. K.; Ogata, S.; Hu, C.-C. A.; Grotenbreg, G. M.; Guillen, E.; Jaenisch, R.; Ploegh, H. L. IgG1+ ovalbumin-specific B-cell transnuclear mice show class switch recombination in rare allelically included B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (34), 13739−13744.
(41) Thaunat, O.; Granja, A. G.; Barral, P.; Filby, A.; Montaner, B.; Collinson, L.; Martinez-Martin, N.; Harwood, N. E.; Bruckbauer, A.; Batista, F. D. Asymmetric segregation of polarized antigen on B cell division shapes presentation capacity. *Science* **2012**, *335* (6067), 475−479.
(42) Yamamoto, T.; Lynch, R. M.; Gautam, R.; Matus-Nicodemos, R.; Schmidt, S. D.; Boswell, K. L.; Darko, S.; Wong, P.; Sheng, Z.; Petrovas, C.; et al. Quality and quantity of TFH cells are critical for broad antibody development in SHIVAD8 infection. *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7* (298), 298ra120−298ra120.
(43) Moris, A.; Pajot, A.; Blanchet, F.; Guivel-Benhassine, F.; Salcedo, M.; Schwartz, O. Dendritic cells and HIV-specific CD4+ T cells: HIV antigen presentation, T-cell activation, and viral transfer. *Blood* **2006**, *108* (5), 1643−1651.
(44) Zou, W.; Restifo, N. P. T_H17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10* (4), 248−256.
(45) Fontenot, J. D.; Gavin, M. A.; Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **2003**, *4* (4), 330−336.
(46) Brusko, T. M.; Putnam, A. L.; Bluestone, J. A. Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunol. Rev.* **2008**, *223* (1), 371−390.
(47) Ferrer, I. R.; Hester, J.; Bushell, A.; Wood, K. J. Induction of transplantation tolerance through regulatory cells: from mice to men. *Immunol. Rev.* **2014**, *258* (1), 102−116.
(48) Thaunat, O.; Morelon, E.; Defrance, T. Am"B"valent: anti-CD20 antibodies unravel the dual role of B cells in immunopathogenesis. *Blood* **2010**, *116* (4), 515−521.
(49) Fillatreau, S.; Sweenie, C. H.; McGeachy, M. J.; Gray, D.; Anderton, S. M. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.* **2002**, *3* (10), 944−950.
(50) Blair, P. A.; Noreña, L. Y.; Flores-Borja, F.; Rawlings, D. J.; Isenberg, D. A.; Ehrenstein, M. R.; Mauri, C. CD19(+)CD24(hi)-CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* **2010**, *32* (1), 129−140.
(51) Mauri, C.; Bosma, A. Immune regulatory function of B cells. *Annu. Rev. Immunol.* **2012**, *30*, 221−241.
(52) Chesneau, M.; Michel, L.; Dugast, E.; Chenouard, A.; Baron, D.; Pallier, A.; Durand, J.; Braza, F.; Guerif, P.; Laplaud, D.-A.; et al. Tolerant Kidney Transplant Patients Produce B Cells with Regulatory Properties. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2015**, *26*, 2588.
(53) Lampropoulou, V.; Calderon-Gomez, E.; Roch, T.; Neves, P.; Shen, P.; Stervbo, U.; Boudinot, P.; Anderton, S. M.; Fillatreau, S. Suppressive functions of activated B cells in autoimmune diseases reveal the dual roles of Toll-like receptors in immunity. *Immunol. Rev.* **2010**, *233* (1), 146−161.
(54) Lampropoulou, V.; Hoehlig, K.; Roch, T.; Neves, P.; Gomez, E. C.; Sweenie, C. H.; Hao, Y.; Freitas, A. A.; Steinhoff, U.; Anderton, S. M.; et al. TLR-Activated B Cells Suppress T Cell-Mediated Autoimmunity. *J. Immunol.* **2008**, *180* (7), 4763−4773.
(55) Madan, R.; Demircik, F.; Surianarayanan, S.; Allen, J. L.; Divanovic, S.; Trompette, A.; Yogev, N.; Gu, Y.; Khodoun, M.; Hildeman, D.; et al. Nonredundant roles for B cell-derived IL-10 in immune counter-regulation. *J. Immunol.* **2009**, *183* (4), 2312−2320.
(56) Landwehr-Kenzel, S.; Issa, F.; Luu, S. H.; Schmück, M.; Lei, H.; Zobel, A.; Thiel, A.; Babel, N.; Wood, K.; Volk, H. D.; et al. Novel GMP-Compatible Protocol Employing an Allogeneic B Cell Bank for Clonal Expansion of Allospecific Natural Regulatory T Cells. *Am. J. Transplant.* **2014**, *14* (3), 594−606.
(57) Tu, W.; Lau, Y.-L.; Zheng, J.; Liu, Y.; Chan, P.-L.; Mao, H.; Dionis, K.; Schneider, P.; Lewis, D. B. Efficient generation of human alloantigen-specific CD4+ regulatory T cells from naive precursors by CD40-activated B cells. *Blood* **2008**, *112* (6), 2554−2562.
(58) Kang, Y.; Melo, M.; Deng, E.; Tisch, R.; El-Amine, M.; Scott, D. W. Induction of hyporesponsiveness to intact foreign protein via retroviral-mediated gene expression: the IgG scaffold is important for induction and maintenance of immune hyporesponsiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96* (15), 8609−8614.
(59) Agarwal, R. K.; Kang, Y.; Zambidis, E.; Scott, D. W.; Chan, C. C.; Caspi, R. R. Retroviral gene therapy with an immunoglobulin-antigen fusion construct protects from experimental autoimmune uveitis. *J. Clin. Invest.* **2000**, *106* (2), 245−252.
(60) Skupsky, J.; Zhang, A.-H.; Su, Y.; Scott, D. W. B-cell-delivered gene therapy induces functional T regulatory cells and leads to a loss of antigen-specific effector cells. *Mol. Ther.* **2010**, *18* (8), 1527−1535.
(61) Calderon-Gomez, E.; Lampropoulou, V.; Shen, P.; Neves, P.; Roch, T.; Stervbo, U.; Rutz, S.; Kühl, A. A.; Heppner, F. L.; Loddenkemper, C.; et al. Reprogrammed quiescent B cells provide an effective cellular therapy against chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* **2011**, *41* (6), 1696−1708.
(62) Mason, N. J.; Coughlin, C. M.; Overley, B.; Cohen, J. N.; Mitchell, E. L.; Colligon, T. A.; Clifford, C. A.; Zurbriggen, A.; Sorenmo, K. U.; Vonderheide, R. H. RNA-loaded CD40-activated B cells stimulate antigen-specific T-cell responses in dogs with spontaneous lymphoma. *Gene Ther.* **2008**, *15* (13), 955−965.
(63) Lee Szeto, G.; Van Egeren, D.; Worku, H.; Sharei, A.; Alejandro, B.; Park, C.; Frew, K.; Brefo, M.; Mao, S.; Heimann, M.; et al.

DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b03801
Nano Lett. 2016, 16, 297−308

Microfluidic squeezing for intracellular antigen loading in polyclonal B-cells as cellular vaccines. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 10276.
(64) Zentz, C.; Wiesner, M.; Man, S.; Frankenberger, B.; Wollenberg, B.; Hillemanns, P.; Zeidler, R.; Hammerschmidt, W.; Moosmann, A. Activated B cells mediate efficient expansion of rare antigen-specific T cells. *Hum. Immunol.* **2007**, *68* (2), 75−85.
(65) Fujiwara, H.; Melenhorst, J. J.; Ouriaghli; El, F.; Kajigaya, S.; Grube, M.; Sconocchia, G.; Rezvani, K.; Price, D. A.; Hensel, N. F.; Douek, D. C.; et al. In vitro induction of myeloid leukemia-specific CD4 and CD8 T cells by CD40 ligand-activated B cells gene modified to express primary granule proteins. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11* (12), 4495−4503.
(66) Coughlin, C. M.; Vance, B. A.; Grupp, S. A.; Vonderheide, R. H. RNA-transfected CD40-activated B cells induce functional T-cell responses against viral and tumor antigen targets: implications for pediatric immunotherapy. *Blood* **2004**, *103* (6), 2046−2054.
(67) Sicard, A.; Koenig, A.; Morelon, E.; Defrance, T.; Thaunat, O. Cell therapy to induce allograft tolerance: time to switch to plan B? *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 149.
(68) Zheng, J.; Liu, Y.; Lau, Y.-L.; Tu, W. CD40-activated B cells are more potent than immature dendritic cells to induce and expand CD4(+) regulatory T cells. *Cell. Mol. Immunol.* **2010**, *7* (1), 44−50.
(69) Bovia, F.; Salmon, P.; Matthes, T.; Kvell, K.; Nguyen, T. H.; Werner-Favre, C.; Barnet, M.; Nagy, M.; Leuba, F.; Arrighi, J.-F.; et al. Efficient transduction of primary human B lymphocytes and nondividing myeloma B cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Blood* **2003**, *101* (5), 1727−1733.
(70) Janssens, W.; Chuah, M. K. L.; Naldini, L.; Follenzi, A.; Collen, D.; Saint-Remy, J.-M.; VandenDriessche, T. Efficiency of onco-retroviral and lentiviral gene transfer into primary mouse and human B-lymphocytes is pseudotype dependent. *Hum. Gene Ther.* **2003**, *14* (3), 263−276.
(71) Serafini, M.; Naldini, L.; Introna, M. Molecular evidence of inefficient transduction of proliferating human B lymphocytes by VSV-pseudotyped HIV-1-derived lentivectors. *Virology* **2004**, *325* (2), 413−424.
(72) von Bergwelt-Baildon, M.; Shimabukuro-Vornhagen, A.; Popov, A.; Klein-Gonzalez, N.; Fiore, F.; Debey, S.; Draube, A.; Maecker, B.; Menezes, I.; Nadler, L. M.; et al. CD40-activated B cells express full lymph node homing triad and induce T-cell chemotaxis: potential as cellular adjuvants. *Blood* **2006**, *107* (7), 2786−2789.

DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b03801
Nano Lett. 2016, 16, 297−308

HIV-Infected Dendritic Cells Present Endogenous MHC Class II–Restricted Antigens to HIV-Specific CD4$^+$ T Cells

Pierre-Grégoire Coulon,* Clémence Richetta,*,[1] Angéline Rouers,*,[1] Fabien P. Blanchet,[†] Alejandra Urrutia,* Mathilde Guerbois,[‡] Vincent Piguet,[§] Ioannis Theodorou,*,[¶] Anne Bet,* Olivier Schwartz,[‖] Frédéric Tangy,[‡] Stéphanie Graff-Dubois,* Sylvain Cardinaud,* and Arnaud Moris*,[¶]

It is widely assumed that CD4$^+$ T cells recognize antigenic peptides (epitopes) derived solely from incoming, exogenous, viral particles or proteins. However, alternative sources of MHC class II (MHC-II)–restricted Ags have been described, in particular epitopes derived from newly synthesized proteins (so-called endogenous). In this study, we show that HIV-infected dendritic cells (DC) present MHC-II–restricted endogenous viral Ags to HIV-specific (HS) CD4$^+$ T cells. This endogenous pathway functions independently of the exogenous route for HIV Ag presentation and offers a distinct possibility for the immune system to activate HS CD4$^+$ T cells. We examined the implication of autophagy, which plays a crucial role in endogenous viral Ag presentation and thymic selection of CD4$^+$ T cells, in HIV endogenous presentation. We show that infected DC do not use autophagy to process MHC-II–restricted HIV Ags. This is unlikely to correspond to a viral escape from autophagic degradation, as infecting DC with Nef- or Env-deficient HIV strains did not impact HS T cell activation. However, we demonstrate that, in DC, specific targeting of HIV Ags to autophagosomes using a microtubule-associated protein L chain 3 (LC3) fusion protein effectively enhances and broadens HS CD4$^+$ T cell responses, thus favoring an endogenous MHC-II–restricted presentation. In summary, in DC, multiple endogenous presentation pathways lead to the activation of HS CD4$^+$ T cell responses. These findings will help in designing novel strategies to activate HS CD4$^+$ T cells that are required for CTL activation/maintenance and B cell maturation. ***The Journal of Immunology*****, 2016, 197: 517–532.**

Accumulating evidence suggests that HIV-specific (HS) CD4$^+$ T cells play a critical role in HIV infection (1). The breadth and specificity of HS CD4$^+$ T cell responses are associated with improved viral control and low viremia during acute and chronic infection, respectively (2, 3). In particular, the generation of Gag-specific CD4$^+$ T cells and their maintenance correlate with a better disease outcome and viral control, respectively (2, 3). There is also evidence of an association between certain HLA-DRβ1 alleles and Gag-specific CD4$^+$ T cell activity with delayed disease progression (4). HS CD4$^+$ T cells can also exert direct antiviral functions by eliminating infected cells and/or inhibiting viral replication (5). Nonetheless, in the absence of treatment, most patients are unable to control HIV infection. Characterizing the pathways leading to HS CD4$^+$ T cell activation in the context of HIV infection or vaccination can therefore directly contribute to the development of novel therapies.

CD4$^+$ T cells recognize their cognate peptide Ag presented by MHC class II (MHC-II) molecules on the surface of APC, including B cells, macrophages, and dendritic cells (DC). It is widely assumed that MHC-II molecules display peptides exclusively derived from extracellular Ag. In this classical pathway, extracellular Ags are captured and then routed in endosomes where they are progressively processed by an array of proteases to be eventually loaded in late endosomes as short peptides (or epitopes) onto nascent MHC-II (6). However, there are numerous exceptions to this rule (7). Polarized secretion of proteases at the B cell immunological synapse leads to Ag processing in extracellular space (8) and potentially epitope loading on MHC-II on the surface of adjacent cells (9). Epitopes derived from exogenous virus can also bind in early endosomes on recycling MHC-II (10, 11). Some influenza Ags can be retro-translocated in the cytosol and processed by proteasomes and translocated in the endoplasmic reticulum by TAP pumps, prior to being loaded on MHC-II molecules (12). Using measles virus infection, early studies have demonstrated that endogenous, meaning neosynthesized, viral Ags are presented on MHC-II molecules as a mechanism of CD4$^+$ T cell activation (13, 14). In a more recent study, Miller et al. (15) showed that initiation of CD4$^+$ T cell responses to influenza virus is driven predominantly by endogenous Ags

*Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, U1135, CNRS 8255, F-75013 Paris, France; [†]CNRS, FRE3689, Université de Montpellier, Centre d'Études d'Agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé, 34293 Montpellier, France; [‡]Unité de Génomique Virale et Vaccination, Institut Pasteur, 75724 Paris, France; [§]Department of Dermatology and Wound Healing, Institute of Infection and Immunity, Cardiff University School of Medicine, Cardiff CF14 4XN, United Kingdom; [¶]Département d'Immunologie, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 75013 Paris, France; and [‖]Unité Virus et Immunité, Institut Pasteur, 75724 Paris, France

[1]C.R. and A.R. contributed equally to this work.

ORCIDs: 0000-0002-8437-3204 (A.R.); 0000-0003-3168-0697 (F.P.B.); 0000-0003-4101-5834 (A.U.); 0000-0001-6079-4517 (V.P.); 0000-0002-5699-2745 (A.B.); 0000-0001-7273-3930 (S.G.-D.); 0000-0002-5052-1678 (A.M.).

Received for publication February 17, 2016. Accepted for publication May 17, 2016.

This work was supported by the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les Hépatites Virales, the Sidaction, and by the Université Pierre et Marie Curie.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Arnaud Moris, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, 91 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France. E-mail address: arnaud.moris@upmc.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: ART, antiretroviral therapy; AZT, azidothymidine; BFA, brefeldin A; DC, dendritic cell; DRiP, defective ribosomal product; HS, HIV-specific; ICCS, intracellular cytokine staining; ICS, intracellular Gag FACS staining; IF, immunofluorescence; LC3, microtubule-associated protein L chain 3; 3-MA, 3-methyladenine; MHC-II, MHC class II; NVP, nevirapine; p.i., postinfection; sh, short hairpin; VSV-G, vesicular stomatitis virus glycoprotein-G.

Copyright © 2016 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/16/$30.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1600286

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at INSERM DISC DOC on July 11, 2016

expressed within the infected APC. Taken together, these findings challenge the notion that a single epitope's fate is sealed by its origin, and, instead, they indicate that commitment to its processing or presentation pathways depends on the Ag source, localization, and type of APC (16, 17).

Recent evidence suggests that macroautophagy (herein referred to as autophagy) participates at steady-states (18) and, upon infection (19), in the processing of Ag. Autophagy allows eukaryotic cells to digest the content of their own cytoplasm through lysosomal routes (20). It involves de novo formation of a double membrane that sequesters a portion of the cytoplasm in an autophagosome, which then matures into a lytic vesicle (21). As for the ubiquitin/proteasome system, autophagy participates in quality control of protein aggregates and thus affects Ag presentation (22). In particular, defective ribosomal products (DRiPs), which constitute a source of Ag for MHC-I–restricted presentation, form aggregates that are degraded by both the ubiquitin/proteasome system and autophagy (22). Autophagy has been shown to contribute to presentation of HSV-1 and CMV Ags by MHC-I molecules (23, 24). The participation of autophagy in MHC-II Ag presentation has been studied in APC-expressing tumor-derived or transfected Ags (25–27) and in the context of infections with attenuated bacteria (28) or with herpes viruses, including EBV (19, 29) and HSV-1 (30). Mice with selective impairment of autophagy in conventional DC displayed a reduced capacity to process MHC-II–restricted HSV-1 Ag (30). In contrast, alterations of autophagy in influenza-infected mouse DC or fibroblasts had no impact on the activation of influenza-specific $CD4^+$ T cells (31). Autophagy was initially described as being involved in the processing of intracellular endogenous MHC-II Ag (19). However, we provided evidence that it also participates in exogenous MHC-II Ag presentation (32). Using human DC, we demonstrated that the inhibition of autophagy with drugs or small interfering RNA reduced the degradation of incoming HIV particles and subsequent activation of HS $CD4^+$ T cell clones (32). Therefore, the impact of autophagy on antiviral $CD4^+$ T cell activation might vary depending on the Ag source, the infection, and/or escape mechanisms developed by viruses. In particular, in HIV-infected cells following expression of the integrated provirus, whether autophagy participates in the processing of endogenous Ags derived from viral proteins remains unknown.

DC play a key role in the initiation of antiviral immune responses. HIV subverts the migration properties of DC to get access to $CD4^+$ T cell–rich compartments (33). Although most HIV particles are rapidly degraded upon their encounter with a DC (34, 35), providing material for MHC-II Ag presentation (32, 36, 37), some viral particles escape degradation and are either directly transmitted to $CD4^+$ T cells by *trans*-infection or initiate *cis*-infection of DC. Indeed, in the absence of treatment, infected DC can be found in the blood of HIV^+ donors (38–40) and, ex vivo, sorted $BCDA1^+$ myeloid DC support productive infection of HIV-1 (41, 42). Monocyte-derived DC are also equipped with HIV receptors (CD4, CCR5, and CXCR4) allowing *cis*-infection (35, 43–45). Nonetheless, HIV replicates poorly in DC as compared with activated $CD4^+$ T cells (35, 44, 46, 47). This is due to the expression of various viral restriction factors that block HIV-1 replication at different stages of DC infection (48). In particular in DC, SAMHD1, a cellular enzyme that depletes intracellular 2′-deoxynucleoside 5′-triphosphates and degrades viral RNA, interferes with reverse transcription, limiting viral replication (49, 50). Still, this residual HIV replication in DC might be sufficient to produce Ags for MHC-II presentation.

In the present study we sought to determine whether HIV-infected DC use an endogenous source of Ag to activate HS $CD4^+$ T cell clones. Using monocyte-derived DC and model cell lines, we demonstrated that de novo expression of HIV Gag and Env Ags leads to the activation of Gag- and Env-specific $CD4^+$ T cell clones. The endogenous presentation of HIV Gag Ag is epitope-dependent, as infected DC activate some but not all Gag-specific $CD4^+$ T cell clones. Because in infected cells, HIV proteins form aggregates (51, 52), we asked whether autophagy might participate in the presentation of endogenous HIV Ag. In contrast to what we observed using the viral input, we show that autophagy does not contribute to the activation of Gag- and Env-specific $CD4^+$ T cell clones when DC are productively infected. However, targeting Gag to autophagosomes using microtubule associated protein light chain 3 (LC3) fusion protein promotes Gag-specific $CD4^+$ T cell activation and broadens the capacity to activate T cells.

Our work unravels novel pathways of MHC-II–restricted HIV Ag presentation and suggests that in infected cells, Gag and Env HIV Ags are not processed in the autophagic pathway. However, the ability to target HIV-derived epitopes to autophagic machinery offers a novel strategy for inducing a robust antiviral $CD4^+$ T cell response.

Materials and Methods

Cells

PBMC from HIV-1 seronegative donors were purchased from the Etablissement Français du Sang of the Pitié-Salpêtrière Hospital (Paris, France), and HLA-DRβ*01$^+$, HLA-DRβ*0401$^+$, and HLA-DRβ*0402$^+$ donors were selected using Luminex xMAP technology (53). Purified monocyte populations were isolated with $CD14^+$ magnetic beads (Miltenyi Biotec) and cultured with RPMI 1640 containing 10% FBS (Invitrogen), 20 ng/ml GM-CSF, and 2 ng/ml IL-4 (Miltenyi Biotec) for 4–5 d to obtain DC. This procedure generates immature DC ($CD1a^+$, MHC class I^+, $MHC\text{-}II^+$, $CD83^-$, $CD80^{-/low}$, $CD86^{-/low}$) (36). HeLa-CIITA cells were provided by P. Benaroche (Institut Curie, Paris, France).

HIV-1–specific CD4$^+$ T cell clones

The F12, N2, and L11 HS $CD4^+$ T cell clones are specific for HIV Gag-p24 (gag2: aa 271–290). F12 recognizes HLA-DRβ1*01 whereas N2 and L11 recognize HLA-DRβ1*04. The IV-9 HS $CD4^+$ T cell clone is specific for HIV Gag-p24 (gag1: aa 311–350) and is restricted by HLA-DRβ1*01 (36). The Een217 $CD4^+$ T cell clone (provided by R.F. Siliciano) is specific for HIV Env (gp120: aa 410–429) and restricted by HLA-DRβ1*0402 (54). The T cell clones were restimulated and expanded, as previously described (36), using irradiated feeders and autologous lymphoblastoid cell lines loaded with cognate peptides in T cell cloning medium (RPMI 1640 containing 5% AB serum [Institut Jacques Boy], 100 IU/ml recombinant human IL-2, and 1 μg/ml PHA [PAA Laboratories] complemented with nonessential amino acids and sodium pyruvate [Life Technologies]). At least 4 h before coculture with APC, T cell clones were thawed and allowed to rest in cloning medium without PHA.

Viral stocks, lentiviral vectors, and plasmids

Replication-competent HIV-1 CCR5-tropic (HIV_{Yu2b}) and CXCR4-tropic ($HIV_{NL4\text{-}3}$), Nef-deficient HIV-1 ($HIV_{Yu2b\Delta Nef}$), and envelope-deficient HIV-1 ($HIV_{Bru\Delta Env}$) were generated as previously (34) by transfection in 293T cells. $HIV_{Bru\Delta Env}$ and $HIV_{NL4\text{-}3}$ were pseudotyped with the envelope from vesicular stomatitis virus (VSV-G) to allow a single round of infection (34). The Gag-p24 content of all viral stocks was measured using an ELISA (PerkinElmer).

Strawberry-Atg4BC74A and GFPLC3 cloned into pE-C1 (U55763) were provided by T. Yoshimori (Osaka University, Suita, Osaka, Japan) and G. Kroemer (Institut Gustave-Roussy, Paris, France), respectively (55, 56). pTRIP-CMV-Gag (encoding Gag protein under the control of a CMV promotor) was a gift from N. Manel (Curie Institute, Paris, France). p41LC3 was cloned into pEGFPLC3-C1 by replacing GFP with the Gag p41 encoding sequence from HIV_{Bru}. Strawberry-Atg4BC74A, GFPLC3, and p41LC3 were inserted in the lentiviral vector pTRIPdeltaU3-CMV using NheI and KpnI restriction sites. The G120A mutation was introduced in p41LC3 using (5′- AGCCAGTGCTGTCGCGAACGTC-TCCTG-3′) primer with a QuikChange XL site-directed mutagenesis kit (Stratagene).

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at INSERM DISC DOC on July 11, 2016

The short hairpin (sh)CTRL and shLC3 were purchased (Open Biosystems). The impact of the anti-LC3B shRNA set (RHS4531-EG81631) and anti-LC3A shRNA set (RHS4531-EG84557) on LC3 expression was assessed in 293T cells upon transfection of the plasmid DNA (not shown). Two shRNA targeting LC3B (V2LHS_226621 and V3LHS_408637) were selected for their capacity to inhibit LC3-I and LC3-II in Western blotting and were subsequently used as a pool. Lentiviral particles were produced by transfection of 293T cells (57).

Cell infection, transduction, and transfection

DC were exposed to the indicated HIV strains at a concentration ranging from 100 to 500 ng/ml p24 for 3–4 h at 37°C, washed, and cultured in medium with IL-4 and GM-CSF. In the HIV plus antiretroviral therapy (ART) conditions, DC were loaded as before with HIV but in the presence of 5 μM azidothymidine (AZT) and 1.2 μM nevirapine (NVP). AZT, NVP, and cytokines were maintained in the culture medium and renewed every second day.

At the indicated time points, DC infection was monitored using anti-Gag Ab (KC57-FITC or -PE, from Beckman Coulter) and flow cytometry. Cell transductions were performed as described (57) in the presence of SIV-Vpx (provided by A. Cimarelli, Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon, France) to enhance the transduction efficiency. Transduction efficiency was monitored by flow cytometry using GFP expression or Strawberry for pGIPZ shRNA lentiviral vectors or the expression of Atg4BC74A, respectively (55). HeLa-CIITA cells stably expressing pGIPZ shRNA-LC3 or pAtg4BC74A were generated by transduction and subsequent selection using puromycin (3 μg/ml). We obtained homogeneous populations of HeLa-CIITA cells with 100% GFP^+ or $Strawberry^+$ cells following transduction with shRNA-LC3 or Atg4BC74A, respectively. HeLa-CIITA cells were transfected with $pHIV_{Yu2b}$ or pTRIP-CMV-Gag plasmids using calcium phosphate (58) or Viromer (Lipocalyx).

Ag presentation assays

Four to 5 d postinfection (p.i.), HLA-matched DC infected with the indicated strain of HIV or exposed to HIV (HIV plus ART) were washed and incubated for 6 h with HS $CD4^+$ T cell clones at a 1:2 E:T ratio. As additional controls for endogenous Ag presentation, uninfected DC were loaded overnight in the presence of ART with the supernatant of HIV-infected cells prior to coculture with T cells. Eventually, the two controls, HIV plus ART and uninfected DC exposed to the supernatant, were pooled. To monitor HIV Ag exogenous presentation, DC were exposed to HIV (16 h at the indicated concentrations in the presence of ART) prior to coculture with T cells. Three days after transfection, HeLa-CIITA cells were cocultured with T cells. As positive controls, stimulator cells were incubated with cognate peptides (at 0.5 μg/ml) or effector cells treated with PMA (50 ng/ml; Sigma-Aldrich) in combination with ionomycin (1 μg/ml; Calbiochem). Brefeldin A (BFA; 5 μg/ml; Sigma-Aldrich) was added 5 h before staining. Cell surface stainings were performed at 4°C for 30 min using anti-CD4 (13B8.2-allophycocyanin; Beckman Coulter), anti-CD3 (SP34-2–PerCP; BD Pharmingen), or anti–DC-SIGN (120507-allophycocyanin/-PE; R&D Systems) mAbs. Cytokine production was then detected using intracellular Gag FACS staining (ICS). Briefly, cells were fixed (4% PFA, 10 min), washed, and permeabilized (PBS, 0.1% BSA, 0.05% saponin, 15 min) prior to mAb staining. The following Abs were used: anti–IL-2 (MQ1-17H12–PE), anti–IFN-γ (B27-PE), anti–TNF-α (11-PE) (all from BD Pharmingen), and anti-MIP1β (24006; R&D Systems). Anti–HIV Gag (KC57-FITC; Beckman Coulter) mAb was used to detect infected cells. Isotype-matched mAbs and Aqua (InvitroGen) were used as a negative control and viability marker, respectively. Samples were examined by flow cytometry using either FACSCalibur or FACSCanto (both from Becton Dickinson), and results were analyzed using FlowJo software. When stated, Torin 1 (Tocris Bioscience), 3-methyladenine (3-MA), E64, chloroquine, BFA, leupeptin (Sigma-Aldrich), spautin-1, bestatin (Merck Millipore), and epoxomicin (Focus Biomolecules) were added at the indicated concentrations 16 h prior to coculture with HS T cells. IFN-γ production was measured in ELISPOT assays as described (36).

Confocal microscopy

Cells (from 10^5 to 2.5×10^5) were left to adhere overnight on glass coverslips at 37°C in culture medium. Prior to harvesting, to better visualize $LC3^+$ vesicles, cells were treated with chloroquine (2 h, 50 μM). Cells were then fixed (4% PFA, 10 min), washed, and permeabilized (PBS, 1% BSA, 0.05% saponin, 15 min), and stained with indicated primary Abs and then when necessary with fluorescently labeled secondary Abs (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Gag staining was performed using KC57-FITC mAb or rabbit polyclonal Ab (gift from P. Boulanger, Lyon, France). $LC3^+$ puncta were visualized using anti-LC3 rabbit polyclonal Ab (MBL International, PMO36) or following cell transduction with GFP-LC3. Confocal microscopy analysis was carried out on an Olympus FV-1000 with a ×60 objective. Z series of optical sections were performed at 0.4-μm increments for qualitative analysis. Blue, green, and red fluorescence were acquired sequentially. Images were processed using ImageJ software (National Institutes of Health).

Western blotting

Sixteen hours after DC treatment with the drugs, 4 d after DC transduction, or 1 d prior to HeLa-CIITA infection, 10^6 cells were lysed (20 min, 4°C) in 20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1 mM $NaVO_4$, 50 mM NaF, and 10 mM $Na_4P_2O_7$ containing protease inhibitors (Roche) supplemented with PMSF (Sigma-Aldrich) and centrifuged at $13{,}000 \times g$ for 20 min. Supernatants were analyzed by SDS gel electrophoresis using 4–12% NuPAGE gels (Invitrogen) transferred to a nitrocellulose membrane and immunoblotted. Anti-LC3 (rabbit, PM036 and mouse, 4E12; MBL International), anti-p62 (3/p62; Becton Dickinson), anti-tubulin (rabbit, 2148, Cell Signaling Technology), and anti-actin (C-2; Santa Cruz Biotechnology) were used.

Ethics statement

PBMC from HLA-DRβ1– or HLA-DRβ4–matched HIV-1 seronegative donors were purchased from the Etablissement Français du Sang of the Pitié-Salpêtrière Hospital (Paris, France). All samples were anonymized and used according to French National Ethic laws. The project was approved by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Statistical analysis

Data were analyzed using a Wilcoxon rank-sum test.

Results

HIV-infected cells present newly synthesized endogenous HIV Ag to HS $CD4^+$ T cells

We first analyzed the capacity of HIV-infected DC to activate HS $CD4^+$ T cells. To this end, monocyte-derived DC were infected with a CCR5-tropic strain of HIV-1 (HIV_{Yu2b}) in the presence or absence of ART (Fig. 1A). We used a combination of two reverse transcriptase inhibitors (AZT and NVP) to block HIV DNA synthesis and subsequent expression of newly produced HIV proteins. Viral propagation was then monitored by intracellular Gag staining using flow cytometry (Fig. 1B). As expected, 5 d p.i. we observed a limited but significant replication of HIV that was abolished by ART, with 2.1 and 0.1% of Gag^+ cells in untreated and treated cells, respectively (Fig. 1B). We compared the ability of HIV-infected and ART-treated DC to activate L11, an HS $CD4^+$ T cell clone. L11 recognizes an immunodominant epitope from Gag p24 (gag2) presented by HLA-DRβ1*04, as previously described (36). T cell activation was evaluated by IFN-γ, TNF-α, IL-2, and MIP1β intracellular cytokine staining (ICCS; Supplemental Fig. 1). Remarkably, HIV-infected DC induced the secretion of multiple cytokines and chemokines upon L11 activation (Fig. 1C, Supplemental Fig. 1). In contrast, DC exposed to the same viral dose but not infected (HIV plus ART) failed to activate L11. These results suggest that, 5 d p.i., ongoing viral replication is required to achieve HS $CD4^+$ T cell activation. Furthermore, as an additional control, uninfected DC were incubated overnight with the supernatant of HIV-infected cells in the presence of ART (to avoid de novo infection) and cocultured with HS $CD4^+$ T cells [Fig. 1C, Ni + Sup. of (1)]. This treatment of DC prevented L11 activation, suggesting that in our culture conditions, Ags released by HIV-infected cells were not sufficient immunogens to activate HS $CD4^+$ T cells.

The expression of viral envelopes (Env) enhances exogenous Ag presentation (36, 59). We therefore analyzed the capacity of DC infected with an HIV strain lacking Env expression ($HIV_{\Delta Env}$) to activate gag-specific $CD4^+$ clones. To allow HIV entry, $HIV_{\Delta Env}$

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at INSERM DISC DOC on July 11, 2016

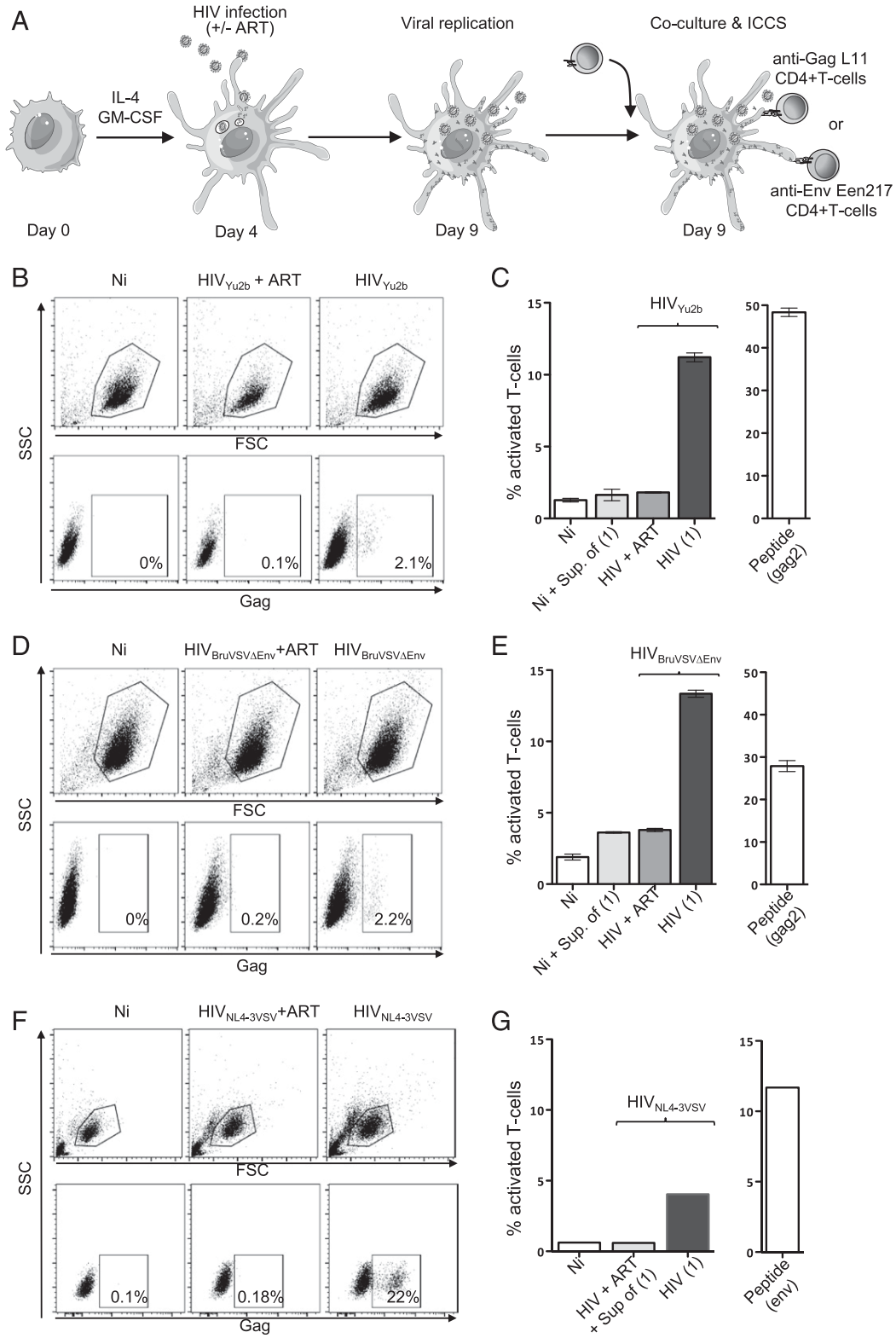


FIGURE 1. HIV-infected DC present endogenous MHC-II–restricted HIV Ags to HS CD4$^+$ T cells. (**A**) DC were generated from HLA-DRβ1*04$^+$ (**B**–**E**) or HLA-DRβ1*0402$^+$ (**F** and **G**) PBMC and infected with HIV$_{Yu2b}$ (B and C), HIV$_{BruVSV\Delta Env}$ (D and E), or HIV$_{NL4\text{-}3}$ (F and G) in the absence or presence of RT inhibitors AZT and NVP (HIV plus ART). At day 5 p.i., DC were collected and the percentage of infected cells was evaluated by ICS (B, D, and F). Infected DC were then used to stimulate L11, a Gag-specific CD4$^+$ T cell clone restricted by HLA-DRβ1*04 (C) and (E), or Eenv217, an Env-specific CD4$^+$ T cell clone restricted by HLA-DRβ1*0402 (G). T cell activation was monitored using ICCS (C, E, and G). ICCS was performed using anti–IL-2, anti–IFN-γ, anti–TNF-α, and anti-MIP1β. Results are presented as the proportion of activated cells producing at least one of these cytokines/chemokines upon stimulation and are the mean ± SD of duplicates. Noninfected DC (Ni) and DC pulsed with the cognate peptide (0.5 μg/ml) were used as negative and positive controls, respectively. (C and E) Noninfected DC pulsed overnight in the presence of ART with the supernatant of HIV-infected cells [Ni + Sup. of (1)] and DC infected in the presence of ART (HIV + ART) were used as control to monitor the residual contribution of Ag (*Figure legend continues*)

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at INSERM DISC DOC on July 11, 2016

was pseudotyped with the vesicular stomatitis virus G protein ($HIV_{VSV\Delta Env}$) and used to infect DC (Fig. 1D). Five days p.i., 2.2% of DC were infected (Gag^+) and, as expected, ART blocked infection in treated DC (Fig. 1D). $HIV_{VSV\Delta Env}$-infected DC induced the activation of L11 (Fig. 1E). In contrast, ART-treated DC and DC loaded with the supernatant of infected cells induced only a residual background stimulation of L11 (Fig. 1E). These data strongly suggest that Gag expression by infected APC is required to achieve HS $CD4^+$ T activation.

We extended these observations to a second viral protein Env. DC were infected as previously described with HIV_{NL4-3}. Because this CXCR4-tropic HIV-1 strain replicates poorly in DC (44), we pseudotyped HIV_{NL4-3} with VSV-G to enhance viral entry (Fig. 1F). Five days p.i., infected cells were then cocultured with the Env-specific $CD4^+$ T cell clone Een217 (Fig. 1G). This clone recognizes gp120 (aa 410–429) peptide and is restricted by HLA-DRβ1*0402 (54). Note that in model APC infected with recombinant vaccinia, Rowell et al. (60) showed that the expression of gp120 leads to Een217 activation but, in contrast, secreted forms of gp120 do not activate Een217 $CD4^+$ T cells, thus strongly suggesting that an intracellular route of Env degradation is required for Een217 activation. Remarkably, we observed that HIV-infected DC activated Een217, leading to the secretion of multiple cytokines and chemokines (Fig. 1G). In contrast, DC exposed to the same viral dose but not infected (HIV plus ART) and loaded with the supernatant of infected DC failed to activate Een217 (Fig. 1G). As for Gag, these data strongly suggest that Env expression by infected APC is required to achieve HS $CD4^+$ T activation.

To further demonstrate that neosynthesized viral proteins are the source of Ag, we used the HeLa-CIITA cell line as model APC (61). In HeLa cells, the transactivator CIITA drives the expression of HLA-DRβ1*01 and other molecules required for MHC-II trafficking and loading. Of note, although this cell line constitutes a model for the study of MHC-II–mediated Ag presentation, HeLa-CIITA cells exhibit minimal APC specialization (62). Remarkably, transfection of HIV proviral DNA in these cells led to Gag expression (Supplemental Fig. 2A, 2B) and the activation of F12 (36), another HS $CD4^+$ T cell clone that also recognizes gag2 but bound to HLA-DRβ1*01 (Supplemental Fig. 2C).

Collectively, our results demonstrate that productive infection and/or expression of neosynthesized HIV Ags in APC allow the activation of HS $CD4^+$ T cells.

Endogenous presentation of HIV Gag Ag is epitope-dependent

We sought to compare the capacity of HIV-infected DC to activate various HS $CD4^+$ T cell clones. To this end, DC were infected (with and without ART) for 5 d and cocultured with two distinct HS $CD4^+$ T cell clones, F12 and IV-9 (Fig. 2). The clones F12 and IV-9 recognize two distinct epitopes from Gag p24, gag2 and gag1, respectively, both presented by HLA-DRβ1*01 (36). As expected, productive DC infection was required to activate F12 (Fig. 2A, *right panel*), further confirming that neosynthesized gag2 epitope is presented by MHC-II molecules. In contrast, 5 d p.i., IV-9 clones were not activated by HIV-infected DC or by ART-treated DC, as evidenced in several independent experiments (Fig. 2B). The absence of IV-9 activation was not due to ineffective HLA-DR presentation because DC pulsed with the cognate gag1 peptide, used as a positive control, activated IV-9 (Fig. 2B, *right panel*). The results presented in Fig. 2A and 2B were generated using DC isolated from different blood donors. To eliminate the possibility of intrinsic donor variations, we compared the capacity of HLA-DRβ1*01^+ DC derived from the same individual in activating F12 and IV-9 (Fig. 2C). As seen previously, we confirmed that infected (Gag^+) DC were able to activate F12 but failed to activate IV-9 (Fig. 2C). We also asked whether increasing the rate and percentage of HIV-infected DC might induce the activation of IV-9 clones. To this end, DC were infected with HIV-1 in the presence of the SIV protein Vpx (SIV-Vpx) that alleviates the restriction mediated by SAMHD1 (49). In the presence of SIV-Vpx, 30% of DC were productively infected, compared with only 5.5% in the absence of SIV-Vpx (Fig. 2C). Although increasing the percentage of HIV-1–infected cells led to a 3- to 4-fold increase of F12 activation (reaching up to 30% of activated cells), it did not have a significant impact on IV-9 activation.

As an additional control, 16 h prior to coculture with HS $CD4^+$ T cell clones, DC were also incubated with HIV and SIV-Vpx in the presence of ART (Fig. 2C). Under these experimental conditions, the source of HIV-derived Ag corresponds to the incoming viral particles (36). We previously showed that F12 but also IV-9 can be activated by HIV-pulsed DC (36). Indeed, HLA-DRβ1*01^+ DC loaded with HIV particles for 16 h in the presence of ART activated both F12 and IV-9 (Fig. 2C). These results conclusively demonstrated that productively infected DC failed to activate the clone IV-9 whereas DC loaded with exogenous HIV Ag resulted in activation. These results strongly suggest that exogenous and endogenous Gag Ag processing routes rely on distinct cellular pathways.

Autophagy does not contribute to endogenous presentation of Gag and Env epitopes in HIV-infected DC

To get a hint on potential processing routes, we transfected HeLa-CIITA cells with a plasmid-encoding HIV Gag and treated the cells with various drugs prior to coculture with the HS $CD4^+$ T cell clone F12 (Supplemental Fig. 2A, 2D). Drugs affecting cathepsin activities (E64 and leupeptin) and acidification (chloroquine) inhibited, in a dose-dependent manner, the activation of F12. At the highest concentration used, bestatin, an aminopeptidase inhibitor, and BFA-1, which blocks vesicular trafficking, also slightly inhibited T cell activation. In contrast, a potent proteasome inhibitor (epoxomycin) did not impact T cell activation (Supplemental Fig. 2D). With the exception of BFA-1 and bestatin (used at the highest concentrations), the drugs did not influence the presentation of the cognate peptide to F12 (Supplemental Fig. 2D). These results suggested that processing of the Gag2 epitope relies on endolysosomal proteolysis by cysteine cathepsins and potentially on the loading of newly synthetized MHC-II molecules. We previously demonstrated that the presentation of Gag Ag by HIV-loaded DC to HS $CD4^+$ T cell clones is dependent on endolysosomal processing and partially on autophagy (32, 36). Because Gag expression leads to the formation of DRiPs (51) and protein aggregates (52) and has been shown in infected macrophages to colocalize with autophagosomes (63, 64), we asked whether, in HIV-infected DC, autophagy might be involved in endogenous presentation of viral Ags. To this end, DC were infected for 4 d and treated with drugs modulating autophagy for an

transfer and/or exogenous Ag presentation in T cell activation. (G) DC infected in the presence of ART (HIV + ART) were loaded with the supernatant of infected cells [Sup. of (1)] and used as control. The results are representative of at least three independent experiments using HLA-DRβ1*04^+ or HLA-DRβ1*0402^+ DC from different donors. HIV (1), HIV-infected cells; Ni, noninfected cells; Sup. of (1), supernatant of HIV-infected cells. The numbers in quadrants indicate the percentage of Gag^+ cells.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at INSERM DISC DOC on July 11, 2016

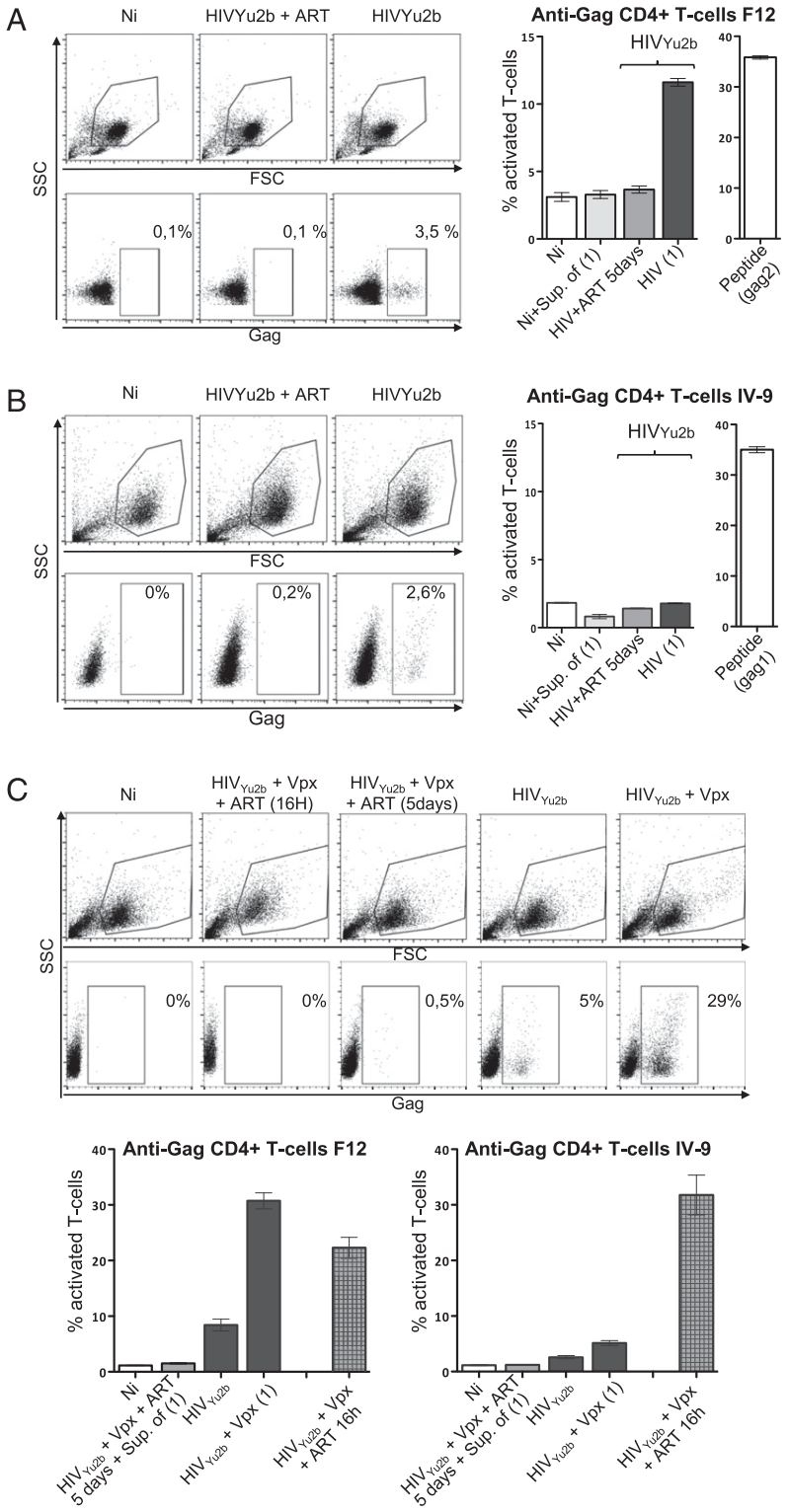


FIGURE 2. Endogenous presentation of HIV Gag Ag is epitope-dependent. HLA-DRβ1*01$^+$ DC were generated and infected with HIV with and without ART as in Fig. 1. Five days p.i., the percentage of Gag$^+$ cells was monitored by ICS (**A** and **B**, *left panel*) and DC used to stimulate HS CD4$^+$ T cell clones, F12 (A) and IV-9 (B) that are restricted by HLA-DRβ1*01. T cell activation was monitored using ICCS (A and B, *right panel*). Results are presented as the proportion of activated cells producing at least one cytokine/chemokine and are the means ± SD of duplicates. Noninfected DC (Ni) and DC pulsed with the cognate peptide (gag2 or gag1, 0.5 μg/ml) were used as negative and positive controls, respectively. Noninfected DC pulsed overnight in the presence of ART with the supernatant of HIV-infected cells [Ni + Sup. of (1)] and DC infected in the presence of ART (HIV + ART 5 d) were used as control. (**C**) Side-by-side comparison of F12 and IV-9 activation by infected DC generated from the same HLA-DRβ1*01$^+$ individual. When stated, to enhance infection, DC were loaded with SIV-Vpx 1 h prior to infection [HIV + Vpx (1)]. The infectivity (percentage of Gag$^+$ cells) was evaluated. To confirm the capacity of IV-9 to recognize HIV-derived Ag, 16 h prior to ICCS, uninfected DC were pulsed with a high dose of HIV in the presence of ART (HIV + Vpx + ART 16 h). Under these conditions, the source of HIV Ag corresponds to the incoming viral particles. To monitor the residual contribution of Ag transfer or/and exogenous Ag presentation in T cell activation, as in (A) and (B), DC infected in the presence of ART (HIV + Vpx + ART) were loaded with the supernatant of infected cells [Sup. of (1)] and used as control. The results are representative of at least three independent experiments using DC from various donors. HIV (1), HIV-infected cells; Ni, noninfected cells; Sup. of (1), supernatant of HIV-infected cells.

additional 16 h prior to coculture with L11 (Fig. 3A). Using Western blotting, the modulation of autophagy was assessed by measuring the conversion of LC3-I to LC3-II, the lipidated form of LC3 that is essential for autophagosome formation (Supplemental Fig. 3) (20). Increasing concentrations of 3-MA, an autophagy inhibitor, blocked in a dose-dependent manner the conversion of LC3-I to LC3-II in DC lysates (Supplemental Fig. 3A, *left panel*). In contrast, the addition of Torin 1, a potent inducer of autophagy, induced a strong accumulation of LC3-II (Supplemental Fig. 3A, *right panel*). Drug treatments did not affect the viability of the cells (not shown) or the capacity of peptide-pulsed DC to activate L11 (Fig. 3B, *right panel*). Regardless of the treatment, modulating autophagy with drugs did not alter the percentage of Gag$^+$ cells (not shown) and, more

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at INSERM DISC DOC on July 11, 2016

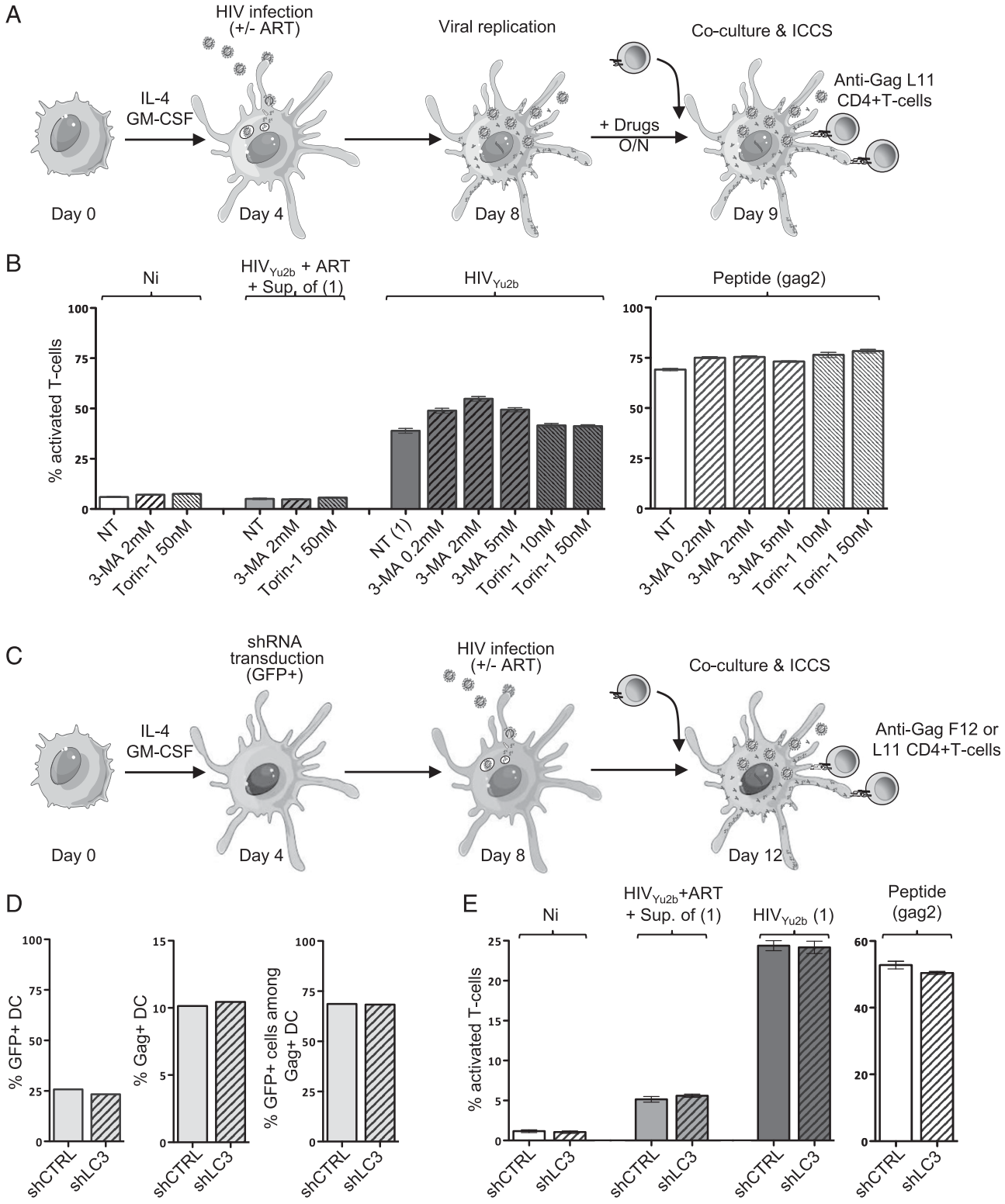


FIGURE 3. Autophagy does not contribute to endogenous presentation of Gag epitopes in HIV-infected cells. (**A**) HLA-DRβ1*04$^+$ DC were generated and infected with HIV with and without ART. Prior to coculture with L11, the percentage of Gag$^+$ cells was evaluated (11%, not shown) and DC were treated for 16 h with the indicated concentrations of 3-MA or Torin 1, inhibitor or inducer of autophagy, respectively. (**B**) Drug-treated or mock-treated DC were then cocultured with L11 and T cell activation assessed by ICCS, as previously. Noninfected DC (Ni) and DC pulsed with the cognate peptide (gag2, 0.5 μg/ml) were used as negative and positive controls, respectively. These controls were also treated with the highest concentration of drugs to evaluate possible effects of the drugs on T cell activation. (**C**) HLA-DRβ1*04$^+$ DC were generated and transduced with control shRNA (shCTRL) or anti-LC3 shRNA (shLC3) together with SIV-Vpx. Four days after transduction, DC were infected with HIV with and without ART. (**D**) The percentage of transduced (GFP$^+$) and infected (Gag$^+$) DC was determined by flow cytometry. (**E**) The capacity of treated DC to activate L11 or F12 was then evaluated by ICCS. Uninfected DC (Ni) and DC pulsed with the cognate peptide (gag2, 0.5 μg/ml) were used as negative and positive controls, respectively. In (B) and (E), DC infected in the presence of ART (HIV + ART) were loaded with the supernatant of *(Figure legend continues)*

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at INSERM DISC DOC on July 11, 2016

importantly, had no impact on the capacity of HIV-infected DC to activate L11 (Fig. 3B). Nonetheless, because 3-MA might exert pleiotropic effects (65), we repeated these experiments using a newly described specific and potent autophagy inhibitor Spautin-1 (66). Spautin-1 offers the advantage to be less toxic to the cell and to be used at lower concentration (μM range). As for 3-MA, a 16-h incubation with Spautin-1 did not influence the capacity of infected DC to activate HS-CD4$^+$ T cells (not shown). Note that we extended these results to Env processing and observed that treating HIV-infected DC with autophagy inhibitors did not change the activation levels of the Env-specific T cell clone Een217 (not shown).

We further confirmed these observations using shRNA targeting LC3 expression (Fig. 3C, 3D). DC were transduced with lentiviruses encoding anti-LC3 or irrelevant control shRNA, both encoded with GFP (Fig. 3C). SIV-Vpx was used to enhance transduction efficiency (57). LC3 downmodulation was evaluated using Western blotting and confocal imaging (immunofluorescence [IF]; Supplemental Fig. 3B, 3C). Four days after transduction, DC were infected with HIV for an additional 4–5 d (Fig. 3C). The percentage of GFP$^+$ and infected Gag$^+$ cells was analyzed by flow cytometry prior to coculture with L11 (Fig. 3D). Depending on the DC preparation, we observed that 25–50% of cells were GFP$^+$. We noticed a preferential infection of transduced GFP$^+$ cells (75% of Gag$^+$ cells were GFP$^+$, Fig. 3D) that was most likely due to Vpx-mediated, sustained degradation of SAMHD1 (49, 57, 67). As expected, DC treated with the control shRNA and productively infected with HIV induced the activation of HS L11 (Fig. 3E). In contrast, DC loaded with HIV in the presence of ART or incubated with the supernatant of infected cells induced residual background stimulation (Fig. 3E). In agreement with experiments in which autophagy flux was pharmacologically modulated (Fig. 3B), reducing LC3 expression in infected cells did not influence anti-Gag CD4$^+$ T cell activation as compared with control shRNA-treated cells (Fig. 3E).

The LC3 family of enzymes includes various members, that is, LC3A-C, GABARAP, and GABARAPL1-3, which might have redundant functions (20). Although we observed a major inhibition of LC3-I and LC3-II expression using shLC3 and anti-LC3 Abs specific for LC3A-C by Western blotting and IF (Supplemental Fig. 3B, 3C), we could not formally exclude that we were unable to completely inhibit the appropriate LC3 isoform involved in Ag presentation. We therefore undertook an alternative approach and cloned a *trans*-dominant negative mutant of Atg4B, Atg4BC74A, fused to the fluorescent protein Strawberry, into a lentiviral vector (Fig. 4). Transduction of Atg4BC74A in DC was very efficient, ranging from 50 to 85% of Strawberry$^+$ cells (Fig. 4B, *left panel*). Atg4BC74A has been previously reported to neutralize the cleavage of LC3 precursor into LC3-I and thus to impede the formation of autophagosomes (55). Indeed, transduced cells failed to form autophagosomes, as evaluated by confocal imaging of GFPLC3 puncta (Fig. 4A). As described above, abolishing autophagosome formation did not impact the capacity of HIV-infected DC to activate anti-Gag CD4$^+$ T cell clones (L11; Fig. 4C and F12 not shown).

We extended these results to HeLa-CIITA cells stably expressing anti-LC3 shRNA or Atg4BC74A (Supplemental Fig. 4). In these cells, the downregulation of LC3 expression and the inhibition of autophagy by Atg4BC74A were confirmed by Western blotting using anti-LC3 and anti-p62 Abs, respectively (Supplemental Fig. 4B, 4D). p62 (or SQSTM-1) is a cellular target of autophagic degradation whose accumulation is a classical feature of autophagy inhibition (32). LC3$^-$ and Atg4BC74A$^+$ HeLa-CIITA cells were then transfected with HIV proviral DNA (Supplemental Fig. 4A), cocultured with F12, and monitored by ICCS (Supplemental Fig. 4C, 4E) or IFN-γ ELISPOT (not shown) to evaluate T cell activation. As observed with DC, abolishing autophagosome formation did not impact the capacity of HIV-transfected cells to activate anti-Gag CD4$^+$ T cell clone F12.

Note that the study of Env Ag presentation using shRNA or Atg4BC74A and DC or HeLa-CIITA cells could not be envisage because the anti–env Een217 CD4$^+$ T cell clone is restricted by HLA-DRβ1*0402 that has a very low frequency in the general population (limiting the availability of primary cells) and that is not expressed by HeLa-CIITA cells.

Nonetheless, our results using CD4$^+$ T cells clones specific for two viral proteins (Gag and Env), primary DC together with a model cell line, drugs, and shRNA suggest that autophagy might not participate in the processing of endogenous HIV Ag in infected DC.

HIV viral proteins Nef and Env do not significantly impact endogenous presentation of HIV Gag Ag

Through the action of accessory viral proteins such as Nef, HIV developed multiple strategies to manipulate the trafficking of cellular receptors and vesicles (68). In particular, Nef induces a strong accumulation of surface-immature MHC-II molecules characterized by a reduced capacity to present exogenous peptide to Ag-specific CD4$^+$ T cells (61). Additionally, it has been reported that Nef might favor HIV release from infected macrophages while impeding viral degradation by inhibiting the maturation of autophagosomes into autolysosomes (63). We therefore asked whether Nef might influence the ability of infected cells to activate HS CD4$^+$ T cells. To this end, DC were infected with wild-type and *nef*-deficient HIV (HIV$_{\Delta Nef}$; Fig. 5). Five days p.i., HIV$_{\Delta Nef}$ readily infected DC but the percentage of infected cells was slightly reduced as compared with HIV wild-type (1.8 and 2.2% of cells were Gag$^+$, respectively; Fig. 5A). This was expected, as Nef affects various steps of viral replication (68, 69). Nonetheless, HIV$_{\Delta Nef}$-infected cells activated HS clones (F12 and L11) at levels similar than wild-type HIV and did not induce the activation of the IV-9 clone (Fig. 5B and not shown). Additionally, altering autophagy using the anti-LC3 shRNA or overexpressing Atg4BC74A did not influence the capacity of HIV$_{\Delta Nef}$-infected DC to activate HS clones (F12 and L11, not shown).

When engaging with its cellular receptors, the viral envelope also initiates various signaling cascades that influence HIV replication (70). We have previously shown that Env binding to CD4 activates the mTOR signaling pathway, leading to transient downregulation of the autophagic flux (32). We thus asked whether Env might influence the ability of infected cells to activate HS CD4$^+$ T cells. As in Fig. 1, we used VSV-G pseudotyped viruses HIV$_{VSV\Delta Env}$ and HIV$_{VSV}$ to infect DC (Fig. 5C). Five days p.i., the percentages of Gag$^+$ cells were quite similar in both conditions (3.9 and 4.7% using HIV$_{VSV\Delta Env}$ and HIV$_{VSV}$, respectively; Fig. 5C). Remarkably, HIV$_{VSV\Delta Env}$- and HIV$_{VSV}$-infected DC induced similar levels of F12 or L11 activation and did not stimulate IV-9 clones (Fig. 5D and not shown). These data demonstrate that the viral

infected cells [Sup. of (1)] and used as control. The results are representative of three independent experiments using DC from various donors. HIV (1), HIV-infected cells; Ni, noninfected cells; NT, mock-treated cells; Sup. of (1), supernatant of HIV-infected cells.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at INSERM DISC DOC on July 11, 2016

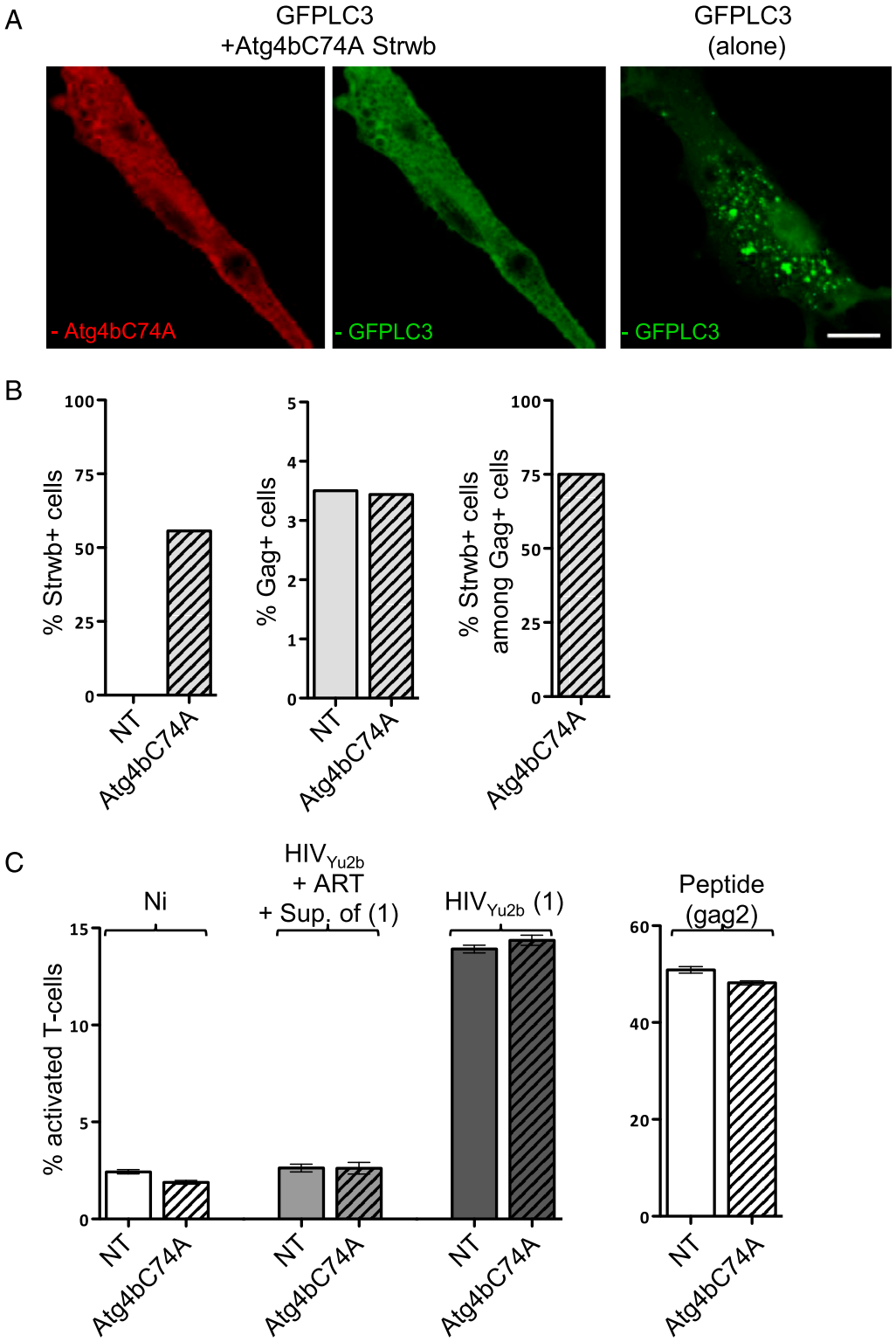


FIGURE 4. Inhibiting autophagy with the dominant negative Atg4BC74A does not affect endogenous presentation of HIV Gag Ag by DC. HLA-DRβ1*04$^+$ DC were generated and transduced with Atg4BC74A together with SIV-Vpx. (**A**) Atg4BC74A-transduced DC were further transduced with GFPLC3 and the knockdown of autophagy was determined upon analysis of GFPLC3$^+$ puncta by IF. Four days after transduction, DC were infected with HIV with and without ART as in Fig. 1. Scale bar, 10 μm. (**B**) Atg4BC74A-transduced DC were infected by HIV. The percentage of transduced (Strwb$^+$) and infected (Gag$^+$) DC was determined by flow cytometry. (**C**) The capacity of treated DC to activate L11 was then evaluated by ICCS as in Fig. 1. Noninfected DC (Ni) and DC pulsed with the cognate peptide (gag2, 0.5 μg/ml) were used as negative and positive controls, respectively. As in Fig. 2C, DC infected in the presence of ART (HIV + ART) were loaded with the supernatant of infected cells [Sup. of (1)] and used as control. The results are representative of three independent experiments using DC from various donors. NT, mock-transduced; Strwb, Strawberry.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at INSERM DISC DOC on July 11, 2016

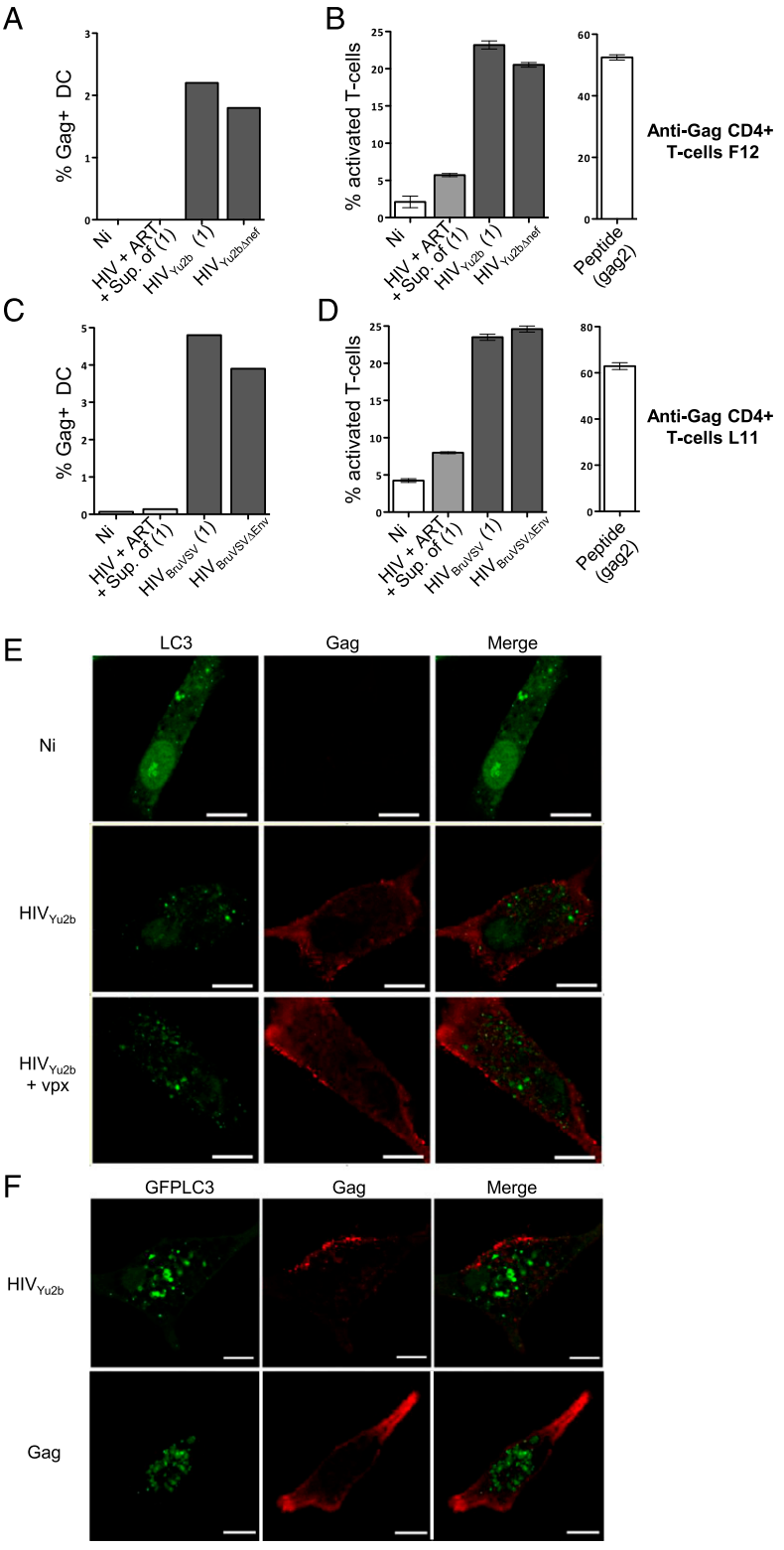


FIGURE 5. HIV Nef and Env do not impact endogenous presentation of HIV Gag Ag. DC were generated from HLA-DRβ1*04$^+$ PBMC and infected with HIV_{Yu2b}, $HIV_{Yu2b\Delta Nef}$ (**A** and **B**), or $HIV_{Yu2b\Delta Env}$ (**C** and **D**) with and without ART. At day 5 p.i., DC were collected and the percentage of infected Gag$^+$ cells was evaluated (A and C). Infected DC were then used to stimulate F12 or L11. T cell activation was monitored using ICCS (B and D). Results are presented as the percentage of activated cells producing at least one cytokine/chemokine. Uninfected DC (Ni) and DC pulsed with the cognate peptide (gag2, 0.5 μg/ml) were used as negative and positive controls, respectively. DC infected in the presence of ART (HIV + ART) were loaded with the supernatant of infected cells [Sup. of (1)] and used as control. (**E**) Gag does not colocalize with autophagosomes in HIV-infected DC. DC were infected with HIV_{Yu2b} or HIV_{Yu2b} plus SIV-Vpx. Gag colocalization with LC3 was monitored 4 d p.i. using anti-Gag and anti-LC3 Abs and IF. Scale bars, 10 μm. (**F**) To facilitate the detection of autophagosomes, DC were transduced with GFP-LC3 and infected with HIV_{Yu2b} or cotransduced with a vector encoding HIV Gag protein in the absence of other viral proteins. Gag colocalization with GFP-LC3 was monitored, 4 d p.i. or transduction, using anti-Gag Ab and IF. All results are representative of at least three independent experiments using DC from different donors. Scale bars, 10 μm. HIV (1), HIV-infected cells; Ni, noninfected cells; Sup. of (1), supernatant of HIV-infected cells.

proteins Nef and Env do not significantly alter the capacity of HIV-1–infected DC to activate HS CD4$^+$ T cells.

Using confocal imaging, we then compared the cellular localization of Gag in HIV-infected DC. As expected, we observed a diffuse cytosolic distribution and a brighter staining of Gag at the cellular membranes of HIV-infected cells (Fig. 5E). However, in these cells, Gag staining did not colocalize with LC3 puncta detected with LC3-specific Abs (Fig. 5E). Infecting DC with HIV in the presence of SIV-Vpx, although favoring viral replication (Fig. 2C), induces DC maturation and the activation of type IFN responses (not shown and Ref. 46) but had no impact on the cellular distribution of Gag. Additionally, to exclude the possibility that another viral protein than Nef and Env might interfere with the autophagic degradation of Gag, we asked whether Gag

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at INSERM DISC DOC on July 11, 2016

expressed alone might colocalize with LC3 (Fig. 5E). As with infected DC, Gag expressed in the absence of other viral protein did not colocalize with LC3 (Fig. 5F). Collectively, these data strongly argue against a major role of autophagy, if any, in the presentation of endogenous Gag Ag by APC.

Targeting Gag to autophagosomes strongly enhances HS CD4$^+$ T cell activation and reveals additional MHC-II–restricted endogenous epitopes

Delivering viral Ag or epitope to autophagosomes was previously reported to enhance Ag-specific CD4$^+$ T cell activation (26, 31). We therefore sought to determine whether targeting HIV Gag to autophagosomes could boost HS CD4$^+$ T cell activation. In an approach similar to that of Schmid et al. (26), we fused LC3, which anchors within the lumen of autophagosomes and allows specific targeting of cargo, at the C terminus of Gag p41 leading to the fusion protein p41LC3 (20). As expected, when transduced in DC or HeLa-CIITA cells, p41LC3 colocalized with GFPLC3, which is commonly used as a marker for autophagosomes (Fig. 6A). DC transduced with p41LC3 were then cocultured with L11 and T cell activation was monitored by ICCS. Remarkably, although transduction levels were very weak with only 2% of DC expressing p41LC3 (Fig. 6B), we observed a very strong stimulation of HS clones when cocultured with p41LC3-transduced DC (Fig. 6C). T cell activation was reduced to background levels when DC were transduced in the presence of ART (Fig. 6C). Additionally, prior to coculture, a 16-h incubation of p41LC3-transduced DC with increasing concentrations of 3-MA inhibited HS T cell activation in a dose-dependent manner (Fig. 6C). As illustrated in Supplemental Fig. 3, 3-MA blocked the conversion of LC3-I to LC3-II. The treatment with 3-MA did not influence the capacity of DC to present the cognate gag2 peptide to HS T cells (Fig. 6C). Thereafter, when specifically delivered into autophagosomes, HIV-1–Gag can be processed in an autophagy-dependent manner, leading to very strong HS CD4$^+$ T cell activation.

We then compared the efficiency of p41LC3-tranduced DC and HIV-1–infected DC in activating HS CD4$^+$ T cells. Although the percentage of Gag$^+$ cells was lower when compared with HIV-1–infected cells (1 versus 3.5%, respectively; Fig. 6D), p41LC3-transduced DC induced a stronger activation of the F12 HS CD4$^+$ T cell clone (16 versus 11% of activated T cells, respectively; Fig. 6E).

Similar results were obtained when using HeLa-CIITA cells transfected with p41LC3 or pHIV cocultured with HS CD4$^+$ T cell clones (Fig. 7B, 7C). Remarkably, transfecting HeLa-CIITA cells with a vector encoding HIV Gag protein, in the absence of other viral proteins, did not enhance T cell activation levels as compared with cells transfected with pHIV. Thereafter, a specific targeting of Gag to autophagosomes, through fusion with LC3, seems required to enhance T cell activation. To conclusively demonstrate the role of the autophagic pathway in processing p41LC3 and consequently enhancing T cell activation, we used two additional controls (Fig. 7B, 7C). First, to abolish the lipidation and autophagosome incorporation of LC3, we introduced a G120A mutation in the C terminus of LC3 from our p41LC3 fusion construct (26). In contrast to p41LC3, p41LC3$_{G120A}$ did not target p41 to autophagosomes, as confirmed by the lack of colocalization with GFPLC3 in transfected HeLa-CIITA cells (Fig. 7A). Second, p41LC3 was transfected in HeLa-CIITA cells stably expressing Atg4BC74A (Fig. 7B, 7C). Using both approaches, we observed that p41LC3$_{G120A}$ or p41LC3 plus Atg4BC74A expression by HeLa-CIITA cells reduced F12 activation down to the levels induced by HeLa-CIITA cells transfected with HIV proviral DNA or HIV Gag–encoding plasmid (Fig. 7B, 7C). Note that Atg4BC74A expression did not influence T cell activation mediated by HeLa-CIITA cells transfected with pHIV, HIV Gag plasmid, or loaded with the cognate peptide, used as control. These results demonstrate that a functional coupling of Gag to LC3 strongly enhances APC-mediated HS CD4$^+$ T cell activation in an autophagy-dependent manner.

We then analyzed the capacity of p41LC3-tranduced DC to activate the IV-9 HS CD4$^+$ T cell clones, shown to be exclusively activated upon MHC-II–mediated presentation of exogenous HIV particles from challenged DC but not by productively HIV-1–infected DC (see Fig. 2B, 2C). Remarkably, 2.5% of p41LC3$^+$ DC were sufficient to induce a robust activation of IV-9, reaching up to 30% of activated cells (Fig. 7D, 7E). As reported above, HIV-infected DC (2.4% of Gag$^+$ cells) failed to activate IV-9 clones (Fig. 7D, 7E). Thus, the specific targeting of HIV-1–derived Ag to autophagosomes not only enhances T cell activation but also diversifies the pool of endogenous MHC-II–restricted epitopes.

Discussion

The recent discovery of broad and potent HIV-1–neutralizing Abs has renewed optimism for developing an effective vaccine against HIV-1 (71). However, broad and potent HIV-1–neutralizing Ab generation requires multiple rounds of BCR affinity maturation, a process that is strictly controlled by preactivated CD4$^+$ Th cells, in particular T follicular helper cells (72). Thereafter, understanding how DC prime antiviral CD4$^+$ T cells is of particular interest for basic immunology but also in the field of vaccine development.

MHC-II molecules can present HIV-derived Ag that arises from various origins. We previously described that HIV virions can be captured and processed by DC, leading to Gag-specific CD4$^+$ T cell clone activation (36, 37). Early studies also reported that endogenous expression of HIV Env, following recombinant vaccinia virus infection of B cells, allowed the activation of Env-specific CD4$^+$ T cells (60, 73). The presentation of some Env epitopes was dependent on Env recycling from the cell surface but independent of cytosolic processing (60). In contrast, secreted forms of gp120 could not activate the Een217 CD4$^+$ T cell clone also used in our study (60), thus strongly suggesting that an intracellular route of Env degradation was required for T cell activation (60). We also demonstrated that Gag expression in B cells and DC using recombinant measles virus (74) or modified vaccinia virus Ankara (75) infections, respectively, lead to Gag-specific CD4$^+$ T cell activation. Using murine cells, Thiele et al. (76) recently suggested that the processing of a model Ag by modified vaccinia virus Ankara–infected DC was, in part, dependent on autophagy. Several reports using mRNA transfection (77, 78) or single-cycle infection with VSV-pseudotyped HIV particles (46) also suggested that DC present endogenous Ags to HS CD4$^+$ T cells.

Our present study revealed that DC infected with replication-competent HIV can process and present newly synthesized/endogenous Gag and Env Ags to HS CD4$^+$ T cells. We used various controls to exclude the possibility that residual exogenous Ag, from the viral input or virions released from HIV-infected cells, might be responsible for HS CD4$^+$ T cells activation. In particular, because viral envelopes facilitate Ag transfer from virus-like particles or exosomes to uninfected cells (59) and enhance HIV capture and routing into degradative endolysosomal compartments (36), we used Env-deficient HIV strains to emphasize that HIV-infected DC present endogenous Gag Ag. To further demonstrate that this pathway requires de novo synthesis of Gag and does not rely on Ag transfer, we transfected HeLa-CIITA cells with an HIV-1 proviral genome. Although these cells present minimal APC specialization and are unable to process

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at INSERM DISC DOC on July 11, 2016

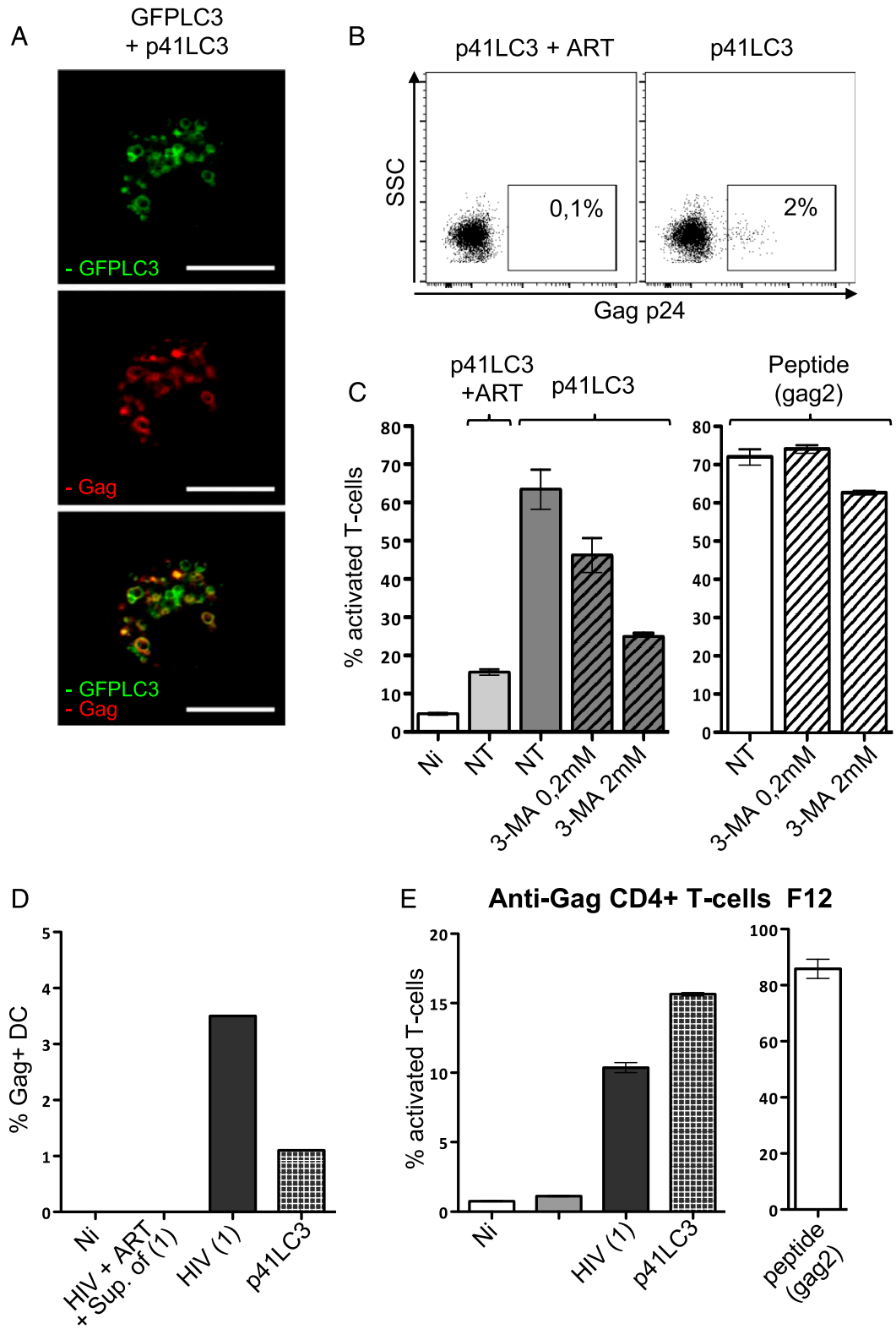


FIGURE 6. Targeting Gag to autophagosomes strongly enhances HS CD4$^+$ T cell activation. (**A**) DC were cotransduced with p41LC3 and GFPLC3. p41LC3 colocalization with GFPLC3 was evaluated using anti-Gag Abs and revealed by IF. Scale bars, 10 μm. (**B** and **C**) HLA-DRβ1*04$^+$ DC were transduced with p41LC3 with and without ART. Four days after transduction, DC were treated for 16 h with 3-MA at the indicated concentrations, prior to coculture with L11. The percentage of p41LC3 transduced DC was evaluated using Gag ICS (B) and T cell activation monitored using ICCS (C). Peptide-pulsed DC were also treated with 3-MA to evaluate possible side effect on T cell activation. DC transduced in the presence of ART (p41LC3 + ART) led to residual background stimulation. (**D** and **E**) HLA-DRβ1*01$^+$ DC were either transduced with p41LC3 or infected with HIV_{Yu2b} with and without ART. Five days later, the percentage of Gag$^+$ cells was monitored by ICCS (D) and DC used to stimulate F12 (E). T cell activation was monitored using ICCS. Results are presented as the proportion of activated cells producing at least one cytokine/chemokine and are the mean ± SD of duplicates. Uninfected or untransduced DC (Ni) and DC pulsed with gag2 (0.5 μg/ml) were used as negative and positive controls, respectively. (*Figure legend continues*)

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at INSERM DISC DOC on July 11, 2016

exogenous HIV Ag to HS CD4$^+$ T cells (not shown), we show that HIV-transfected HeLa-CIITA cells efficiently activated gag-specific CD4$^+$ T cells.

We demonstrate that a single HIV epitope (e.g., gag2) that can be recognized by F12, N2, and L11 Gag-specific T cell clones can be processed through exogenous and endogenous Gag Ag presentation pathways, further highlighting that various intracellular routes are involved in Ag processing of a single epitope. In contrast, HIV-infected DC failed to activate HS CD4$^+$ T cell clones, which are specific for the gag1 epitope and are very efficiently activated by HIV-loaded DC (36). Thus, the endogenous presentation of HIV Ag, upon DC infection, is seemingly separate from the exogenous pathway. The processing and presentation of neo-synthesized viral Ag might generate a distinct set of HIV-derived epitopes and directly impact the repertoire of activated HS CD4$^+$ T cells.

Our recent work highlighted that exogenous HIV Ags are routed toward endolysosomal compartments and processed at least partially through autophagy (32, 36). Inhibiting autophagy with drugs or small interfering RNA reduced the capacity of HIV-loaded DC to present the gag2 epitope and, thus, to activate HS F12 and L11 clones (32). Autophagy also plays a role in degrading newly formed virions (79) or proteins (80). In fact, several lines of evidence suggested that endogenous HIV Gag and Env might be processed through autophagy in infected cells: first, in infected macrophages, HIV-1 Gag was shown to colocalize with LC3$^+$ vesicles (63) and HIV-1 virions could be visualized inside autophagosomes by electron microscopy (64); second, HIV Gag expression leads to the formation of DRiPs (51) and protein aggregates (52); and third, in B cells, targeting Env to lysosomes enhances anti-Env CD4$^+$ T cell activation (81). Despite these observations, we show that once the infection is established, autophagy does not contribute to the processing of endogenous gag2 and gp120 (aa 410–429) epitopes in infected professional APC such as DC. We first treated infected DC with drugs that modulate autophagy and we could not detect any impact on HS T cell activation. We then used shRNA-mediated gene silencing of LC3 to alter the autophagy pathway and study gag2 presentation. LC3 is critically required for autophagosome membrane elongation and closure (20). Indeed, our shRNA-LC3 induced a major inhibition of both LC3-I and LC3-II expression with the concomitant disappearance of LC3 puncta in transduced cells. Furthermore, we used an alternative approach based on the overexpression of a *trans*-dominant mutant of Atg4B (Atg4BC74A), which blocks the cleavage of the LC3 precursor into the cytosolic LC3-I (55). In contrast to HIV-loaded DC (32), we demonstrate that modulating autophagy in infected DC (or HeLa-CIITA cells) does not influence anti-Gag CD4$^+$ T cell activation.

Autophagy and/or autophagy-related genes have both antiviral and proviral effects on the life cycles and pathogenesis of many different viruses (82). As we have shown for HIV (32), autophagy can target incoming virions or viral components (80) for lysosomal degradation. However, the binding of HIV Env to CD4 on the cell surface of DC triggers a signal that causes transient inhibition of autophagy flux, thereby reducing degradation of incoming virions (32). In simian cells, it was observed following viral fusion that HIV Gag from incoming viral particles might be selectively targeted to autophagosomal degradation by the antiviral restriction factor TRIM5α (83). Although whether functional autophagy is required for TRIM5α-mediated HIV restriction is a matter of debate (84), these results suggest that specific adaptors might be required to target HIV Gag to autophagosomes. In the present study, we did not observe any colocalization between Gag and LC3 in productively infected DC and cells expressing Gag in the absence of other viral proteins. Furthermore, we did not detect any significant impact on HIV replication following the inhibition of autophagy. This is in contrast to infected macrophages, where autophagy has been reported to sustain viral replication (63, 64). In these cells, HIV Nef interferes with the maturation step of autophagy, thus reducing the degradation of viral proteins in autophagolysosomes and favoring the release of HIV particles (63, 64, 85). We analyzed whether Nef or Env expression might interfere with MHC-II–restricted endogenous presentation of Gag Ag. We observed that DC productively infected with HIV strains defective for Env or Nef expression had similar capacities to activate HS CD4$^+$ T cells when compared with their wild-type counterpart. Remarkably, infecting DC in the presence of SIV-Vpx, which enhances HIV replication and HIV sensing leading to DC maturation and antiviral cytokine secretions, including type I IFN (46), did not induce Gag or Env (not shown) targeting to autophagosomes. Therefore, in vitro, in the course of DC HIV infection, the cytokine environment might not significantly influence the cellular localization of HIV Gag and Env. Interestingly, in this regard note that IL-4, used to generate DC in our study, enhances the autophagic flux and also favors endogenous MHC-II–restricted bacterial Ag presentation (86).

Overall, we show that in infected DC, autophagy is probably not involved in Gag and Env Ag presentation. This is, however, not an exception, as Comber et al. (31) reported that, in vitro, silencing autophagy in infected cells did not influence the activation of influenza-specific CD4$^+$ T cells. Alternatively, because within a single protein, for example, EBNA1 from EBV, some epitopes could be processed in an autophagy-dependent but also independent manner (29), we might have missed the identification of Gag or Env epitopes processed by autophagy during productive HIV infection. However, in infected DC, Gag and Env do not colocalize with LC3$^+$ vesicles even when pretreating cells with drugs that strongly inhibit lysosomal degradation or when inducing DC maturation with Vpx. Also, in DC infected with wild-type, Nef-deficient, or Env-deficient HIV isolates (not shown), Gag does not colocalize with LC3$^+$ puncta. Thus, our results support the hypothesis that autophagy is not involved in Gag and Env processing.

Nevertheless, we confirmed that the autophagic pathway interacts with the MHC-II loading machinery because the specific delivery of Gag into autophagosomes leads to the stimulation of Gag-specific CD4$^+$ T cells. Once targeted into autophagosomes, the processing of Gag is strictly dependent on functional autophagic machinery. Thus, depending on the cellular localization, endogenous HIV Ag can be processed by distinct routes. As previously reported for influenza Ag, Gag from the SIV, and the tumor Ag NY-ESO-1 (26, 87, 88), we observed that targeting Ag to autophagosomes promotes CD4$^+$ T cell activation. This enhancement of gag-specific T cell activation was abolished when inhibiting autophagy with Atg4b74A or introducing a G120A mutation in the C terminus of p41LC3. Additionally, we show that autophagy-mediated degradation of Gag in DC modulates the activation of Gag-specific CD4$^+$ T cell clones (IV-9) that are otherwise not activated by HIV-infected DC.

Uninfected DC pulsed overnight, in the presence of ART, with the supernatant of HIV-infected cells [Ni + Sup. of (1)] and DC infected in the presence of ART (HIV + ART 5 d) were pooled and used as a control. The results are representative of at least three independent experiments using DC from various donors. HIV (1), HIV-infected cells; Ni, noninfected or untransduced cells; Sup. of (1), supernatant of HIV-infected cells.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at INSERM DISC DOC on July 11, 2016

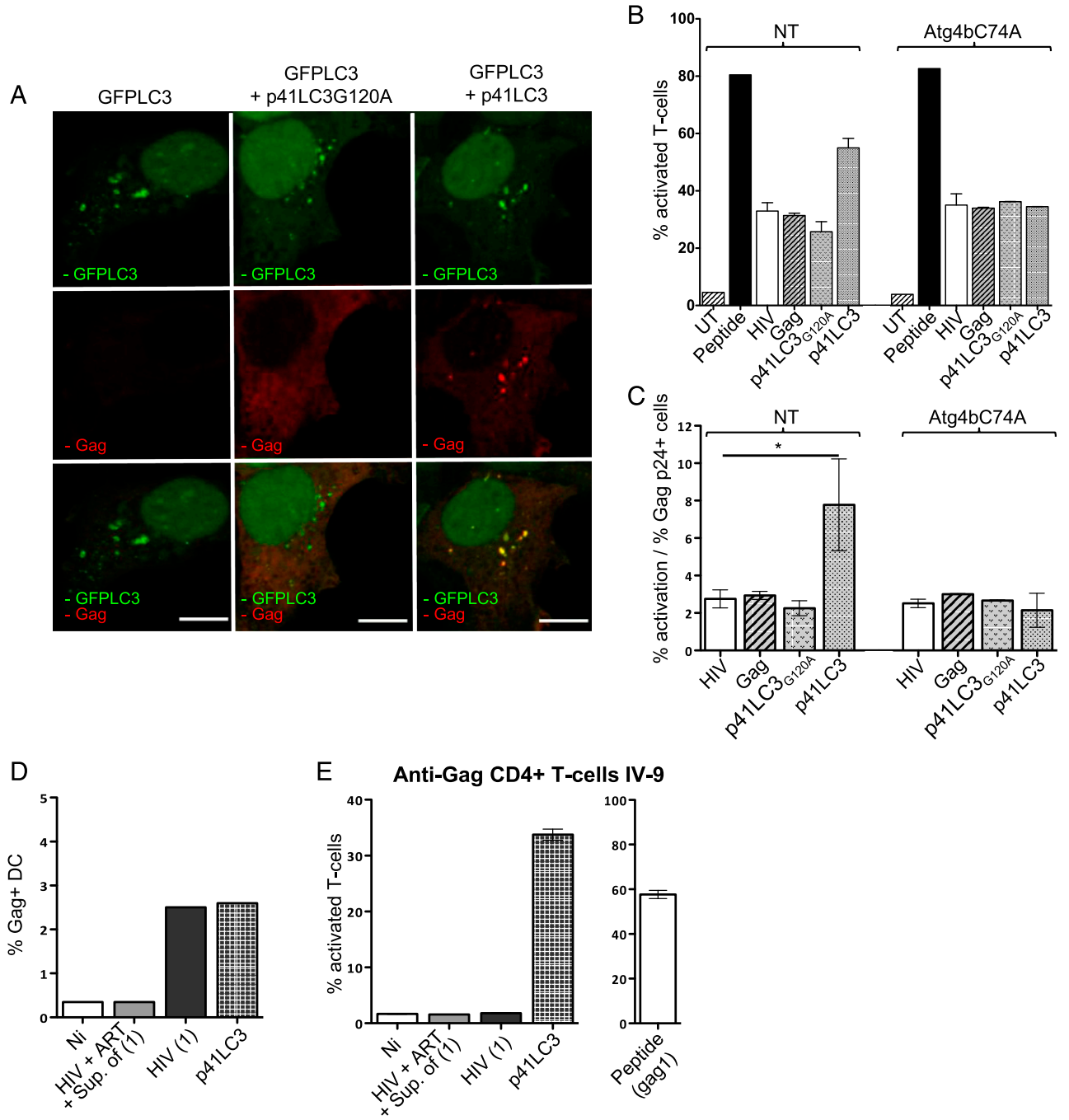


FIGURE 7. Autophagic degradation is required to enhance T cell activation and reveals additional MHC-II–restricted endogenous epitopes. (**A**) HeLa-CIITA cells were transduced with GFPLC3 or cotransduced with p41LC3 and p41LC3G120A and colocalization analyzed by IF and confocal imaging. Scale bars, 10 μm. (**B**) A representative experiment using HeLa-CIITA cells and Atg4BC74A$^+$ Hela-CIITA cells transfected with DNA plasmids encoding either HIV_{Yu2b} (HIV), HIV Gag protein (Gag), $p41LC3_{G120A}$, or p41LC3. At day 3 after transfection, cells were collected and the percentage of Gag$^+$ cells was evaluated using ICS (whatever the treatments, transfected cells exhibited similar levels of Gag$^+$ cells; not shown). The cells were then used to stimulate F12 and T cell activation was monitored using ICCS as in Supplemental Fig. 1. Results are presented as the percentage of activated cells producing at least one cytokine/chemokine. The experiment was performed in duplicate. (**C**) Mean (±SD) of three independent experiments performed in duplicate presented as the percentage of activated cells divided by the percentage of transfected (Gag$^+$) cells. Enhancement of T cell activation with p41LC3 ($p < 0.038$) was statistically significant (Wilcoxon rank sum test). UT, mock-transfected. (**D** and **E**) HLA-DRβ1*01$^+$ DC were either transduced with p41LC3 or infected with HIV_{Yu2b} with and without ART. Five days later, the percentage of Gag$^+$ cells was monitored by ICS (D) and DC used to stimulate IV-9 (E). T cell activation was monitored using ICCS. Results are presented as percentage of activated cells producing at least one cytokine/chemokine and are the mean ± SD of duplicates. Noninfected DC (Ni) and DC pulsed with gag1 (0.5 μg/ml) were used as negative and positive controls, respectively. Uninfected DC pulsed overnight, in the presence of ART, with the supernatant of HIV-infected cells [Ni + Sup. of (1)] and DC infected in the presence of ART (HIV + ART 5 d) were pooled and used as a control. The results are representative of at least three independent experiments using DC from various donors. HIV (1), HIV-infected cells; Ni, noninfected or untransduced cells; Sup. of (1), supernatant of HIV-infected cells.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at INSERM DISC DOC on July 11, 2016

In summary, the ability of HIV-1–infected DC to activate some but not all Gag-specific $CD4^+$ T cell clones demonstrates that the presentation of newly synthesized Gag peptides occurs in an epitope-specific manner. This endogenous pathway functions independently of the exogenous route for HIV Ag presentation and offers a distinct possibility for the immune system to activate HS $CD4^+$ T cells. However, productively infected DC do not use autophagy to process MHC-II–restricted Gag and Env Ag. In the present study, we have shown that vector-driven targeting of HIV Ags to the autophagosomes in DC can be used to usurp this unutilized endogenous pathway for MHC-II presentation and effectively enhance and broaden HS $CD4^+$ T cell responses. In the future, it will be important to determine whether endogenous presentation of HIV Ags is a specific feature of infected DC. In particular, this pathway could be used by the immune system to allow the lysis of infected $CD4^+$ T cells and macrophages by antiviral $CD4^+$ T cells. Nonetheless, our findings, using DC, might help to design novel strategies to prime HS $CD4^+$ T cells that are required for CTL activation/maintenance and B cell maturation.

Acknowledgments

We thank N. Manel for discussions. We acknowledge T. Yoshimori and F. Lafont for providing the Atg4BC74A-encoding plasmid and Club Francophone de l'Autophagie and Club Francophone des Cellules Dendritiques for allowing the presentation of this work at conferences.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

1. Porichis, F., and D. E. Kaufmann. 2011. HIV-specific CD4 T cells and immune control of viral replication. *Curr. Opin. HIV AIDS* 6: 174–180.
2. Ranasinghe, S., M. Flanders, S. Cutler, D. Z. Soghoian, M. Ghebremichael, I. Davis, M. Lindqvist, F. Pereyra, B. D. Walker, D. Heckerman, and H. Streeck. 2012. HIV-specific CD4 T cell responses to different viral proteins have discordant associations with viral load and clinical outcome. *J. Virol.* 86: 277–283.
3. Schieffer, M., H. K. Jessen, A. F. Oster, F. Pissani, D. Z. Soghoian, R. Lu, A. B. Jessen, C. Zedlack, B. T. Schultz, I. Davis, et al. 2014. Induction of Gag-specific CD4 T cell responses during acute HIV infection is associated with improved viral control. *J. Virol.* 88: 7357–7366.
4. Ranasinghe, S., S. Cutler, I. Davis, R. Lu, D. Z. Soghoian, Y. Qi, J. Sidney, G. Kranias, M. D. Flanders, M. Lindqvist, et al. 2013. Association of HLA-DRB1-restricted $CD4^+$ T cell responses with HIV immune control. *Nat. Med.* 19: 930–933.
5. Zheng, N., M. Fujiwara, T. Ueno, S. Oka, and M. Takiguchi. 2009. Strong ability of Nef-specific $CD4^+$ cytotoxic T cells to suppress human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication in HIV-1-infected $CD4^+$ T cells and macrophages. *J. Virol.* 83: 7668–7677.
6. Mantegazza, A. R., J. G. Magalhaes, S. Amigorena, and M. S. Marks. 2013. Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. *Traffic* 14: 135–152.
7. Eisenlohr, L. C., N. Luckashenak, S. Apcher, M. A. Miller, and G. Sinnathamby. 2011. Beyond the classical: influenza virus and the elucidation of alternative MHC class II-restricted antigen processing pathways. *Immunol. Res.* 51: 237–248.
8. Yuseff, M. I., A. Reversat, D. Lankar, J. Diaz, I. Fanget, P. Pierobon, V. Randrian, N. Larochette, F. Vascotto, C. Desdouets, et al. 2011. Polarized secretion of lysosomes at the B cell synapse couples antigen extraction to processing and presentation. *Immunity* 35: 361–374.
9. Moss, C. X., T. I. Tree, and C. Watts. 2007. Reconstruction of a pathway of antigen processing and class II MHC peptide capture. *EMBO J.* 26: 2137–2147.
10. Pinet, V., M. Vergelli, R. Martin, O. Bakke, and E. O. Long. 1995. Antigen presentation mediated by recycling of surface HLA-DR molecules. *Nature* 375: 603–606.
11. Sinnathamby, G., and L. C. Eisenlohr. 2003. Presentation by recycling MHC class II molecules of an influenza hemagglutinin-derived epitope that is revealed in the early endosome by acidification. *J. Immunol.* 170: 3504–3513.
12. Tewari, M. K., G. Sinnathamby, D. Rajagopal, and L. C. Eisenlohr. 2005. A cytosolic pathway for MHC class II-restricted antigen processing that is proteasome and TAP dependent. *Nat. Immunol.* 6: 287–294.
13. Sekaly, R. P., S. Jacobson, J. R. Richert, C. Tonnelle, H. F. McFarland, and E. O. Long. 1988. Antigen presentation to HLA class II-restricted measles virus-specific T-cell clones can occur in the absence of the invariant chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1209–1212.
14. Jacobson, S., R. P. Sekaly, W. J. Bellini, C. L. Johnson, H. F. McFarland, and E. O. Long. 1988. Recognition of intracellular measles virus antigens by HLA class II restricted measles virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 540: 352–353.
15. Miller, M. A., A. P. Ganesan, N. Luckashenak, M. Mendonca, and L. C. Eisenlohr. 2015. Endogenous antigen processing drives the primary $CD4^+$ T cell response to influenza. *Nat. Med.* 21: 1216–1222.
16. Nuchtern, J. G., W. E. Biddison, and R. D. Klausner. 1990. Class II MHC molecules can use the endogenous pathway of antigen presentation. *Nature* 343: 74–76.
17. Miller, M. A., A. P. Ganesan, and L. C. Eisenlohr. 2013. Toward a network model of MHC class II-restricted antigen processing. *Front. Immunol.* 4: 464.
18. Dengjel, J., O. Schoor, R. Fischer, M. Reich, M. Kraus, M. Müller, K. Kreymborg, F. Altenberend, J. Brandenburg, H. Kalbacher, et al. 2005. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 7922–7927.
19. Paludan, C., D. Schmid, M. Landthaler, M. Vockerodt, D. Kube, T. Tuschl, and C. Münz. 2005. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* 307: 593–596.
20. Mizushima, N. 2007. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* 21: 2861–2873.
21. Esclatine, A., M. Chaumorcel, and P. Codogno. 2009. Macroautophagy signaling and regulation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 335: 33–70.
22. Wenger, T., S. Terawaki, V. Camosseto, R. Abdelrassoul, A. Mies, N. Catalan, N. Claudio, G. Clavarino, A. de Gassart, Fde. A. Rigotti, et al. 2012. Autophagy inhibition promotes defective neosynthesized proteins storage in ALIS, and induces redirection toward proteasome processing and MHCI-restricted presentation. *Autophagy* 8: 350–363.
23. English, L., M. Chemali, J. Duron, C. Rondeau, A. Laplante, D. Gingras, D. Alexander, D. Leib, C. Norbury, R. Lippé, and M. Desjardins. 2009. Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat. Immunol.* 10: 480–487.
24. Tey, S. K., and R. Khanna. 2012. Autophagy mediates transporter associated with antigen processing-independent presentation of viral epitopes through MHC class I pathway. *Blood* 120: 994–1004.
25. Dörfel, D., S. Appel, F. Grünebach, M. M. Weck, M. R. Müller, A. Heine, and P. Brossart. 2005. Processing and presentation of HLA class I and II epitopes by dendritic cells after transfection with in vitro-transcribed MUC1 RNA. *Blood* 105: 3199–3205.
26. Schmid, D., M. Pypaert, and C. Münz. 2007. Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity* 26: 79–92.
27. Ireland, J. M., and E. R. Unanue. 2011. Autophagy in antigen-presenting cells results in presentation of citrullinated peptides to CD4 T cells. *J. Exp. Med.* 208: 2625–2632.
28. Jagannath, C., D. R. Lindsey, S. Dhandayuthapani, Y. Xu, R. L. Hunter, Jr., and N. T. Eissa. 2009. Autophagy enhances the efficacy of BCG vaccine by increasing peptide presentation in mouse dendritic cells. *Nat. Med.* 15: 267–276.
29. Leung, C. S., T. A. Haigh, L. K. Mackay, A. B. Rickinson, and G. S. Taylor. 2010. Nuclear location of an endogenously expressed antigen, EBNA1, restricts access to macroautophagy and the range of CD4 epitope display. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 2165–2170.
30. Lee, H. K., L. M. Mattei, B. E. Steinberg, P. Alberts, Y. H. Lee, A. Chervonsky, N. Mizushima, S. Grinstein, and A. Iwasaki. 2010. In vivo requirement for Atg5 in antigen presentation by dendritic cells. *Immunity* 32: 227–239.
31. Comber, J. D., T. M. Robinson, N. A. Siciliano, A. E. Snook, and L. C. Eisenlohr. 2011. Functional macroautophagy induction by influenza A virus without a contribution to major histocompatibility complex class II-restricted presentation. *J. Virol.* 85: 6453–6463.
32. Blanchet, F. P., A. Moris, D. S. Nikolic, M. Lehmann, S. Cardinaud, R. Stalder, E. Garcia, C. Dinkins, F. Leuba, L. Wu, et al. 2010. Human immunodeficiency virus-1 inhibition of immunoamphisomes in dendritic cells impairs early innate and adaptive immune responses. *Immunity* 32: 654–669.
33. Steinman, R. M. 2000. DC-SIGN: a guide to some mysteries of dendritic cells. *Cell* 100: 491–494.
34. Moris, A., C. Nobile, F. Buseyne, F. Porrot, J. P. Abastado, and O. Schwartz. 2004. DC-SIGN promotes exogenous MHC-I-restricted HIV-1 antigen presentation. *Blood* 103: 2648–2654.
35. Turville, S. G., J. J. Santos, I. Frank, P. U. Cameron, J. Wilkinson, M. Miranda-Saksena, J. Dable, H. Stössel, N. Romani, M. Piatak, Jr., et al. 2004. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* 103: 2170–2179.
36. Moris, A., A. Pajot, F. Blanchet, F. Guivel-Benhassine, M. Salcedo, and O. Schwartz. 2006. Dendritic cells and HIV-specific $CD4^+$ T cells: HIV antigen presentation, T-cell activation, and viral transfer. *Blood* 108: 1643–1651.
37. Rodriguez-Plata, M. T., A. Urrutia, S. Cardinaud, M. J. Buzón, N. Izquierdo-Useros, J. G. Prado, M. C. Puertas, I. Erkizia, P. G. Coulon, S. Cedeño, et al. 2012. HIV-1 capture and antigen presentation by dendritic cells: enhanced viral capture does not correlate with better T cell activation. *J. Immunol.* 188: 6036–6045.
38. Centlivre, M., N. Legrand, R. Steingrover, R. van der Sluis, M. L. Grijsen, M. Bakker, S. Jurriaans, B. Berkhout, W. A. Paxton, J. M. Prins, and G. Pollakis. 2011. Altered dynamics and differential infection profiles of lymphoid and myeloid cell subsets during acute and chronic HIV-1 infection. *J. Leukoc. Biol.* 89: 785–795.
39. Donaghy, H., A. Pozniak, B. Gazzard, N. Qazi, J. Gilmour, F. Gotch, and S. Patterson. 2001. Loss of blood $CD11c^+$ myeloid and $CD11c^-$ plasmacytoid

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at INSERM DISC DOC on July 11, 2016

dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood* 98: 2574–2576.
40. Patterson, S., M. S. Roberts, N. R. English, S. E. Macatonia, M. N. Gompels, A. J. Pinching, and S. C. Knight. 1994. Detection of HIV DNA in peripheral blood dendritic cells of HIV-infected individuals. *Res. Virol.* 145: 171–176.
41. Granelli-Piperno, A., I. Shimeliovich, M. Pack, C. Trumpfheller, and R. M. Steinman. 2006. HIV-1 selectively infects a subset of nonmaturing BDCA1-positive dendritic cells in human blood. *J. Immunol.* 176: 991–998.
42. Donaghy, H., B. Gazzard, F. Gotch, and S. Patterson. 2003. Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. *Blood* 101: 4505–4511.
43. Hertoghs, N., A. M. van der Aar, L. C. Setiawan, N. A. Kootstra, S. I. Gringhuis, and T. B. Geijtenbeek. 2015. SAMHD1 degradation enhances active suppression of dendritic cell maturation by HIV-1. *J. Immunol.* 194: 4431–4437.
44. Nobile, C., C. Petit, A. Moris, K. Skrabal, J. P. Abastado, F. Mammano, and O. Schwartz. 2005. Covert human immunodeficiency virus replication in dendritic cells and in DC-SIGN-expressing cells promotes long-term transmission to lymphocytes. *J. Virol.* 79: 5386–5399.
45. Su, B., M. E. Biedma, A. Lederle, M. Peressin, M. Lambotin, A. Proust, T. Decoville, S. Schmidt, G. Laumond, and C. Moog. 2014. Dendritic cell-lymphocyte cross talk downregulates host restriction factor SAMHD1 and stimulates HIV-1 replication in dendritic cells. *J. Virol.* 88: 5109–5121.
46. Manel, N., B. Hogstad, Y. Wang, D. E. Levy, D. Unutmaz, and D. R. Littman. 2010. A cryptic sensor for HIV-1 activates antiviral innate immunity in dendritic cells. *Nature* 467: 214–217.
47. Harman, A. N., N. Nasr, A. Feetham, A. Galoyan, A. A. Alshehri, D. Rambukwelle, R. A. Botting, B. M. Hiener, E. Diefenbach, R. J. Diefenbach, et al. 2015. HIV blocks interferon induction in human dendritic cells and macrophages by dysregulation of TBK1. *J. Virol.* 89: 6575–6584.
48. Simon, V., N. Bloch, and N. R. Landau. 2015. Intrinsic host restrictions to HIV-1 and mechanisms of viral escape. *Nat. Immunol.* 16: 546–553.
49. Laguette, N., B. Sobhian, N. Casartelli, M. Ringeard, C. Chable-Bessia, E. Ségéral, A. Yatim, S. Emiliani, O. Schwartz, and M. Benkirane. 2011. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 474: 654–657.
50. Lahouassa, H., W. Daddacha, H. Hofmann, D. Ayinde, E. C. Logue, L. Dragin, N. Bloch, C. Maudet, M. Bertrand, T. Gramberg, et al. 2012. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat. Immunol.* 13: 223–228.
51. Schubert, U., L. C. Antón, J. Gibbs, C. C. Norbury, J. W. Yewdell, and J. R. Bennink. 2000. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404: 770–774.
52. Nermut, M. V., W. H. Zhang, G. Francis, F. Ciampor, Y. Morikawa, and I. M. Jones. 2003. Time course of Gag protein assembly in HIV-1-infected cells: a study by immunoelectron microscopy. *Virology* 305: 219–227.
53. Dunbar, S. A. 2006. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. *Clin. Chim. Acta* 363: 71–82.
54. Siliciano, R. F., T. Lawton, C. Knall, R. W. Karr, P. Berman, T. Gregory, and E. L. Reinherz. 1988. Analysis of host-virus interactions in AIDS with anti-gp120 T cell clones: effect of HIV sequence variation and a mechanism for $CD4^+$ cell depletion. *Cell* 54: 561–575.
55. Fujita, N., M. Hayashi-Nishino, H. Fukumoto, H. Omori, A. Yamamoto, T. Noda, and T. Yoshimori. 2008. An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure. *Mol. Biol. Cell* 19: 4651–4659.
56. Kabeya, Y., N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19: 5720–5728.
57. Berger, G., S. Durand, C. Goujon, X. N. Nguyen, S. Cordeil, J. L. Darlix, and A. Cimarelli. 2011. A simple, versatile and efficient method to genetically modify human monocyte-derived dendritic cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Nat. Protoc.* 6: 806–816.
58. Casartelli, N., F. Guivel-Benhassine, R. Bouziat, S. Brandler, O. Schwartz, and A. Moris. 2010. The antiviral factor APOBEC3G improves CTL recognition of cultured HIV-infected T cells. *J. Exp. Med.* 207: 39–49.
59. Testa, J. S., G. S. Apcher, J. D. Comber, and L. C. Eisenlohr. 2010. Exosome-driven antigen transfer for MHC class II presentation facilitated by the receptor binding activity of influenza hemagglutinin. *J. Immunol.* 185: 6608–6616.
60. Rowell, J. F., P. E. Stanhope, and R. F. Siliciano. 1995. Endocytosis of endogenously synthesized HIV-1 envelope protein. Mechanism and role in processing for association with class II MHC. *J. Immunol.* 155: 473–488.
61. Stumptner-Cuvelette, P., S. Morchoisne, M. Dugast, S. Le Gall, G. Raposo, O. Schwartz, and P. Benaroch. 2001. HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 12144–12149.
62. Bania, J., E. Gatti, H. Lelouard, A. David, F. Cappello, E. Weber, V. Camosseto, and P. Pierre. 2003. Human cathepsin S, but not cathepsin L, degrades efficiently MHC class II-associated invariant chain in nonprofessional APCs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 6664–6669.
63. Kyei, G. B., C. Dinkins, A. S. Davis, E. Roberts, S. B. Singh, C. Dong, L. Wu, E. Kominami, T. Ueno, A. Yamamoto, et al. 2009. Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J. Cell Biol.* 186: 255–268.
64. Espert, L., M. Varbanov, V. Robert-Hebmann, S. Sagnier, I. Robbins, F. Sanchez, V. Lafont, and M. Biard-Piechaczyk. 2009. Differential role of autophagy in CD4 T cells and macrophages during X4 and R5 HIV-1 infection. *PLoS One* 4: e5787.
65. Heckmann, B. L., X. Yang, X. Zhang, and J. Liu. 2013. The autophagic inhibitor 3-methyladenine potently stimulates PKA-dependent lipolysis in adipocytes. *Br. J. Pharmacol.* 168: 163–171.
66. Klionsky, D. J., K. Abdelmohsen, A. Abe, M. J. Abedin, H. Abeliovich, A. Acevedo-Arozena, H. Adachi, C. M. Adams, P. D. Adams, K. Adeli, et al. 2016. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12: *1*–222.
67. Hrecka, K., C. Hao, M. Gierszewska, S. K. Swanson, M. Kesik-Brodacka, S. Srivastava, L. Florens, M. P. Washburn, and J. Skowronski. 2011. Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* 474: 658–661.
68. Basmaciogullari, S., and M. Pizzato. 2014. The activity of Nef on HIV-1 infectivity. *Front. Microbiol.* 5: 232.
69. Rosa, A., A. Chande, S. Ziglio, V. De Sanctis, R. Bertorelli, S. L. Goh, S. M. McCauley, A. Nowosielska, S. E. Antonarakis, J. Luban, et al. 2015. HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation. *Nature* 526: 212–217.
70. Wilen, C. B., J. C. Tilton, and R. W. Doms. 2012. HIV: cell binding and entry. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2: 2.
71. Chiodi, F., and R. A. Weiss. 2014. Human immunodeficiency virus antibodies and the vaccine problem. *J. Intern. Med.* 275: 444–455.
72. Crotty, S. 2014. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* 41: 529–542.
73. Callahan, K. M., J. F. Rowell, M. J. Soloski, C. E. Machamer, and R. F. Siliciano. 1993. HIV-1 envelope protein is expressed on the surface of infected cells before its processing and presentation to class II-restricted T lymphocytes. *J. Immunol.* 151: 2928–2942.
74. Guerbois, M., A. Moris, C. Combredet, V. Najburg, C. Ruffié, M. Février, N. Cayet, S. Brandler, O. Schwartz, and F. Tangy. 2009. Live attenuated measles vaccine expressing HIV-1 Gag virus like particles covered with gp160ΔV1V2 is strongly immunogenic. *Virology* 388: 191–203.
75. Brandler, S., A. Lepelley, M. Desdouits, F. Guivel-Benhassine, P. E. Ceccaldi, Y. Lévy, O. Schwartz, and A. Moris. 2010. Preclinical studies of a modified vaccinia virus Ankara-based HIV candidate vaccine: antigen presentation and antiviral effect. *J. Virol.* 84: 5314–5328.
76. Thiele, F., S. Tao, Y. Zhang, A. Muschaweckh, T. Zollmann, U. Protzer, R. Abele, and I. Drexler. 2015. Modified vaccinia virus Ankara-infected dendritic cells present $CD4^+$ T-cell epitopes by endogenous major histocompatibility complex class II presentation pathways. *J. Virol.* 89: 2698–2709.
77. Kavanagh, D. G., D. E. Kaufmann, S. Sunderji, N. Frahm, S. Le Gall, D. Boczkowski, E. S. Rosenberg, D. R. Stone, M. N. Johnston, B. S. Wagner, et al. 2006. Expansion of HIV-specific $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells by dendritic cells transfected with mRNA encoding cytoplasm- or lysosome-targeted Nef. *Blood* 107: 1963–1969.
78. Van Gulck, E. R., P. Ponsaerts, L. Heyndrickx, K. Vereecken, F. Moerman, A. De Roo, R. Colebunders, G. Van den Bosch, D. R. Van Bockstaele, V. F. Van Tendeloo, et al. 2006. Efficient stimulation of HIV-1-specific T cells using dendritic cells electroporated with mRNA encoding autologous HIV-1 Gag and Env proteins. *Blood* 107: 1818–1827.
79. Tallóczy, Z., W. Jiang, H. W. Virgin, IV, D. A. Leib, D. Scheuner, R. J. Kaufman, E. L. Eskelinen, and B. Levine. 2002. Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2α kinase signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 190–195.
80. Orvedahl, A., S. MacPherson, R. Sumpter, Jr., Z. Tallóczy, Z. Zou, and B. Levine. 2010. Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system. *Cell Host Microbe* 7: 115–127.
81. Rowell, J. F., A. L. Ruff, F. G. Guarnieri, K. Staveley-O'Carroll, X. Lin, J. Tang, J. T. August, and R. F. Siliciano. 1995. Lysosome-associated membrane protein-1-mediated targeting of the HIV-1 envelope protein to an endosomal/lysosomal compartment enhances its presentation to MHC class II-restricted T cells. *J. Immunol.* 155: 1818–1828.
82. Richetta, C., and M. Faure. 2013. Autophagy in antiviral innate immunity. *Cell. Microbiol.* 15: 368–376.
83. Mandell, M. A., A. Jain, J. Arko-Mensah, S. Chauhan, T. Kimura, C. Dinkins, G. Silvestri, J. Münch, F. Kirchhoff, A. Simonsen, et al. 2014. TRIM proteins regulate autophagy and can target autophagic substrates by direct recognition. *Dev. Cell* 30: 394–409.
84. Imam, S., S. Talley, R. S. Nelson, A. Dharan, C. O'Connor, T. J. Hope, and E. M. Campbell. 2016. TRIM5α degradation via autophagy is not required for retroviral restriction. *J. Virol.* 90: 3400–3410.
85. Shoji-Kawata, S., R. Sumpter, M. Leveno, G. R. Campbell, Z. Zou, L. Kinch, A. D. Wilkins, Q. Sun, K. Pallauf, D. MacDuff, et al. 2013. Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide. *Nature* 494: 201–206.
86. Terawaki, S., V. Camosseto, F. Prete, T. Wenger, A. Papadopoulos, C. Rondeau, A. Combes, C. Rodriguez Rodrigues, T. P. Vu Manh, M. Fallet, et al. 2015. RUN and FYVE domain-containing protein 4 enhances autophagy and lysosome tethering in response to Interleukin-4. *J. Cell Biol.* 210: 1133–1152.
87. Jin, Y., C. Sun, L. Feng, P. Li, L. Xiao, Y. Ren, D. Wang, C. Li, and L. Chen. 2014. Regulation of SIV antigen-specific $CD4^+$ T cellular immunity via autophagosome-mediated MHC II molecule-targeting antigen presentation in mice. *PLoS One* 9: e93143.
88. Fonteneau, J. F., F. Brilot, C. Münz, and M. Gannagé. 2016. The tumor antigen NY-ESO-1 mediates direct recognition of melanoma cells by $CD4^+$ T cells after intercellular antigen transfer. *J. Immunol.* 196: 64–71.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at INSERM DISC DOC on July 11, 2016

Impact of chronic HIV/SIV infection on germinal center reaction: Lessons from transcriptional analysis of follicular helper T cell subsets

Suite à la parution de l'article **« HIV-Infected Spleens Present Altered Follicular Helper T Cell (Tfh) Subsets and Skewed B Cell Maturation »** dans le journal Plos One en octobre 2015, nous avons été sollicités par le journal « Frontiers in immunology » pour écrire une revue destinée à être publiée dans un numéro spécial portant sur les Tfh et l'infection par le VIH. Cette revue est cours de soumission.

Hosting Journal: Frontiers in Immunology

Hosting Specialty: Frontiers in Immunology, section HIV and AIDS

Research Topic Title: CD4 T follicular helper cells in HIV

Topic Editor(s): Smita S Iyer, Lilin Ye, Scott Hale

Informations complémentaires :

http://journal.frontiersin.org/researchtopic/4461/cd4-t-follicular-helper-cells-in-hiv#overview

frontiers

Impact of chronic HIV/SIV infection on germinal center reaction: Lessons from transcriptional analysis of follicular helper T cell subsets

Stéphanie Graff-Dubois[1*], Angeline Rouers[1], Arnaud Moris[1]

[1]Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM U1135, CNRS ERL 8255, Center for Immunology and Microbial Infections – CIMI-Paris, F-75013, Paris, France, France

Submitted to Journal:
Frontiers in Immunology

Specialty Section:
HIV and AIDS

Article type:
Review Article

Manuscript ID:
228271

Received on:
31 Aug 2016

Frontiers website link:
www.frontiersin.org

In review

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

Author contribution statement

SGD AR and AM wrote and approved the version to be published

Keywords

HIV, SIV, Tfh cell differentition, Tfh cell dynamics, germinal center reaction

Abstract

Word count: 252

The discovery of broad and potent HIV-1 neutralizing antibodies (bNAbs) has renewed optimism for developing an effective vaccine against HIV-1. The generation of most bNAbs requires multiple rounds of B cell receptor (BcR) affinity maturation, suggesting a crucial role of follicular helper T (Tfh) cells in their production. However, less than 1% of HIV-infected patients develop bNAbs that arise late in the course of infection, indicating probable Tfh and B cell dysfunctions in this context. Since the last few years and despite their low abundance, Tfh cells have been studied in the lymph nodes and spleen of individuals with HIV infection and of macaques experimentally infected with SIV. Various lymphoid Tfh cell subsets have been characterized, including pre Tfh (pTfh), germinal center Tfh (GC Tfh) and the regulatory counterpart of Tfh cells, the so-called follicular regulatory T (Tfr) cells. The latter have been reported to play a crucial role in the control of T and B cell crosstalk and germinal center reactions. More recently, circulating Tfh-like cells (cTfh) have been identified. Meanwhile, advances in single-cell technologies have made possible to analyze the transcriptional profiles of low abundant cells such as Tfh populations. Using transcriptional signatures, we review here the impact of chronic SIV/HIV infection on Tfh, GC Tfh, pTfh and cTfh differentiation and helper T cell functions with regard to their capacity to induce efficient B cell maturation. We will explore some hypothesis to explain the increased proportion of Tfh cells reported in chronically infected individuals and the impact on HIV pathogenesis.

Under review

Impact of chronic HIV/SIV infection on germinal center reaction: Lessons from transcriptional analysis of follicular helper T cell subsets

Stéphanie Graff-Dubois[1*], Angeline Rouers[1], Arnaud Moris[1]

[1]Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM U1135, CNRS ERL 8255, Center for Immunology and Microbial Infections – CIMI-Paris, F-75013, Paris, France

*Corresponding author Email : stephanie.graff-dubois@upmc.fr

Grant support : Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les hépatites virales (ANRS)

Running title : Follicular helper T cell functions and dynamics in HIV/SIV infection

Keywords : HIV, SIV, Tfh cell differentiation, Tfh cell dynamics, germinal center reaction

In review

Abstract

The discovery of broad and potent HIV-1 neutralizing antibodies (bNAbs) has renewed optimism for developing an effective vaccine against HIV-1. The generation of most bNAbs requires multiple rounds of B cell receptor (BcR) affinity maturation, suggesting a crucial role of follicular helper T (Tfh) cells in their production. However, less than 1% of HIV-infected patients develop bNAbs that arise late in the course of infection, indicating probable Tfh and B cell dysfunctions in this context. Since the last few years and despite their low abundance, Tfh cells have been studied in the lymph nodes and spleen of individuals with HIV infection and of macaques experimentally infected with SIV. Various lymphoid Tfh cell subsets have been characterized, including pre Tfh (pTfh), germinal center Tfh (GC Tfh) and the regulatory counterpart of Tfh cells, the so-called follicular regulatory T (Tfr) cells. The latter have been reported to play a crucial role in the control of T and B cell crosstalk and germinal center reactions. More recently, circulating Tfh-like cells (cTfh) have been identified. Meanwhile, advances in single-cell technologies have made possible to analyze the transcriptional profiles of low abundant cells such as Tfh populations. Using transcriptional signatures, we review here the impact of chronic SIV/HIV infection on Tfh, GC Tfh, pTfh and cTfh differentiation and helper T cell functions with regard to their capacity to induce efficient B cell maturation. We will explore some hypothesis to explain the increased proportion of Tfh cells reported in chronically infected individuals and the impact on HIV pathogenesis.

In review

Introduction

In germinal centers (GC), follicular helper T (Tfh) cells deliver helper signals and cytokines required for B cell affinity maturation and B cell differentiation into long-lived plasma cells. Optimal Tfh and B cell crosstalk is a prerequisite for the induction of efficient humoral immunity to pathogens. By providing survival and differentiation signals, Tfh cells control multiple steps of B cell maturation and antibody (Ab) production.

In addition to the cognate antigen interaction with B cells, Tfh cells express costimulatory molecules such as CD40L, ICOS and OX40. Tfh cells secrete high levels of Interleukin-21 (IL-21) and IL-4, which are necessary for GC formation and B cell differentiation into long-lived plasma cells, respectively [1–3].

Among tissue resident Tfh cell subsets, pre Tfh (pTfh) and germinal center Tfh (GC Tfh) represent two different stages of the Tfh cell maturation. Follicular regulatory T (Tfr) cells are identified as the regulatory counterpart of Tfh cells. Tfr cells control T and B cell crosstalk and germinal center reactions. Blood circulating Tfh cells (cTfh) have been recently identified as a memory compartment of tissue resident Tfh cells. Like tissue resident Tfh cells, cTfh are endowed with the capacity to produce IL-21 and to provide B cell help [4].

Since the last 5 years, Tfh cells are extensively studied in the lymph nodes and spleens of individuals with chronic HIV/SIV infection. HIV infection is associated with an altered B cell differentiation [5] and Tfh isolated from lymph nodes of HIV-infected (HIV^+) individuals provide inadequate B cell help *in vitro* [6]. As lymphoid tissue-resident Tfh cells are targeted by HIV/SIV early after infection, they constitute a major compartment for HIV infection, replication and production of viral particles in lymph nodes (LN) of viremic individuals [7–9]. Likewise, in blood, within central memory CD4T cells, cTfh cells serve as HIV reservoir in chronic HIV-infected individuals under antiretroviral therapy [10]. Very recently, in natural HIV controllers, study of HIV replication in various CD4 T cell subsets evidences various

In review

mechanism of HIV persistence according to the CD4 T cell compartment [11]. Lymph node resident helper T cells (Tfh and non-Tfh) showed replicative virus, while clonally expanded blood CD4 T cells arbor inducible provirus [11]. However, despite their high susceptibility to HIV/SIV infection, most studies reported an accumulation of tissue-resident or circulating Tfh cell populations during the chronic phases of infection [7,8,12,13].

Various hypotheses can support the higher proportions of Tfh cell subsets in the context of chronic HIV infection: (i) Tfh cells might present high proliferative or survival capacities; (ii) antigen persistence could drive CD4 T cells toward Tfh differentiation; (iii) Regulatory cells that control the Tfh/B cell crosstalk might be defective.

Here, we propose to review recent studies based on transcriptional analysis of Tfh cell subsets and to discuss the potential consequences on GC deregulations reported in chronic HIV/SIV infection.

In review

Potential impact of HIV infection on Tfh cell differentiation

The signals involved in Tfh cell differentiation include TCR activation, costimulation, cytokines and migration associated molecules. However, the origin of Tfh cells is not well defined: it is not clear whether Tfh fate is established at the time of DC priming or later. Here we review the impact of HIV infection on Tfh cell differentiation, from the priming of CD4 T cells by DCs cells until their ultimate stage of differentiation corresponding to GC Tfh and circulating memory Tfh. Two distinct differentiation pathways have been described.

The linear multistage Tfh differentiation pathway implicates multiple antigen-specific interactions in secondary lymphoid organs: (i) DC priming of naïve T cells leads to the rise of pTfh cells expressing CXCR5 molecule; pTfh cells migrate towards the T/B cell border zone where they experience (ii) a second antigen-specific interaction with B cells. This interaction leads to the progression of pTfh cells within the B cell follicle and differentiation into Tfh

cells. (iii) In the B cell follicle, Tfh cells experience multiple interactions with B cells, leading to B cell maturation and the complete differentiation of Tfh cells into GC Tfh. Thus in this model, B cells appear central in the terminal differentiation of Tfh cell into GC Tfh and reciprocally, Tfh are also required for B cell maturation. As with other helper T cell subsets, the stimulatory cytokines produced by DCs during the priming of naïve T cells are a critical parameter of Tfh cell differentiation. Using monocyte-derived DCs (MoDCs), Schmitt *et al.* demonstrated the key role of IL-12-producing MoDCs in the induction of IL-21-producing Tfh-like cells [14]. More recently, the same group found that TGF-β acts together with IL-12 and IL-23 to induce the expression of various molecules associated with Tfh functions by human naïve helper T cells, including CXCR5, ICOS, IL-21, Bcl-6 and the transcription factors BATF and c-Maf [15]. However, little is known about the type of DCs responsible for inducing Tfh cell priming. A recent study reported that engagement of DC-SIGN by fucose-based PAMPs licenses DCs for inducing Tfh polarization [16]. Such activated DCs produce IL-27, which is essential for Tfh polarization. This finding highlights the importance of adjuvants in the induction of Tfh cells. Interestingly, HIV particles bind DC-SIGN through Gp120, the viral envelope [17]. Therefore, one can hypothesize that, under chronic HIV infection, interactions between HIV particles and DC-SIGN expressing DCs could support the T helper cell differentiation toward a Tfh polarization. A recent study also showed that treatment with CpG (TLR-9 ligand) induces Il-6 production by monocyte-derived DC, orientating helper T cells differentiation toward the Tfh-cell lineage [18]. Indeed, by inducing Bcl6 early during the T cell activation, IL-6 has been shown to be critic for Tfh polarization [19]. In the context of HIV/SIV infection, several groups reported higher plasma levels of IL-6 [13,20]. However, we and others [21] did not find any difference in the amount of secreted IL-6 between HIV-infected and uninfected spleens upon activation [8]. Nonetheless, in naïve T cells from HIV-infected spleens we detected higher levels of IL-6 receptor transcripts

In review

(unpublished data) suggesting that naïve T cells from HIV-infected spleens might be more exposed locally to IL-6 and thus might preferentially polarize into Tfh cells. Once engaged into Tfh differentiation, the sequential differentiation model proposes that pTfh / B cell interactions dictate the fate of Tfh cells. Several groups highlighted the requirement of antigen presentation by B cells to induce Tfh cell and in turn GC reactions. In the absence of B cells, DC restricted antigen presentation initiates Tfh cell differentiation (into pTfh) but fails to complete ultimate effector Tfh cell differentiation [22]. In a model of bone marrow chimera, B cells deficient for the expression of MHC-II-molecules exhibit a reduced capacity to initiate T cell expansion and differentiation [23]. In fact, sequential antigen specific interactions of Tfh cell with DC and B cells are required to initiate Tfh cell and GC differentiation [24] and antigen persistence sustains Tfh responses and GC reactions [25]. Using live multiphoton imaging, Schwickert et al. suggested that the amount of peptide–MHC (pMHC) complexes presented by antigen specific B cells to cognate T cells, at the B-cell-T-cell border, was a limiting factor regulating the entry of B cell clones into GC [26]. Furthermore, highlighting the critical role of MHC-II molecules expressed by B cells in the generation of Abs of diverse functions and of memory B-cell responses, B cells lacking MHC-II expression are unable to differentiate into memory cells and are defective in producing antigen-specific IgG [27]. These results demonstrate that MHC-II-restricted antigen presentation by B cells is strictly required for B cells to receive help by antigen specific Tfh cells, and thus to establish a potent humoral immune response. Therefore, Tfh cell differentiation and GC development require the combination of DC and B cell antigen presentation.

As DC during T cell priming, B cells also provide additional signals to Tfh cells, contributing to their helper functions and maintenance. These signals include CD40L/CD40, OX40/OX40L, Signaling Lymphocyte Activation Molecule (SLAM) family members and adhesion molecules that strengthen GC Tfh / GC B cell interaction. Interaction between ICOS

In review

and ICOS ligand as well as IL-21 production have been implicated in GC formation [28,29]. PD-1/ PD-1 ligands interactions also control Tfh and GC B cell differentiation [1,30]. In Sum, the sequential differentiation proposes that combined interactions with DC and B cell dictate the fate of Tfh cells.

The alternative "post effector" developmental pathway proposes that Tfh-like cells may develop either from the memory CD4 T cell lineage [31,32] or from effector T helper cell subsets [33,34], rather than arising from pTfh cells. It has been shown that Tfh and central memory T cells (T_{CM}) are similar in their developmental pathway, including the requirement of Bcl6 and low levels of IL-2 signaling [35]. In line with this, Tfh and T_{CM} gene programs can co-initiate from effector Th1 cells upon increased Bcl-6 expression in response to a decrease of IL-2, resulting in a "Tfh/T_{CM}-like" population. IL-7 signaling also acts as a negative feedback that down-regulates the differentiation of Th1 into Tfh-like cells [36]. Interestingly, in spleens from HIV-infected individuals with a high proportion of Tfh cells, we reported a markedly reduced expression of the IL-7r encoding gene in all CD4 T cell populations [8]. Taken together these observations support the hypothesis that, in addition to Tfh cells, other T helper populations may contribute to B cell maturation into long-lived plasma cells. Hence, in humans, the precursors of Tfh cells might be composed of heterogeneous cell populations, which have the ability to differentiate into distinct types of Tfh cells. The latter keep some functional imprint from the parental T cell subtype. Of note, in this alternative pathway, interactions with antigen-presenting B cells are still a key event of the Tfh cell orientation thus raising the question of the impact of Tfh infection by HIV on the B cell compartments.

GC Tfh cells have long been considered as the terminal stage of tissue-resident Tfh cell differentiation. Newly identified, memory Tfh cells are preferentially located in secondary lymphoid organs and bone marrow although they can recirculate in the blood. These cTfh

In review

involve several subsets that differentially support antibody secretion [4] and are related to lymphoid-tissue-resident Tfh cells by their gene expression profile, cytokine production and functional properties [37]. Recently, adding to the CXCR5 and PD-1 canonical markers, Schultz et al. proposed that cTfh can be identified by their ability to produce IL-21, the cardinal Tfh cytokine [38]. Interestingly, activated memory B cells induce rapid re-expression of Bcl6 by memory Tfh cells [39], reinforcing the concept that many features of Tfh cells are highly linked with those of the B cells. Thanks to their accessibility and relative high frequencies, cTfh cell dynamics and features are the focus of growing interest in the context of infection and vaccination.

The frequency and functions of Tfh cells are tightly controlled

Tfh cell homeostasis is critical to the induction of high affinity antibody responses that are devoid of self-reactivity. Indeed, optimal Tfh cell frequency imposes competition between B cells, thus favoring survival of high affinity B cell clones. Several cell populations maintain Tfh cell homeostasis, including regulatory T (Treg) cells, T follicular regulatory (Tfr) cells, CD8 regulatory cells and plasma cells [40]. Tfr cells are identified as the main T cell subset implicated in the control of Tfh cells. They migrate into follicles and directly control GC reaction [41,42]. Hence, many studies have demonstrated increased GC and T cell responses in the absence of Tfr [41,43,44]. Tfr cells co-express Bcl6 and Blimp-1 [41] that is known to negatively regulate Tfh cell differentiation pathway [45]. Indeed, Blimp-1 represses Bcl-6 and reciprocally, which might explain the lower expression of Bcl-6 in Tfr cells as compared to Tfh cells [41]. Tfr cells express CTLA-4 and produce high amounts of IL-10. They have been shown to arise from Foxp3+ precursors that highjack the Tfh differentiation pathway. However, a recent study showed that, using an appropriate vaccine adjuvant, Tfr cells can derive directly from naïve CD4 T cells [46]. Alteration of Tfr cells functionality might

In review

contribute to higher proportions of Tfh cells during HIV-infection. Our results indicated that HIV infection did not impact splenic Tfh / Tfr ratio suggesting that Tfr and Tfh cell subsets expended equally during HIV infection [8]. However, Chowdhury et al. have shown a limited expansion of Tfr cells as compared to the one of Tfh cells during SIV infection [47]. They explored the transcriptional profile of CXCR5+PD1hiCD127-CD25+ Tfr cells after SIV infection. Overall, genes linked with Tfh differentiation and functions such as PD-1, IL-6R, SLAMF6 and CD84 were more expressed in Tfr cells while expression of IL-2RA linked with Treg functions was reduced after SIV infection suggesting that SIV infection might impair expression of genes associated with Treg and thus Tfr regulatory functions [47].

According to their transcription profile, Tfr cells are situated between Tfh and Treg cell subsets. However, foxp-3 expression is not taken into account in most Tfh cell studies that *de facto* include Tfr subset among Tfh cells. Recently, adding to Tfr cells, Treg cells expressing CTLA-4 have been reported as major inhibitors of B cell expression of CD80 and CD86, which are essential to the induction of Tfh cells [48–50].

Tfh cell dynamics during the course of HIV/SIV infection

Tfh and cTfh cells are targeted by HIV/SIV very early after infection and constitute a major compartment for HIV replication and production of viral particles in lymph nodes (LN) and periphery of viremic individuals [7–9,11]. Despite their high susceptibility to HIV/SIV infection, most studies reported an accumulation of tissue-resident or cTfh cell populations [7,8,12,13]. Interestingly, the Tfh cell frequency positively correlates with plasma viremia levels [7,12] and Tfh cell accumulation is reduced in individuals that control SIV infection [51], suggesting that the persistence of viral antigens might drive Tfh cell expansion. Accordingly, cTfh cell expansion has been recently reported in untreated individuals while the frequency of cTfh cells is restored to normal levels under cART suggesting that viral

In review

replication also drives cTfh cell dynamics [10]. Most studies report an increase of Tfh cells among memory CD4 T cells during HIV/SIV infection whereas others conclude with the opposite statement [9,52]. In SIV-infected rhesus macaques, Moukambi et al. recently showed that Tfh dynamics differs from one compartment to another (peripheral blood vs lymph nodes or spleen) [9]. Moreover, the Tfh cell frequency varies according to (i) the stage of HIV/SIV infection [51], (ii) the severity of the disease (iii) the ability to develop broadly neutralizing antibodies (bNAbs) [53,54]. In **Table 1,** we summarized Tfh cell dynamics from various studies taking into account: the type of infection (HIV/SIV), the phase (acute vs chronic), the disease progression (slow vs fast), the immune compartment (peripheral blood vs secondary lymphoid organs), the phenotype and the antigen specificity of the Tfh cells. Irrespective of the immune compartment (lymph nodes, spleen or blood) Tfh cells are preserved in HIV/SIV controllers, displaying no Tfh cell accumulation or loss. On the contrary, Tfh cell loss is reported in fast progressors as well as in the late stages of disease.

Tfh cell accumulation is reported during slow progression or chronic stage of the disease. Indeed, evidences support the pivotal role of persistent viral antigen within the germinal center (GC) in driving Tfh cell expansion. HIV particles are associated to FDC in tonsils and lymph nodes from infected patients [55–57] and Cheynier et al. reported the persistence of high levels of HIV particles in GC of HIV^+ spleens from untreated subjects [58]. In addition to FDC-bound virions, opsonized HIV particles interact with B cells trough CD21 membrane receptor [59,60]. Remarkably, the accessibility of CTL to GC is reduced, thus limiting the elimination of HIV-infected cells [61]. Therefore, B cell follicles locally concentrate cell subsets implicated in HIV replication and viral production, which maintain antigen persistence and GC reactions. It appears that antigen persistence sustains ongoing GC reactions in which Tfh and GC B cell frequencies are highly correlated [8,12,62]. However, a limited number of fully functional Tfh cells is required for the induction of bNAbs [40].

In review

Another clue supporting the pivotal role of GC in driving Tfh cell expansion is that the disruption of GC organization coincides with the loss of Tfh cells and the onset of AIDS in terminal stages of SIV infection [51]. PD1/PD-L2 axis contributes to the survival of Tfh and B cells. Interestingly, the expression of PD-L2 on B cells is severely impacted in the late stages of SIV-infection potentially contributing to a decreased survival of T and B cells and the termination of GC reaction [51].

In sum, increased proportions of Tfh cells do not necessarily results in a better immune control of HIV infection and Tfh cell proportions must be tightly regulated to allow efficient maturation and selection of B cells displaying high BCR affinity. Tfh cell functions need to be preserved to allow the production of potent bNAbs.

In review

	Phase	Disease outcome	Compartment	Phenotype	Antigen specificity	Dynamics	ref
SIV	acute	P	spleen	CXCR5+PD-1+	total	loss	[9]
SIV	acute	Slow P	LN	CXCR5+PD-1+	total	accumulation	[63]
SIV	chronic	Slow P	LN	CXCR5+PD-1+	total	accumulation	[64]
SIV	chronic	Slow P	spleen, LN	CD45RA-CD62L+CXCR5+PD-1+	total	accumulation	[9]
SIV	chronic	Fast P	LN	CXCR5+PD-1+	total	loss	[9]
SIV	late	P	LN	CXCR5+PD-1+	total	loss	[51]
SIV	chronic	C	LN	CXCR5+PD-1+	total	preservation	[51]
SIV	chronic	P	LN	CXCR5+PD-1+	total	accumulation	[65]
SIV	chronic	ND	LN	CD28hiCD95hi CCR7loPD-1hi	total	accumulation	[13]
HIV	acute	C	blood	CXCR5+PD-1+	total	preservation	[53]
HIV	chronic	P	blood	CCR7+CXCR5+ CCR6+PD-1+(+/-CXCR3)	total	loss	[52]
HIV	chronic	High neutralizers	blood	CCR7lowCXCR5+PD-1+ CXCR3-	total	preservation	[37]
HIV	chronic	ND	blood	CCR7+CXCR5+PD-1+ CXCR3-	total	accumulation	[10]
HIV	chronic	ND	LN	CXCR5+PD-1+Bcl-6+	HIV-specific	accumulation	[7]
HIV	chronic	ND	LN	CXCR5+PD-1+Bcl-6+ (CCR7-CD45RA-)	total / HIV-specific	accumulation	[12]
HIV	chronic	ND	spleen	CCR7-CD45RA-CXCR5+PD-1+	total	accumulation	[8]

Table 1: Tfh cell dynamics in HIV/ SIV infection according to the stage (acute, chronic or late) and the outcome (P: progressors, C: controllers, ND: non determined) of the disease. The phenotype and the immune compartment (spleen, blood or lymph nodes (LN) are mentioned.

For Review

					Helper functions					Differentiation						Regulation		
		Compartment	Ref	Population	IL-21	IL-4	OX40	CD40L	ICOS	BCL6	CXCR5	MAF	CXCL13	STAT3	BLIMP-1	PD-1	IL-10	CTLA4
HIV/SIV$^+$ vs HIV/SIV$^-$		Lymphoid organs	[9]	Tfh CXCR5+PD1bright	=													
			[13]	CD28hiCD95hiCCR7loPD1hi ICOShiCD150lo		-							+					
			[8]	CCR7loCXCR5+PD1+	+		-	-	- (ns)	+	=		+	-		-	-	-
		Blood	[52]	CXCR5hiCCR6hiPD1hi	-	-			+									
Disease outcome	Slow progression	Lymphoid organs	[9]	Total splenocytes						=	+	+						
	High neutralization		[62]	CD28+CD95+CXCR5+PD1hi CD154+	+					+	+	+	+		-			
	Controller status	Blood	[66]	CD45RA-CXCR5+CXCR3-	+					+								

Table 2 Transcriptional profiles of Tfh cells in HIV/SIV-infection. Gene expression profiles presented by functions: helper, differentiation, migration or regulation. Top of the table (dark grey) : differential expression of genes in HIV or SIV-infected individuals as compared to HIV or SIV-negative individuals. Bottom of the table (light grey) : differential expression of genes depending on disease outcome. Individuals presenting slow progressions, high neutralization titers or HIV-control are compared to individuals with fast progression, poor neutralization and absence of HIV control, respectively.

"+", higher expression; "-", lower expressed, "=" similarly expression, "ns", non significant

In review

Alteration of Tfh cell functions in the context of HIV infection

The key role of Tfh cells is to provide B cell helper signals and to promote their differentiation into memory B cell displaying high affinity for pathogens. These signals consists of production of cytokines such as IL-4 and IL-21 and the expression of cell surface molecules such as OX40, ICOS and CD40L by Tfh cells [67]. As other groups, we analyzed the transcriptome profiles of Tfh as a mean to assess potential Tfh dysfuntions (see references in Table 2). Using single cell sorting and high throughput PCR (Fluidigm BioMark HD), we showed that expression of genes implicated in splenic Tfh and GC Tfh cell functions are deeply impacted by chronic HIV infection [8]. In this section, we intend to review the impact of HIV/SIV infection on the main signals implicated in Tfh cell functions.

CD40L - CD40 (expressed by Tfh and B cell respectively) interactions are required for the induction and maintenance of GC reaction. Blocking this molecular axis leads to GC disruption [68]. In line with this, mutation in the CD40L gene is responsible for the X-linked hyper-IgM syndrome in humans characterized by a markedly decreased serum concentrations of IgA, IgE and IgG [69]. Our transcriptional data showed that the expression of CD40L gene is severely impacted in Tfh and GC Tfh from HIV-infected spleens [8]. Of note, CD40L down modulation has been reported in global CD4+ T cell population during the late stages of HIV infection [70] and our unpublished data.

OX40 - OX40L interaction is required for B cell differentiation into plasma cells [71]. In humans, mutations in OX40 gene lead to decreased proportion of circulating memory B cells but does not impact the antibody responses [72]. HIV-infected spleens exhibit defective expression of gene encoding OX40 in Tfh and GC Tfh cells [8]. Intriguingly, we reported a reduction of memory B cell compartment in chronically HIV-infected individuals. Whether

In review

OX40 defective expression by Tfh is involved in this decrease in memory B cell should be further investigated.

During GC reactions, the expression ICOS by Tfh cells plays a major role in the process of selection of high affinity B cells. ICOS ligation leads to the overexpression of CD40L by Tfh cells that, in turn, promotes the expression of ICOS Ligand (ICOSL) by GC B cells [73]. In mice, recent findings emphasize the crucial role of T and B cell interactions through ICOS-ICOSL and CD40L-CD40 molecular axis in the maintenance of GC reactions and the production of high affinity bone-marrow plasma cells. ICOSL has been identified as a key regulator of positive selection of high affinity B cells during T-B cell interaction. Noteworthy, in comparison with uninfected donors, ICOS expression is enhanced in cTfh of ART-treated HIV-infected individuals [52] suggesting an overall immune activation of cTfh in those patients.

IL-21 is considered as the cardinal cytokine of the Tfh cell population. Tfh-secreted IL-21 induces B cell affinity maturation [74]. A defective production of IL-21 by Tfh cells as well as a defective expression of its receptor by B cells severely impacts B cell proliferation and their differentiation into plasma cells [75]. In the context of HIV infection, circulating $CD4^+$ T cells secreting IL-21 are defined as the closest relative of tissue resident (from secondary lymphoïd organs) Tfh cells, both phenotypically and transcriptionally [76]. cTfh cells from chronically HIV-infected individuals present altered expression of IL-21 gene [52] suggesting defective helper function. Conversely, we showed higher level of IL-21 transcripts in Tfh cells from chronically HIV-infected spleens [8] while Moukambi and collaborators reported a similar level of expression between Tfh from uninfected macaques and SIV-infected macaques during the early and the chronic phases of SIV infection [9]. Discrepancies concerning the stage of the disease as well as the immune compartment (blood, spleen, lymph nodes) might explain these conflicting observations. Higher levels of IL-21 transcripts in cTfh

In review

cells are associated with HIV-controller status [66] or with cross-reactive neutralizing responses in rhesus macaques during the chronic phase of SIV infection (34 to 50 weeks post infection) [62].

IL-4 plays a major role in Tfh function [67] and confers anti-apoptotic properties to GC B cells that are particularly susceptible to cell death by apoptosis [77]. IL-4 also participates to GC B cells selection [78]. Tfh cells from SIV-infected rhesus macaques showed a marked reduction of IL-4 gene expression and a global alteration of genes implicated in the network associated with IL-4 pathway [13]. A defective expression of IL-4 gene has also been reported in cTfh from ART treated HIV-infected individuals [52]. We have shown a decreased secretion of IL-4 and IL-10 in splenocytes from chronically HIV-infected individuals [8]. IL-10 contributes to B cell differentiation [79]. Altered IL-10 secretion was also confirmed at the transcriptional level [8]. However, our experimental settings did not allow the discrimination of Tfh cells from the Tfr subset and IL-10 deficiencies might also be related to defective Tfr functions.

SLAMF1 is specifically required for IL-4 and IL-21 production by GC Tfh cells [80] and SAP (SLAM-associated protein) is essential for GC reaction by stabilizing interaction between Tfh and B cells [81]. In spleens from HIV-infected donors, we also observed a defective SLAMF1 gene expression in Tfh cell subsets that might explain the low level of IL-4 production by splenocytes from HIV-infected patients [8].

Altogether, these results indicate that HIV infection severely impacts Tfh cell functions in their capacity to provide adequate B cell help. These alterations result from both intrinsic Tfh cell defects and higher proportions of Tfh cells. Whether HIV infection alters Tfr cell functions is not clear. This issue will require further studies, especially addressing the capacities of Tfr cells to suppress Tfh cell functions or differentiation as well as B cell maturation. However, it will require identifying Tfr specific extracellular markers.

In review

Requirement for early ART initiation and optimized accessibility to lymphoid tissues

HIV/SIV infection results in antigen persistence that drives CD4 T cell differentiation toward the Tfh phenotype, thus maintaining high level of Tfh cells in GC. By controlling viremia, introduction of cART allows a normalization of cTfh cell proportions while Tfh cell functions are not fully restored. In particular, *in vitro* production of immunoglobulin is reduced in both untreated patients and HIV-infected individuals under cART [52]. Hence, despite cART, HIV patients showing a detectable viral load (163 +/- 178 HIV RNA copies/mL) did not respond to the 2009 H1N1/09 vaccine whereas vaccine responders displayed undetectable viral loads (< 40 HIV RNA copies/mL). This suggests that the persistence of viremia compromises Tfh cell functions [82]. Altogether, early control of viremia appears crucial to preserve Tfh cells functions. Additionally, while B cell compartment is not recovered in chronically infected individuals under cART, early cART initiation restores the memory B cell compartment during acute HIV infection [83].

Early cART initiation during primo infection allows a dramatic decrease of cell-associated HIV DNA and thus limits establishment of the reservoir [84,85]. However, the poor penetration of cART into lymphoid tissues [86] could limit the efficiency of drugs even if cART was initiate early. To address these limitations, several approaches, mainly based on the molecular formulation of drugs, are actually envisaged. Injectable cART could overcome the limited access to lymphoid tissues. In the LATTE clinical trial, injection of combined cabotegravir and rilpivirine was well tolerated and efficient [87]. However, the relevance of this approach on the persistence of the HIV reservoir has not been reported yet. Very recently, the efficient elimination of latently HIV-infected cells using HIV protease-sensitive toxin nanocapsules has been reported [88]. This strategy presents the advantage to specifically eliminate HIV-infected cells without impacting healthy cells, allowing a less invasive

In review

approach. Combining new ART formulations with innovative route of administration could contribute to eradicate HIV reservoir from lymphoid organs.

In conclusion, HIV/SIV infections target Tfh cell subsets and severely affect Tfh cell frequency and functions, with dramatic impact on GC homeostasis. While limited number of fully functional Tfh cells is required for the induction of bNAbs, it is now well established that viral antigen persistence drives increased Tfh cell differentiation. To this regard, blocking HIV replication in lymphoid tissues might be a prerequisite to the induction of potent bNAbs. Preventing virus from entering lymphoid tissues, should give another benefit to early ART initiation, as well as the development of new strategies to optimize the access of ART to lymphoid tissues.

Acknowledgments: We apologize to authors and colleagues whose work was not cited. We thank lab members, Dr B. Combadière and Pr B. Autran for discussions. We also thank ANRS, Sidaction, UPMC, INSERM and CNRS for continuous support.

In review

References

1. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). Annu Rev Immunol. 2011/02/15 ed. 2011;29: 621–663. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101400
2. Vogelzang A, McGuire HM, Yu D, Sprent J, Mackay CR, King C. A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells. Immunity. 2008;29: 127–137. doi:10.1016/j.immuni.2008.06.001
3. Ohara J, Paul WE. Up-regulation of interleukin 4/B-cell stimulatory factor 1 receptor expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85: 8221–8225.
4. Morita R, Schmitt N, Bentebibel S, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G, et al. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. Immunity. 2011;34: 108–21. doi:10.1016/j.immuni.2010.12.012
5. Moir S, Fauci AS. B cells in HIV infection and disease. Nat Rev Immunol. 2009;9: 235–45. doi:10.1038/nri2524
6. Cubas R a, Mudd JC, Savoye A-L, Perreau M, van Grevenynghe J, Metcalf T, et al. Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. Nat Med. Nature Publishing Group; 2013;19: 494–9. doi:10.1038/nm.3109
7. Perreau M, Savoye A-L, De Crignis E, Corpataux J-M, Cubas R, Haddad EK, et al. Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. J Exp Med. 2013;210: 143–156. doi:10.1084/jem.20121932
8. Colineau L, Rouers A, Yamamoto T, Xu Y, Urrutia A, Pham H-P, et al. HIV-Infected Spleens Present Altered Follicular Helper T Cell (Tfh) Subsets and Skewed B Cell Maturation. PLoS One. 2015;10: e0140978. doi:10.1371/journal.pone.0140978
9. Moukambi F, Rabezanahary H, Rodrigues V, Racine G, Robitaille L, Krust B, et al. Early Loss of Splenic Tfh Cells in SIV-Infected Rhesus Macaques. PLoS Pathog. 2015;11: 1–30. doi:10.1371/journal.ppat.1005287
10. Pallikkuth S, Sharkey M, Babic DZ, Gupta S, Stone GW, Fischl MA, et al. Peripheral T Follicular Helper Cells Are the Major HIV Reservoir Within Central Memory CD4 T Cells in Peripheral Blood from chronic HIV infected individuals on cART. J Virol. 2015; JVI.02883–15. doi:10.1128/JVI.02883-15
11. Boritz EA, Darko S, Swaszek L, Wolf G, Wells D, Wu X, et al. Multiple Origins of Virus Persistence during Natural Control of HIV Infection. Cell. Elsevier Inc.; 2016;166: 1004–1015. doi:10.1016/j.cell.2016.06.039
12. Lindqvist M, Lunzen J Van, Soghoian DZ, Kuhl BD, Ranasinghe S, Kranias G, et al. Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. J Clin Invest. 2012;122: 3271–3280. doi:10.1172/JCI64314.action
13. Petrovas C, Yamamoto T, Gerner MY, Boswell KL, Wloka K, Smith EC, et al. CD4 T follicular helper cell dynamics during SIV infection. J Clin Invest. 2012;122: 3281–3294. doi:10.1172/JCI63039.factors
14. Schmitt N, Morita R, Bourdery L, Bentebibel SE, Zurawski SM, Banchereau J, et al. Human dendritic cells induce the differentiation of interleukin-21-producing T follicular helper-like cells through interleukin-12. Immunity. 2009;31: 158–69. doi:10.1016/j.immuni.2009.04.016
15. Schmitt N, Liu Y, Bentebibel S-E, Munagala I, Bourdery L, Venuprasad K, et al. The cytokine TGF-β co-opts signaling via STAT3-STAT4 to promote the differentiation of human TFH cells. Nat Immunol. 2014;15: 856–865. doi:10.1038/ni.2947
16. Gringhuis SI, Kaptein TM, Wevers B a, van der Vlist M, Klaver EJ, van Die I, et al. Fucose-based PAMPs prime dendritic cells for follicular T helper cell polarization via

DC-SIGN-dependent IL-27 production. Nat Commun. 2014;5: 5074. doi:10.1038/ncomms6074

17. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. Cell. 2000;100: 587–597. doi:10.1016/S0092-8674(00)80694-7

18. Chakarov S, Fazilleau N. Monocyte-derived dendritic cells promote T follicular helper cell differentiation. EMBO Mol Med. 2014;6: 590–603. doi:10.1002/emmm.201403841

19. Choi YS, Eto D, Yang J a, Lao C, Crotty S. Cutting edge: STAT1 is required for IL-6-mediated Bcl6 induction for early follicular helper cell differentiation. J Immunol. 2013;190: 3049–3053. doi:10.4049/jimmunol.1203032

20. Kuller LH, Tracy R, Belloso W, De Wit S, Drummond F, Lane HC, et al. Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. PLoS Med. 2008;5: 1496–1508. doi:10.1371/journal.pmed.0050203

21. Shive CL, Biancotto A, Funderburg NT, Pilch-Cooper HA, Valdez H, Margolis L, et al. HIV-1 is not a major driver of increased plasma IL-6 levels in chronic HIV-1 disease. J Acquir Immune Defic Syndr. 2012;61: 145–52. doi:10.1097/QAI.0b013e31825ddbbf

22. Goenka R, Barnett LG, Silver JS, O'Neill PJ, Hunter CA, Cancro MP, et al. Cutting edge: dendritic cell-restricted antigen presentation initiates the follicular helper T cell program but cannot complete ultimate effector differentiation. J Immunol (Baltimore, Md 1950). 2011;187: 1091–1095. doi:10.4049/jimmunol.1100853

23. Crawford A, Macleod M, Schumacher T, Corlett L, Gray D. Primary T cell expansion and differentiation in vivo requires antigen presentation by B cells. J Immunol. 2006;176: 3498–506. doi:10.4049/jimmunol.176.6.3498

24. Barnett LG, Simkins HMA, Barnett BE, Korn LL, Johnson AL, Wherry EJ, et al. B cell antigen presentation in the initiation of follicular helper T cell and germinal center differentiation. J Immunol. 2014;192: 3607–17. doi:10.4049/jimmunol.1301284

25. Baumjohann D, Preite S, Reboldi A, Ronchi F, Ansel KM, Lanzavecchia A, et al. Persistent antigen and germinal center B cells sustain T follicular helper cell responses and phenotype. Immunity. Elsevier Inc.; 2013;38: 596–605. doi:10.1016/j.immuni.2012.11.020

26. Schwickert T a, Victora GD, Fooksman DR, Kamphorst AO, Mugnier MR, Gitlin AD, et al. A dynamic T cell-limited checkpoint regulates affinity-dependent B cell entry into the germinal center. J Exp Med. 2011;208: 1243–52. doi:10.1084/jem.20102477

27. Shimoda M, Li T, Pihkala JPS, Koni P a. Role of MHC class II on memory B cells in post-germinal center B cell homeostasis and memory response. J Immunol. 2006;176: 2122–2133. doi:10.4049/jimmunol.176.4.2122

28. Choi YS, Kageyama R, Eto D, Escobar TC, Robert J, Monticelli L, et al. ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. Immunity. 2011;34: 932–946. doi:10.1016/j.immuni.2011.03.023.Bcl6

29. McAdam A, Greenwald RJ, Levin M, Chernova T, Malenkovich N, Ling V, et al. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. Nature. 2001;409: 102–5. doi:10.1038/35051107

30. Good-Jacobson KL, Szumilas CG, Chen L, Sharpe AH, Tomayko MM, Shlomchik MJ. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. Nat Immunol. Nature Publishing Group; 2010;11: 535–42. doi:10.1038/ni.1877

31. Fairfax KC, Everts B, Amiel E, Smith AM, Schramm G, Haas H, et al. IL-4-Secreting

Secondary T Follicular Helper (Tfh) Cells Arise from Memory T Cells, Not Persisting Tfh Cells, through a B Cell-Dependent Mechanism. J Immunol. 2015;194: 2999–3010. doi:10.4049/jimmunol.1401225
32. Qi H, Liu D, Ma W, Wang Y, Yan H. Bcl-6 controlled TFH polarization and memory: the known unknowns. Curr Opin Immunol. Elsevier Ltd; 2014;28: 34–41. doi:10.1016/j.coi.2014.01.016
33. Lu KT, Kanno Y, Cannons JL, Handon R, Bible P, Elkahloun AG, et al. Functional and Epigenetic Studies Reveal Multistep Differentiation and Plasticity of In Vitro-Generated and In Vivo-Derived Follicular T Helper Cells. Immunity. Elsevier Inc.; 2011;35: 622–632. doi:10.1016/j.immuni.2011.07.015
34. Oestreich KJ, Mohn SE, Weinmann AS. Molecular mechanisms that control the expression and activity of Bcl-6 in TH1 cells to regulate flexibility with a TFH-like gene profile. Nat Immunol. 2012;13: 405–11. doi:10.1038/ni.2242
35. Pepper M, Pagán AJ, Igyártó BZ, Taylor JJ, Jenkins MK. Opposing Signals from the Bcl6 Transcription Factor and the Interleukin-2 Receptor Generate T Helper 1 Central and Effector Memory Cells. Immunity. 2011;35: 583–595. doi:10.1016/j.immuni.2011.09.009
36. McDonald PW, Read KA, Baker CE, Anderson AE, Powell MD, Ballesteros-Tato A, et al. IL-7 signalling represses Bcl-6 and the TFH gene program. Nat Commun. 2016;7: 10285. doi:10.1038/ncomms10285
37. Locci M, Havenar-Daughton C, Landais E, Wu J, Kroenke MA, Arlehamn CL, et al. Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. Immunity. 2013;39: 758–769. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.031
38. Schultz BT, Teigler JE, Pissani F, Oster AF, Kranias G, Alter G, et al. Circulating HIV-Specific Interleukin-21(+)CD4(+) T Cells Represent Peripheral Tfh Cells with Antigen-Dependent Helper Functions. Immunity. Elsevier; 2016;44: 167–78. doi:10.1016/j.immuni.2015.12.011
39. Ise W, Kohyama M, Schraml BU, Zhang T, Schwer B, Basu U, et al. The transcription factor BATF controls the global regulators of class-switch recombination in both B cells and T cells. Nat Immunol. Nature Publishing Group; 2011;12: 536–43. doi:10.1038/ni.2037
40. Pratama A, Vinuesa CG. Control of TFH cell numbers: why and how? Immunol Cell Biol. 2014;92: 40–8. doi:10.1038/icb.2013.69
41. Linterman M a, Pierson W, Lee SK, Kallies A, Kawamoto S, Rayner TF, et al. Foxp3(+) follicular regulatory T cells control the germinal center response. Nat Med. Nature Publishing Group; 2011;17: 975–982. doi:10.1038/nm.2425
42. Sage PT, Francisco LM, Carman C V, Sharpe AH. The receptor PD-1 controls follicular regulatory T cells in the lymph nodes and blood. Nat Immunol. 2013;14: 152–161. doi:10.1038/ni.2496
43. Wollenberg I, Agua-Doce A, Hernández A, Almeida C, Oliveira VG, Faro J, et al. Regulation of the germinal center reaction by Foxp3+ follicular regulatory T cells. J Immunol. 2011;187: 4553–4560. doi:10.4049/jimmunol.1101328
44. Chung Y, Tanaka S, Chu F, Nurieva RI, Martinez GJ, Rawal S, et al. Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. Nat Med. 2011;17: 983–988. doi:10.1038/nm.2426
45. Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, Barnett B, et al. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. Science (80-). 2009/07/18 ed. 2009;325: 1006–1010. doi:10.1126/science.1175870
46. Aloulou M, Carr EJ, Gador M, Bignon A, Liblau RS, Fazilleau N, et al. Follicular

regulatory T cells can be specific for the immunizing antigen and derive from naive T cells. Nat Commun. 2016;7: 10579. doi:10.1038/ncomms10579
47. Chowdhury A, Del Rio PME, Tharp GK, Trible RP, Amara RR, Chahroudi A, et al. Decreased T Follicular Regulatory Cell/T Follicular Helper Cell (TFH) in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Rhesus Macaques May Contribute to Accumulation of TFH in Chronic Infection. J Immunol. 2015;195: 3237–3247. doi:10.4049/jimmunol.1402701
48. Sage PT, Paterson AM, Lovitch SB, Sharpe AH. The coinhibitory receptor ctla-4 controls B cell responses by modulating T follicular helper, T follicular regulatory, and T regulatory cells. Immunity. Elsevier Inc.; 2014;41: 1026–39. doi:10.1016/j.immuni.2014.12.005
49. Wing JB, Ise W, Kurosaki T, Sakaguchi S. Regulatory T Cells Control Antigen-Specific Expansion of Tfh Cell Number and Humoral Immune Responses via the Coreceptor CTLA-4. Immunity. Elsevier Inc.; 2014;41: 1013–25. doi:10.1016/j.immuni.2014.12.006
50. Linterman MA, Denton AE. Treg Cells and CTLA-4: The Ball and Chain of the Germinal Center Response. Immunity. Elsevier Inc.; 2014;41: 876–8. doi:10.1016/j.immuni.2014.12.009
51. Xu H, Wang X, Malam N, Lackner A a, Veazey RS. Persistent Simian Immunodeficiency Virus Infection Causes Ultimate Depletion of Follicular Th Cells in AIDS. J Immunol. 2015;195: 4351–7. doi:10.4049/jimmunol.1501273
52. Boswell KL, Paris R, Boritz E, Ambrozak D, Yamamoto T, Darko S, et al. Loss of Circulating CD4 T Cells with B Cell Helper Function during Chronic HIV Infection. PLoS Pathog. 2014;10: 1–14. doi:10.1371/journal.ppat.1003853
53. Cohen K, Altfeld M, Alter G, Stamatatos L. Early Preservation of CXCR5+ PD-1+ Helper T Cells and B Cell Activation Predict the Breadth of Neutralizing Antibody Responses in Chronic HIV-1 Infection. J Virol. 2014;88: 13310–13321. doi:10.1128/JVI.02186-14
54. Locci M, Havenar-Daughton C, Landais E, Wu J, Kroenke MA, Arlehamn CL, et al. Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. Immunity. 2013;39: 758–69. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.031
55. Embretson J, Zupancic M, Ribas J, Burke A. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. Nature. 1993;362.
56. Pantaleo G, Cohen OJ, Schacker T, Vaccarezza M, Graziosi C, Rizzardi GP, et al. Evolutionary pattern of human immunodeficiency virus (HIV) replication and distribution in lymph nodes following primary infection: implications for antiviral therapy. Nat Med. 1998;4: 341–5.
57. Biberfeld P, Chayt KJ, Marselle LM, Biberfeld G, Gallo RC, Harper ME. HTLV-III expression in infected lymph nodes and relevance to pathogenesis of lymphadenopathy. Am J Pathol. 1986;125: 436–442.
58. Cheynier R, Henrichwark S, Hadida F, Pelletier E, Oksenhendler E, Autran B, et al. HIV and T cell expansion in splenic white pulps is accompanied by infiltration of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes. Cell. 1994;78: 373–87.
59. Moir S, Malaspina A, Li Y, Chun TW, Lowe T, Adelsberger J, et al. B cells of HIV-1-infected patients bind virions through CD21-complement interactions and transmit infectious virus to activated T cells. J Exp Med. 2000;192: 637–46. doi:10.1084/jem.192.5.637
60. de Bree GJ, Lynch RM. B cells in HIV pathogenesis. Curr Opin Infect Dis. 2016;29:

23–30. doi:10.1097/QCO.0000000000000225
61. Fukazawa Y, Lum R, Okoye A a, Park H, Matsuda K, Bae JY, et al. B cell follicle sanctuary permits persistent productive simian immunodeficiency virus infection in elite controllers. Nat Med. Nature Publishing Group; 2015;21: 132–9. doi:10.1038/nm.3781
62. Yamamoto T, Lynch RM, Gautam R, Matus-nicodemos R, Schmidt SD, Boswell KL, et al. Quality and quantity of T FH cells are critical for broad antibody development in SHIV AD8 infection. Sci Transl Med. 2015;7: 1–12. doi:10.1126/scitranslmed.aab3964
63. Hong JJ, Amancha PK, Rogers KA, Courtney CL, Havenar-Daughton C, Crotty S, et al. Early lymphoid responses and germinal center formation correlate with lower viral load set points and better prognosis of simian immunodeficiency virus infection. J Immunol. 2014;193: 797–806. doi:10.4049/jimmunol.1400749
64. Hong JJ, Amancha PK, Rogers K, Ansari AA, Villinger F. Spatial alterations between CD4(+) T follicular helper, B, and CD8(+) T cells during simian immunodeficiency virus infection: T/B cell homeostasis, activation, and potential mechanism for viral escape. J Immunol. 2012;188: 3247–56. doi:10.4049/jimmunol.1103138
65. Xu H, Wang X, Malam N, Aye PP, Alvarez X, Lackner AA, et al. Persistent SIV infection drives differentiation, aberrant accumulation, and latent infection of germinal center follicular T helper cells. J Virol. 2015;90: JVI.02471–15. doi:10.1128/JVI.02471-15
66. Cubas R, van Grevenynghe J, Wills S, Kardava L, Santich BH, Buckner CM, et al. Reversible Reprogramming of Circulating Memory T Follicular Helper Cell Function during Chronic HIV Infection. J Immunol. 2015; doi:10.4049/jimmunol.1501524
67. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). Annu Rev Immunol. 2011;29: 621–663. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101400
68. Casamayor-Palleja M, Feuillard J, Ball J, Drew M, MacLennan IC. Centrocytes rapidly adopt a memory B cell phenotype on co-culture with autologous germinal centre T cell-enriched preparations. Int Immunol. 1996;8: 737–44. doi:10.1093/intimm/8.5.737
69. Allen RC, Armitage RJ, Conley ME, Rosenblatt H, Jenkins N a, Copeland NG, et al. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. Science. 1993;259: 990–3.
70. Vanham G, Penne L, Devalck J, Kestens L, Colebunders R, Bosmans E, et al. Decreased CD40 ligand induction in CD4 T cells and dysregulated IL-12 production during HIV infection. Clin Exp Immunol. 1999;117: 335–342. doi:10.1046/j.1365-2249.1999.00987.x
71. Stüber E, Strober W. The T cell-B cell interaction via OX40-OX40L is necessary for the T cell-dependent humoral immune response. J Exp Med. 1996;183: 979–89. doi:10.1084/jem.183.3.979
72. Byun M, Ma CS, Akçay A, Pedergnana V, Palendira U, Myoung J, et al. Inherited human OX40 deficiency underlying classic Kaposi sarcoma of childhood. J Exp Med. Rockefeller University Press; 2013;210: 1743–59. doi:10.1084/jem.20130592
73. Liu D, Xu H, Shih C, Wan Z, Ma X, Ma W, et al. T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction. Nature. Nature Publishing Group; 2015;517: 214–8. doi:10.1038/nature13803
74. Linterman MA, Beaton L, Yu D, Ramiscal RR, Srivastava M, Hogan JJ, et al. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. J Exp Med. 2010;207: 353–63. doi:10.1084/jem.20091738
75. Zotos D, Coquet JM, Zhang Y, Light A, D'Costa K, Kallies A, et al. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. J Exp Med. 2010;207: 365–378. doi:10.1084/jem.20091777

Preview

76. Schultz BT, Teigler JE, Pissani F, Oster AF, Kranias G, Alter G, et al. Circulating HIV-Specific Interleukin-21+CD4+ T Cells Represent Peripheral Tfh Cells with Antigen-Dependent Helper Functions. Immunity. Elsevier; 2016;44: 167–178. doi:10.1016/j.immuni.2015.12.011
77. Wurster AL, Rodgers VL, White MF, Rothstein TL, Grusby MJ. Interleukin-4-mediated protection of primary B cells from apoptosis through Stat6-dependent up-regulation of Bcl-xL. J Biol Chem. 2002;277: 27169–75. doi:10.1074/jbc.M201207200
78. Cunningham AF, Serre K, Toellner KM, Khan M, Alexander J, Brombacher F, et al. Pinpointing IL-4-independent acquisition and IL-4-influenced maintenance of Th2 activity of CD4 T cells. Eur J Immunol. 2004;34: 686–694. doi:10.1002/eji.200324510
79. Arpin BC, Banchereau J, Liu Y. Memory B cells Are Biased Towards Terminal Differentiation : A Strategy That May Prevent Repertoire Freezing. J Exp Med. 1997;186.
80. Yusuf I, Kageyama R, Monticelli L, Johnston RJ, Hansen K, Barnett B, et al. Germinal Center T Follicular Helper Cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150). J Immunol. 2010;185: 190–202. doi:10.4049/jimmunol.0903505.Germinal
81. Crotty S, Kersh EN, Cannons J, Schwartzberg PL, Ahmed R. SAP is required for generating long-term humoral immunity. Nature. 2003;421: 2–7. doi:10.1038/nature01338.Published
82. Pallikkuth S, Parmigiani A, Silva SY, George VK, Fischl M, Pahwa R, et al. Impaired peripheral blood T-follicular helper cell function in HIV-infected nonresponders to the 2009 H1N1/09 vaccine. Blood. 2012;120: 985–993. doi:10.1182/blood-2011-12-396648
83. Muir R, Metcalf T, Tardif V, Takata H, Phanuphak N, Kroon E, et al. Altered Memory Circulating T Follicular Helper-B Cell Interaction in Early Acute HIV Infection. PLoS Pathog. 2016;12: e1005777. doi:10.1371/journal.ppat.1005777
84. Hocqueloux L, Avettand-Fènoël V, Jacquot S, Prazuck T, Legac E, Mélard A, et al. Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key to achieving both low HIV reservoirs and normal T cell counts. J Antimicrob Chemother. 2013;68: 1169–1178. doi:10.1093/jac/dks533
85. Laanani M, Ghosn J, Essat A, Melard A, Seng R, Gousset M, et al. Impact of the timing of initiation of antiretroviral therapy during primary HIV-1 infection on the decay of cell-associated HIV-DNA. Clin Infect Dis. 2015;60: 1715–1721. doi:10.1093/cid/civ171
86. Fletcher C V, Staskus K, Wietgrefe SW, Rothenberger M, Reilly C, Chipman JG, et al. Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111: 2307–12. doi:10.1073/pnas.1318249111
87. Margolis DA, Brinson CC, Smith GHR, de Vente J, Hagins DP, Eron JJ, et al. Cabotegravir plus rilpivirine, once a day, after induction with cabotegravir plus nucleoside reverse transcriptase inhibitors in antiretroviral-naive adults with HIV-1 infection (LATTE): A randomised, phase 2b, dose-ranging trial. Lancet Infect Dis. 2015;15: 1145–1155. doi:10.1016/S1473-3099(15)00152-8
88. Wen J, Yan M, Liu Y, Li J, Xie Y, Lu Y, et al. Specific Elimination of Latently HIV-1 Infected Cells Using HIV-1 Protease-Sensitive Toxin Nanocapsules. PLoS One. 2016;11: e0151572. doi:10.1371/journal.pone.0151572

In review

TLR-3, -4, NOD2 and DC-SIGN ligands impact viral replication and T cell activation-capacity of HIV-infected dendritic cells

Sylvain Cardinaud[1], Alejandra Urrutia[1], Angeline Rouers[1,*], Pierre-Grégoire Coulon[1,*], Clémence Richetta[1], Emmanuel Atangana Maze[1], Martin Larsen[2], Maria-Candela Iglesias[2], Victor Appay[2], Stéphanie Graff-Dubois[1] and Arnaud Moris[1]

Author affiliations:

[1] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM U1135, CNRS ERL 8255, Center for Immunology and Microbial Infections – CIMI-Paris, Paris, F-75013, France;

[2] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM U1135, Center for Immunology and Microbial Infections – CIMI-Paris, Paris, F-75013, France;

* co-third author

Present address:

SC: INSERM, U955, IMRB, Vaccine Research Institute, F-94010, Creteil, France

AU: Institut Pasteur, Centre d'Immunologie Humaine, F-75015, Paris, France

MCI: CI Consulting - Global Health & Development Consulting Services, Oslo, Norway

EAM: School of Biomedical & Healthcare Sciences, Plymouth University, Plymouth UK

Corresponding author:

Arnaud Moris

Center for Immunology and Microbial Infections - CIMI-Paris

UPMC UMRS CR7, INSERM U1135, CNRS ERL8255,

Faculté de Médecine de l'UPMC

91 Bd de l'Hopital

75013 Paris, France

E-mail: arnaud.moris@upmc.fr

Key words: DC, PRR, antigen presentation, CTL, polyfunctionality, APOBEC3, HIV-1,

For Peer Review

ABSTRACT

A variety of signals influence the capacity of dendritic cells (DC) to mount potent antiviral cytotoxic T cell (CTL) responses. In particular, innate immune sensing by pathogen recognition receptor (PRR) influence DC biology and affect their susceptibility to HIV infection. Yet, whether the combined effects of PPR-triggering and HIV infection influence HIV-specific CTL responses remained enigmatic. We dissected the impact of innate immune sensing by PRR on DC maturation, HIV infection and on the quality of HIV-specific CTL activation. Remarkably, TLR-3, -4, NOD2 and DC-SIGN ligands despite reducing viral replication, markedly increased the capacity of infected DC to stimulate HIV-specific CTL. This was exemplified by the diversity and the quantity of cytokines produced by HIV-specific CTL. The expression of APOBEC innate antiviral factors enhanced the antigen-presenting skills of infected DC. Our results highlight the tight interplay between innate and adaptive immunity and will help developing innovative immunotherapies against viral infections.

For Peer Review

INTRODUCTION

In human, several DC subsets have been identified including BDCA-1+ and BDCA-3+ conventional DC (cDC) and inflammatory monocyte-derived DC (MDDC) [1]. DC share common features such as the capacity to capture antigen (Ag), migrate and form privileged interactions with effector T-cells in lymphoid tissues. While migrating, DC process captured antigens such as proteins, virions or infected cells leading to the loading of major histocompatibility class I (MHC-I) or class II (MHC-II) molecules and activation of CD8+ or CD4+ T cells, respectively [2]. Alternatively, DC can be directly infected and will process and present newly synthetized antigens (so called endogenous antigens) to T cells [3]. The sensing of microbes by pathogen recognition receptor (PRR) initiate the maturation of DC that enhances their capacities to interact and present antigen to T cells [4]. DC maturation is characterized by a higher cell surface expression of MHC-I and MHC-II molecules, of co-stimulatory molecules (e.g. CD83, CD86 and CD40), but also changes in vesicular trafficking or composition of proteases involved in antigen processing [5]. PRR include transmembrane receptors such as TLR- and C-type lectins as well as cytosolic sensors including NOD2 [6]. PRR bind distinct pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and trigger different cascades of intracellular signaling leading to the expression of lymphokines that strongly influence the capacity of DC to cross-present infected cells and soluble antigens to cytotoxic CD8+ T cells (CTL) [7-9]. In addition, PRR-triggering initiates the expression of antiviral factors and the secretion of antiviral cytokines/chemokines [6].

cDC contribute to HIV-1 infection (hereafter referred as HIV) and spread while initiating innate and adaptive anti-HIV immune responses [10]. cDC and MDDC, that are located or attracted at HIV entry sites, are among the targets of HIV infection [11] and contribute to chronic infection [12]. In the absence of treatment, infected cDC and monocytes are found in the blood of HIV+ donors [11, 13]. Ex vivo, sorted BDCA1+ cDC support productive infection of HIV strains [14, 15]. MDDC are equipped with HIV receptors and express molecules involved in HIV capture (e.g. DC-SIGN and Siglec-1) that facilitate infection and viral transfer [16, 17]. Nonetheless, HIV replicates poorly in DC as compared to activated CD4+ T-cells [18, 19]. This is due to the expression of viral restriction factors that block HIV replication at different stages of DC infection, e.g. SAMHD1 depletes intracellular dNTPs and degrades viral RNA, and APOBEC-3G (A3G) and -3F (A3F) interfere with reverse transcription and introduce point mutations in HIV DNA [20, 21]. DC maturation further reduces susceptibility to infection and is associated with an increase in A3G and A3F

For Peer Review

expressions [21, 22]. HIV also exploits innate immune signaling pathways to facilitate productive infection of DC [23]. Hence, depending on the PRR involved, triggering of innate antiviral responses in DC has contrasting roles on viral replication [23-25].

HIV specific (HS)-CTL play a critical role in controlling HIV replication. During acute infection, expansion of HS-CTL is associated with decreased viremia and determines viral set point during chronic infection [26]. Resistance to disease progression correlates with detection of HIV Gag-specific CTL and with expression of particular HLA alleles, such as HLA-B*57 and –B*27 [27, 28]. HIV rapidly mutates to evade virus-specific CTL responses, underlying the selection pressure exerted by CTL [29]. However, our understanding of T-cell efficacy in HIV infection is still limited. The quality, defined as the secretion of multiple antiviral cytokines/chemokines, and not the magnitude of T-cell responses determines HIV disease outcome [30]. The quality of T cell activation is linked to various parameters such as the avidity of the TcR/MHC interactions, the cytokine environment but also the kinetics and quantity of antigen presented on APC. These factors are influenced by PRR-activation [9]. Previous reports have shown, *in vivo* and *in vitro,* that treatments with TLR-3 and TLR-7 ligands improve the capacity of DC to present HIV protein antigens or HIV peptides to HS-CTL [8, 31].

In the present study, we asked whether PRR-triggering of HIV-infected DC might influence their capacity to present endogenous viral antigens with direct consequences on the intensity and the quality of HS-CTL activation. We systematically analyzed the impact of a library of PRR ligands on MDDC maturation, HIV replication in MDDC and on the capacity of infected MDDC to activate HS-CTL. We demonstrate that while all ligands induced a robust to intermediate MDDC maturation only certain PRR ligands (TLR-3, -4, NOD2 and DC-SIGN ligands) strongly reduced HIV infection of MDDC. As expected, inhibition of HIV replication was associated with the expression of antiviral restriction factors. Notably, despite a reduced infection, we observed that infected MDDC treated with TLR-3, -4, NOD2 or DC-SIGN ligands were more potent in inducing HS-CTL responses. Finally providing a link towards a potential mechanism, we show that A3G and A3F, whose expression are induced by PRR ligands, not only act as antiviral factors in MDDC, but also potently increase the Ag-presenting skills of infected MDDC.

For Peer Review

RESULTS

MDDC express NOD2 and various levels of TLR-1 to TLR-9.

Using RT-qPCR, we first analyzed the relative expression levels of some PRR in sorted DC-SIGN+ MDDC. As expected [32, 33], transcripts encoding TLR-1 to -8 and NOD2 were detected, though to variable rates (not shown). In contrast to Li et al. [32] but in accordance with the work of Tada et al. [33], we also detected TLR9 mRNA. TLR-2 and TLR-4 mRNA were the most abundant. We thus selected a library of ligands binding to TLR-1 to -9 and NOD2. In addition, we included an agonist of DC-SIGN, as this C-type lectin is also involved in HIV binding, replication and antigen presentation [34].

We used this library to analyze the impact of PRR triggering on DC maturation, viral replication and antigen presentation, as described in Fig. S1A. MDDC were infected 24h or 3 days, with the R5-tropic HIV_{Yu2b} strain, in the presence or absence of reverse transcription inhibitors, respectively. Simultaneously, MDDC were treated with TLR-1 to -9, NOD2 and DC-SIGN agonists or untreated as negative control. At each time point, the maturation and the capacity of PRR-ligand treated MDDC to present HIV antigens to HIV-specific CTL was compared. Three day post infection (p.i.), HIV replication in MDDC cultures was also monitored.

HIV infection does not interfere with PRR-induced maturation of MDDC.

We monitored the consequences of PRR-triggering on the cell surface expressions of the classical DC maturation markers: CD86, CD83, MHC-I, HLA-DR and DC-SIGN (Fig. 1). A representative staining using MDDC from one individual using TLR-4 ligand (LPS) is shown in Fig. 1A. This experiment was repeated using MDDC from 8 healthy individuals and the results compiled in Fig. 1B. For each marker, the means of fluorescence intensities (MFI) were normalized to untreated non-infected samples and the data expressed as fold increase.

At early time points (24h), LPS induced a strong up-regulation of CD86, CD83, MHC-I and HLA-DR (fold increase ranging 2.5 to 4.1). LPS-activated DC also down-regulate DC-SIGN expression (average fold change < 0.7) (Fig. 1B and S1B). Note that in contrast to other cell surface markers, the decrease of DC-SIGN expression is a hallmark of DC maturation [35]. All PRR-ligands induced to various extend the maturation of MDDC 24h after treatment (Fig. 1B). CD86 CD83 and HLA-DR were highly up-regulated following TLR-1/2, TLR-4 and DC-SIGN triggering (fold change ranging 1.7 to 4.1), while other PRR ligands

For Peer Review

moderately change expression for some of these maturation markers (average fold change ranging 1.5 to 2). At 24h, the loading of MDDC with viral particles induced a marked increase of CD86 and HLA-DR, (fold change expression of 1.6 and 2.8, respectively) and a slight increase of other maturation markers. However, loading MDDC simultaneously with HIV and PRR agonists further induced maturation with a profile similar to PRR-agonists alone.

At later time points (72h after treatment), TLR-2 and TLR-9 induced a modest maturation of MDDC (Fold change < 1.5). All other agonists induced a significant increase of two (e.g. TLR-8) to five (e.g. TLR-4) maturation markers of DC (average fold increases ranging from 1.5 to 5.1). TLR-4 and DC-SIGN agonists induced a significant DC-SIGN down-regulation both at 24h or 72h after treatment. Remarkably, HIV-infection of DC (72h) induced a strong but non-significant increase of CD86 and a slight increase of all other maturation markers. PRR-activation of infected DC established a matured phenotype, exacerbating the maturation profile observed for uninfected DC (Fig. 1B). We then compared the maturation profile of productively infected (Gag-p24 positive) and "by-stander" (Gag-p24 negative) cells (Fig. S1C). Among PRR-treated but also untreated cells, Gag-p24 positive cells showed a higher significant expression of CD83 and HLA-DR than Gag-p24 negative cells. The expression profiles of CD86 and HLA-I were only slightly up-regulated in Gag-p24 positive cells as compared with Gag-p24 negative cells.

In summary, as expected most tested PRR agonists induce moderate (TLR-2) to strong (TLR-1/2, TLR-4, NOD2 and DC-SIGN) MDDC maturation. HIV provokes a slight maturation of MDDC. Within infected cell-cultures, productively infected MDDC (Gag-p24+ cells) seemed more mature than Gag-24 negative cells. HIV infection does not interfere with the maturation induced by each of the ligands.

Triggering of TLR-3, -4, NOD2 and DC-SIGN diminishes HIV replication in MDDC.

We then asked whether PRR signaling might modulate HIV replication. Three days p.i., we analyzed the capacity of HIV to replicate in DC treated with the panel of PRR agonists (Fig. 2). MDDC were collected and the percentage of infected cells determined using intracellular Gag-p24 staining and flow cytometry. A representative experiment using MDDC from a single donor is presented in Fig. 2A. The results from 8 independent experiments using MDDC derived from 8 individuals are presented as percent of Gag-p24+ cells (Fig. 2B) and as relative levels of infection (Fig. 2C). The infection rate of untreated MDDC using HIV_{Yu2b} was on average 12.4% (ranging from 4.3 to 24.7%). None of the PRR agonists

For Peer Review

significantly increased HIV-infection of MDDC. In contrast, DC treatment with TLR-3, TLR-4, NOD2 and DC-SIGN ligands was associated with a significant ($p<0.05$) reduction in HIV replication (as exemplified by the decrease in the frequency of Gag-p24+ cells). TLR-5, TLR-8 and TLR-9 agonists also lead to a slight reduction of Gag-p24+ cells (average fold decrease of 0.8). The most dramatic decrease was observed using the agonists of TLR-4 (LPS) and TLR-3 (PolyI:C), for which viral replication was on average 80% and 55% reduced as compared with untreated cells, respectively (Fig. 2). We obtained similar results when collecting cell-culture supernatant and performed a p24-ELISA (not shown).

Innate antiviral factors are upregulated upon PRR activation.

We measured by RT-qPCR the expression of viral restriction factors (A3G, A3A, A3F, SAMHD1, Tetherin, CyPA and ADAR1). We extended this analysis to viral sensors or enzymes that interact with PRR signaling (RIG-I, MDA5, A20 and TREX1) [36] and we used as control the innate immune activation marker, MxA (Fig. 3). We focused our analysis on PRR-ligands that induce an inhibition of HIV replication in DC (TLR-3, TLR-4, NOD2, and DC-SIGN) and as a control TLR-6/2 agonist, which does not impact HIV infection (Fig. 2). MDDC were treated with PRR-agonists in the presence or absence of replicative competent HIV_{YU2b} and the relative mRNA expression levels were compared to the untreated uninfected controls. With the exception of SAMHD1 and CypA, TLR-3 and -4 agonists induced modest (1.2 and 3.3 fold increases in Tetherin expression, respectively) to very strong (31 and 563 fold increases in A3A expression) up-regulation of all mRNA analyzed. HIV infection further enhanced the mRNA expression levels without changing the overall profiles. TLR-6/2 ligand only slightly increased the expression of A3F, ADAR-1 and A20 mRNA. NOD2 and DC-SIGN agonists induced an intermediate expression profile with a slight increase of A3G, A3F, ADAR1, RIG-I, MDA5, A20 and MxA (folds changes between 1.9 and 6.9). In contrast, mRNA of A3A, SAMHD1 and CypA were downregulated by NOD2 and DC-SIGN ligands. These down-modulations were even more pronounced in HIV-infected DC. Overall, we observed an increase of transcripts encoding for the antiviral restriction factors A3G, A3A, A3F, ADAR-1 and Tetherin upon treatment with TLR-3, -4, NOD2, DC-SIGN but not TLR-6/2 ligands (Fig. 3).

TLR-3, TLR-4, NOD2 and DC-SIGN agonists enhance HS-CTL responses.

We then analyzed the capacity of PRR-treated DC to activate HS-CTL. Twenty-four hours and 3d p.i., MDDC loaded or infected with HIV_{Yu2b}, respectively, and treated with the panel

For Peer Review

of PRR ligands were co-cultured with an HS-CTL clone restricted by HLA-A*0201 and specific for SL9 peptide from HIV Gag-p17 (Fig. 4). Note that for DC loaded with HIV for 24h in the presence of RT inhibitors (AZT+NVP), HIV antigens are derived solely from incoming viral particles (so-called exogenous presentation) [34]; in contrast, upon 3-day of infection, the source of HIV antigens corresponds mainly to newly synthetized HIV proteins (so-called endogenous presentation) [37]. T-cell activation was monitored using IFN-γ ELISpot (Fig. 4). A representative experiment using a single donor is presented in Supplemental Fig. 2 and the data combined with three additional independent experiments in Fig. 4. PRR activation had no significant impact on the capacity of HIV- or peptide-loaded MDDC to activate the SL9-specific CTL clone (Fig. 4A). LPS (TLR-4)-treatment of MDDC induced a slight, but not significant, decrease of T cell activation by HIV-loaded MDDC (Fig. 4A). Interestingly, with the exception of LPS that decreases T cells activation levels, PRR triggering had, at first sight, also a minor influence on the capacity of HIV-infected cells (3d p.i.) to stimulate the SL9-specific CTL clone (Fig. 4B). However, 3-day post-infection the main source of antigens is derived from newly synthetized Gag antigens [37]. We thus examined T cell activation relative to the infection rates (Fig. 4B, right panel). Strikingly, relative to their capacity to reduce viral replication (Fig. 2), TLR-3, TLR-4, NOD2 and DC-SIGN agonists enhanced (3 to 6 fold) the activation of the SL9-specific CTL clone. Note that, 3-day post treatment, PRR-triggering increased modestly, if any, peptide-mediated activation of the SL9-specific CTL (Fig. 4B, left panel). Overall, our results strongly suggest that TLR-3, TLR-4, NOD2 and DC-SIGN triggering improve the capacity of infected MDDC to stimulate HS-CTL, and this is not uniquely due to increased MHC-I expression.

We then examined the capacity of HIV-loaded or –infected PRR-treated MDDC to induce T cell polyfunctional responses using two HLA-B*27 restricted CTL clones (E2C and H8B) specific for Gag-p24 KK10 epitope and whose polyfunctional profile has been previously characterized [38]. As illustrated in Supplemental Fig. 3, polyfunctional activation was analyzed by flow cytometry using IFN-γ, IL-2, TNF-α, MIP-1β and CD107a mobilization [38]. As for the SL9-specific CTL clones, 24h post PRR-stimulation, MDDC loaded with KK10 peptide or with HIV, induced similar levels of activation (not shown). 72h post PRR-treatment, peptide-loaded MDDC also brought comparable levels of HS-CTL activation (Fig. 5, left panels). 72h post infection, most PRR ligands provoked a modest increase of KK10-specific CTL activation (Fig. 5). To highlight the quality of T cell activation, the results were also expressed as a polyfunctional index (P-index) that allows a

For Peer Review

quantitative assessment of T cell polyfunctionality [39]. The polyfunctional indexes induced by KK10-peptide loaded- or HIV-infected PRR-treated MDDC followed a similar trend than the global HS-CTL activation levels (Fig. 5). However, relatively to their capacity to reduce viral replication (Fig. 2), TLR-3, TLR-4, NOD2 and DC-SIGN agonists increased the activation and the polyfunctionality of the KK10-specific CTL clones from 3-16 fold (Fig. 5, right panels).

Thereafter using distinct HS-CTL clones and analyzing both the magnitude and quality of T cell activation, we observed that TLR-3, TLR-4, NOD2 and DC-SIGN pathways have a dual role: they limit HIV replication in DC while inducing highly functional HS-CTL responses.

APOBEC-3G (A3G) and -3F (A3F) enhance HIV antigen presentation by MDDC.

We have previously shown that A3G- mediated viral restriction contributes to the immunogenicity of HIV-infected T cells [40]. Since, A3G but also A3F expressions are induced upon TLR-3, TLR-4, NOD2 and DC-SIGN MDDC activation, we decided to define their role in the enhancement of CTL activation by MDDC. To this end, we introduced A3G and A3F in HIV_{SF2} particles prior to infecting MDDC (Fig. 6A) [40]. A3G and A3F are packaged into newly formed HIV particles and subsequently edit the nascent viral DNA leading to G- to -A hypermutations in the proviral genome [41]. As expected, infecting a CEM-A2+ T cell line with A3G- or A3F-containing HIV virions lead to reduced viral replication, as compared to wild-type HIV, but increase activation of the SL9-specific CTL clone than HIV alone (Fig. 6B) ($p < 0.05$). These results confirmed, and further extend to A3F, our previous demonstration that A3G editing enhances the ability of HIV-infected CD4+ T cells to activate HS-CTL [40].

Using a similar approach, MDDC were infected with HIV, $A3G^+$ and $A3F^+$ containing HIV, viral replication monitored and cells co-cultured with the SL9-specific CTL clone (Fig. 6C). As previously, the antiviral activity of A3G and A3F reduced MDDC infection as compared to HIV alone but enhanced the capacity of MDDC to activate the HS-CTL clone ($p < 0.05$). Importantly, to distinguish between exogenous and endogenous antigen presentation (derived from the viral input or from newly synthetized proteins, respectively), MDDC were also infected in the presence of RT-inhibitors (AZT+NVP). MDDC treated with RT-inhibitors did not induce a significant CTL activation. As in CD4+ T cells, these results strongly suggest that in DC, the editing activity of A3G and A3F favors the generation of MHC-I restricted antigens leading to improved HS-CTL activation.

For Peer Review

DISCUSSION

In the present work, we examined the consequences of PRR-triggering of DC on immunological and virological parameters: maturation, HIV replication and quality of CTL stimulation by HIV-infected DC. We show that HIV infection induces an intermediate maturation of DC. However, PRR activation fully restores DC maturation. Only a limited set of PRR agonists (TLR-3, TLR-4, NOD2 and DC-SIGN ligands) influence HIV replication, highlighting that DC maturation is not systematically associated with lower viral replication. Notably, the agonists that reduce viral replication promote the expression of antiviral factors, such as APOBECs, but also enhance the capacity of infected DC to stimulate HS-CTL. This is exemplified by the magnitude and the quality of HS-CTL activation. Finally, we demonstrate that the antiviral factors A3G and A3F enhance the ability of DC to activate HS-CTL responses, thus linking innate and adaptive immunity.

DC express membrane bound, endosomal or cytosolic PRR that are involved in the sensing of microbes and viruses. In pDC, previous studies have shown that the ssRNA of HIV is sensed by TLR-7/8 [42, 43]. In MDDC, the uptake of HIV leads to NF-KB activation, also through the triggering of TLR-8, and results in abortive transcription of HIV genome [23]. However, whether HIV-mediated TLR-8-activation leads to MDDC maturation is less clear [23]. In fact, the effect of HIV infection on MDDC maturation is controversial. Using single cycle virus or AZT to block productive infection, some reports have shown that the viral inoculum does not induce maturation [19, 44]. In contrast, using highly purified chemically inactivated virus, others have shown that the viral input induces, in a dose dependent manner, a partial maturation of MDDC [45, 46]. In our work, we also observed that abortive HIV infection (HIV+ART) induces an intermediate maturation of DC. The impact of productive infection of MDDC is also a matter of debate as some authors described that HIV replication induces MDDC maturation [19, 45-47] while others did not [44, 48, 49]. Using 8 MDDC preparations, we show here that HIV replication induces the maturation of MDDC with productively infected cells (HIV Gag-p24+) exhibiting a more mature phenotype. Remarkably, the treatment of MDDC with TLR-1 to -9, DC-SIGN and NOD-2 ligands further enhanced the phenotypic maturation of cells loaded or infected with the virus.

PRR triggering initiates an antiviral state involving the secretion of antiviral cytokines and the expression of Interferon-stimulated genes (ISG). Some ISG including A3G, A3A, A3F, SAMHD1, Tetherin, CyPA and ADAR1 inhibit HIV replication [36]. HIV replication

For Peer Review

in MDDC induces the expression of ISG [19]. However in HIV-infected cells, ISG upregulation is delayed as compared to PRR treated MDDC [19], potentially due to hijacking of the TBK-1/IRF3 transduction pathway [50]. Productive infection of MDDC might also, at least partially, block TLR-induced phenotypic maturation of MDDC [48]. On the other hand, TLR-3 and -4 ligands increase A3G and A3F expression limiting HIV replication in macrophages and DC [21, 24, 51]. Triggering of NOD2 also reduces HIV replication in MDDC [52]. The kinetics of PRR-triggering differentially influence viral replication: for instance, a 24h- or a short 2h-pulse with TLR-2 ligand, prior to MDDC HIV infection, has been shown to decrease or enhance HIV replication, respectively [24, 52].

In our study, we decided to focus on TLR-, NOD2 and DC-SIGN ligands because i) these PRR are expressed by MDDC; ii) primary HIV infection is often associated with co-infections; iii) TLR- ligands are already included in vaccine formulations; iv) TLR- ligands are currently considered as potential adjuvants for therapeutic vaccination against HIV. With the exception of the work by Thibault et al. [24] who focused on TLR-2 and TLR-4, most authors studied the impact of PRR ligands on HIV replication using fully matured MDDC (e.g. infecting 24h post PRR-treatment). In our work, MDDC were treated with the agonists during HIV loading to mimic potential HIV co-infections and more importantly vaccine administration. We show that none of the PRR agonists significantly increased HIV-infection of MDDC. In contrast, DC treatment with TLR-3, TLR-4, NOD2 and DC-SIGN ligands induced a reduction of HIV replication. TLR-5, TLR-8 and TLR-9 agonists only slightly reduced MDDC infection. We observed an increase of transcripts encoding for the antiviral restriction factors A3G, A3A, A3F, ADAR-1 and Tetherin upon treatment with TLR-3, -4, NOD2, DC-SIGN but not TLR-6/2 ligands that does not influence replication, suggesting a potential link between the expression of these antiviral factors and the inhibition of HIV replication in MDDC. Note that other ISG, such as TRIM5 or Mx2 that influence HIV replication might also account for the inhibition of HIV replication [36].

PRR triggering also regulates the capacity of DC to capture, process and present antigens to T cells [4]. TLR-signals redirect recycling MHC-I molecules to phagosomes allowing cross-presentation of antigens to CTL [53]. They upregulate mRNA translation and the expression of rapidly degraded proteins, a major source of MHC-I restricted antigens [54]. TLR-activation increases the expression of factors involved in the MHC-I restricted processing pathways such as TAP, Tapasin, and favors a switch between standard to classical immunoproteasomes in DC, potentially impacting the nature of peptide loaded on MHC-I molecules [55]. We analyzed the capacity of PRR-activated DC to present antigens

For Peer Review

derived from incoming viral particles (exogenous presentation) or from productive viral infection, thus including newly-synthetized viral products. PRR-triggering did not influence the presentation of exogenous HIV antigens to HS-CTL. Other studies have shown that TLR- triggering differentially impact the cross-presentation of cellular antigens [7, 56]. However, the kinetics of PRR activation and PRR-triggering, *per se*, might have different outcome depending on the routes of antigen delivery, e.g. the presentation of MHC-I-restricted HIVGag-p24 antigens derived from the viral input relies on fusion of HIV and host membranes [34]. In addition, although we used HS-CTL specific for different viral proteins (Gag-p17 and Gag-p24) and exhibiting various functional avidities, our work, with T cell clones, might underestimate the impact of PRR-triggering of CTL activation.

Nonetheless, using HS-CTL clones, we demonstrate that TLR-3, -4, NOD2 and DC-SIGN ligands promote CTL activation by infected DC. Signaling through these PRR favors the production of multiple cytokines/chemokines, thus showing that PRR-triggering influence CTL activation both qualitatively and quantitatively. At first sight, our results reveal a potential paradox as triggering of TLR-3, TLR-4, NOD2 and DC-SIGN reduced viral replication, thus reducing the source of Gag-p24 antigens, but enhanced HS-CTL responses. However, the source of MHC-I restricted viral antigens is not limited to full length proteins as misfolded or truncated proteins represent a major source of endogenous peptides for the loading of MHC-I molecules [57, 58]. In T cells, we have previously shown that A3G enhances the recognition of HIV-infected cells by HS-CTL. This phenomenon requires the enzymatic activity of A3G that introduces hypermutations in HIV genome, leading to the expression of misfolded or truncated viral proteins [22, 40]. In this study, we demonstrate that A3F also enhances the immunogenicity of infected T cells. In DC, confirming previous findings [21, 24, 51, 52], we show that the expression of A3G and A3F is strongly induced upon TLR-3, -4, NOD2 activation. We observed that DC-SIGN signaling also increases their expression. In addition, we demonstrate that in DC as in T cells, A3G and A3F when present in viral particles strongly favor CTL activation, thus providing a mechanism explaining PRR-mediated enhancement of CTL activation. Remarkably in the context of vaccinations, the induction of A3G expression correlates with the activation of polyfunctional CTL and upon challenge, to lower viral loads [59].

Overall, we demonstrate that triggering of TLR-3, -4, NOD2 and DC-SIGN decreases HIV replication but in contrast enhances the quality of CTL activation mediated by HIV-infected DC (Fig. 7). In DC, we highlight the role APOBEC family members in enhancing CTL activation.

For Peer Review

MATERIAL AND METHODS

Cells

PBMC from the blood of HIV–seronegative donors (Etablissement Français du Sang, Paris, France) were screened by FACS for the expression of HLA-A*02 using BB7.2 antibody (Biolegends). HLA-B27-positive donors were selected using the Luminex xMAP technology [60]. Monocytes were isolated with CD14+ magnetic beads (Miltenyi Biotec) and cultured with RPMI 1640 containing 10% FBS and cytokines (GM-CSF at 20 ng/mL and IL-4 at 2 ng/mL, Miltenyi Biotec). On day 5, MDDC were infected with HIV and simultaneously treated with PRR ligands (see Fig. S1A). The SL9c2 and KK10 CD8+ T cell clones, specific for HIV Gag-p17 (SLYNVATL, aa 77–85, SL9 peptide; restricted by HLA-A*0201) and for HIV Gag-p24 (KRWIILGLNK, aa 263-272, KK10 peptide, restricted by HLA-B*2705) respectively, were used for antigen presentation assays [34, 38]. T-cell clones were restimulated and expanded, as previously described [34]. At least 4 h before coculture with MDDC, T-cell clones were thawed and allowed to rest in RPMI containing 5% human AB serum. CEM-HLA*02+ cells were cultured in RPMI 10% FBS.

PRR ligands

TLR-1 to -9 and NOD2 ligands were purchased from Invivogen and used at the following concentrations: Pam3CSK4 (TLR-1/2; 0.2 µg/ml); HKLM (TLR-2; $0.2x10^8$ cells/ml); Poly(I:C) LMW (TLR-3; 2 µg/ml); *E. coli K12* LPS (TLR-4; 200 ng/ml); *S. Typhimurium* Flagellin (TLR-5; 200 ng/ml); FSL1 (TLR-6/2; 200 ng/ml); Imiquimod (TLR-7; 0.2 µg/ml); ssRNA40 (TLR-8; 0.2 µg/ml); ODN2006 (TLR-9; 1 µM) and Muramyl dipeptide (MDP) (NOD2; 20 µg/ml). DC-SIGN ligand (ManLam, used at 2 µg/ml) was a kind gift from Olivier Neyrolles (Toulouse, France).

Antibodies

On day 5, the purity of immature MDDC was controlled by flow cytometry (FACScanto Flow Cytometer; BD Biosciences) using CD14-PE (clone M5E2; BD Pharmingen), and DC-SIGN-APC antibodies (clone DCN46; BD Pharmingen). DC maturation was analyzed 24h or 72h post PRR-treatment using antibodies to HLA class I-FITC (clone W6/32; Sigma-Aldrich), HLA-DR–PE (clone L243; BD Biosciences), CD86-FITC (clone 2331; BD Pharmingen), CD83-PE (clone HB15e; BD Pharmingen), DC-SIGN-APC, and fluorochrome matched isotype controls.

For Peer Review

Virus and infection

Viruses were produced as previously described [40]. Briefly, 293T cells were transfected with HIV YU2b or SF2Δnef proviral DNA using calcium phosphate buffer. For incorporation of A3G or A3F into viral particles, A3G and A3F encoding vectors were added to the transfection DNA mix, respectively [40]. The Gag-p24 content of all viral supernatants was measured using ELISA (PerkinElmer). MDDC were exposed to the indicated HIV strains at 250 ng/mL of p24 for 4 hours at 37°C, washed, and cultured in medium with IL-4 and GM-CSF. In the HIV+ART conditions (24h treatment of PRR-ligands), DC were loaded as before with HIV but in the presence of 5 µM AZT and 1.2 µM NVP. AZT, NVP and cytokines were renewed every second day. Three day post-treatment, infection of MDDC was controlled by HIV Gag-p24 intracellular staining (KC57-RD1, Beckman Coulter).

T-cell activation assay

HS-CTL activation was assessed using IFN-γ ELISpot assay or intracellular cytokine staining (ICCS). For IFN-γ ELISpot, MDDC (100,000 cells per well) were co-cultured (16h) with HS-CTL (ranging from 2,500 to 10,000 CD8+ T-cells per well) and IFN-γ production measured as previously described [34]. As positive controls, MDDC were loaded (1h) with cognate peptides (1 µg/ml) and washed prior to addition of CTL. For ICCS, MDDC and T-cells were co-cultured (6h) at a (1:1) ratio. Brefeldin A (5 µg/mL; Sigma) and Monensin (2.5 µg/mL; Sigma) were added 1h after setting the co-cultures. Accumulation of cytokines/chemokines in T-cells was assessed by ICCS using CD8-A405 (3B5, Invitrogen), CD4-APC-Cy7 (RPA-T4, BD), MIP1-β-FITC (24006, RD system), TNFα -PECy7 (Mab11, BD), IL-2-APC (5344.111), IFN-γ-A700 (B27, BD) and CD107a-PE-Cy5 (H4A3, BD) antibodies and Flow cytometry (BD Fortessa). Data were analyzed with FlowJo software (Tree Star). Multifunctional data were analyzed with PESTLE v1.3.2 and SPICE v3.1 (Mario Roederer, ImmunoTechnology Section, VRC/NIAID/NIH). Polyfunctionality of HS-CTL was evaluated as end-point measure by calculating a polyfunctional index (P-index, 1) as previously described [39]. Briefly,

$$\text{Polyfunctionality index} = \sum_{i=0}^{n} F_i \cdot \left(\frac{i}{n}\right)^q \qquad (1)$$

where Fi is the frequency of cells performing i simultaneous functions. The polyfunctionality parameter q was set conservatively to 1. The polyfunctionality index

For Peer Review

analysis was conducted with the FunkyCells ToolBox V.0.1.2 software package (www.FunkyCells.com).

Real time RT-qPCR

Total RNA of 2 million MDDC was isolated by using TRIZOL Reagent (Invitrogen), treated with RQ1 RNAse-free DNase I (Promega), and isopropanol precipitated. Four µg total RNA was reverse transcribed with oligo(dT)15 primers (Promega) using SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). SYBR Green PCR was performed with 50 ng of cDNA templates using commercial kit (Applied Biosystems) and GeneAmp 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Each sample was analyzed in duplicates, and the amounts of templates were estimated by linear regression against the known standard and normalized to internal controls (β-actin). Primer sequences are listed in Supplemental Table 1. Positive PCR were also confirmed on agarose gel (data not shown).

Statistical analysis

Non-parametric Friedmans repeated measures paired one-way analysis of variance (ANOVA) tests with Dunn's multiple testing correction, or two-way ANOVA Holm-Sidak multiple comparisons test were used to determine statistical significance at the level of 0.05 (*), 0.01 (**), 0.001 (***), 0.0001 (****) for changes of the expression of maturation markers, cell infection and T-cell activation. Significant adjusted p values are depicted. Prism 6.0 (GraphPad, San Diego) was used to process all the statistical analyses.

For Peer Review

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was granted by ANRS and Sidaction. We thank the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program for providing drugs and compounds. P.-G. Coulon was a fellow of the UPMC "Emergence program" and of ANRS. S.C. was supported by ANRS and Sidaction and is currently granted by Vaccine Research Institute (VRI). A.U. was supported by Sidaction. A.B. and C.R. are supported by ANRS and ANR (AutoVirIm), respectively.

Conflict of Interest Disclosure

M.L. is inventor of the polyfunctionality index (patent number: WO2013127904) and proprietary owner of the Funky Cells ToolBox software (www.FunkyCells.com).

For Peer Review

REFERENCES

1 **Segura, E., Touzot, M., Bohineust, A., Cappuccio, A., Chiocchia, G., Hosmalin, A., Dalod, M. et al.,** Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity* 2013. **38**: 336-348.

2 **Segura, E. and Amigorena, S.,** Cross-Presentation in Mouse and Human Dendritic Cells. *Adv Immunol* 2015. **127**: 1-31.

3 **van Kasteren, S. I., Overkleeft, H., Ovaa, H. and Neefjes, J.,** Chemical biology of antigen presentation by MHC molecules. *Curr Opin Immunol* 2014. **26**: 21-31.

4 **Iwasaki, A. and Medzhitov, R.,** Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol* 2015. **16**: 343-353.

5 **Blander, J. M. and Medzhitov, R.,** Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science* 2004. **304**: 1014-1018.

6 **Cerboni, S., Gentili, M. and Manel, N.,** Diversity of pathogen sensors in dendritic cells. *Adv Immunol* 2013. **120**: 211-237.

7 **Schulz, O., Diebold, S. S., Chen, M., Naslund, T. I., Nolte, M. A., Alexopoulou, L., Azuma, Y. T. et al.,** Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* 2005. **433**: 887-892.

8 **Lore, K., Betts, M. R., Brenchley, J. M., Kuruppu, J., Khojasteh, S., Perfetto, S., Roederer, M. et al.,** Toll-like receptor ligands modulate dendritic cells to augment cytomegalovirus- and HIV-1-specific T cell responses. *J Immunol* 2003. **171**: 4320-4328.

9 **Watts, C., West, M. A. and Zaru, R.,** TLR signalling regulated antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 2010. **22**: 124-130.

10 **Blanchet, F., Moris, A., Mitchell, J. P. and Piguet, V.,** A look at HIV journey: from dendritic cells to infection spread in CD4(+) T cells. *Curr Opin HIV AIDS* 2011. **6**: 391-397.

11 **Patterson, S., Roberts, M. S., English, N. R., Macatonia, S. E., Gompels, M. N., Pinching, A. J. and Knight, S. C.,** Detection of HIV DNA in peripheral blood dendritic cells of HIV-infected individuals. *Res Virol* 1994. **145**: 171-176.

12 **McIlroy, D., Autran, B., Cheynier, R., Wain-Hobson, S., Clauvel, J. P., Oksenhendler, E., Debre, P. et al.,** Infection frequency of dendritic cells and CD4+ T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients. *J Virol* 1995. **69**: 4737-4745.

13 **Centlivre, M., Legrand, N., Steingrover, R., van der Sluis, R., Grijsen, M. L., Bakker, M., Jurriaans, S. et al.,** Altered dynamics and differential infection profiles of lymphoid and myeloid cell subsets during acute and chronic HIV-1 infection. *J Leukoc Biol* 2011. **89**: 785-795.

14 **Granelli-Piperno, A., Shimeliovich, I., Pack, M., Trumpfheller, C. and Steinman, R. M.,** HIV-1 selectively infects a subset of nonmaturing BDCA1-positive dendritic cells in human blood. *J Immunol* 2006. **176**: 991-998.

15 **Donaghy, H., Gazzard, B., Gotch, F. and Patterson, S.,** Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. *Blood* 2003. **101**: 4505-4511.

16 **Turville, S. G., Santos, J. J., Frank, I., Cameron, P. U., Wilkinson, J., Miranda-Saksena, M., Dable, J. et al.,** Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* 2004. **103**: 2170-2179.

17 **Pino, M., Erkizia, I., Benet, S., Erikson, E., Fernandez-Figueras, M. T., Guerrero, D., Dalmau, J. et al.,** HIV-1 immune activation induces Siglec-1 expression and enhances viral trans-infection in blood and tissue myeloid cells. *Retrovirology* 2015. **12**: 37.

18 **Nobile, C., Petit, C., Moris, A., Skrabal, K., Abastado, J. P., Mammano, F. and Schwartz, O.,** Covert human immunodeficiency virus replication in dendritic cells and in DC-SIGN-expressing cells promotes long-term transmission to lymphocytes. *J Virol* 2005. **79**: 5386-5399.

19 **Manel, N., Hogstad, B., Wang, Y., Levy, D. E., Unutmaz, D. and Littman, D. R.,** A cryptic sensor for HIV-1 activates antiviral innate immunity in dendritic cells. *Nature* 2010. **467**: 214-217.

20 **Laguette, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringeard, M., Chable-Bessia, C., Segeral, E., Yatim, A. et al.,** SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 2011. **474**: 654-657.

21 **Pion, M., Granelli-Piperno, A., Mangeat, B., Stalder, R., Correa, R., Steinman, R. M. and Piguet, V.,** APOBEC3G/3F mediates intrinsic resistance of monocyte-derived dendritic cells to HIV-1 infection. *J Exp Med* 2006. **203**: 2887-2893.

22 **Moris, A., Murray, S. and Cardinaud, S.,** AID and APOBECs span the gap between innate and adaptive immunity. *Front Microbiol* 2014. **5**: 534.

23 **Gringhuis, S. I., van der Vlist, M., van den Berg, L. M., den Dunnen, J., Litjens, M. and Geijtenbeek, T. B.,** HIV-1 exploits innate signaling by TLR8 and DC-SIGN for productive infection of dendritic cells. *Nat Immunol* 2010. **11**: 419-426.

24 **Thibault, S., Fromentin, R., Tardif, M. R. and Tremblay, M. J.,** TLR2 and TLR4 triggering exerts contrasting effects with regard to HIV-1 infection of human dendritic cells and subsequent virus transfer to CD4+ T cells. *Retrovirology* 2009. **6**: 42.

25 **Brichacek, B., Vanpouille, C., Kiselyeva, Y., Biancotto, A., Merbah, M., Hirsch, I., Lisco, A. et al.,** Contrasting roles for TLR ligands in HIV-1 pathogenesis. *PLoS One* 2010. **5**.

26 **Goonetilleke, N., Liu, M. K., Salazar-Gonzalez, J. F., Ferrari, G., Giorgi, E., Ganusov, V. V., Keele, B. F. et al.,** The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *J Exp Med* 2009. **206**: 1253-1272.

For Peer Review

27 **Migueles, S. A., Sabbaghian, M. S., Shupert, W. L., Bettinotti, M. P., Marincola, F. M., Martino, L., Hallahan, C. W. et al.,** HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000. **97**: 2709-2714.

28 **Edwards, B. H., Bansal, A., Sabbaj, S., Bakari, J., Mulligan, M. J. and Goepfert, P. A.,** Magnitude of functional CD8+ T-cell responses to the gag protein of human immunodeficiency virus type 1 correlates inversely with viral load in plasma. *J Virol* 2002. **76**: 2298-2305.

29 **Jones, N. A., Wei, X., Flower, D. R., Wong, M., Michor, F., Saag, M. S., Hahn, B. H. et al.,** Determinants of human immunodeficiency virus type 1 escape from the primary CD8+ cytotoxic T lymphocyte response. *J Exp Med* 2004. **200**: 1243-1256.

30 **Appay, V., Douek, D. C. and Price, D. A.,** CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nat Med* 2008. **14**: 623-628.

31 **Quinn, K. M., Yamamoto, A., Costa, A., Darrah, P. A., Lindsay, R. W., Hegde, S. T., Johnson, T. R. et al.,** Coadministration of polyinosinic:polycytidylic acid and immunostimulatory complexes modifies antigen processing in dendritic cell subsets and enhances HIV gag-specific T cell immunity. *J Immunol* 2013. **191**: 5085-5096.

32 **Li, N., Chen, M. Q., Qian, Z. P., Zhu, M. Q., Li, Q., Zheng, J. M., Wang, X. Y. et al.,** Correlation of the expression of toll-like receptors in monocyte-derived dendritic cells with prognosis of chronic severe hepatitis B. *J Dig Dis* 2011. **12**: 117-124.

33 **Tada, H., Aiba, S., Shibata, K., Ohteki, T. and Takada, H.,** Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect Immun* 2005. **73**: 7967-7976.

34 **Moris, A., Nobile, C., Buseyne, F., Porrot, F., Abastado, J. P. and Schwartz, O.,** DC-SIGN promotes exogenous MHC-I-restricted HIV-1 antigen presentation. *Blood* 2004. **103**: 2648-2654.

35 **Turville, S. G., Cameron, P. U., Handley, A., Lin, G., Pöhlmann, S., Doms, R. W. and Cunningham, A. L.,** Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat. Immunol.* 2002. **3**: 975-983.

36 **Simon, V., Bloch, N. and Landau, N. R.,** Intrinsic host restrictions to HIV-1 and mechanisms of viral escape. *Nat Immunol* 2015. **16**: 546-553.

37 **Ayinde, D., Bruel, T., Cardinaud, S., Porrot, F., Prado, J. G., Moris, A. and Schwartz, O.,** SAMHD1 Limits HIV-1 Antigen Presentation by Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J Virol* 2015. **89**: 6994-7006.

38 **Almeida, J. R., Sauce, D., Price, D. A., Papagno, L., Shin, S. Y., Moris, A., Larsen, M. et al.,** Antigen sensitivity is a major determinant of CD8+ T-cell polyfunctionality and HIV-suppressive activity. *Blood* 2009. **113**: 6351-6360.

39 **Larsen, M., Sauce, D., Arnaud, L., Fastenackels, S., Appay, V. and Gorochov, G.,** Evaluating cellular polyfunctionality with a novel polyfunctionality index. *PLoS One* 2012. **7**: e42403.

40 **Casartelli, N., Guivel-Benhassine, F., Bouziat, R., Brandler, S., Schwartz, O. and Moris, A.,** The antiviral factor APOBEC3G improves CTL recognition of cultured HIV-infected T cells. *J Exp Med* 2010. **207**: 39-49, S31-32.

41 **Harris, R. S., Bishop, K. N., Sheehy, A. M., Craig, H. M., Petersen-Mahrt, S. K., Watt, I. N., Neuberger, M. S. et al.,** DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* 2003. **113**: 803-809.

42 **Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G. et al.,** Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004. **303**: 1526-1529.

43 **Beignon, A. S., McKenna, K., Skoberne, M., Manches, O., DaSilva, I., Kavanagh, D. G., Larsson, M. et al.,** Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest* 2005. **115**: 3265-3275.

44 **Granelli-Piperno, A., Golebiowska, A., Trumpfheller, C., Siegal, F. P. and Steinman, R. M.,** HIV-1-infected monocyte-derived dendritic cells do not undergo maturation but can elicit IL-10 production and T cell regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004. **101**: 7669-7674.

45 **Harman, A. N., Wilkinson, J., Bye, C. R., Bosnjak, L., Stern, J. L., Nicholle, M., Lai, J. et al.,** HIV induces maturation of monocyte-derived dendritic cells and Langerhans cells. *J Immunol* 2006. **177**: 7103-7113.

46 **Fantuzzi, L., Purificato, C., Donato, K., Belardelli, F. and Gessani, S.,** Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induces abnormal maturation and functional alterations of dendritic cells: a novel mechanism for AIDS pathogenesis. *J Virol* 2004. **78**: 9763-9772.

47 **Wilflingseder, D., Mullauer, B., Schramek, H., Banki, Z., Pruenster, M., Dierich, M. P. and Stoiber, H.,** HIV-1-induced migration of monocyte-derived dendritic cells is associated with differential activation of MAPK pathways. *J Immunol* 2004. **173**: 7497-7505.

48 **Hertoghs, N., van der Aar, A. M., Setiawan, L. C., Kootstra, N. A., Gringhuis, S. I. and Geijtenbeek, T. B.,** SAMHD1 degradation enhances active suppression of dendritic cell maturation by HIV-1. *J Immunol* 2015. **194**: 4431-4437.

49 **Smed-Sorensen, A., Lore, K., Walther-Jallow, L., Andersson, J. and Spetz, A. L.,** HIV-1-infected dendritic cells up-regulate cell surface markers but fail to produce IL-12 p70 in response to CD40 ligand stimulation. *Blood* 2004. **104**: 2810-2817.

50 **Harman, A. N., Nasr, N., Feetham, A., Galoyan, A., Alshehri, A. A., Rambukwelle, D., Botting, R. A. et al.,** HIV Blocks Interferon Induction in Human Dendritic Cells and Macrophages by Dysregulation of TBK1. *J Virol* 2015. **89**: 6575-6584.

51 **Trapp, S., Derby, N. R., Singer, R., Shaw, A., Williams, V. G., Turville, S. G., Bess, J. W., Jr. et al.,** Double-stranded RNA analog poly(I:C) inhibits human immunodeficiency virus amplification in dendritic cells via type I interferon-mediated activation of APOBEC3G. *J Virol* 2009. **83**: 884-895.

For Peer Review

52 **Ogawa, Y., Kawamura, T., Kimura, T., Ito, M., Blauvelt, A. and Shimada, S.,** Gram-positive bacteria enhance HIV-1 susceptibility in Langerhans cells, but not in dendritic cells, via Toll-like receptor activation. *Blood* 2009. **113**: 5157-5166.

53 **Nair-Gupta, P., Baccarini, A., Tung, N., Seyffer, F., Florey, O., Huang, Y., Banerjee, M. et al.,** TLR signals induce phagosomal MHC-I delivery from the endosomal recycling compartment to allow cross-presentation. *Cell* 2014. **158**: 506-521.

54 **Pierre, P.,** Immunity and the regulation of protein synthesis: surprising connections. *Curr Opin Immunol* 2009. **21**: 70-77.

55 **Leone, P., Di Tacchio, M., Berardi, S., Santantonio, T., Fasano, M., Ferrone, S., Vacca, A. et al.,** Dendritic cell maturation in HCV infection: altered regulation of MHC class I antigen processing-presenting machinery. *J Hepatol* 2014. **61**: 242-251.

56 **Weck, M. M., Appel, S., Werth, D., Sinzger, C., Bringmann, A., Grunebach, F. and Brossart, P.,** hDectin-1 is involved in uptake and cross-presentation of cellular antigens. *Blood* 2008. **111**: 4264-4272.

57 **Cardinaud, S., Starck, S. R., Chandra, P. and Shastri, N.,** The synthesis of truncated polypeptides for immune surveillance and viral evasion. *PLoS One* 2010. **5**: e8692.

58 **Yewdell, J. W.,** DRiPs solidify: progress in understanding endogenous MHC class I antigen processing. *Trends Immunol* 2011. **32**: 548-558.

59 **Sui, Y., Zhu, Q., Gagnon, S., Dzutsev, A., Terabe, M., Vaccari, M., Venzon, D. et al.,** Innate and adaptive immune correlates of vaccine and adjuvant-induced control of mucosal transmission of SIV in macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010. **107**: 9843-9848.

60 **Dunbar, S. A.,** Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. *Clin Chim Acta* 2006. **363**: 71-82.

For Peer Review

FIGURE LEGENDS

Figure 1: HIV infection does not interfere with PRR-induced maturation of MDDC. Maturation of MDDC at 24h and 72h p.i. was analyzed using antibodies to indicated cell surface maturation markers and flow cytometry. **(A)** Representative staining using MDDC from one individual and using TLR-4 ligand (LPS). Numbers correspond to the fold changes of HLA-I expression (MFI) to the untreated (untx) or uninfected (NI) conditions induced by HIV, LPS or HIV+LPS. **(B)** MDDC from 8 healthy individuals were submitted to infection and PRR-treatments (as in Fig. S1A) and the results for each maturation marker combined in a radar chart. For each marker, the means of fluorescence intensities (MFI) were normalized to untreated non-infected samples and the data expressed as fold increase. In red and green are depicted the results from HIV-loaded/infected or uninfected MDDC, respectively. Standard deviations are not depicted for clarity. Raw data are presented in Fig. S1.

Figure 2: Triggering of TLR-3, -4, NOD2 and DC-SIGN diminishes HIV replication in MDDC. MDDC were infected with HIV_{YU2b} at 250ng/ml of p24. 72h p.i., viral replication was analyzed by intracellular HIV Gag-p24 staining **(A-C)**. **(A)** Representative staining using infected PRR-treated MDDC from one individual. MDDC were stained for HIV Gag-p24 and HLA-I molecule expressions to monitor the % of infected cells and to allow a better discrimination of cells respectively. PRR agonists are indicated on the top of each blot. MDDC were gated on SSC and FSC (not shown). The number in each quadrant indicated the % of Gag-p24+ cells. This quadrant was set based on the staining of uninfected cells (not shown). **(B)** MDDC from 8 healthy individuals were submitted to infection and PRR-treatments (as in Fig. S1A) and the results combined. **(C)** For each donor, the infection rate was normalized to untreated infected samples and the data expressed as fold change. In red mean percentage of infection (B) or fold change (C) (± SD). For each condition, differences of percentage of infection to the untx control were determined by a non-parametric Friedmans repeated paired one-way ANOVA test followed by Dunn multiple corrections. Significant adjusted p values are indicated (* $p<0.05$, **** $p<0.0001$).

Figure 3: Innate antiviral factors are upregulated upon PRR activation.
Heat map of antiviral and innate factor mRNA expression. MDDC were infected with HIV_{YU2b} in the presence of the indicated PRR-agonists (as in Fig. S1A). As control, MDDC were untreated (untx), uninfected (ni) or untreated and uninfected. The mRNA encoding for

For Peer Review

the indicated antiviral and innate factors were quantified by RT-qPCR and normalized to a house-keeping gene. The fold increase of each transcript is compared to untx ni sample.

Figure 4: TLR-3, TLR-4, NOD2 and DC-SIGN agonists enhance HIV Gag-p17 SL9-specific CTL responses. MDDC from four HLA-A*02+ donors were loaded with HIV_{YU2b} in the presence of AZT/NVP (ART, 24h) **(A,** right panel) or productively infected (72h pi) **(B,** middle and right panels**)** in the presence of the indicated PRR-agonists (as in Fig. S1A) and co-cultured with the HIV Gag-p17 SL9-specific CTL clone. Uninfected cells were treated with the PRR-ligands and loaded with SL9 peptide (1µg/ml) **(A and B,** left panels**)** prior co-culture with the clone. T cell activation was monitored using IFNγ-ELISpot. For each donor and condition (infected or uninfected), activations were normalized to untreated (untx) samples and the data expressed as fold change. As illustrated in Fig S2, number of IFN-γ producing T-cells were normalized to the number of Gag-p24+ MDDCs for each condition, normalized to untreated samples and data were expressed as fold changes (**B**, right panel). The results from 4 independent experiments performed with cells from different donors are presented. In green and red, means (± SD). Two-way Holm-Sidak multiple comparisons ANOVA tests were performed for all data to determine differences to the untreated samples. Adjusted significant p values are indicated (* $p<0.05$, **** $p<0.0001$).

Figure 5: TLR-3, TLR-4, NOD2 and DC-SIGN agonists improve the quality of HIV Gag-p24 KK10-specific CTL responses. HLA-B*27+ MDDC were infected with HIV_{YU2b} in the presence of the indicated PRR-agonists (as in Fig. S1A) and co-cultured with the HIV Gag-p24 KK10-specific CTL clones (DC + HIV, 72h, middle panels). As control, uninfected cells were treated with the PRR-ligands and loaded with KK10 peptide (1µg/ml) prior co-culture with the clone (DC + KK10 peptide, left panels). T cell activation was monitored by ICCS using IFN-γ, IL-2, TNF-α, MIP-1β and CD107a mobilization. For each donor and conditions (infected or uninfected), activation levels were normalized to untreated (untx) samples and the data expressed as fold change. Bottom panels, polyfunctional activations expressed as a P-index allowing a quantitative assessment of T cell polyfunctionality. Right panels, data expressed as a ratio of percent of activated cells or P-index to percent of infected Gag-p24+ cells. The results from 3 independent experiments performed with cells from two different donors are presented. In green and red, mean (± SD). Statistical analysis were performed as in Fig. 4 (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

For Peer Review

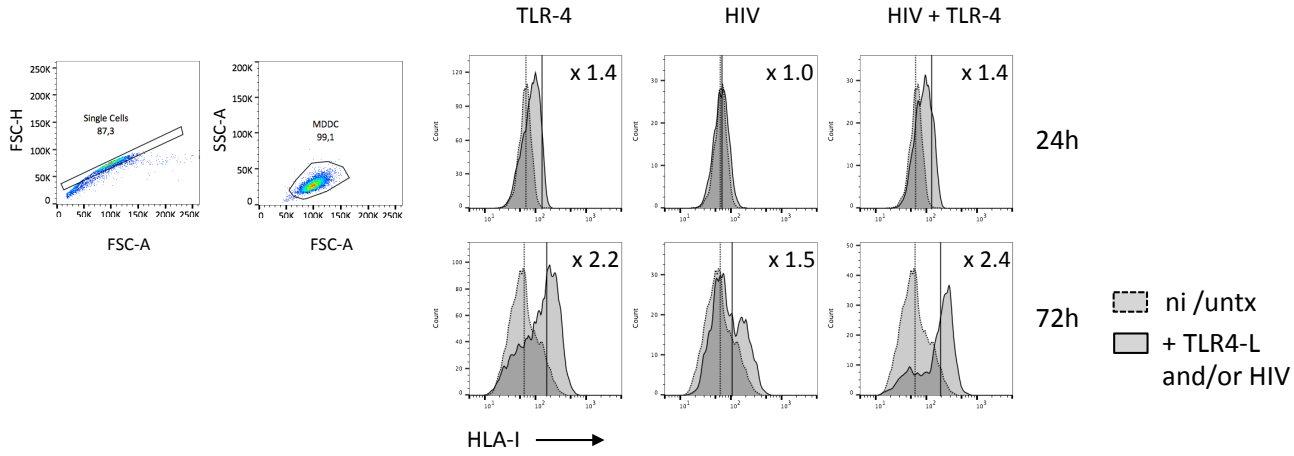
Figure 6: APOBEC-3G (A3G) and -3F (A3F) enhance HIV antigen presentation by MDDC. (A) Representation of the experimental procedure. Viruses were produced upon cotransfection in 293T cells of HIV genome and plasmids encoding for A3G or A3F. CEM-A2+ cells or MDDC were then infected. We used a Nef-deficient isolate since Nef interferes with HLA-A2 expression. CEM-A2+ cells do not express A3G, thus A3G and A3F exert their editing activity exclusively during the first cycle of replication. **(B)** CEM-A2+ cells were incubated with $HIV_{SF2\Delta nef}$, or $HIV_{SF2\Delta nef}$ + A3G or $HIV_{SF2\Delta nef}$ + A3F (5 to 20 ng/mL of Gag-p24) and the kinetics of viral infection analyzed by Gag-p24 FACS staining (top panel). 24h p.i., infected cells were collected and used to stimulate the SL9-specific CTL clone in an IFN-γ-Elispot (1200 CTL/well) (bottom panel). As negative control CEM-A2+ cells were also infected in the presence of ART (AZT/NVP) and co-cultured with the clones (not shown). Background IFN-γ production induced by uninfected cells was subtracted. Background IFN-γ productions by CEM-A2+ cells alone were close to zero. Activation levels with SL9 peptide–loaded cells were around 500 IFN-γ+ spots/well (not depicted). Middle panels, percentage infection and IFNγ-responses normalized to CEM-A2+ cells infected with WT HIV. Right panel, data presented as a ratio of IFN-γ+ spots to percentage infection. Each symbol represents an independent experiment. In red mean (±SD) of 5 experiments. **(C)** As in (B) using HLA-A*02+ MDDC as target cells. From 24 to 72h p.i., infected DC were collected, stained for Gag-p24+ cells (top panel) and used to stimulate HIV Gag-p17 SL9-specific CTL clone in ICCS (bottom panel). As negative control DC were also infected in the presence of ART (AZT/NVP) and co-cultured with the clones. Activation levels induced by SL9 peptide–loaded DC were ranging from 25 to 60 % (not depicted). Middle panels data normalized to the results using HIV-infected DC. Right panel, data presented as a ratio of % activation to % infection. Each symbol represents an independent experiment using cells from different donors. In red mean (±SD) of 4 experiments. Statistical analysis were performed as in Fig. 4 and adjusted p values are presented (ns: non significant, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

Figure 7: Radar chart summarizing the differential impact of PRR ligands on DC, maturation, infection and HIV Ag-presentation. All calculated index (maturation, infection, IFN-γ production in ELISpot and polyfunctional index (P-Index) were assembled for each PRR ligand.

For Peer Review

Figure-1

A.


TLR-4
HIV
HIV + TLR-4
FSC-H
FSC-A
Single Cells
87,3
SSC-A
FSC-A
MDDC
99,1
x 1.4
x 1.0
x 1.4
24h
x 2.2
x 1.5
x 2.4
72h
ni /untx
+ TLR4-L
and/or HIV
HLA-I

B.

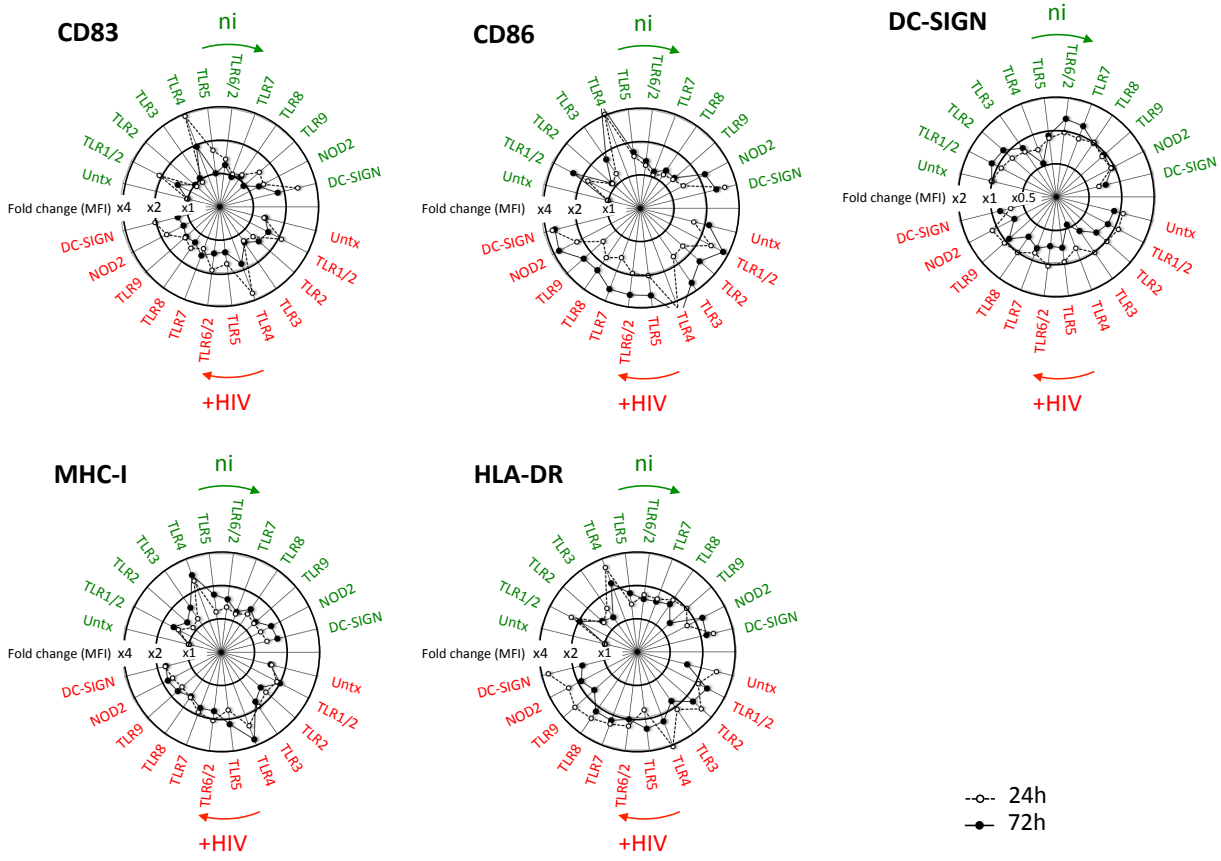

CD83
CD86
DC-SIGN
MHC-I
HLA-DR
ni
+HIV
Fold change (MFI)
Untx
TLR1/2
TLR2
TLR3
TLR4
TLR5
TLR6/2
TLR7
TLR8
TLR9
NOD2
DC-SIGN
24h
72h

Figure-2

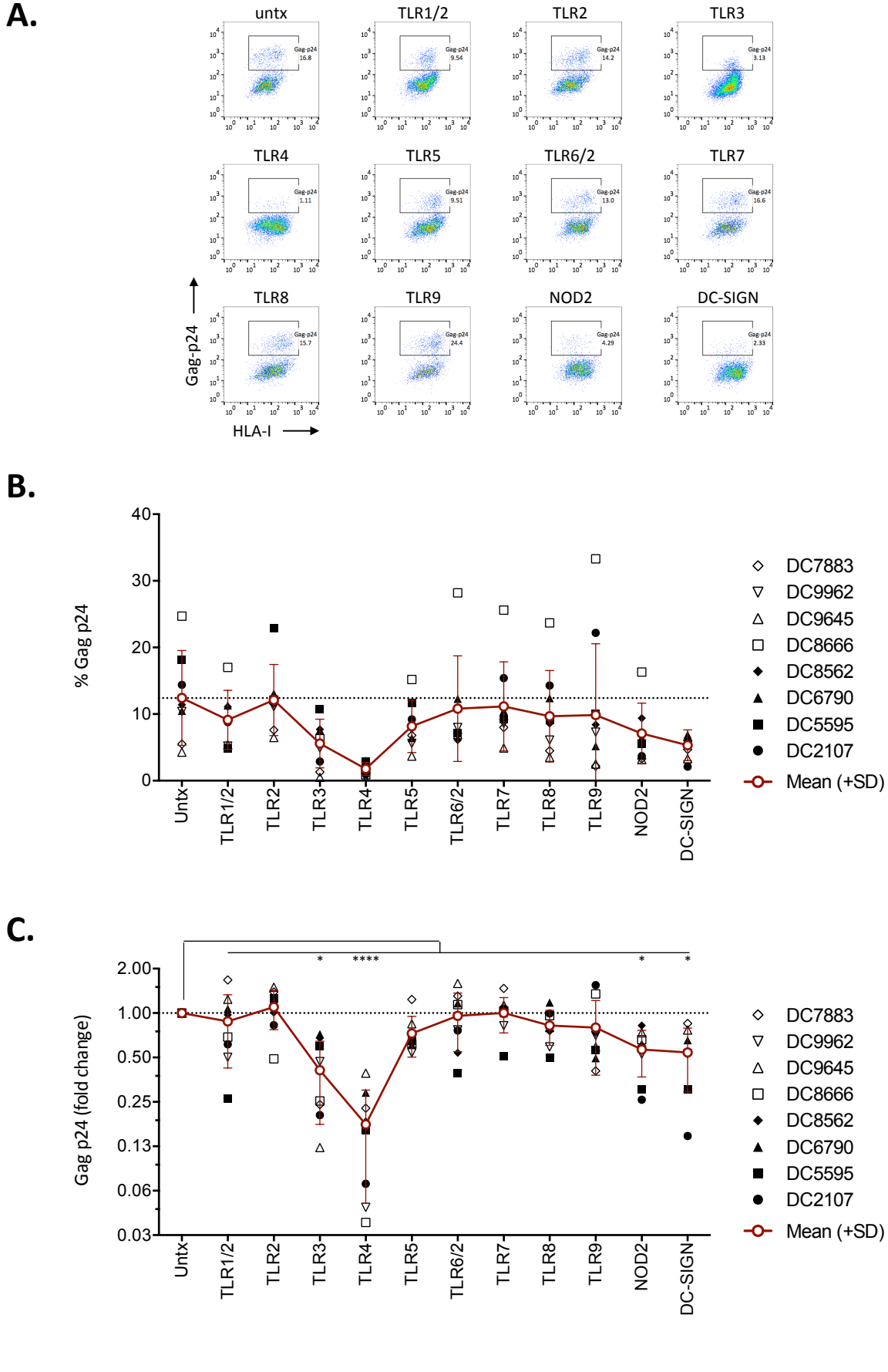

A.
untx
TLR1/2
TLR2
TLR3
TLR4
TLR5
TLR6/2
TLR7
TLR8
TLR9
NOD2
DC-SIGN
Gag-p24
HLA-I
B.
% Gag p24
Untx
TLR1/2
TLR2
TLR3
TLR4
TLR5
TLR6/2
TLR7
TLR8
TLR9
NOD2
DC-SIGN
DC7883
DC9962
DC9645
DC8666
DC8562
DC6790
DC5595
DC2107
Mean (+SD)
C.
Gag p24 (fold change)
2.00
1.00
0.50
0.25
0.13
0.06
0.03
*
****
*
*

Figure-3

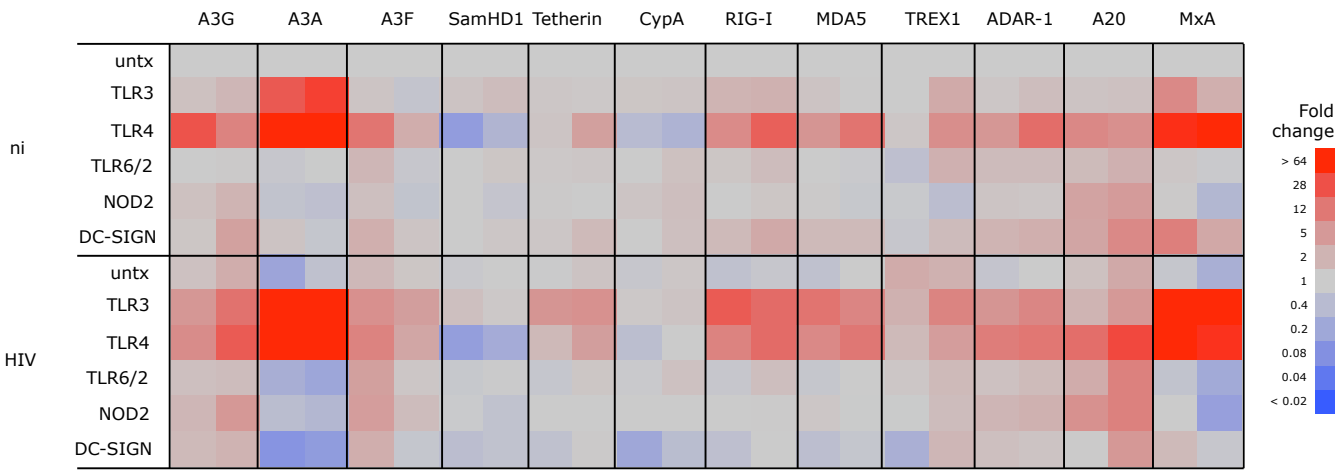
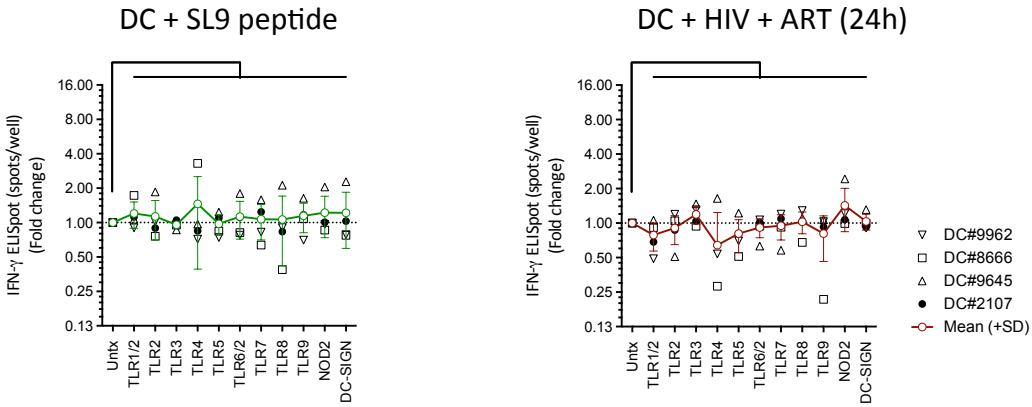

A3G
A3A
A3F
SamHD1
Tetherin
CypA
RIG-I
MDA5
TREX1
ADAR-1
A20
MxA
ni
HIV
untx
TLR3
TLR4
TLR6/2
NOD2
DC-SIGN
Fold change
> 64
28
12
5
2
1
0.4
0.2
0.08
0.04
< 0.02

Figure-4

A.


DC + SL9 peptide
DC + HIV + ART (24h)
IFN-γ ELISpot (spots/well)
(Fold change)
16.00
8.00
4.00
2.00
1.00
0.50
0.25
0.13
Untx
TLR1/2
TLR2
TLR3
TLR4
TLR5
TLR6/2
TLR7
TLR8
TLR9
NOD2
DC-SIGN
DC#9962
DC#8666
DC#9645
DC#2107
Mean (+SD)

B.

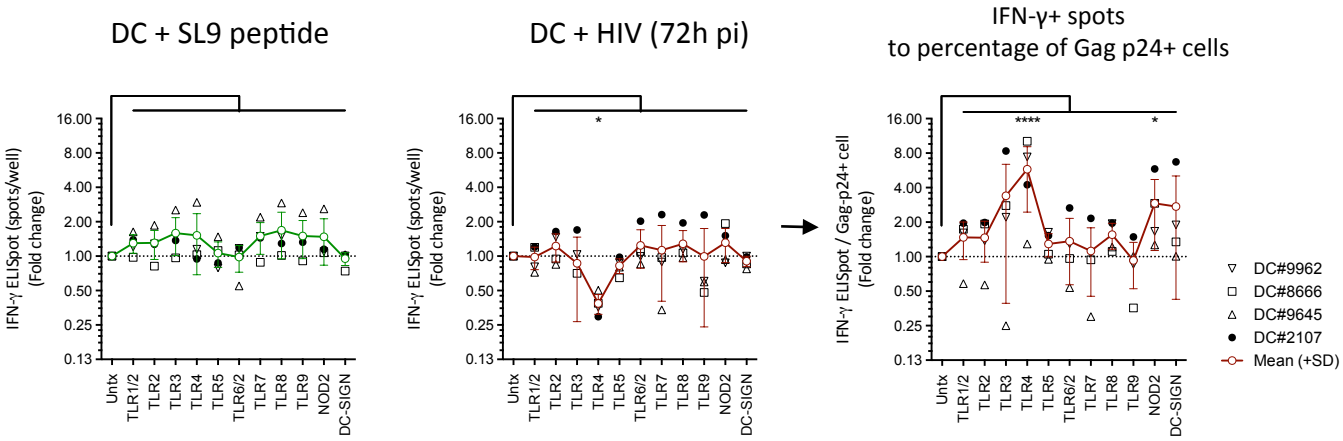

DC + SL9 peptide
DC + HIV (72h pi)
IFN-γ+ spots
to percentage of Gag p24+ cells
IFN-γ ELISpot (spots/well)
(Fold change)
IFN-γ ELISpot / Gag-p24+ cell
(Fold change)
*
****
16.00
8.00
4.00
2.00
1.00
0.50
0.25
0.13
Untx
TLR1/2
TLR2
TLR3
TLR4
TLR5
TLR6/2
TLR7
TLR8
TLR9
NOD2
DC-SIGN
DC#9962
DC#8666
DC#9645
DC#2107
Mean (+SD)

Figure-5

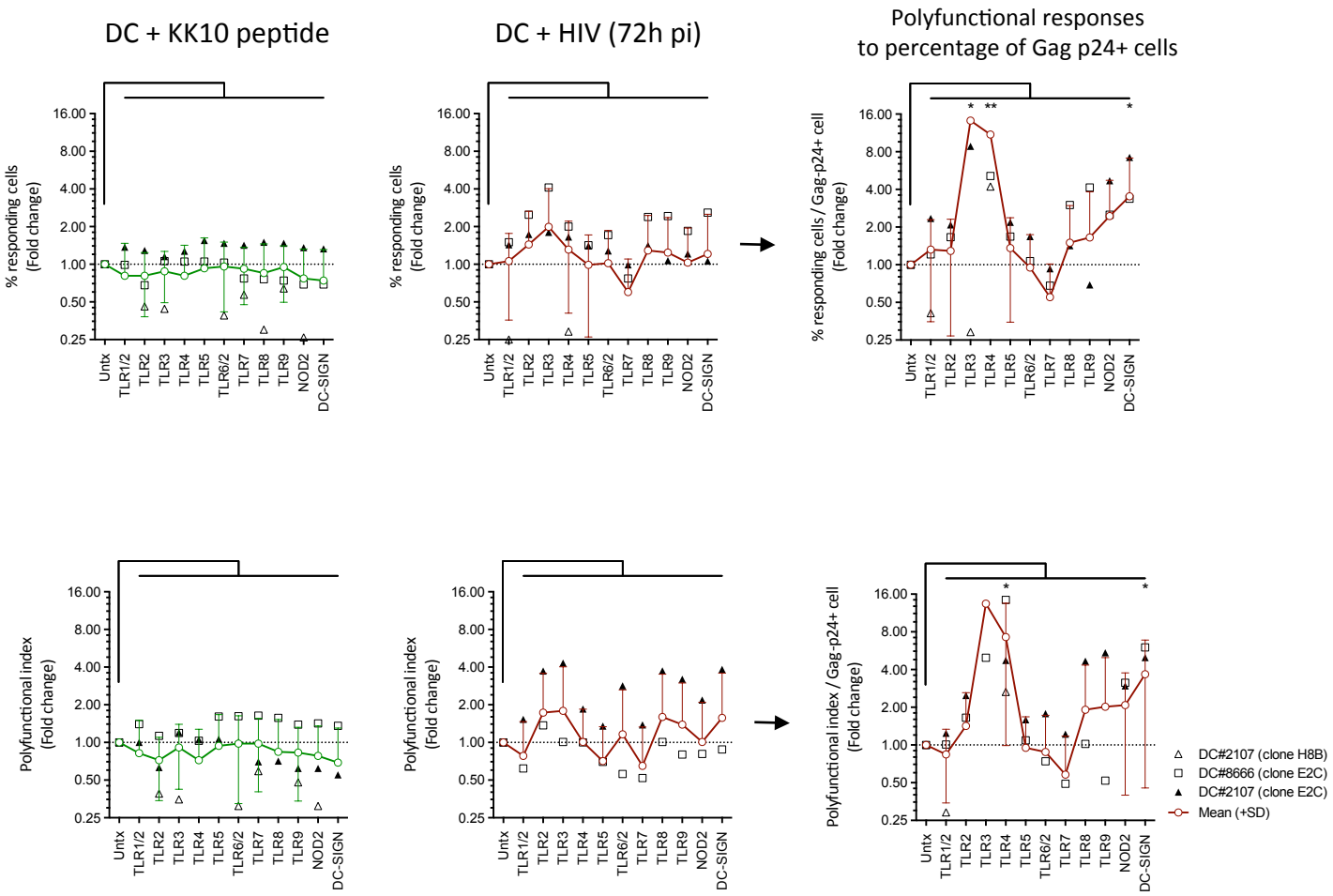

DC + KK10 peptide
DC + HIV (72h pi)
Polyfunctional responses
to percentage of Gag p24+ cells
% responding cells
(Fold change)
% responding cells / Gag-p24+ cell
(Fold change)
Polyfunctional index
(Fold change)
Polyfunctional index / Gag-p24+ cell
(Fold change)
16.00
8.00
4.00
2.00
1.00
0.50
0.25
Untx
TLR1/2
TLR2
TLR3
TLR4
TLR5
TLR6/2
TLR7
TLR8
TLR9
NOD2
DC-SIGN
DC#2107 (clone H8B)
DC#8666 (clone E2C)
DC#2107 (clone E2C)
Mean (+SD)

Figure-6

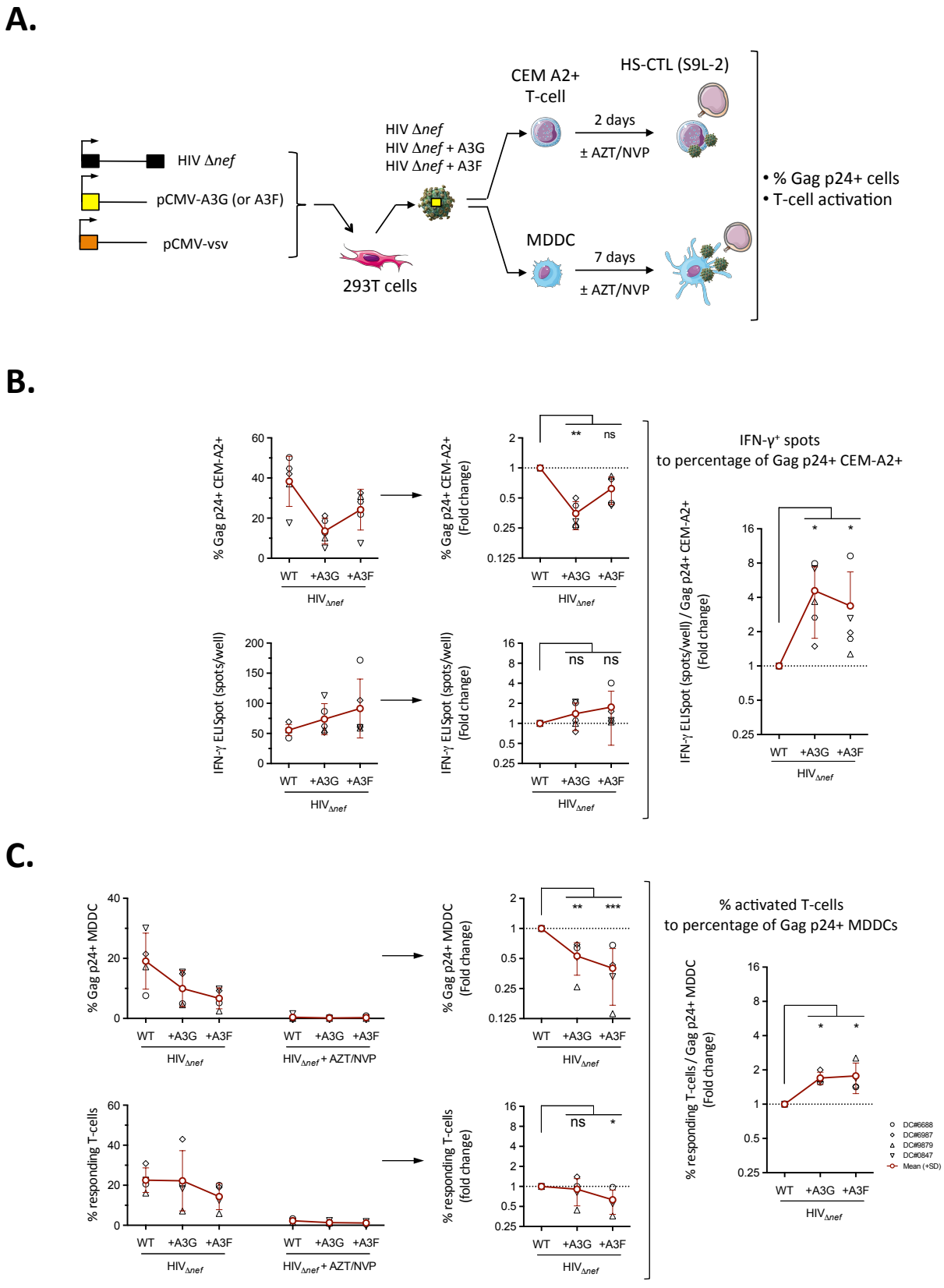
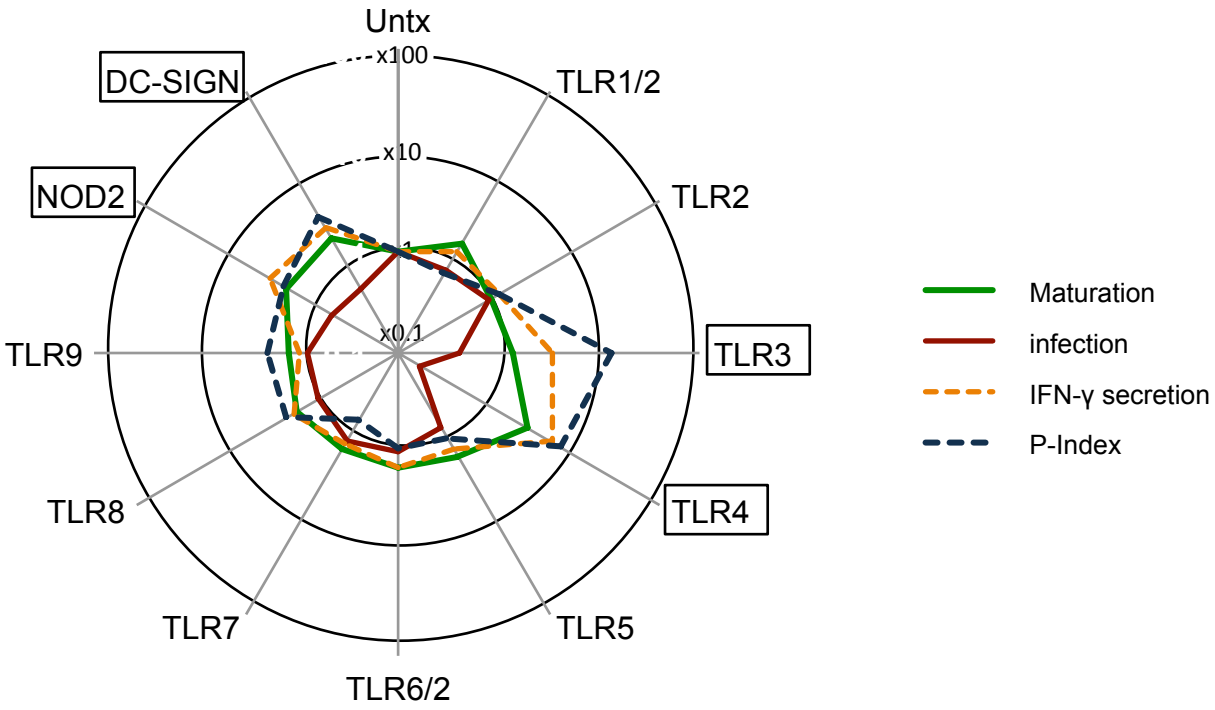
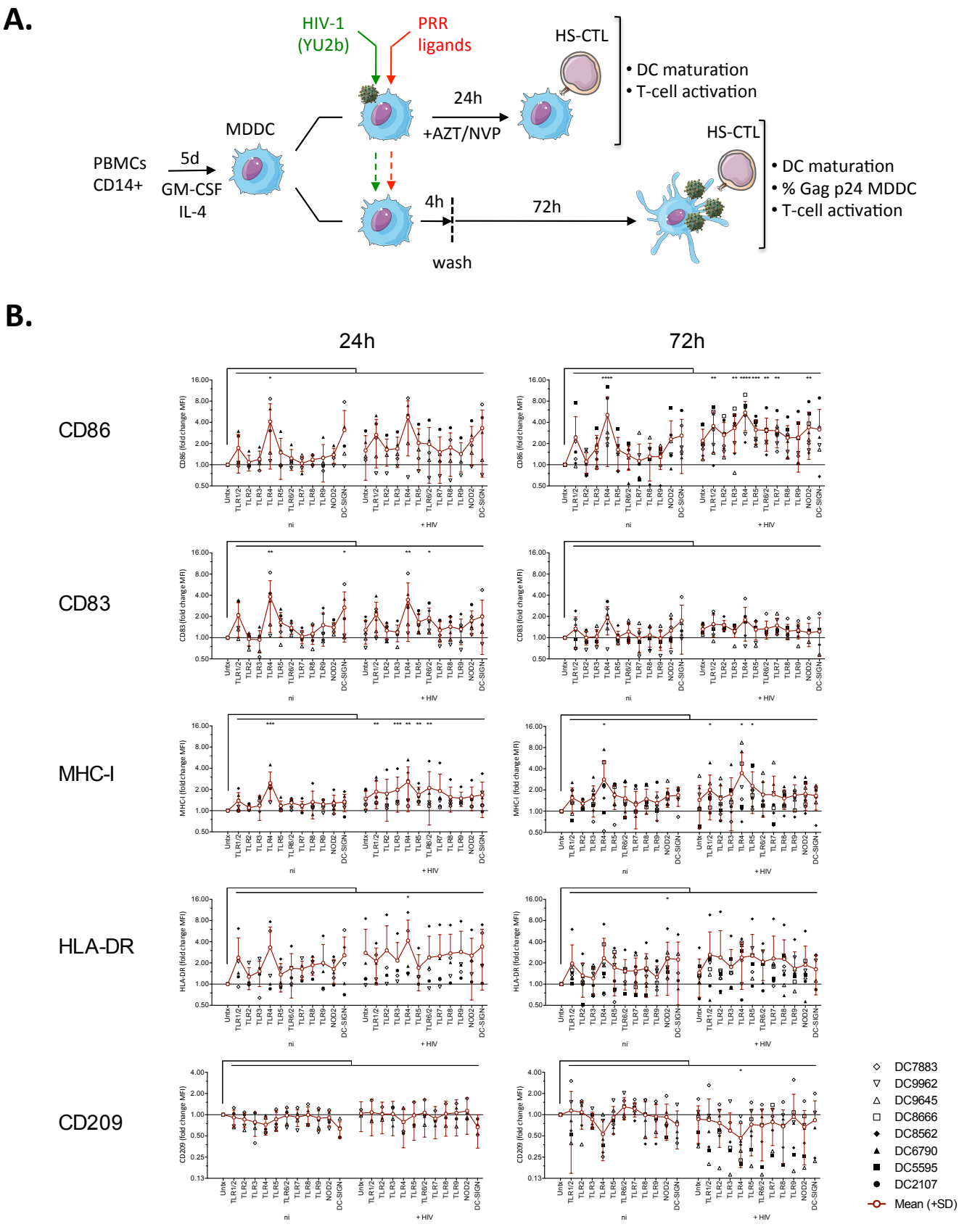

A.
HIV Δnef
pCMV-A3G (or A3F)
pCMV-vsv
293T cells
HIV Δnef
HIV Δnef + A3G
HIV Δnef + A3F
CEM A2+ T-cell
2 days
± AZT/NVP
HS-CTL (S9L-2)
MDDC
7 days
± AZT/NVP
• % Gag p24+ cells
• T-cell activation
B.
% Gag p24+ CEM-A2+
% Gag p24+ CEM-A2+ (Fold change)
IFN-γ ELISpot (spots/well)
IFN-γ ELISpot (spots/well) (Fold change)
WT +A3G +A3F
HIVΔnef
IFN-γ+ spots to percentage of Gag p24+ CEM-A2+
IFN-γ ELISpot (spots/well) / Gag p24+ CEM-A2+ (Fold change)
C.
% Gag p24+ MDDC
% Gag p24+ MDDC (Fold change)
% responding T-cells
% responding T-cells (fold change)
HIVΔnef + AZT/NVP
% activated T-cells to percentage of Gag p24+ MDDCs
% responding T-cells / Gag p24+ MDDC (Fold change)
DC#6688
DC#6987
DC#9879
DC#0847
Mean (+SD)

Figure 7


Untx
x100
x10
x0.1
TLR1/2
TLR2
TLR3
TLR4
TLR5
TLR6/2
TLR7
TLR8
TLR9
NOD2
DC-SIGN
Maturation
infection
IFN-γ secretion
P-Index

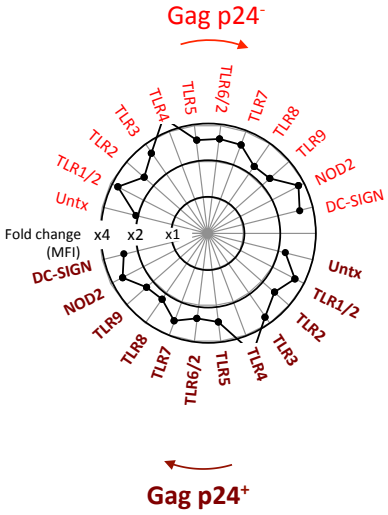
Supplementary Figure 1



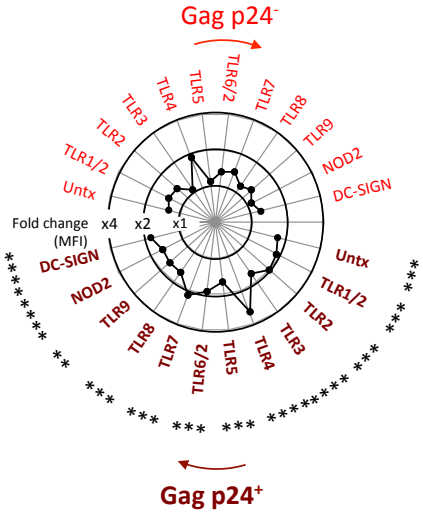
Supplementary Figure 1

C.

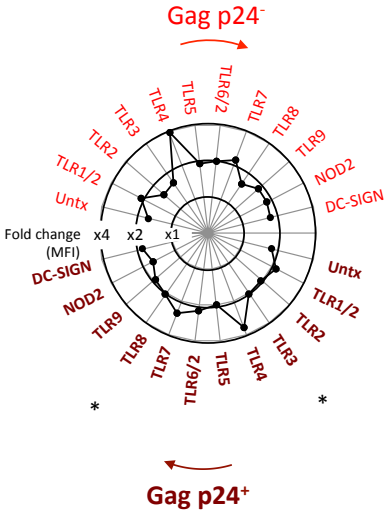
CD86



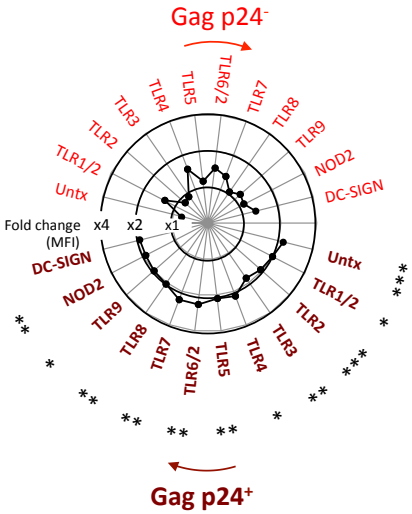
CD83



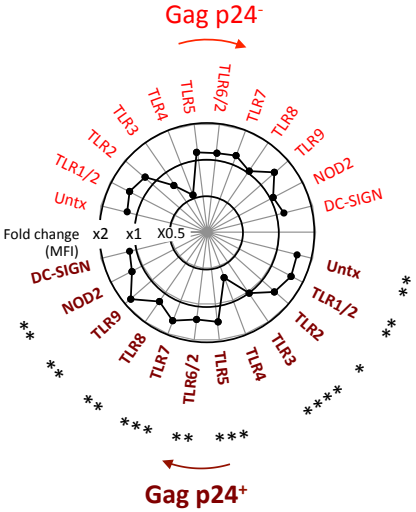
MHC-I



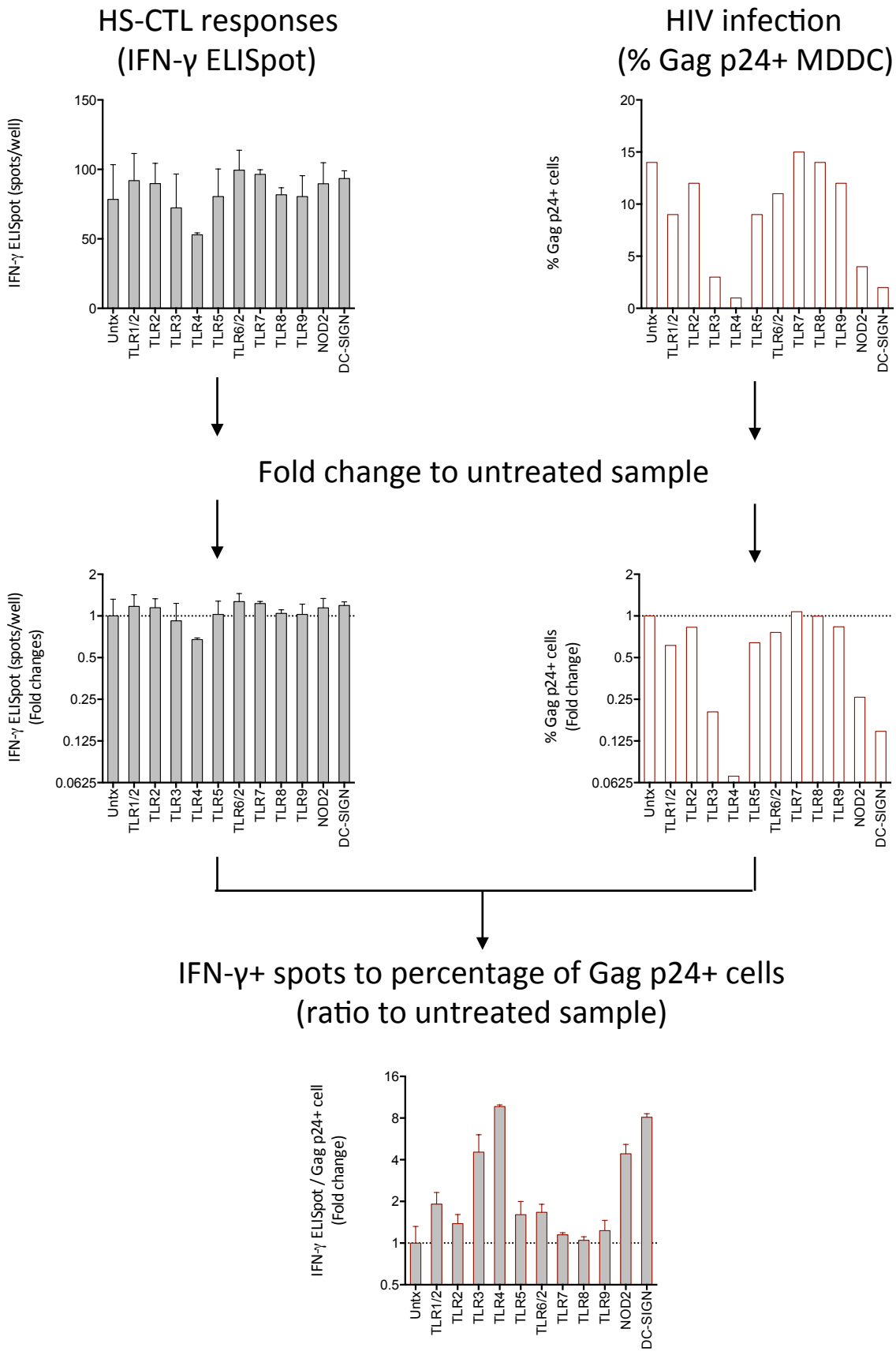
HLA-DR



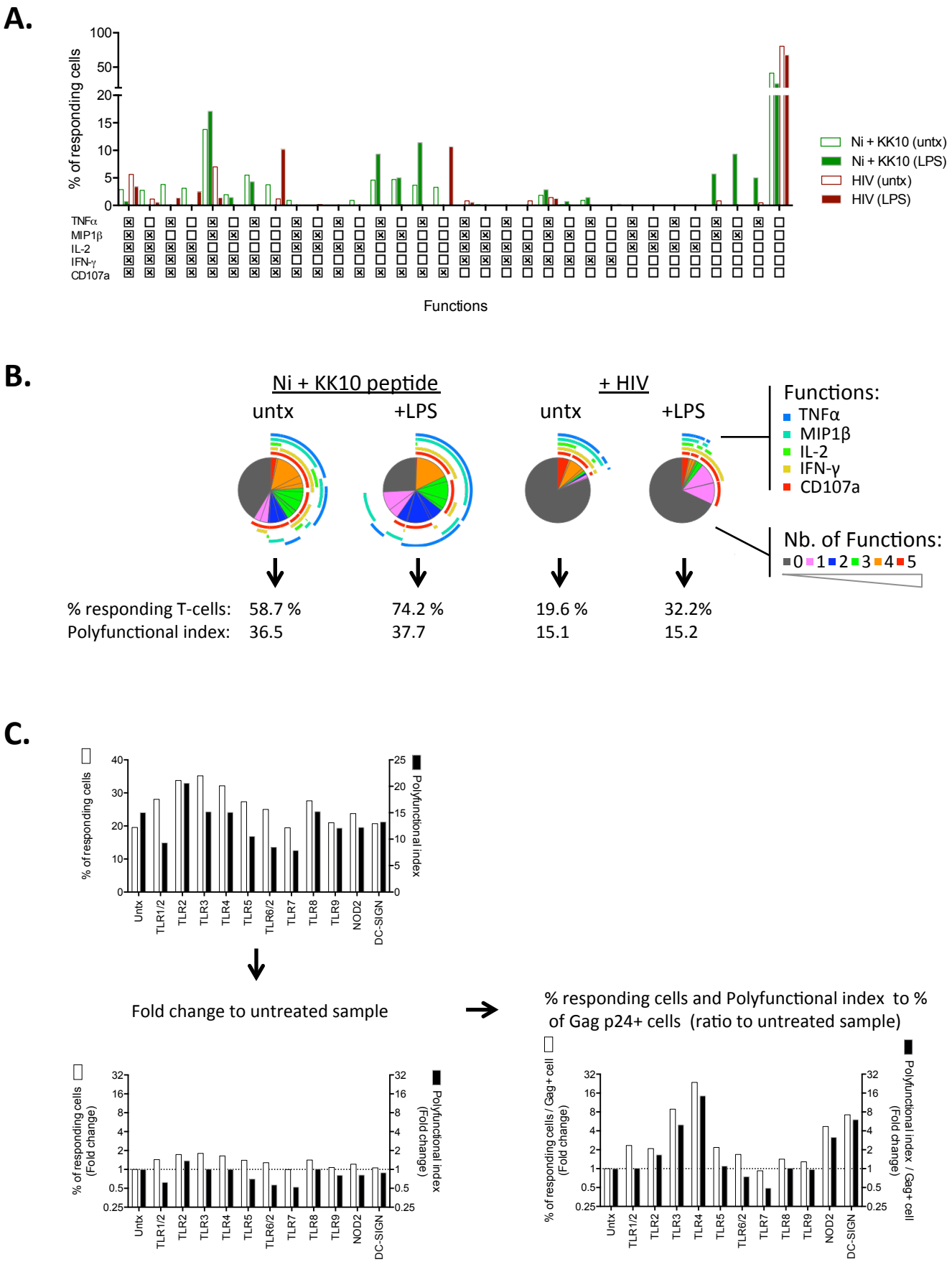
CD209



Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 1 (related to Fig. 1):

Productive HIV infection enhances PRR-induced MDDC maturation. **(A)** Schematic representation of the experimental procedure. MDDC were generated from CD14+ monocytes using IL4 and GM-CSF. MDDC were then loaded (AZT/NVP) or infected with HIV_{Yu2b} and simultaneously treated with PRR agonists. HIV-loaded (24h) or infected (72h) MDDC were analyzed using flow cytometry for the expression of DC-maturation markers and co-cultured with HS-CTL clones. CTL activation was monitored using IFN-γ ELISpot assay or ICCS. 72h p.i. replication was also analyzed using anti-Gag-p24 antibody or ELISA (not shown). **(B)** Raw data from Fig. 1B presented as fold change of expression for each maturation markers for the 8 independent experiments. Data were normalized to uninfected untreated MDDC. For each maturation marker, mean expression (±SD) of 8 independent experiments using 8 donors are indicated and statistical difference to the untx ni samples were determined as in Fig 1. **(C)** Increased expression of maturation markers on productively infected MDDC analyzed and presented as in Fig. 1. In bold and light red are depicted the results from productively infected (Gag p24+) and "by-standard" uninfected (Gag p24-) MDDC from the same co-cultures, respectively. Individual percentages of infection are presented in Fig 2B (ranging from 4.3 to 24.7%). For each PRR treatment, fold change of maturation marker were compared between the Gag-24- versus Gag-24+ cells using a two-way Holm-Sidak ANOVA multiple comparison test. Adjusted significant p values are presented (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, *** $p<0.0001$).

Supplementary Figure 2 (related to Fig. 4):

TLR-3, TLR-4, NOD2 and DC-SIGN agonists enhance HIV Gag-p17 SL9- specific CTL responses. Representative experiment using productively infected MDDC. MDDC from donor DC#2107 were productively infected in the presence of the indicated PRR-agonists (as in Fig. S1B). Three days p.i., viral replication was evaluated using HIV-Gag p24 intracellular staining (right panels) and cells co-cultured with an HIV Gag-p17 SL9-specific CTL clone (1000 CTL/well). T cell activation was then monitored using IFNγ-ELISpot (left panels). T cell activation and percentage infection were normalized to untreated (untx) samples and the data expressed as fold change (left and right middle panels, respectively). Relative to their capacity to reduce viral replication (bottom panel), TLR-3, TLR-4, NOD2 and DC-SIGN agonists enhanced (4 to 8 fold) the activation of the SL9-specific CTL clone. Background IFN-γ production induced by uninfected cells and treated MDDC alone were subtracted; both were at least 10 times lower than with SL9-specific CTL. Activation levels with SL9 peptide–

For Peer Review

loaded cells were around 500 IFN-γ+ spots/well (not depicted). Data are the mean (±SD) of triplicates using cells from the DC#2107 donor.

Supplementary Figure 3 (related to Fig. 5):

TLR-3, TLR-4, NOD2 and DC-SIGN agonists improve the quality of HIV Gag-p24 KK10- specific CTL responses. Representative experiment using productively infected MDDC from donor DC#2107. MDDC were productively infected in the presence of the indicated PRR-agonists (as in Fig. S1B). Three days p.i., viral replication was evaluated using HIV Gag-p24 intracellular staining (not shown) and cells co-cultured with an HIV Gag-p24 KK10-specific CTL. T cell activation was monitored by ICCS and flow cytometry using IFN-γ, IL-2, TNF-α, MIP-1β and CD107a mobilization. **(A)** Representative ICCS experiment using TLR-4 agonist (LPS). The percentage of activated KK10 HS-CTL clones induced by KK10-peptide loaded or infected DC are indicated for non-treated cells (untx) and LPS-treated cells. Background secretions induced by uninfected cells were close to zero (not shown). Marked boxes indicated whether the specific cytokines/chemokines or CD107a were positive for each condition. **(B)** The same data are also presented as pies showing the proportion of cells producing one or multiple cytokine/chemokine or marked for their cytolytic activity (CD107a mobilization). The total % of activated cells (mono or polyfunctional) and the polyfunctional indexes are also indicated for the 4 conditions tested. **(C)** Raw data from donor DC#2107 presented as percentage of responding KK10 HS-CTL clones and polyfunctional index (top panel) and as fold change to untreated cells (bottom left panel) for each PRR agonist. Taking into account to their capacity to reduce viral replication (bottom right panel), TLR-3, TLR-4, NOD2 and DC-SIGN agonists enhanced (3 to 17 fold) the activation of the KK10-specific CTL clone. The polyfunctional index follows the exact trend as the percentage of activation.

Supplementary Table 1 related to Fig. 3: Primers used for qRT-PCR

Gene targeted	Primer		Gene targeted	Primer	
A3G	Forward 5'-	CCGAGGACCCGAAGGTTAC	RIG-I	Forward 5'-	GACCCTCCCGGCACAGA
	Reverse 5'-	TCCAACAGTGCTGAAATTCG		Reverse 5'-	TCAGCAACTGAGGTGGCAATC
A3F	Forward 5'-	CCGTTTGGACGCAAAGAT	A20	Forward 5'-	TGCCCAGGAATGCTACAGAT
	Reverse 5'-	CCAGGTGATCTGGAAACACTT		Reverse 5'-	ACAAGTGGAACAGCTCGGATT
A3A	Forward 5'-	GAGAAGGGACAAGCACATGG	ADAR-1	Forward 5'-	CTTCCAGTGCGGAGTAGCG
	Reverse 5'-	TGGATCCATCAAGTGTCTGG		Reverse 5'-	ATTCATTGCGCCCGCGAG
SamHD1	Forward 5'-	AAAACCAGGTTTCACAACTTCTGC	CypA	Forward 5'-	GTCTCCTTTGAGCTGTTTGC
	Reverse 5'-	TGCGGCATACAAACTCTTTCTGT		Reverse 5'-	CGTATGCTTTAGGATGAAGTTCTC
Tetherin	Forward 5'-	AAGAAAGTGGAGGAGCTTGAGG	TREX1	Forward 5'-	GCATCTGTCAGTGGAGACCA
	Reverse 5'-	CCTGGTTTTCTCTTCTCAGTCG		Reverse 5'-	AGATCCTTGGTACCCCTGCT
MDA5	Forward 5'-	GGTCTGGATATTAAAGAATGTAACATTGTTATC	MxA	Forward 5'-	GCCGGCTGTGGATATGCTA
	Reverse 5'-	CCAGGACGTAGGTGCTCTCATC		Reverse 5'-	TTTATCGAAACATCTGTGAAAGCAA
Actin-B	Forward 5'-	TCCTTCCTGGGCATGGAGT			
	Reverse 5'-	AGCACTGTGTTGGCGTACAG			

For Peer Review