

Université de Montréal

**L'impact des cellules dendritiques dans la dérégulation des cellules B dans un contexte
d'infection au virus d'immunodéficience humaine**

par

Josiane Chagnon-Choquet

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Microbiologie, Infectiologie et Immunologie

Décembre, 2013

© Josiane Chagnon-Choquet, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

L'impact des cellules dendritiques dans la dérégulation des cellules B dans un contexte
d'infection au virus d'immunodéficience humaine

Présenté par :
Josiane Chagnon-Choquet

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Petronela Ancuta, président-rapporteur
Dr Michel Roger, directeur de recherche
Dre Johanne Poudrier, co-directrice de recherche
Dr Daniel Kauffman, membre du jury

Résumé

Les cellules dendritiques (DC) sont parmi les premières cellules à rencontrer le virus d'immunodéficience humaine (VIH) au niveau des muqueuses. De plus, le fait que les DC sont, de manière directe ou indirecte par le virus et ses composantes, altérées tant par leur nombre, leur phénotype et leur fonction suggère leur implication dans les dérégulations des cellules B. Selon cette hypothèse, des études longitudinales impliquant des individus infectés au VIH-1 présentant différents profils de progression clinique menées dans notre laboratoire ont démontré que les altérations des cellules B sont concomitantes à une augmentation de l'expression de BLyS/BAFF dans le sang ainsi que par les DC myéloïdes (mDC) sanguines. De plus, lors de travaux antérieurs utilisant le modèle murin VIH-transgénique, les altérations des cellules B ont démontré une implication des DC et d'un excès de BLyS/BAFF, et ce, dépendamment du facteur négatif du VIH (Nef). Dans cette optique, nous investiguons dans cette présente étude l'implication de Nef dans la modulation du phénotype des DC ainsi que dans les dérégulations des cellules B. Chez tous les patients virémiques infectés au VIH-1, nous avons détecté la présence de Nef dans le plasma ainsi qu'au niveau des mDC et de leurs précurseurs d'origine monocytaire, tout au long du suivi de la progression clinique et au-delà de la thérapie antirétrovirale (ART). La surexpression de BLyS/BAFF est associée à la présence de Nef au niveau des mDC et de leur précurseur.. Des essais *in vitro* ont permis de démontrer l'induction d'un phénotype proinflammatoire par des mDC dérivés de monocytes lorsqu'en présence de Nef soluble, via l'augmentation de l'expression de BLyS/BAFF et de TNF- α , et où cet effet est bloqué par l'ajout de l'acide rétinoïque. Nos résultats suggèrent donc que Nef est impliquée dans le déclenchement et la persistance des dérégulations des cellules B retrouvées chez les individus infectés au VIH-1. Basé sur nos observations, une thérapie adjointe impliquant le blocage de BLyS/BAFF et/ou Nef pourrait contribuer au contrôle de l'inflammation et des altérations des cellules B. De plus, la quantification de Nef post-ART pourrait s'avérer utile dans l'évaluation du statut des réservoirs.

Précédemment, nous avons démontré que les dérégulations des cellules B sanguines de ces mêmes individus présentant un profil de progression rapide et classique sont accompagnées par l'augmentation de la fréquence d'une population partageant des

caractéristiques des cellules B transitionnelles immatures (TI) et des cellules B de la zone marginale (ZM), que nous avons nommé les cellules B précurseur de la ZM. Toutefois, cette population est préservée chez les contrôleurs élités, chez qui nous avons trouvé une diminution significative de la fréquence des cellules B de la ZM présentant des marqueurs phénotypiques plus matures. Récemment, ces cellules ont été associées à un potentiel de fonction régulatrice (Breg), motivant ainsi notre poursuite, dans cette étude, de la caractérisation de ces cellules B. Comme pour les individus non infectés au VIH-1, nous avons démontré que les cellules B matures de la ZM contrôlent leur capacité de production d'IL-10 chez les contrôleurs élités, contrairement à une augmentation chez les progresseurs rapides et classiques. Aussi, les cellules B précurseur de la ZM des contrôleurs élités fournissent une expression importante de LT- α lorsque comparés aux individus non infectés au VIH-1, alors que cet apport de LT- α est attribué aux cellules B TI chez les progresseurs. Le contrôle de la progression clinique semble associé à un ratio en faveur de LT- α vs IL-10 au niveau des cellules B précurseur de la ZM. Nos résultats suggèrent qu'un maintien de l'intégrité du potentiel régulateur ainsi qu'une expression augmentée de LT- α par les cellules B de première ligne, telles les populations de la ZM, sont impliqués dans le contrôle de la progression clinique du VIH-1, possiblement par leur contribution à la modulation et l'homéostasie immunitaire. De telles populations doivent être considérées lors de l'élaboration de vaccins, ces derniers cherchant à générer une réponse protectrice de première ligne et adaptative.

Mots-clés : Virus de l'immunodéficience humaine, Nef, cellules dendritiques, cellules B, BLyS, BAFF, IL-10, inflammation, progression clinique, contrôle de la progression, zone marginale

Abstract

In the context of HIV-1 infection, DC are amongst the first cells to encounter the virus at the mucosal surfaces, and are directly and indirectly affected by the virus or its components. The fact that DC are altered in number, phenotype and function in the context of HIV, suggest they may be involved in driving B cell dysregulations, which occur as early as in the acute phase of HIV-infection and are not fully restored by therapy. As such, in recent longitudinal studies involving HIV-infected individuals with different rates of disease progression, we have shown that B cell dysregulations were associated with increased BLyS/BAFF expression in plasma and by blood myeloid DC (mDC). In previous work with HIV-transgenic mice, B cell dysregulations involved DC, excess BLyS/BAFF and were dependant on the HIV negative factor (Nef). We therefore aim to investigate the impact of HIV-Nef in modulating DC phenotype and B cell dysregulations. Blood samples from the same HIV-infected individuals as mentioned above were studied, following the identical longitudinal scheme. HIV-Nef was detected in plasma and beared by blood mDC and mDC precursors of all viremic HIV-infected patients, throughout follow-up and beyond therapy. Detection of HIV-Nef in mDC and their precursors was associated with BLyS/BAFF over-expression. *In vitro*, soluble HIV-Nef drove monocyte-derived mDC towards a pro-inflammatory phenotype by increasing the expression of BLyS/BAFF and TNF- α . Futhermore, this effect was blocked by the addition of retinoic acid. These data suggest that HIV-Nef is involved in the driving and persistence of B cell dysregulations in HIV-infected individuals. Based on our observations, therapeutic blocking of BLyS/BAFF and/or Nef could help control inflammation and B cell disorders. Moreover, measurement of HIV-Nef post-therapy may be useful in assessing reservoir status.

We have previously shown that B cell dysregulations in the blood of HIV-infected rapid and classic progressors were accompanied by the increased frequency of a population presenting characteristics of both transitional immature (TI) and marginal zone (MZ) B cells, which we have termed “MZ-like precursors”. However, this population was unaltered in ELITE controllers (EC), even though we found significantly lower frequencies of more mature MZ-like B cells. These results suggest that such first line B cell populations may be involved in the battle against HIV-1. Interestingly, MZ-like B cell populations have recently been

associated with Breg potential. As such, we found that as for HIV negative individuals, mature MZ-like B cells control their capacity of IL-10 production in EC. In contrast, HIV-1-infected rapid and classic progressors presented increased relative frequencies of MZ-like B cells expressing IL-10. Interestingly, in EC, blood MZ-like precursors provided substantial LT- α expression when compared to HIV negative individuals, and in contrast to that found in rapid and classic progressors, where significant LT- α expression was provided by TI B cells. In fact, the degree of control of disease progression seems associated with greater LT- α to IL-10 ratio within the MZ-like precursors population. Our results therefore suggest that maintenance of Breg integrity and increased LT- α expression by first line B cells, such as MZ-like populations, is involved in the control of HIV-1 disease progression, possibly through contribution to immune modulation and homeostasis. Soliciting such populations should be borne in mind in the design of vaccine strategies aiming at generating both first line and adaptive protective responses.

Keywords : Human immunodeficiency virus, Nef, dendritic cells, B cells, BLyS, BAFF, IL-10, inflammation, clinical progression, marginal zone

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xii
Dédicace.....	xvi
Remerciements.....	xvii
Avant-propos.....	xviii
Revue de littérature.....	1
1. Virus d'Immunodéficience Humaine (VIH).....	1
1.1. Structure du VIH-1.....	1
1.2. Génome viral.....	1
Facteur négatif du VIH-1 (Nef).....	2
1.3. Cycle réplcatif.....	6
1.3.1. Phase précoce.....	7
1.3.2. Phase tardive.....	7
2. Pathogénèse du VIH-1.....	8
2.1. Transmission.....	8
2.2. Phases cliniques de progression.....	9
2.2.1. Primo-Infection ou la phase aigüe.....	9
2.2.2. Séroconversion ou la phase précoce.....	10
2.2.3. Phase chronique.....	10
2.2.4. SIDA.....	11
2.3. Établissement de la latence et des réservoirs.....	11
2.4. Traitement antirétroviral.....	12
2.5. Type de progression clinique.....	13
2.5.1. Progresseurs rapides.....	13

2.5.2. Progresseurs classiques.....	13
2.5.3. Progresseurs lents.....	14
2.6. Facteurs associés à la progression clinique ou à son contrôle.....	14
2.6.1. Facteurs viraux.....	14
2.6.1.1. Charge virale.....	14
2.6.1.2. Changement de tropisme.....	15
2.6.1.3. Protéines virales et polymorphismes.....	15
2.6.2. Facteurs génétiques de l'hôte.....	16
2.6.2.1. Récepteurs à chimiokines.....	16
2.6.2.2. Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I.....	17
2.6.2.3. Cytokines.....	18
2.6.2.4. Facteurs de restriction.....	18
2.6.3. Facteurs immunologiques de l'hôte.....	19
2.6.3.1. Cellules dendritiques.....	19
2.6.3.2. Lymphocytes T CD4+.....	20
2.6.3.3. Lymphocytes T CD8+.....	22
2.6.3.4. Lymphocytes B.....	22
2.6.3.5. Activation immune chronique.....	23
2.6.3.6. Cytokines et chimiokines.....	24
3. Cellules dendritiques.....	25
3.1. Populations de cellules dendritiques et fonctions.....	25
3.1.1. Monocytes et précurseurs de cellules dendritiques.....	25
3.1.2. Cellules dendritiques myéloïdes.....	27
3.1.3. Cellules dendritiques mucoïdes.....	28
3.1.4. Cellules dendritiques plasmacytoïdes.....	30
3.1.5. Cellules de Langerhans.....	30
3.2. Les cellules dendritiques dans le contexte d'une infection au VIH-1.....	30
3.2.1. Impact du VIH-1 sur les monocytes et les précurseurs de DC.....	30
3.2.2. Infection et transinfection des cellules dendritiques.....	31
3.2.3. Impact du VIH-1 sur les DC myéloïdes.....	33

3.2.4. Impact du VIH-1 sur les DC plasmacytoïdes	33
4. Lymphocytes B	33
4.1. Différentiation des lymphocytes B et fonction des différentes populations	33
4.1.1. Développement des cellules B dans la moelle osseuse.....	33
4.1.2. Maturation dans les organes lymphoïdes secondaires	34
4.1.3. Réponse T-dépendante.....	37
4.1.4. Cellules B de la zone marginale.....	38
4.1.5. Réponse T-indépendante.....	40
4.1.6. Réponse des lymphocytes B aux muqueuses.....	40
4.1.7. Fonctions des lymphocytes B	43
4.1.7.1. Fonctions effectrices des anticorps	43
4.1.7.2. Cellules B régulatrices «Breg»	44
4.2. Les lymphocytes B dans le contexte d'une infection au VIH-1	45
4.2.1. Infection des lymphocytes B et transmission.....	45
4.2.2. Activation polyclonale	46
4.2.3. Altération de la mémoire immunologique	47
4.2.4. Perturbation de la dynamique des populations de lymphocytes B	48
4.2.5. Effet de la thérapie sur la restauration du compartiment B	48
4.3. Importance de la réponse B dans le contexte d'une infection au VIH-1	49
5. Implication des DC dans la dérégulation du compartiment B dans le contexte d'une infection au VIH-1	51
5.1. Modèle murin VIH transgénique.....	51
5.2. Étude longitudinale sur une cohorte de patients infectés au VIH-1	53
Hypothèse 1	55
Objectif 1	56
Hypothèse 2	57
Objectif 2	58
Article 1	59
Article 2	96

Discussion.....	130
1. Observations en relation avec un contexte de progression clinique du VIH-1.....	131
1.1. Évaluation longitudinale de Nef.....	131
1.2. Association de Nef et de la surexpression de BLyS/BAFF par les DC.....	132
1.3. Altération des populations de cellules B.....	135
2. Observations en relation avec un contexte de contrôle de la progression clinique du VIH-1.....	138
3. Implication des DC au niveau des muqueuses.....	141
Conclusion.....	145
Perspectives.....	147
Bibliographie.....	148
Annexes.....	xix
Annexe 1 - Comparaison de la concentration plasmatique de chimiokines.....	xix
Annexe 2 - Article de revue <i>Influence of Dendritic Cells on B-Cell Responses during HIV infection</i>	xxi
Annexe 3 – Liste des présentations réalisées par affiches et communications orales.....	lii
Annexe 4 – Résumé de communication orale et affiche Symposium B Cell Development and Function/HIV Vaccines.....	liv
Annexe 5 – Affiche Symposium B Cell Development and Function/HIV Vaccines.....	lv
Annexe 6 – Affiche Symposium B Cell Development and Function/HIV Vaccines.....	lvi

Liste des tableaux

Article 1 :

Table 1. Sociodemographic and clinical characteristics of HIV-1-infected individuals 84

Article 2

Table 1. Sociodemographic and clinical characteristics of HIV-1-infected individuals 125

Liste des figures

Figure 1. Schéma de la structure du VIH-1	1
Figure 2. Schéma du cycle de réplication du VIH-1	6
Figure 3. Phases cliniques de l'infection au VIH-1	9
Figure 4. Différentiation des lymphocytes T CD4+	20
Figure 5. Réponse T-dépendante et T-indépendante au niveau des muqueuses.....	42
Figure 6. L'implication de l'expression de BLYS/BAFF dans la modulation de réponses spécifiques au VIH-1	144

Article 1 :

Figure 1. Longitudinal variations of CD4 ⁺ T-cell counts, viral loads and levels of Nef in the blood of HIV-1-infected individuals.....	90
Figure 2. Detection of Nef in blood myeloid dendritic cell (mDC) populations of HIV-1 infected individuals.....	91
Figure 3. BLYS/BAFF expression by blood myeloid dendritic cells (mDCs) and monocytic mDC precursors bearing HIV-1 Nef.....	92
Figure 4. . Effect of recombinant soluble HIV-1 Nef (sNef) on BLYS/BAFF expression by monocyte derived dendritic cells (Mo-DCs).....	93
Figure 5. Effect of Retinoic acid (RA) on BLYS/BAFF expression by monocyte derived dendritic cells (Mo-DCs)	94
Figure supplémentaire 1.....	95

Article 2 :

Figure 1. Longitudinal analysis of blood B-cell populations of HIV-1 infected individuals .	120
Figure 2. IL-10 expression by blood B-cell populations	121
Figure 3. Percentage of IL-10 expressing cells for each B-cell population, within each patient group	122
Figure 4. LT- α expression by blood B-cell populations	123

Figure 5. Percentage of LT- α expressing cells for each B-cell population, within each patient group 124

Figure supplémentaire 1 127

Figure supplémentaire 2 128

Figure supplémentaire 3 129

Liste des abréviations

ADCC : *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
AID : *activation-induced cytidine deaminase*
AIRE : *autoimmune regulator*
AP : *adipocyte lipid-binding protein*
APC : cellule présentatrice d'antigène
APOBEC3G : *apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G*
APRIL : *a proliferation-inducing ligand*
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messenger
ART : thérapie antirétrovirale
ATRA : *all-trans retinoic acid*
BAFF : *B-cell activating factor*
BAFF-R : *B-cell activating factor receptor*
BCA-1 : *B-cell attracting chemokine 1*
Bcl-2 : *B-cell leukemia/lymphoma 2*
BCMA : *B-cell maturation antigen*
BCR : récepteur des cellules B
BLyS : *B lymphocyte stimulator*
Breg : cellules B régulatrice
BST-2 : *B cell stromal factor 2*
CA : capsid
CCL : *chemokine C-C motif ligand*
CCR : *chemokine C-C motif receptor*
c-fos : *FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CR : *complement receptor*
CRABP : *cellular retinoic acid-binding protein*
CRBP : *cellular retinol-binding protein*
CRF : *HIV circulating recombinant form*
CTL : cellules T cytotoxiques
CTLA : *cytotoxic T-lymphocyte associated serin esterase*
CXCR : *chemokine C-X-C motif receptor*
DC : cellule dendritique
DC-SIGN : *dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing-nonintegrin related*
dNTP : désoxyribonucléotides triphosphates
EC : *ELITE controller*, contrôleur élite
EndoCAb : *Endogenous-endotoxin-core antibody*
Env : enveloppe
EpCAM : *epithelial cell adhesion molecule*
ESCRT : *endosomal sorting complex required for transport*

Fc : fragment cristallisable d'une immunoglobuline
 FcγRIII : *Fc receptor, IgG, low affinity III*
 FcεRII : *Fc receptor, IgE, low affinity II*
 FDC : cellule dendritique folliculaire
 FOXO3A : *forkhead box O3A*
 FOXP3 : *Forhead box P3*
 GALT : *gut-associated lymphoid tissues*
 GATA : *aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit A*
 HAART : *highly active antiretroviral therapy*
 Hck : *hemopoietic cell kinase*
 HESN : *highly exposed seronegative individual*
 HEV : haute veinule endothéliale
 HIV : *human immunodeficiency virus*
 HLA : *human leukocyte antigen*
 ICAM : *intercellular adhesion molecule*
 ICOS : *inducible T-cell costimulator*
 IDO : *indoleamine 2,3-deoxygenase*
 IFN : interféron
 Ig : immunoglobuline
 IκBα : *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cell inhibitor, alpha*
 IP-10 : *interferon gamma-inducible protein 10*
 IRAK : *interleukin-1 receptor-associated kinase*
 IRF : *interferon regulatory factor*
 IL : interleukine
 Jun-D : *jun D proto-oncogene*
 kD : kiloDalton
 LAG-3 : *lymphocyte-activation gene 3*
 LBP : *LPS-binding protein*
 Lck : *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*
 LFA : *lymphocyte function-associated antigen*
 LPS : lipopolysaccharide
 LT : lymphotoxine
 LTNP : *long term non progressors*
 LTR : *long terminal repeat*
 Ly6c : *lymphocyte antigen 6, locus c*
 Lyn : *Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog*
 MA : matrice
 MAdCAM-1 : *mucosal addressin cell adhesion molecule-1*
 MALT : *mucosa-associated lymphoid tissue*
 MCP : *monocyte chemoattractant protein*
 M-CSF : *macrophage colony stimulating factor*
 MDA5 : *melanoma differentiation-associated protein 5*
 mDC : cellule dendritique myéloïde
 MEC : *mucosa-associated epithelial chemokine*
 MIG : *monokine induced by gamma interferon*

MIP : *macrophage inflammatory protein*
Mo-DC : cellule dendritique dérivé de monocyte
MyD88 : *myeloid differentiation primary response 88*
MZ : *marginal zone*
NC : nucléocapside
Nef : *negative factor*
NFAT : *nuclear factor of activated T-cells*
NF- κ B : *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cell*
NK : *natural killer, tueuse naturelle*
NLR : *Nod-like receptor*
ODN : *oligodeoxynucleotide*
OLS : organe lymphoïde secondaire
PAK2 : *p21 protein activated kinase 2*
PAMP : *pathogen associated molecular pattern*
PBMC : *peripheral blood mononucleated cells*
PD-1 : *programmed-death 1*
pDC : cellule dendritique plasmacytoïde
PI3K : *phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase*
PIC : *pre-integration complex*
PPAR : *peroxisome proliferator-activated receptor*
PRR : *pattern recognition receptors*
RA : *retinoic acid, acide rétinoïque*
RALDH : *retinaldehyde dehydrogenase*
RANTES : *regulated upon activation normal T cell expressed and secreted*
RAR : *retinoic acid receptor*
RBP : *retinol-binding protein*
Rev : *regulator of virion expression*
RIG-1 : *retinoic acid inducible gene 1*
ROR γ T : *RAR-related orphan receptor gamma T*
RRE : *Rev response element*
RT : *reverse transcriptase*
SAMHD1 : *SAM domain and HD domain containing protein 1*
SDF-1 : *stromal-cell derived factor 1*
SH : *Src homology domain*
SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise
SLC : *secondary lymphoid-tissue chemokine*
SLE : *lupus systémique érythémateux*
SOCS : *suppressor of cytokine sugnaling*
Src : *Rous sarcoma oncogene*
STAT : *signal-transducer and activator of transcription protein*
TACI : *transmenbrane activator, calcium modulator, and cyclophilin ligand interactor*
TAR : *trans-activating response element*
Tat : *trans-activator of transcription*
T-bet : *T-cell specific T-box transcription factor*
TCR : récepteur des lymphocytes T

TECK : *thymus expressed chemokine*
T_{FH} : *T follicular helper cell*, cellule T auxiliaire folliculaire
Tg : transgénique
TGF : *transforming growth factor*
TI : cellule B transitionnelle immature
TIM-3 : *T-cell immunoglobulin mucin-3*
Th : *T helper cell*, T auxiliaire
TIRAP : *Toll-interleukin-1 receptor domain containing adaptor protein*
TLR : *Toll-like receptors*
TNF : *tumor necrosis factor*
TRAF : *TFN receptor associated factor*
TRAIL : *TNF-related apoptosis inducing-ligand*
TRANCE : *tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine*
Treg : cellule T régulatrice
TRIM5 α : *tripartite motif-containing protein 5, isoform alpha*
Tsg101 : *Tumor susceptibility gene 101*
TSLP : *thymic stromal lymphopoietin*
Vif : *virus infectivity factor*
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
VIS : virus de l'immunodéficience simienne
Vpr : *viral protein R*
Vpu : *viral protein U*
ZAP : *zeta-chain (T-cell receptor) associated protein kinase*
ZM : zone marginale

Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow.

The important thing is not to stop questioning.

Albert Einstein

Remerciements

Je tiens d'abord et avant tout à remercier toutes les personnes qui ont pu contribuer à la réalisation de mon projet de maîtrise, tant par leur connaissances académiques et/ou leur support moral.

Je remercie mon directeur de recherche, Dr Michel Roger, pour son soutien et ses conseils avisés tout au long de mon parcours académique. Également, je ne peux passer sous silence le grand support que j'ai reçu de la part de Dre Johanne Poudrier, tant au niveau de l'élaboration et du suivi de mon projet et de ses connaissances inépuisables, qu'au niveau d'un soutien moral important. Un grand merci à tous mes collègues de laboratoire, Valérie Thibodeau, Geneviève Boily-Larouche, Karine Beauchemin, Marie-Claude Faucher, Laurie-Anne Batrville, Julie Gauvin et Catherine Sabourin-Poirier, où nos discussions et nos partages d'idées portant sur une foule de sujets furent toujours enrichissants, sans compter une aide technique précieuse. Bref, chacun d'entre vous avez su être là pour moi, autant dans les bons moments que dans les moments plus difficiles, et je ne peux que l'apprécier. Merci également à Julien Roger, pour son aide technique dans l'avancement de mon projet. Un très grand merci également à Aurélie Formentin, Émilie Comète et Julie Guenoun, pour tous les nombreux fous rires et les beaux souvenirs que nous avons partagés ensemble.

Enfin, je tiens à remercier ma famille et mes amis, pour leurs conseils et leur soutien moral qu'ils m'ont fournis au cours de mon processus académique, ainsi que dans mes embûches personnelles. Ma famille, que j'aime et que j'adore inconditionnellement, et tout le bien qu'elle m'apporte. Papa, je te remercie de m'avoir transmis ton sens de la curiosité, c'est ce dernier qui m'a mise sur la voie de la recherche.

Jean-François, mon amour, tu as su m'épauler dans ces différentes épreuves tout au long de ces années, et je ne peux que t'en remercier de tout mon cœur.

Merci!

Avant-propos

Dans le contexte d'une infection au virus d'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1), l'importance d'une réponse immunitaire efficace de première ligne et adaptative provenant des cellules B a été mise en lumière de par les nombreuses études portant sur la « résistance » naturelle de certains rares individus face à l'infection au VIH-1, ainsi que l'expérimentation d'une stratégie de vaccination par voie mucoale. Malheureusement, la majorité des individus infectés au VIH-1 présente une entrave quant à l'établissement d'une telle réponse des cellules B, et sont sujets au développement de manifestations auto-immunitaires et de lymphomes. Ils subissent des dérégulations quant à leur compartiment des cellules B, reflétées, entre autres, par une activation polyclonale, une altération dans la dynamique des populations, un épuisement cellulaire, une destruction des centres germinatifs et structures folliculaires, une perte dans la capacité à maintenir et à générer une mémoire immunitaire, contribuant ainsi globalement à une altération dans l'immunité humorale.

Quant à elle, les cellules dendritiques (DC) possèdent la capacité de moduler le développement, la survie ainsi que l'activation des cellules B de façon T-dépendante et T-indépendante via, entre autre, la production de facteurs de croissance tel BlyS/BAFF (*B lymphocyte stimulator, B-cell activating factor*). Lors d'une infection au VIH-1, les DC font parties des premières cellules à entrer en contact avec le virus au niveau des muqueuses, et sont affectées de manière directe ou indirecte par le virus et ses produits dérivés. Elles subissent des altérations quant à leur nombre, leur niveau de maturation, leur phénotype ainsi que de leur fonction.

Dans cette optique, nous émettons donc l'hypothèse que l'altération des DC dans le contexte d'une infection au VIH-1 contribue à la dérégulation du compartiment des cellules B, qui survient dès la phase aigüe de l'infection et n'est pas restauré complètement par l'initiation de la thérapie antirétrovirale.

Revue de littérature

1. Virus d'Immunodéficience Humaine (VIH)

1.1. Structure du VIH

Le VIH-1 est l'agent étiologique responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), et est un lentivirus appartenant à la famille des *Retroviridae*. Il se caractérise par la présence d'une enveloppe externe qui se définit par une double couche phospholipidique en provenance de la membrane cellulaire. La glycoprotéine de surface gp120 et la glycoprotéine transmembranaire gp41 s'y retrouvent généralement sous forme trimérique. La matrice, composée de protéines p17 et se trouvant sous l'enveloppe, englobe la capside conique constituée de protéines p24. C'est à l'intérieur de la capside que se situe la nucléocapside, le génome viral, ainsi que certaines enzymes telles que l'intégrase et la transcriptase inverse (Figure 1)¹.

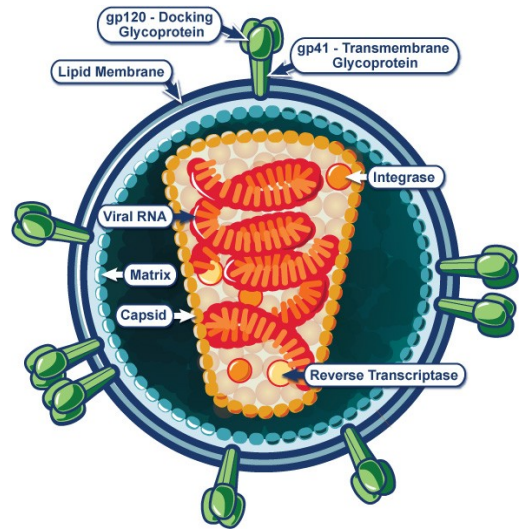


Figure 1. Schéma de la structure du VIH-1. Tiré du NIH (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, États-Unis).

1.2. Génome viral

Le génome du VIH-1, de moins de 10 kb, est constitué de deux copies d'ARN simple brin de polarité positive, et est composé de neuf gènes codant pour 15 protéines virales. Le gène *gag* encode les protéines de structure, soit celles de la matrice (MA, p17), de la capside (CA, p24), de la nucléocapside (NC, p7) ainsi que p6. Le gène *pol* encode les enzymes virales, soit la transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase. La transcriptase inverse permet la transcription de l'ARN viral en ADN complémentaire (ADNc). L'intégrase permet l'intégration du provirus, soit de l'ADN viral, au niveau de l'ADN chromosomique de l'hôte. La protéase, quant à elle, permet le clivage des précurseurs protéiques en protéines fonctionnelles. Le gène *env* encode pour les glycoprotéines de l'enveloppe, soit la gp120 exprimée à la surface et la gp41 qui fait office d'ancrage transmembranaire pour la gp120¹⁻³.

Une particularité du génome du VIH-1 réside dans ses gènes codant pour des protéines régulatrices et accessoires nécessaires à son infectiosité et à la progression de la maladie. La protéine régulatrice Tat possède un domaine d'attachement à l'ARN ainsi qu'un domaine activateur, lui permettant d'activer la transcription de l'ARNm du VIH-1 à partir du provirus^{4,5}. Rev est une protéine régulatrice constituée d'un signal d'export nucléaire et d'un domaine à l'élément de réponse Rev (RRE), et permet l'exportation de l'ARNm viral partiellement épissé ou non épissé et d'ARN génomique du noyau vers le cytoplasme⁴⁻⁶. Vif (*virus infectivity factor*) est une protéine accessoire qui permet l'ubiquitination de l'APOBEC3G (*apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G*), un facteur de restriction cellulaire, et augmente ainsi l'infectiosité des virions⁷. Quant à elle, Vpr (*viral protein R*) est une protéine accessoire possédant de multiples fonctions, telles que le transport de l'ADNc dans le complexe de préintégration virale vers le noyau, l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2, la modulation de l'apoptose des lymphocytes T, la stimulation de l'expression de gènes viraux et cellulaires, et la régulation de l'activité du facteur nucléaire kappa B (NF-κB)⁸. Elle facilite également l'infection des cellules qui ne subissent pas la division cellulaire, tels que les macrophages et les cellules dendritiques⁹. La protéine Vpu (*viral protein U*) se lie à la molécule CD4 du réticulum endoplasmique et entraîne sa dégradation via le protéasome, et assure le relâchement des particules virales lors du bourgeonnement en bloquant l'effet de la théétérine, ou BST-2 (*B cell stromal factor 2*), qui retient ces particules à la surface de la cellule infectée^{7,10}.

Facteur négatif du VIH (Nef)

De par les résultats obtenus antérieurement avec le modèle murin VIH-transgénique (voir plus loin), ses propriétés effectrices et son interaction avec les cellules dendritiques (DC), nous avons porté un grand intérêt dans la protéine virale Nef dans le cadre de ce projet, et son implication dans la pathogénèse du VIH-1 sera discuté plus en profondeur tout au long de ce manuscrit. La protéine Nef, d'environ 27 kD, est une protéine rapidement traduite après l'intégration du provirus au génome cellulaire. Elle a été démontrée capitale dans la pathogénèse de l'infection au VIH-1, où il a été observé que les souches du VIH-1 ou du VIS ne codant pas pour Nef ou présentant une atténuation de son expression peuvent amener à une

progression plus lente chez ces individus ou ces macaques infectés, respectivement^{7,11,12}. Sauf en ce qui a trait à l'activation de la tyrosine kinase Hck, la myristoylation de la protéine est nécessaire aux multiples fonctions de Nef, que ce soit au niveau du transit de protéines cellulaires membranaires, de l'activation ou de l'interférence dans les voies de signalisation cellulaire, de l'augmentation de l'infectiosité des virions et de l'inhibition de la commutation isotypique de classe des immunoglobulines (Ig)¹³⁻¹⁵.

Prévention de la surinfection

L'action de Nef sur la molécule CD4 membranaire, qui est le récepteur principal du VIH-1, est certainement celle étant la plus caractérisée. Via l'effet de Nef, CD4 est rapidement internalisée, et sa diminution à la surface cellulaire offre plusieurs avantages au VIH-1, soit au niveau de la réplication virale, de la production des virions ainsi qu'à l'infectiosité des particules virales¹⁶⁻²⁰. Nef prévient ainsi une surinfection de la cellule infectée, ce qui a été démontrée délétère via des effets cytopathiques causés par une accumulation trop importante d'ADN viral^{17,19,20}. La protéine virale est en mesure de briser l'association entre CD4 et Lck via l'internalisation de Lck, ayant pour effet la modulation de certaines voies de signalisation et contribuant ainsi à un milieu cytoplasmique favorable à la réplication virale²¹. Nef est aussi en mesure de diminuer l'expression de CCR5 et CXCR4, corécepteurs du VIH^{16,22,23}.

Évasion immunitaire

Une autre action de Nef est la diminution de l'expression membranaire des allotypes HLA-A et HLA-B du complexe majeur d'histocompatibilité-1 (CMH-1)^{7,24}, qui permet ainsi une évasion de la reconnaissance des cellules infectées par les cellules T CD8+ cytotoxiques (CTL)^{7,21,25}, et ce, sans affecter les niveaux d'HLA-C et HLA-E, les récepteurs inhibiteurs des cellules tueuses naturelles (*Natural Killer*). De plus, Nef est en mesure de réduire l'expression des molécules de co-stimulation CD28 à la surface des lymphocytes T²⁶, ainsi que des ligands de CD28 et CTLA-4, c'est-à-dire CD80 (B7.1) et CD86 (B7.2), à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (APC) que sont les DC^{27,28}. Un autre mécanisme d'évasion induit par Nef est la diminution des molécules de présentation antigénique CD1a, impliquées dans la présentation des lipides et glycolipides, notamment à la surface des DC immatures²⁹. Des

études ont permis de démontrer que Nef, présente de façon endogène, diminue l'expression en surface du CMH-II mature, et augmente l'expression du CMH-II immature accompagné de sa chaîne invariante, contribuant ainsi à l'altération de la capacité de présentation antigénique^{30,31}. L'effet de Nef exogène sur les APC sera discuté dans un paragraphe prochain.

Augmentation de la dissémination et réplication virale

La diminution du niveau de CD4 membranaire permet également de prévenir une interférence avec le bourgeonnement et la relâche des virions, étant donné l'affinité de CD4 pour la protéine Env^{17,19,21}. Nef augmente également l'expression de DC-SIGN à la surface des DC, une molécule impliquée dans la transinfection des lymphocytes T CD4⁺ qui est un mécanisme de transmission qui sera clarifié plus loin dans ce manuscrit (section 3.2.2), facilitant ainsi la transmission aux cellules cibles^{32,33}. L'expression des chimiokines MIP-1 α et MIP-1 β , médiée par la présence de Nef dans des macrophages infectés, permet l'attraction et l'activation de lymphocytes T^{34,35}. La modulation du statut d'activation des lymphocytes T permet d'augmenter la réplication virale. L'affinité de Nef via son motif PxxP avec le domaine SH3 de nombreuses tyrosines kinases, tel que Lck, Hck et Lyn, est bien établie, mais leur implication biologique dans la pathogénèse du VIH-1, au-delà de l'interférence dans certaines voies de signalisation, reste encore à élucider²¹. De par l'inhibition des activités catalytiques de Lck, Nef interfère avec la signalisation du récepteur des lymphocytes T (TCR), modulant ainsi les signaux induit par cette voie lors d'une synapse immunologique^{17,21,36}. Nef détourne cette cascade de signalisation à l'avantage du virus afin d'induire la transcription de facteurs de transactivation du promoteur LTR du VIH-1, permettant ainsi la transcription d'une panoplie de gènes qui coordonnent l'activation des lymphocytes T³⁷⁻³⁹. Nef peut également induire l'expression des cytokines et chimiokines IL-2, IL-4, TGF- β , MIP-1 α et MIP-1 β ⁴⁰, permettant l'induction d'un état permissif à la réplication virale au niveau des lymphocytes T CD4⁺ quiescentes⁴¹. La protéine cellulaire démontrant le plus d'affinité pour Nef est Hck, retrouvé chez les cellules myéloïdes⁴². L'interaction entre les deux protéines amène l'activation de Hck^{43,44}, provoquant ainsi l'activation subséquente de STAT3 qui peut promouvoir la survie des cellules myéloïdes¹⁴. Cependant, les effets de l'interaction Nef-Hck sont toujours sous investigation, et il est difficile de prédire ces effets de par les rôles à la fois

activateurs et inhibiteurs de Hck dans les voies de signalisation cellulaire^{45,46}. De plus, Nef est aussi en mesure d'induire l'expression de Fas (CD95) et de Fas ligand (CD95L) au niveau des cellules infectées^{21,47}, tout en étant capable d'inhiber l'apoptose de celles-ci, en se liant à ASK1, protéine de la voie d'apoptose Fas et TNF- α , à PI3K et PAK2, venant de la voie de Bad, ainsi qu'à p53⁴⁸. L'expression de Fas ligand contribue à l'évasion immunitaire en induisant l'apoptose des CTL spécifiques⁴⁷.

Effet de Nef au niveau exogène

Dans le sérum d'individus infectés au VIH-1, la protéine virale Nef a été détectée au niveau extracellulaire à une concentration pouvant atteindre jusqu'à 10 ng/ml⁴⁹. La présence de Nef au niveau extracellulaire n'est pas encore élucidée, mais pourrait s'expliquer par la lyse de la cellule infectée, la sécrétion par une voie non classique ou par la sécrétion d'exosomes ou microvésicules contenant la protéine virale⁴⁹⁻⁵¹. Récemment, une étude portant sur les réservoirs du VIH-1 a démontré que Nef peut être relarguée des astrocytes et ce, indépendamment de la réplication virale⁵². Il a été démontré que Nef peut être internalisée par plusieurs types cellulaires dont les monocytes, les macrophages et les DC, probablement par un mécanisme de pinocytose ou d'endocytose⁵³⁻⁵⁵. Sa présence au niveau exogène sur des macrophages dérivés de monocytes augmente l'expression de MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), IL-1 β , IL-6 et TNF- α via une interaction permettant l'activation de NF- κ B⁵⁶, et peut également induire l'activation de STAT1 et STAT3, augmentant l'expression de STAT1 et d'IRF-1, ainsi que de l'IL-6 et MIP-1 α ^{34,57}. Au niveau des DC, les résultats des nombreuses études portant sur l'effet et le rôle de Nef sur ces cellules diffèrent parfois, cela s'expliquant par l'utilisation de Nef au niveau endogène ou exogène, le stade de différenciation des cellules utilisées, ou l'utilisation de lignées cellulaires. En présence de Nef exogène, des DC immatures ont vu une augmentation de l'expression de CD1a, CMH-II, CD40, CD83 et CXCR4, une diminution du CMH-I et du récepteur du mannose, une diminution de leurs capacités d'endocytose et de phagocytose, en plus d'une augmentation dans la production des cytokines proinflammatoires IL-1 β , IL-12, IL-15 et TNF- α et des chimiokines MIP-1 α , MIP-1 β et IL-8⁵⁸. L'augmentation de la molécule CMH-II favorise une activation non spécifique des lymphocytes T CD4+, et augmente ainsi la quantité de cellules permissives à l'infection.

La protéine virale peut induire une activation de NF- κ B et de STAT3, impliquée dans la maturation des DC et la régulation de gènes antiapoptotiques, respectivement^{14,59,60}. Des lymphocytes B non infectés sont en mesure d'internaliser Nef *in vitro*, et de l'accumuler *in vivo* dans les centres germinatifs. Nef inhibe la commutation isotypique de classe vers IgG, IgA et IgE par l'induction d'I κ B α , SOCS1 et SOCS3 qui interfèrent dans les voies de signalisation de CD40, c'est-à-dire au niveau des facteurs associés au récepteur TNF (TRAF), et des cytokines IL-4 et IL-10 via les facteurs de transcription NF- κ B et STAT. La réponse T-dépendante des lymphocytes B se trouve ainsi compromise par l'action de Nef⁶¹. Aussi, la sécrétion d'IL-6 et de ferritine par les macrophages, induite par Nef, a démontré une implication au niveau de l'activation et la différenciation des lymphocytes B^{53,62}. Une autre étude a permis de démontrer l'action de Nef sur la formation de longs conduits formés d'actine dans les macrophages, permettant le transport de la protéine virale vers les lymphocytes B et atténuant ainsi de façon considérable la génération d'IgG2 et d'IgA, tant au niveau des sites d'entrées mucosaux qu'au niveau systémique⁶³.

1.3. Cycle réplcatif

Le cycle réplcatif du VIH-1 est divisé en deux phases, soit les phases précoce et tardive.

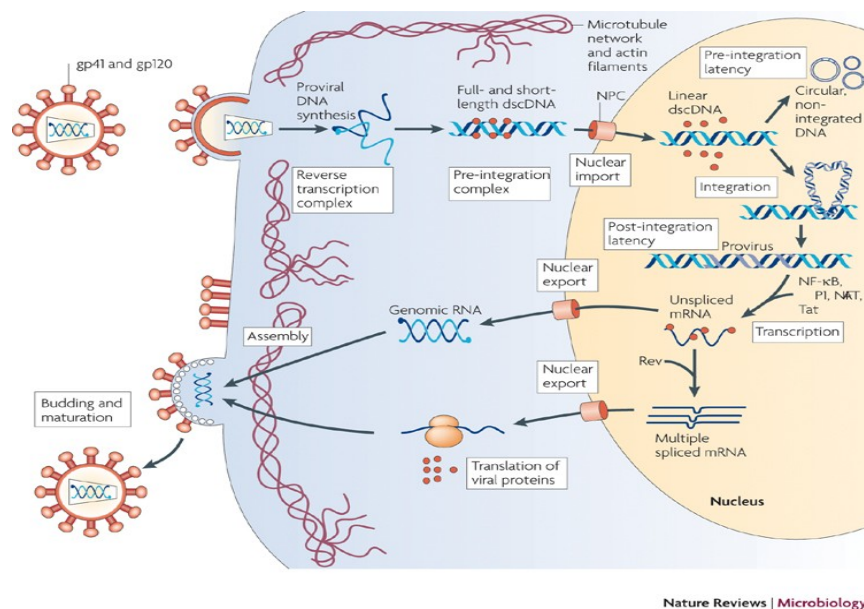


Figure 2. Schéma du cycle de réplcation du VIH-1. Tiré de Coiras *et al*⁶⁴, et reproduit avec l'autorisation de Macmillan Publishers Ltd : Nature Reviews Microbiology, copyright 2009.

1.3.1. Phase précoce

Le mécanisme d'entrée du VIH-1 débute avec la liaison de la gp120 à son récepteur cellulaire, soit la molécule CD4, présent chez les lymphocytes T CD4⁺, les DC ainsi que les macrophages. Cet attachement entre gp120 et CD4 provoque un changement conformationnel dans la gp120, exposant ainsi un site spécifique à la fixation des corécepteurs, que sont principalement les récepteurs à chimiokines CCR5 ou CXCR4⁶. Ensuite, un changement conformationnel s'effectue au niveau de la gp41 de l'enveloppe virale, permettant l'insertion de son peptide de fusion dans la membrane cellulaire. Puis, les deux hélices de la gp41 se replient, formant ainsi une structure à six hélices permettant le rapprochement et la fusion des membranaires virales et cellulaire⁶. Une fois relâchée dans le cytoplasme, la capsid virale est dégradée et il y a formation du complexe de transcription inverse composée des deux copies de l'ARN viral, l'amorce d'ARN de transfert lysine (tARN^{Lys}), de protéines virales contenues dans le virion ainsi que de protéines de l'hôte⁶⁴. Ce complexe se lie aux microfilaments d'actine et débute la transcription inverse via l'action de la transcriptase inverse, aidée de l'amorce tARN^{Lys}, de l'ARN génomique viral en ADN complémentaire double brin, flanqué des « long terminal repeat » (LTR). Le 5'LTR contient un promoteur/enhancer et le 3'LTR, un site de polyadénylation et de terminaison⁶. Le complexe de transcription inverse se désassemble pour reformer un complexe de pré-intégration, composé cette fois d'ADNc double brin, de l'intégrase, de protéine de la matrice, de la transcriptase inverse, de Vpr et de protéines cellulaires. À l'aide des microtubules, il y a translocation de ce complexe vers le noyau⁶⁵, où l'intégrase permet le processus d'intégration de l'ADNc à l'ADN chromosomique de l'hôte. Il peut arriver que l'ADNc double brin ne s'intègre pas, et peut se retrouver sous forme circulaire^{6,64,65}. L'établissement de la latence de l'ADN viral intégré, nommé le provirus, sera discuté dans la section 2.3.

1.3.2. Phase tardive

Sous la forme de provirus, la transcription en ARNm viraux est effectuée par l'ARN polymérase cellulaire, recrutée par le promoteur du 5' LTR viral. Au départ, la transcription ne permet que la formation d'ARN fortement épissé, qui encodent pour les protéines Tat, Rev et Nef. Tat se lie à une formation d'une boucle en épingle à cheveux à l'extrémité 5' du transcrit

naissant d'ARN et recrute ainsi des protéines cellulaires qui forment un complexe de transcription avec l'ARN polymérase, permettant l'élongation du transcrit d'ARNm^{1,6}. Il est nécessaire, pour la maturation et l'assemblage du virion, que des ARNm partiellement ou non épissés soient exportés du noyau vers le cytoplasme, et ce processus s'effectue via l'interaction de Rev au RRE de l'ARNm non épissé. Le cytoplasme est le lieu de synthèse de Env, Vpu, Vif et Vpr, ainsi que des précurseurs polyprotéiques Pr55^{Gag} et Pr160^{Gag-Pol}, à partir de l'ARNm partiellement et non épissé, respectivement¹. Une fois générés, les précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160^{Gag-Pol} sont rapidement transportés au niveau de la membrane cellulaire, et ce, grâce au domaine myristylé de la région MA⁶. Ensuite, les domaines CA et NC des polyprotéines Gag s'oligomérisent et s'assemblent au niveau de la membrane cellulaire. La région NC interagit avec le site d'encapsidation de l'ARN génomique viral. L'ARNm légèrement épissé *env* est traduite sous la forme de gp160, glycosylé lors de la traduction, et s'oligomérisent en structure trimérique et est clivé en gp41 et gp120. L'association non covalente entre le trimère gp41-gp120 permet le transport vers la membrane cellulaire, où il y a interaction entre gp41 et le domaine MA⁶. Le domaine p6 de Gag permet l'encapsidation de Vpr dans la capsid virale ainsi que le recrutement du complexe ESCRT-I (*endosomal sorting complex required for transport*) via une interaction à la protéine Tsg101, cette voie étant normalement impliquée dans la formation de vésicules endosomales.⁶ Dans le contexte de l'infection au VIH-1, la voie ESCRT permet la séparation entre la membrane virale et la membrane cellulaire⁶⁶. Lors du bourgeonnement des virions, la maturation du virion débute par le clivage de la protéase virale du précurseur Pr160^{Gag-Pol}, qui clive ensuite le précurseur Pr55^{Gag} pour libérer les protéines de structure MA, CA, NC et p6, ce qui permet à CA de former le cœur conique, NC de s'organiser autour du génome viral, et MA de s'ancrer à la membrane virale. Pol est ensuite clivé afin de générer l'intégrase et la transcriptase inverse. Une fois la particule virale sous sa forme mature, le virion a acquis son potentiel infectieux^{1,6}.

2. Pathogénèse du VIH-1

2.1. Transmission

Il existe trois modes de transmission pour le VIH : la transmission sexuelle ou par voie muco-sale, la voie parentérale, et la transmission mère-enfant. La transmission par voie

sexuelle, la plus répandue, a lieu au niveau des muqueuses vaginales et rectales ou par la muqueuse du prépuce du pénis. La voie parentérale est une transmission du VIH par inoculation intraveineuse, où les utilisateurs de drogues injectables composent majoritairement ce groupe. La transmission mère-enfant peut se produire durant la grossesse, lors de l'accouchement ou pendant l'allaitement⁶⁷.

2.2. Phases cliniques de progression

L'infection par le VIH-1 se divise en trois phases, soit aiguë, chronique et SIDA.

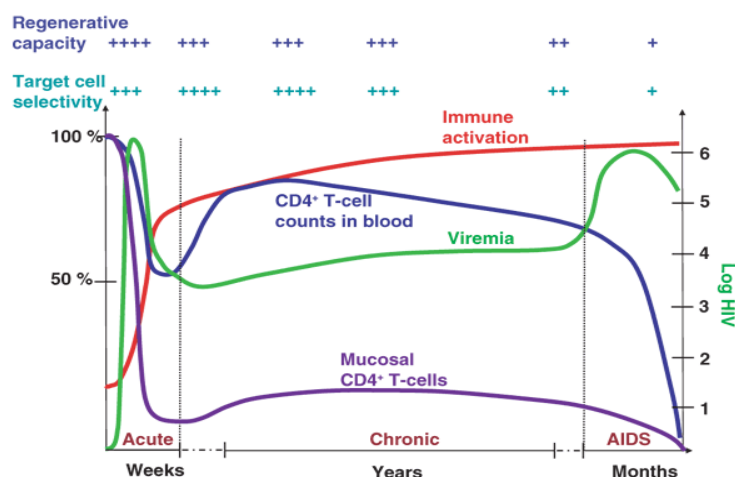


Figure 3. Phases cliniques de l'infection au VIH-1. Tiré de Grossman *et al*⁶⁸, et reproduit avec l'autorisation de Macmillan Publishers Ltd : Nature Medicine, copyright 2006

2.2.1. Primo-infection ou la phase aiguë

Lors d'une transmission par voie mucoale, le virus entre en contact avec plusieurs populations cellulaires présentant une susceptibilité à l'infection, tel que les lymphocytes T CD4⁺, les DC et les cellules de Langerhans⁶⁹. L'exposition du virus à la barrière épithéliale induit le recrutement de DC, dont les DC plasmacytoïdes (pDC), qui permet, entre autre, un enrichissement local de lymphocytes T CD4⁺ activés, facilitant ainsi la formation d'un foyer d'infection, et ce, moins d'une semaine après l'exposition au VIH-1⁷⁰⁻⁷². Par la suite, le virus, ou des cellules portant le virus telles les DC (voir section 3.2.2), accèdent aux ganglions lymphatiques drainants, permettant ainsi au VIH-1 d'atteindre des lymphocytes T CD4⁺CCR5⁺ activés ainsi que des lymphocytes T CD4⁺ naïfs et quiescents, contribuant à

l'établissement d'un réservoir viral (section 2.3)⁷¹. Une réplication et une dissémination virale importante s'en suit, atteignant la périphérie et les tissus lymphoïdes associés au tractus gastro-intestinal (GALT) où les lymphocytes T mémoires effectrices CD4⁺CCR5⁺CCR6⁺ constituent la majorité du « pool » des lymphocytes T CD4⁺ au niveau de la lamina propria. Ces cellules subissent alors une déplétion massive, représentant une perte approximative de 80% lors des trois premières semaines suivant l'infection au VIH-1⁷³. Une diminution des lymphocytes T CD4⁺ se reflète également dans le sang périphérique⁷¹. Rapidement après le début de l'infection, le VIH-1 induit une modulation importante dans le système immunitaire, qui sera discutée dans la section 2.6.3. Lors de la primo-infection, les patients développent des symptômes similaires à la mononucléose, tel que la fièvre, la fatigue, une lymphadénopathie, des maux de gorge, des douleurs musculaires ainsi qu'une perte de poids^{74,75}. Environ 50% à 70% des patients infectés développent des symptômes cliniques lors de la phase aiguë⁷⁶.

2.2.2. Séroconversion ou phase précoce

Après l'obtention d'un pic au niveau de la charge virale, soit trois à quatre semaines suivant l'exposition au VIH-1, il y a un déclin de cette dernière sur plusieurs mois jusqu'à l'atteinte du « set-point » virologique, un déterminant de la progression de la maladie. Lors de ce déclin, après huit à douze semaine suivant l'infection, il y a détection d'anticorps IgG spécifiques, mais ne présentant pas d'activité neutralisante, contre les protéines de structure du VIH-1. Ce stade se définit comme étant la séroconversion^{3,71,77}. Une réponse cytotoxique est également détectable⁷⁸⁻⁸⁰. Cela permet un certain contrôle de la réplication virale, ainsi qu'une restauration partielle des lymphocytes T CD4⁺ du sang, mais non au niveau des muqueuses où les dommages causés sur les populations cellulaires sont irréversibles⁶⁸.

2.2.3. Phase chronique

Lors de la phase chronique de l'infection au VIH-1, l'individu infecté entre alors dans une phase asymptomatique de la maladie, qualifiée de latence clinique. Elle est d'une durée variable selon plusieurs facteurs favorisant une progression plus ou moins rapide, mais d'une moyenne allant de sept à onze ans sans thérapie⁷⁶. Elle est caractérisée par un déclin progressif des lymphocytes T CD4⁺ du sang ainsi que par une faible réplication virale. Une activation

immune chronique s'installe également ainsi qu'un constant renouvellement en cellules T, B et NK, menant ainsi, entre autres, à l'épuisement de ces cellules, reflétant la perte graduelle de la capacité effectrice de la réponse immunitaire⁶⁸. Les différentes implications de l'activation immune chronique seront discutées dans la section 2.6.3.

2.2.4. SIDA

Le SIDA, étape ultime de l'infection au VIH-1, est déclaré lorsque la concentration de lymphocytes T CD4⁺ dans le sang descend à moins de 200 cellules/mm³ et qu'il y a une hausse importante dans la charge virale⁷⁶. À ce stade, le patient peut développer des infections à caractères opportunistes, que ce soit d'origine fongique (candidose), parasitaire (toxoplasme, pneumonie à *Pneumocystis jiroveci*), bactérienne (tuberculose) ou virale (cytomégalovirus, virus du papillome humain, virus de l'herpès simplex, virus Epstein-Barr). Certaines néoplasies peuvent également survenir au stade avancé de la maladie, dont le sarcome de Kaposi, les lymphomes non-hodgkiniens et le carcinome cervical invasif^{81,82}.

2.3. Établissement de la latence et des réservoirs

Un réservoir viral est un type cellulaire ou un site anatomique où le VIH-1 persiste sur une période plus longue que dans les populations où il y a infection productive. Lors de la phase de contraction, la majorité des lymphocytes T CD4⁺ activés meurent lors de la réponse immune, mais une partie de ceux-ci deviennent quiescents; ce sont les lymphocytes mémoires (« resting memory »). C'est, entre autres, dans ces cellules que le VIH-1 peut établir un réservoir viral, où son génome intégré au génome cellulaire n'est peu ou pas transcrit, évitant ainsi une reconnaissance par le système immunitaire⁶⁴. D'autres types cellulaires ont également été proposés dans le contexte de l'élaboration d'un réservoir, mais les mécanismes impliqués sont ardues à déterminer, de par la faible infection de ces cellules⁸³. Chez des patients infectés au VIH-1 sous traitement, il a été possible d'isoler des particules virales infectieuses de monocytes exprimant le récepteur CD16, qui sont plus permissifs à l'infection que les monocytes CD16-⁸⁴. Peu après l'infection, les DC folliculaires (FDC) peuvent maintenir à leur surface de grande quantité de particules virales sous forme de complexes immuns, et les transférer aux lymphocytes T CD4^{+85,86}. Les mDC de la circulation sanguine ne semblent pas

portées le virus lors de la thérapie antirétrovirale (voir ci-bas), tandis que les mDC isolées des ganglions lymphatiques en sont capables^{84,87}. Certains sites anatomiques sont également sous investigation quant à leur implication dans le maintien de réservoirs viraux⁸⁸. Un modèle de macaque infecté au VIS a permis de démontrer que la prise de la thérapie antirétrovirale diminuait rapidement la charge virale au niveau du liquide céphalo-rachidien et du plasma, ainsi que l'ARN viral au niveau du parenchyme cérébral. Toutefois, le taux d'ADN viral dans ce tissu est resté constant malgré la thérapie antirétrovirale⁸⁹. Le système nerveux central est également considéré comme un sanctuaire pharmacologique, où certains agents pharmacologiques démontrent une difficulté à diffuser à travers la barrière hémato-encéphalique⁸⁸. Un autre réservoir anatomique possible est le GALT, où il a été observé chez des patients infectés au VIH-1 prenant la thérapie antirétrovirale que les lymphocytes T CD4⁺ de la lamina propria portent un niveau significativement plus élevé d'ADN viral comparativement à d'autres sites anatomiques⁹⁰. Ces réservoirs cellulaires représentent un obstacle majeur dans l'éradication de la maladie liée au VIH-1.

2.4. Traitement antirétroviral

L'avènement des antirétroviraux est marqué par l'apparition en 1987 du premier inhibiteur de la transcriptase inverse du VIH-1, le zidovudine (AZT). Depuis, plusieurs agents antirétroviraux ont été conçus, ciblant les différentes étapes du cycle de réplication virale. Actuellement, la thérapie utilisée est le traitement antirétroviral très actif (HAART), qui est constitué d'une combinaison d'inhibiteurs de la transcriptase inverse et d'inhibiteur de la protéase ou de l'intégrase. Il est initié lorsque le patient atteint un taux de lymphocytes T CD4⁺ sanguins inférieur à 350 cellules/mm³, lors de l'apparition de symptômes ou de maladies opportunistes⁹¹. L'efficacité de la trithérapie se trouve dans sa capacité à diminuer rapidement la charge virale par le contrôle de la réplication du virus, et de restaurer partiellement certaines fonctions immunes, telle l'augmentation du nombre de lymphocytes T CD4⁺ sanguins, suffisamment pour retarder les infections opportunistes et augmenter considérablement l'espérance de vie du patient. Malgré tout, la déplétion massive des lymphocytes T CD4⁺CCR5⁺ au niveau du GALT est irréversible, et leur rétablissement reste incomplet⁹²⁻⁹⁴. Aussi, un certain niveau d'activation immunitaire persiste, reflété par une circulation élevée de

lymphocytes T activés, de marqueurs solubles d'activation, en plus de certains marqueurs de translocation microbienne⁹⁵⁻¹⁰⁰. Au niveau de la restauration du compartiment B, plusieurs controverses perdurent, et seront approfondies dans la section 4.2. De nombreux autres défis demeurent face au traitement à la trithérapie. Effectivement, en raison de l'établissement des réservoirs viraux lors de l'infection et de la présence du virus à des sites inaccessibles aux agents antirétroviraux, il ne peut y avoir éradication du VIH-1, ni guérison des patients. Le patient est donc soumis à un régime antirétroviral pour la durée de sa vie. La prise de médicaments à long terme implique des difficultés que ce soit au niveau de l'adhérence du patient à son traitement, ainsi que l'émergence de mutations de résistance face aux antirétroviraux¹⁰¹. De plus, la trithérapie provoque son lot d'effets secondaires, telles la stéatose hépatique, la lipodystrophie ou la néphrotoxicité, contribuant ainsi à la mauvaise prise de médicaments de la part du patient et, ultimement, à l'apparition de résistance virale¹⁰¹. Dans cette optique, d'incommensurables efforts sont fournis dans la communauté scientifique afin d'élaborer un vaccin efficace contre le VIH-1 (section 4.3).

2.5. Type de progression clinique

2.5.1. Progresseurs rapides

Environ 10 à 15% des individus infectés au VIH-1 présentent une progression plus rapide de la maladie, s'étalant sur une période de deux à trois ans avant d'atteindre le stade SIDA¹⁰². Ces individus font l'expérience d'une prolongation des symptômes associés à la phase aigüe de l'infection, et ces symptômes peuvent persister en phase chronique, cette dernière étant très courte ou absente. Un contrôle inefficace du pic de la virémie lors de la phase aigüe est associée à une remontée rapide de celle-ci⁷⁶. Aussi, les progresseurs rapides subissent une diminution rapide de leurs lymphocytes T CD4⁺ sanguins¹⁰³, démontrent peu d'anticorps spécifiques pour les protéines de structure^{102,104}, un délai dans la réponse cytotoxique⁷⁸, ainsi que la présence marquée de facteurs d'inflammation¹⁰⁵.

2.5.2. Progresseurs classiques

Une proportion de 70-80% des individus infectés au VIH-1 vont présenter une progression dite classique. Ces individus conservent des taux de lymphocytes T CD4⁺

supérieurs à 200 cellules/mm³ pour une période de cinq ans. La phase chronique est marquée par une absence de symptômes cliniques, une réplication virale persistante, une perte progressive des lymphocytes T CD4⁺ ainsi qu'une activation immune chronique. Le temps médian de cette phase est de six à huit ans, où le patient atteint alors le stade SIDA ^{revue par 76}.

2.5.3. Progresseurs lents

Une proportion d'individus infectés au VIH-1, moins de 5%, possèdent une phase asymptomatique de plus de dix ans¹⁰⁶. Ils sont connus sous plusieurs appellations : progresseurs lents, « Long Term Non Progressors » (LTNP), contrôleurs. Ils présentent des niveaux de lymphocytes T CD4⁺ sanguins normaux et stables et une charge virale basse, et ce, en absence de thérapie antirétrovirale. Ils sont caractérisés par un bas niveau de paramètres virologiques ainsi qu'une préservation des tissus lymphoïdes et des fonctions immunitaires¹⁰⁶⁻¹⁰⁹. Parmi ces progresseurs lents, les contrôleurs élites ou progresseurs lents avirémiques présentent une charge virale indétectable en absence de thérapie antirétrovirale, et ce, même après une période de plus de huit ans post-infection^{106,107}. Les corrélats de protection et les mécanismes impliqués dans le contrôle de la progression sont le sujet d'un grand nombre d'études. Il existe également des individus qui, exposés de façon répétée au VIH-1, demeurent séronégatifs, et sont qualifiés d'individus séronégatifs hautement exposés au VIH-1 (HESN), où leur « résistance naturelle » face au VIH-1 représente un très grand intérêt¹¹⁰.

2.6. Facteurs associés à la progression clinique ou à son contrôle

Plusieurs marqueurs sont observés et utilisés pour déterminer la progression clinique dans le contexte de l'infection au VIH-1, et certains facteurs sont associés à un contrôle de la réplication virale et de la progression clinique.

2.6.1. Facteurs viraux

2.6.1.1. Charge virale

La charge virale est utilisée pour l'évaluation de la progression¹¹¹. Une progression rapide est associée à une charge virale élevée lors du « set point » virologique⁷⁶.

2.6.1.2. Changement de tropisme

Le VIH-1 utilise la molécule CD4 comme récepteur primaire, présente à la surface des principales cibles du virus, soit les lymphocytes T, monocytes, macrophages et DC. Toutefois, l'entrée du virus nécessite également la présence d'un corécepteur, dont la nature varie selon les souches virales, influençant ainsi son tropisme viral. Au début de l'infection, le corécepteur du VIH-1 est principalement le CCR5, situé à la surface des cellules T mémoires effectrices et des DC et macrophages. Les muqueuses gastro-intestinales et vaginales sont particulièrement enrichies de ces cellules, cela permettant une infection fulgurante aux sites d'entrées du VIH-1 par la souche R5. Avec la progression de l'infection survient un changement de tropisme pour le corécepteur CXCR4, présent sur les lymphocytes T CD4⁺ naïfs et mémoires quiescents. La présence de souche X4 est donc un indicateur de la progression de la maladie vers le SIDA¹¹².

2.6.1.3. Protéines virales et polymorphismes

Le VIH-1 étant soumis à un haut taux de réplication virale ainsi qu'à une pression sélective importante de la réponse immunitaire, une pauvre fiabilité de sa transcriptase inverse peut causer de nombreuses mutations au niveau de son génome. Ces mutations permettent l'émergence de quasiespèces, favorisant ou non la progression de l'infection.

La première cohorte de progresseurs lents a été caractérisée dans les années 1980 en Australie, après l'infection d'individus ayant reçu une transfusion sanguine d'un progresseur lent. Le contrôle de la progression de l'infection a été attribué à une délétion dans le gène *nef*, codant ainsi pour une protéine non fonctionnelle^{11,113}. Les multiples implications de Nef dans la pathogénèse du VIH-1 ont été largement abordées dans la section 1.3. D'autres études ont rapportées des délétions au niveau du gène codant pour Nef chez les contrôleurs, tel que *T138Q*, et ont démontré une diminution de la réplication du VIH-1¹¹⁴. Cependant, les mutations atténuant *nef* sont peu fréquentes chez ces individus^{115,116}.

La protéine Vpr est caractérisée par sa grande conservation entre le VIH-1, le VIH-2 et le SIV, ainsi que ses diverses implications dans la pathogénèse virale. Une substitution d'une glutamine pour une arginine en position 77 (R77Q) de la région C-terminale au niveau de Vpr a été trouvée chez des progresseurs lents, et est associée au contrôle de la progression¹¹⁶.

La protéine Vif interfère dans la fonction d' APOBEC3G, un facteur de restriction dont l'action est la désamination de cytosine en uridine sur le brin négatif de l'ADN proviral nouvellement synthétisé, causant ainsi une hypermutation des guanosines en adénosines du brin positif et la formation de codon stop, amenant un arrêt prématuré de la réplication virale. Elle doit être incorporée dans les virions afin d'effectuer sa fonction dans les cellules nouvellement infectées. Vif est en mesure d'induire l'ubiquitination d'APOBEC3G via sa dégradation par la voie du protéasome¹¹⁷. Des études portant sur les progresseurs lents ont démontré chez certains de ces individus la présence de délétions, d'insertions ou de codons stop prématurés dans le gène *vif*, où la protéine Vif est non fonctionnelle¹¹⁸⁻¹²¹.

La protéine Vpu, quant à elle, contrecarre l'effet du facteur de restriction BST-2, ou tétherine, qui inhibe le bourgeonnement des virus enveloppés via leur rétention au niveau de la membrane plasmique. L'action de Vpu sur la tétherine est multiple, car elle est en mesure de l'internaliser, de la séquestrer dans des compartiments intracellulaires et de la dégrader par la voie du protéasome¹²². Une mutation de Vpu d'une sérine en position 52 à l'alanine diminue son effet anti-tétherine au niveau des macrophages, mais pas au niveau des lymphocytes T CD4⁺¹²³. L'importance de Vpu dans la progression clinique reste encore à investiguer.

Globalement, les mutations du VIH-1 observées chez les progresseurs lents ne peuvent être la seule cause du contrôle de la progression de la maladie en raison de leur rareté chez ces individus, mais participent probablement en combinaison avec d'autres facteurs de nature virologique et/ou immunologique¹⁰⁹.

2.6.2. Facteurs génétiques de l'hôte

2.6.2.1. Récepteurs à chimiokines

Le récepteur CCR5 est exprimé à la surface des lymphocytes T CD4⁺ mémoires, monocytes, macrophages et DC¹²⁴. Une délétion de 32 paires de bases dans la région codante de CCR5 (CCR5Δ32) est associée au contrôle de la progression de l'infection du VIH-1. Les individus homozygotes sont résistants à l'infection, et les porteurs hétérozygotes démontrent une progression considérablement plus lente^{revue par 109}. Ce polymorphisme est observé plus fréquemment chez les caucasiens, et est pratiquement absent des populations africaines, asiatiques de l'est et autochtones d'Amérique¹²⁵. Des mutations dans la région du promoteur

de CCR5 causant une augmentation de sa transcription sont associées à une progression plus rapide vers le stade SIDA¹²⁶. Une présence augmentée de CCR5 à la surface des lymphocytes T CD4⁺ centrales mémoires lors de la primo-infection est associée à la progression rapide¹²⁷. Un polymorphisme de CCR2, une substitution d'une isoleucine pour une valine en position 64 (V64I), réduit l'expression de CXCR4 sur les lymphocytes T CD4⁺, et conséquemment, peut causer un ralentissement dans la progression clinique¹²⁸.

La liaison d'un ligand à son récepteur entraîne son internalisation. De ce fait, les ligands naturels des récepteurs à chimiokines CCR5 et CXCR4, corécepteurs principaux du VIH-1, agissent à titre d'inhibiteurs compétitifs avec le VIH-1, et des polymorphismes permettant une augmentation de leur nombre sont associés à un contrôle de l'infection par le VIH-1¹⁰⁹. Les ligands de CCR5 sont MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-1 α P et RANTES, et le ligand de CXCR4 est SDF-1¹²⁸. La chimiokine MIP-1 α P, un isoforme de MIP-1 α , est un ligand très potent du CCR5, où le nombre de copies de son gène est garant de son niveau retrouvé chez l'individu, et il a été démontré que les populations africaines possèdent un plus grand nombre de copies que les populations caucasiennes^{129,130}. Des niveaux faibles de MIP-1 α P sont associés à une susceptibilité accrue face au VIH-1 de tropisme R5, une augmentation de la charge virale et une progression plus rapide de la maladie, alors que des niveaux élevés sont associés à une progression lente^{126,130}. Des polymorphismes impliquant la substitution de nucléotides au niveau de RANTES (-8C \rightarrow G, -403G \rightarrow A) sont associés avec un délai dans la progression de la maladie, alors qu'une mutation au niveau d'un élément de séquence régulateur (1.1C) est associée à une accélération de la progression vers le SIDA^{131,132}.

2.6.2.2. Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I

Le CMH-I ou « human leukocyte antigen » (HLA), retrouvé de façon quasi-ubiquitaire à la surface des cellules nucléées, permet la présentation antigénique aux lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques lors d'infection par des pathogènes intracellulaires. Dans le cadre d'une infection au VIH-1, les individus hétérozygotes pour les gènes du CMH-I sont associés à une plus grande diversité quant à la génération de réponses CD8, contrairement aux individus homozygotes¹³³⁻¹³⁵. Les polymorphismes HLA-B57, plus particulièrement B5701 et B5703, et B27 corrént avec un contrôle de l'infection, par la génération d'une réponse face à des

épitopes immunodominants et une diminution du risque d'évasion immunitaire par l'apparition de mutations¹³⁶⁻¹⁴⁰. Dans les études de cohortes de LTNP, une fréquence plus élevée d'HLA-B57 est trouvée chez les progresseurs lents en comparaison aux progresseurs rapides ou classiques¹⁰⁹. D'autres HLA protecteurs ont été retrouvés chez les contrôleurs, soit B13, B15, B44, B51 et B58, mais l'effet protecteur de chacun de ces allèles n'a pas encore été déterminé¹⁴¹. De l'autre côté, certains allèles du CMH-I sont associées à une accélération de la progression vers le SIDA, dont HLA-A24, A29, B35, C4 et Cw4^{126,142}. L'HLA-G est un type non-classique de CMH-I, retrouvé sous forme membranaire ou soluble, et où sa localisation se concentre au niveau des tissus. Il possède un rôle immunomodulateur de par son effet inhibiteur sur les lymphocytes T CD8⁺ ainsi que les NK, activateur sur les lymphocytes T régulatrices (Treg) et par la production d'IL-10^{revue par 149}. Une concentration élevée d'HLA-G soluble a été détectée chez des progresseurs rapides tôt après l'infection au VIH-1 et persistant lors du traitement antirétroviral. Ceci pourrait favoriser l'établissement et le maintien d'un environnement tolérogénique, contribuant par le fait même à l'évasion immunitaire¹⁴⁴.

2.6.2.3. Cytokines

Des mutations au niveau des gènes codant pour certaines cytokines sont également impliquées dans le rythme de la progression de l'infection. Quatre polymorphismes ont été identifiés au niveau du promoteur de TNF- α , et une faible association entre les individus homozygotes pour l'un deux (-308A) et les LTNP a été identifiée¹⁴⁵. Au niveau de la cytokine IL-10, les polymorphismes -1082A \rightarrow G et -592C \rightarrow A situés dans la région du promoteur sont associés à une augmentation de sa production et d'une diminution de celle-ci, respectivement¹⁴⁶. Lorsque présente, la mutation en position 1082 est associée à un déclin en lymphocytes T CD4⁺ plus lent chez un individu infecté au VIH-1, alors que la mutation en position 592 semble associée à une accélération de la progression de la maladie plus tardivement au cours de l'infection^{147,148}.

2.6.2.4. Facteurs de restriction

Des individus infectés au VIH-1 présentant de bas niveaux d'ARNm d'APOBEC3G sont associés à un risque accru de la progression de la maladie, alors que de hauts niveaux sont

associés à une progression lente¹⁴⁹. De plus, une étude portant sur des individus infectés au VIH-1 à différents stades de l'infection a démontré que les niveaux élevés d'ARNm d'APOBEC3G corrélaient avec des plus hauts taux de lymphocytes T CD4⁺ et une charge virale plus basse¹⁵⁰. Les individus porteurs de l'allèle H186R de l'exon 4 d'APOBEC3G sont associés à une progression plus rapide de la maladie¹⁵¹. La protéine à motif tripartite 5α (TRIM5α) agit sur le VIH-1 lors de son entrée dans la cellule par son attachement à la capsid virale afin d'empêcher la réplication virale¹⁵². Les études portant sur des polymorphismes trouvés au niveau de TRIM5α sont, pour le moment, peu nombreuses et nécessitent de plus amples investigations quant à leur association à la progression clinique^{153,154}. Récemment identifié dans les cellules myéloïdes, le facteur de restriction SAMHD1 a une activité enzymatique d'hydrolyse lui permettant de cliver les désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP). De ce fait, elle diminue le « pool » disponible de nucléotides nécessaires à la synthèse de l'ADNc du VIH-1 par la transcriptase inverse, contrôlant ainsi la réplication virale¹⁵⁵. À l'heure actuelle, aucune étude n'a démontré de réelle association entre des polymorphismes de SAMHD1 et le contrôle de la progression clinique du VIH-1¹⁵⁶.

2.6.3. Facteurs immunologiques de l'hôte

2.6.3.1. Cellules dendritiques

Les DC constituent une population cellulaire hétérogène, où leur appellation diffère selon leur origine, leur localisation et leur fonction. Leur rôle est capital dans l'élaboration et la modulation de l'immunité innée et adaptative, et orchestrent l'homéostasie entre immunité et immunotolérance, via leur capacité à présenter des antigènes et à détecter la présence de pathogènes et signaux de danger^{revue par 157}. Les APC, dont font partie les DC, présentent un phénotype immature jusqu'à ce qu'elles soient activées par des signaux déclencheurs de leur environnement. À cette fin, elles possèdent à leur surface ainsi qu'au niveau de leur cytosol des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR, *pattern recognition receptors*) qui leur permettent de détecter la présence de signaux de danger, associés aux dommages tissulaires ou à la présence de cytokines, et de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP, *pathogen associated molecular pattern*). Une fois activées, les DC mûrissent et migrent du site périphérique vers les organes lymphoïdes secondaires (OLS) drainants. Une

fois sur place, elles peuvent enclencher l'activation des lymphocytes T CD4⁺ via la synapse immunologique, processus qui implique l'engagement du complexe peptide/CMH à la surface de la DC au récepteur du lymphocytes T CD4⁺ spécifique, mais également l'interaction de part et d'autre de molécules d'adhésion moléculaire, de molécules de co-stimulation et la libération subséquente de facteurs telles les cytokines^{revue dans 158}. Les DC sont les seules APC ayant le potentiel d'activer des lymphocytes T CD4⁺ naïfs, et ce sont les signaux déclencheurs de la maturation des DC qui dictent subséquemment le patron de la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs (voir Figure 4). Dans le cadre d'une infection au VIH-1, les DC sont parmi les premières cellules à rencontrer le virus, et subissent de multiples altérations¹⁵⁹. De par la nature du projet de ce mémoire, les DC font l'objet d'une section complète (section 3).

2.6.3.2. Lymphocytes T CD4⁺

L'activation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs, surtout réalisée par les DC, permet leur prolifération et leur différenciation en cellules effectrices, où leur phénotype est déterminé à partir de plusieurs facteurs, dont les molécules de co-stimulation et l'environnement en cytokines. Les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs sont composés de plusieurs types, basés sur leurs facteurs de transcriptions, leur profile en matière de production de cytokines et leur fonction, tel qu'illustré dans la Figure 4^{revue dans 160,161}.

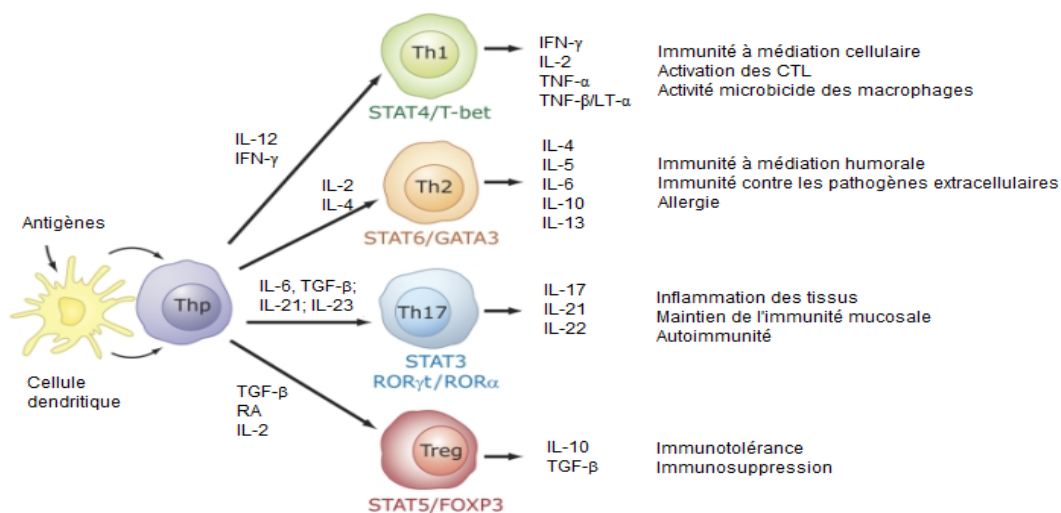


Figure 4. Différenciation des lymphocytes T CD4⁺, facteurs de transcription impliqués, et fonctions effectrices caractéristiques des populations principales. Adaptée de Jetten, Nucl Recep Sign, copyright 2009¹⁶⁰, sous l'autorisation de la licence *Creative Commons Attribution 4.0*.

L'homéostasie entre l'immunité et la tolérance est basée sur l'équilibre des cellules Th effectrices et Treg^{162,163}. L'évaluation clinique de l'évolution de la maladie dans le contexte de l'infection au VIH-1 se fait par le suivi des taux de lymphocytes T CD4⁺ dans le sang périphérique, où la diminution la plus marquée est au niveau des cellules T mémoires CCR5⁺, dont les cellules Th17⁶⁸. *In vitro*, les populations cellulaires les plus permissives sont la lignée Th17 CCR4⁺CCR6⁺, et la lignée Th1/Th17 CXCR3⁺CCR6⁺¹⁶⁴. Ces populations situées dans la muqueuse ne peuvent être restaurées, même après l'initiation de la thérapie¹⁶⁵. La diminution des Th17, associée à une perte de l'intégrité mucoale et une augmentation de la translocation microbienne, représente une mort cellulaire causée directement ou indirectement à la cytopathologie virale¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. En effet, l'infection et la lyse des cellules cibles par le virus n'expliquent qu'une partie de la perte importante des cellules T du GALT. Cependant, la présence/action des protéines accessoires virales, de cytokines proinflammatoires et d'éléments liés à la translocation microbienne, sont en mesure d'induire une activation des cellules T naïves environnantes de façon indépendante de la spécificité du TCR, devenant ainsi activées et effectrices, entraînant potentiellement une apoptose sélective via l'action des CTL ou des NK^{168,169}. Cette activation entraîne l'expression de marqueurs d'épuisement cellulaire, tels CD38, PD-1, LAG-3, TIM-3 et CTLA-4^{170,171}. De plus, le VIH-1 induit une diminution de la génération de lymphocytes T naïfs par le thymus, ainsi qu'une atteinte dans la structure des ganglions lymphatiques⁶⁸. Tous ces éléments participent à une diminution de la survie et de l'expansion des lymphocytes T CD4⁺, contribuant à l'altération du « pool » des lymphocytes T CD4⁺. Graduellement, les lymphocytes T CD4⁺ subit un débalancement dans l'équilibre de ses populations. La fréquence relative des cellules Treg a été trouvée augmentée chez les individus infectés au VIH-1, soit par l'augmentation de leur survie suite au contact avec la gp120, et/ou la différenciation suivant l'interaction avec les DC^{172,173}. La fonction immunomodulatrice des Treg est conservée, préservant ainsi sa capacité à diminuer l'activation immune chronique, mais supprimant les réponses CD4 et CD8 spécifiques pour le VIH¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. De façon générale, une association négative a été trouvée entre la fréquence des Treg et les taux de lymphocytes T CD4⁺, et une corrélation positive avec la charge virale¹⁷³.

Le déclin en lymphocytes T CD4⁺ chez les progressseurs lents est fortement diminué comparativement aux progressseurs. Les lymphocytes T spécifiques pour le VIH chez ces

individus démontrent une conservation de leur polyfonctionnalité ainsi que de leur capacité proliférative, via une réduction dans l'épuisement cellulaire et une augmentation dans leur fréquence relative^{108,177}. Les progresseurs lents et contrôleurs élites démontrent des niveaux similaires, sinon moindres, de Treg comparativement à des individus sains, au niveau du sang et des muqueuses¹⁷³. Toutefois, chez les HESN, la fréquence des Treg est plus élevée au niveau de la périphérie, suggérant ainsi un impact de celles-ci afin de contrer l'infection¹⁷⁸.

2.6.3.3. Lymphocytes T CD8⁺

Les CTL sont des acteurs majeurs dans la réponse antivirale par leur action de cytolysse sur les cellules infectées présentant des peptides viraux via le CMH-I. Pour se faire, elles nécessitent une activation de la part des APC, elles-mêmes préalablement activées par les lymphocytes T CD4⁺. Dans leur mécanisme d'action, les CTL produisent également des cytokines proinflammatoires telles que l'IL-2, MIP-1 β , CD107a, IFN- γ et TNF- α ¹⁷⁹⁻¹⁸³. Dans le contexte de l'infection au VIH-1, la réponse spécifique des CTL contribue au déclin initial de la charge virale lors de la primo-infection, au « set-point » virologique^{70,184}. Les premières réponses sont dirigées contre Env et Nef, puis contre Gag p24 et Pol, ces dernières étant observées dans le maintien de la charge virale¹⁸⁵. Par la suite, sous la pression sélective, de nombreuses mutations surviennent au niveau du génome viral, permettant ainsi l'évasion du virus face à la réponse CD8¹⁸⁶⁻¹⁸⁹. La chronicité de l'infection amène un épuisement cellulaire par l'augmentation du marqueur PD-1, ainsi qu'une perte de leur potentiel fonctionnel^{190,191}.

Quant à eux, les contrôleurs sont associés à des réponses cytotoxiques dirigées contre des épitopes immunodominants conservés, tel que Gag^{192,193}. Leurs CTL sont caractérisés par une production accrue de perforine et granzyme B, et par une conservation de leur polyfonctionnalité, c'est-à-dire leur capacité proliférative ainsi que la production de leurs cytokines proinflammatoires, ce qui a également été observé chez les HESN¹⁹⁴⁻¹⁹⁷.

2.6.3.4. Lymphocytes B

Lors de la séroconversion, il est possible de détecter la présence des premiers anticorps générés contre les protéines de structure du VIH-1. Ceux-ci ne possèdent pas d'activité neutralisante, il faudra attendre jusqu'à au moins 12 semaines suivant l'infection pour détecter

les premiers anticorps neutralisants dirigés contre les glycoprotéines de l'enveloppe¹⁹⁸⁻²⁰¹. Cependant, les mutations virales ainsi que la glycosylation des sites de reconnaissance par les anticorps surviennent rapidement, échappant ainsi à cette réponse immunitaire^{198,199,202}. Toutefois, des études récentes ont permis de détecter la présence d'anticorps capable de neutraliser un large spectre d'isolats viraux dans le sérum de patients infectés au VIH-1. Ceux-ci démontrent une affinité pour le site de liaison à CD4 au niveau de l'enveloppe virale, et ce, malgré la glycosylation de gp120²⁰³. Les caractéristiques quant à la génération et les particularités de ces anticorps ainsi que leur implication dans l'élaboration d'un vaccin seront discutés plus en détail dans la section 4.3. Les études portant sur les anticorps neutralisants dans le contexte d'un contrôle de la progression de l'infection sont conflictuelles. Certaines d'entre elles ont démontrés une plus grande fréquence de ces anticorps chez les contrôleurs par rapport aux progressseurs^{204,205}, alors que d'autres ont démontrées le contraire²⁰⁶⁻²⁰⁹. Les divergences pourraient s'expliquer en partie par l'atteinte plus ou moins grande de l'intégrité immunitaire, par la nature des populations produisant ces anticorps et/ou le contexte immunitaire dans lequel ces anticorps sont générés. Chez les HESN, plusieurs études ont détectées la présence d'IgA spécifiques au VIH-1 au niveau de la muqueuse vaginale, dont les fonctions observées étaient la neutralisation et l'inhibition de la transcytose²¹⁰. Une étude a permis de démontrer que l'activité neutralisante d'IgA dirigé contre le VIH-1 de clade A ou C était associée à une réduction de l'acquisition du virus²¹¹. L'immunité humorale au niveau des muqueuses, site d'acquisition du VIH-1, sera discutée dans la section 4.1.6. Également, l'étude des corrélats de protection associée au vaccin RV144 ont démontré l'importance de la diminution du risque d'infection associée aux IgG plasmatiques se liant aux régions variables V1/V2 de l'enveloppe du VIH-1 (voir section 4.3).

2.6.3.5. Activation immunitaire chronique

L'activation immunitaire chronique chez les individus infectés par le VIH-1 fait partie intégrante de la pathogénèse, et est indicatrice de la progression clinique^{212,213}. Elle est caractérisée par l'activation polyclonale des lymphocytes B²¹⁴, un taux de renouvellement élevé des populations T CD4⁺ et T CD8⁺ accompagné de l'expression accrue de molécules d'activation par celles-ci²¹⁵, et de concentrations élevées de cytokines et chimiokines

proinflammatoires²¹⁶. Elle peut être causée en partie par la présence du virus et de ses produits dérivés, qui seront détectés par les PRR, provoquant ultimement une activation cellulaire non-spécifique²¹⁷. Cependant, de plus en plus d'études mettent à jour le cœur de l'activation persistante du système immunitaire, c'est-à-dire la translocation microbienne^{99,218}. Cette translocation est due à un bris dans l'intégrité de la muqueuse gastro-intestinale, qui entraîne le mouvement d'endotoxines microbiennes vers le sang^{100,219}. Ces éléments sont reconnus par les PRR, tels les « Toll-like receptors » (TLR), causant ainsi une activation non-spécifique de des monocytes, macrophages, DC et lymphocytes B^{96,220-222}. Dès la phase aiguë de l'infection, il est possible de détecter dans le sang des individus infectés au VIH-1 de grandes concentrations de CD14 soluble, qui forme un complexe en se liant à TLR-4 et MD-2, de lipopolysaccharide (LPS), de la protéine se liant à LPS (LBP) ainsi que d'EndoCAb, qui sont des anticorps IgM, IgG et IgA spécifiques pour le noyau de l'endotoxine²²³⁻²²⁵.

2.6.3.6. Cytokines et chimiokines

La production de cytokines lors de l'infection au VIH-1 est un marqueur important de la progression clinique, ainsi que de l'activation immunitaire chronique. Rapidement après l'infection, il est possible de détecter une augmentation transitoire d'IL-15 et d'interféron de type 1 (IFN- α) alors que l'augmentation de l'IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α , IFN- γ et IL-22 perdurent au long de l'infection. L'augmentation d'IL-10 survient par la suite lors de la phase aiguë^{97,226,227}. L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire associée à des fonctions régulatrices au niveau des lymphocytes T, et elle est sécrétée par les DC, les monocytes, ainsi que les cellules T, B et NK²²⁸. Cette cytokine a également le potentiel d'activer les lymphocytes B en permettant leur survie, leur prolifération et la production d'anticorps²²⁹. En revanche, une diminution de la production d'IL-2, IL-12 et d'IFN- α est associée à la progression de la maladie²³⁰. Lors de la phase chronique, une diminution d'IL-21 a été observée, qui est une cytokine principalement produite par les lymphocytes T CD4⁺ folliculaires (T_{FH}) et induit le développement des cellules Th17, maintient les fonctions des lymphocytes T CD8⁺ et régule les cellules T effectrices dans le GALT^{177,231}, en plus de contribuer au raffinement dans la sélection du récepteur des cellules B (BCR) des lymphocytes B au niveau des centres germinatifs²³². Chez les progresseurs, certaines chimiokines ont été

trouvées élevées au niveau du plasma, telles MCP-1 (CCL2), MIP-3 β (CCL19), MIP-3 α (CCL20), SLC (CCL21), MIG (CXCL9), IP-10 (CXCL10), et BCA-1 (CXCL13)²³³. Les chimiokines MIP-3 β et SLC se lient au récepteur CCR7, et permettent la migration vers les ganglions lymphatiques des DC matures et cellules T CD4⁺ naïves et mémoires centrales²³⁴. L'augmentation de la production de ces chimiokines est associée à la progression clinique²³⁵. Également, des niveaux élevés d'IP-10 en primo-infection sont prédictifs d'une progression rapide²³⁶. L'exposition des lymphocytes T CD4⁺ aux ligands de CCR7 (MIP-3 β), CXCR3 (MIG et IP-10) et CCR6 (MIP-3 α) permet l'établissement de la latence virale²³⁷. De plus, dans une cohorte de femmes travailleuses du sexe exposées au VIH-1, les individus infectés au VIH-1 ont présenté une augmentation des chimiokines MCP-3 (CCL7) et de MIG au niveau de leur sang, et de manière beaucoup plus importante au niveau de leurs sécrétions vaginales comparativement à des HESN²³⁸. Les chimiokines MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES sont les ligands naturels de CCR5, et sont associés à une diminution dans le risque de l'infection²³⁹. Ceci s'explique par le fait que la liaison de ces chimiokines à leur récepteur CCR5 entrave la liaison du VIH-1 à son corécepteur, permettant ainsi un blocage dans l'entrée du virus.

3. Cellules dendritiques

3.1. Populations de DC et fonctions

3.1.1. Monocytes et précurseurs de DC

Les monocytes, d'origine myéloïde, sont générés au niveau de la moelle osseuse, et représentent environ 10% des leucocytes du sang périphérique, qui recirculent également au niveau de la rate²⁴⁰. Malgré l'hétérogénéité de ces cellules, certains marqueurs sont exprimés par tous, tels que M-CSF (*macrophage colony stimulating factor receptor*, CD115), et CX3CR1, et produisent plusieurs cytokines et chimiokines (i.e. TNF- α , IL-1 β , CXCL8, IL-6, et l'IL-10)^{revue dans 240}. À ce jour, trois sous-populations sont définies d'après l'expression de CD14 et CD16 (récepteur du fragment cristallisable gamma de type III, Fc γ RIII)^{241,242}. Les monocytes « classiques » constituent la majorité de la population monocyttaire, et expriment les marqueurs CD14⁺⁺, CCR2^{hi} et CD62L (L-sélectine). Ce type est caractérisé par l'absence de CD16, une faible expression d'HLA-DR et de CX3CR1 et d'une grande capacité de

phagocytose^{243,244}. Son équivalent murin (Ly6c⁺) est recruté aux sites d'inflammation en réponse au ligand de CCR2, soit MCP-1 et MCP-3, et peut se différencier en macrophage ou en DC inflammatoire ou Tip-DC, ces dernières pouvant produire de grandes quantités de TNF- α et d'oxyde nitrique^{245,246}. Les monocytes Ly6C⁺ peuvent renouveler les macrophages et DC résidant au niveau de la peau, du tractus gastro-intestinal et des poumons²⁴⁰. Une autre population de monocytes, retrouvée en plus faible fréquence dans le sang périphérique, se distingue de par son expression de CD16, CX3CR1^{hi}, CCR5, et l'absence de CCR2^{244,245}. Les monocytes CD16⁺ partagent plusieurs particularités des DC, soit la présence du CMH-II, de molécules d'interaction et de signalisation cellulaire tel CD40, de co-stimulation tels CD80, CD83 et CD86, d'adhésion moléculaire tels CD11c (sous-unité α X de l'intégrine CR4) et CD54 (ICAM-1)²⁴⁷⁻²⁴⁹. L'équivalent murin des monocytes CD16⁺ est Ly-6C^{lo} (Gr1⁻), CX3CR1^{hi}, CCR2^{lo/neg}, CD62L⁻ et CD11c^{lo}²⁴⁴. Cette population est retrouvée dans les tissus sains ou inflammés, se différencie préférentiellement en DC et possèdent une plus grande capacité à induire la prolifération des lymphocytes T²⁴⁵. Plusieurs études ont démontrées une hétérogénéité dans cette population, et ont proposé deux sous-types, soit CD16⁺CD14⁺⁺ et CD16⁺CD14⁺, connues aussi sous l'appellation intermédiaire et non classique, respectivement^{241,250}. La distinction entre ces deux groupes reste encore à définir, mais certaines caractéristiques attribuées au départ à l'ensemble des monocytes CD16⁺ ont pu être assignées à l'un ou l'autre. Les monocytes non classiques semblent associés à une plus grande production de cytokines proinflammatoires telles que TNF- α et d'IL-1 β , ainsi qu'à une fonction de surveillance de signes d'inflammation ou de dommages tissulaires au niveau de l'épithélium²⁵⁰. La population intermédiaire a été trouvée exprimant plus d'HLA-DR et de gènes liés à la présentation d'antigènes, ainsi qu'à la présence de CD40 et CD54^{248,249}.

Lors de maladies infectieuses ou inflammatoires, l'expansion de la population monocyttaire CD16⁺ a été largement répertorié, où la population intermédiaire semble être en cause. Le nombre de monocytes dans le sang périphérique semble augmenter en raison de leur migration en provenance de la moelle osseuse, où plusieurs études ont démontrées l'importance de CCR2 et ses ligands MCP-1 et MCP-3 dans ce contexte^{250,251}.

3.1.2. Cellules dendritiques myéloïdes

Les DC myéloïdes (mDC) représentent environ 0,5% des cellules mononuclées du sang périphérique chez l'humain. Au niveau du compartiment sanguin, les mDC expriment les marqueurs CMH-II et CD11c, et deux populations se distinguent par l'expression exclusive des récepteurs CD1c (BDCA1) ou CD141 (BDCA3). Une autre population se distingue par l'expression de CD16, qui est aussi appelée Slan-DC^{revue par 252}. La génération de ces cellules s'effectuent à partir d'un progéniteur de DC situé dans la moelle osseuse, mais il est également possible pour les monocytes CD14⁺CD16⁺ de se différencier en DC sous l'effet d'une inflammation aux sites périphériques, tel que mentionné précédemment^{245,246}. Les précurseurs de DC ainsi que les mDC immatures présents dans le sang périphérique expriment à leur surface des récepteurs à chimiokines différents selon leur phénotype, leur permettant ainsi de se localiser dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes produisant leur ligand propre²⁵³. L'expression des récepteurs CCR6 et CX3CR1^{hi} permet la migration de ces cellules en réponse aux chimiokines MIP-3 α et la fractalkine (CX3CL1) vers les tissus situés en périphérie, notamment les muqueuses^{244,253-255}. Les précurseurs de DC, notamment les monocytes CD14⁺ CD16⁺ CX3CR1^{hi}, peuvent ainsi se différencier en DC immatures résidentes²⁵⁶. En conditions inflammatoires, la production de chimiokines par les tissus permet le recrutement de ces cellules. Que ce soit en conditions homéostatiques ou inflammatoires, les différents précurseurs et DC sont en mesure de répondre à une pléthore de chimiokines, entre autres MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α , MIP-5 (CCL15), MCP-3, MCP-4 (CCL13), RANTES, TECK (CCL25) et SDF-1 (CXCL12)²⁵⁷. Dans les sites périphériques en situation homéostatique, les mDC prenant leur origine de précurseurs de DC situé dans la moelle osseuse jouent le rôle de sentinelle immunitaire, où leur capacité de détecter les signaux de danger leur permet de faire le pont entre l'immunité innée et adaptative.

Tel que mentionné précédemment, les mDC possèdent une panoplie de PRR leur permettant de détecter la présence des microorganismes et des signaux de danger. Les PRR les mieux décrits sont les TLR, qui sont situés tant au niveau extracellulaire qu'intracellulaire^{158,258}. Les mDC expriment la majorité des TLR, des lectines de type C, des récepteurs Nod-like (NLR), MDA5 et RIG-1^{259,260}. La liaison d'un PRR de la DC à son PAMP entraîne son activation, ce qui induit une cascade de signalisation permettant ultimement sa

maturation, qui se traduit par l'augmentation du CMH-II (HLA-DR) et de molécules de co-stimulation tels que CD80, CD83 et CD86. Également, cela entraîne une diminution des récepteurs à chimiokines ayant permis la migration de la cellule du sang vers le tissu, mais il y a, en contrepartie, augmentation de récepteur CCR7²⁶¹⁻²⁶³. L'expression augmentée de CCR7 permet la migration des mDC vers les vaisseaux lymphatiques afférents via la lymphe, et auront pour destination les OLS drainants, en réponse à MIP-3 β et SLC exprimées par les cellules endothéliales lymphatiques périphériques et les cellules stromales des ganglions lymphatiques. Une fois entrées par le sinus sous-capsulaire du ganglion drainant, les mDC se déplacent vers les régions riches en cellules T afin d'induire l'activation des cellules T naïves en cellules T effectrices, et ce, par présentation de l'antigène via la synapse immunologique. Les DC peuvent également accéder aux ganglions par la circulation sanguine via la haute veinule endothéliale (HEV). D'autres DC ne sont pas retenues au niveau du ganglion lymphatique, et retournent dans la circulation sanguine par le canal thoracique, ce qui les mèneront à la rate. Elles pourront migrer dans les zones riches en cellules T, ou vers la zone marginale de la rate où elles pourront activer les lymphocytes B de façon T-indépendante^{revue par 253}. D'autres structures lymphoïdes possèdent des cellules B s'apparentant à celles de la zone marginale de la rate, telles que les amygdales, les ganglions et les plaques de Peyer au niveau de l'intestin²⁶⁴. Cette activation des lymphocytes B sera discutée dans la section 4.1.5.

3.1.3. Cellules dendritiques mucoales

Par leur fonction de sentinelles et d'APC, les DC mucoales jouent un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie de l'immunité mucoale, en orchestrant la préservation de la tolérance immunitaire envers le soi, le contrôle de la flore commensale, et la capacité à induire une réponse immune face aux agents pathogènes¹⁵⁷. Au niveau de la muqueuse intestinale, des DC sont retrouvées au niveau de la lamina propria, des follicules lymphoïdes, des ganglions mésentériques et des plaques de Peyer^{265,266}. Elles expriment le marqueur CD1a, permettant la présentation des antigènes de nature lipidique aux lymphocytes T, tel que retrouvé chez certaines DC de la peau et d'autres muqueuses^{252,267,268}. Les modèles murins ont permis d'identifier deux populations de DC de la lamina propria, soit par l'expression de CD103 (α E β 7), récepteur de E-cadhérine, ou de CX3CR1^{269,270}, mais une étude récente les divise en

trois : CD103⁺CD11b⁻, CD103⁺CD11b⁺ et CD103⁻CD11b⁺CX3CR1^{int}²⁷¹. Les DC CD103⁻ ont des niveaux accrus de molécules de co-stimulation et de médiateurs proinflammatoires, alors que les DC CD103⁺ expriment des niveaux plus élevés des molécules CCR6, CCR7, des TLR5 et TLR9, et possède une capacité tolérogénique^{271,272}. Des populations de DC analogues ont été décrites chez l'humain au niveau de l'intestin et des poumons^{269,273,274}.

En condition non inflammatoire, les cellules épithéliales ont également un rôle actif dans la préservation de l'immunité mucoale en contribuant au maintien de l'homéostasie par la modulation de l'activité de ces DC^{275,276}. L'interaction des microorganismes de la flore commensale favorise l'expression de la lymphopoiétine thymique stromale (TSLP) ainsi que de TGF-β²⁷⁷. Leur sécrétion, en plus de RA, est nécessaire à la différenciation des DC tolérogéniques CD103⁺²⁷⁸⁻²⁸⁰. La catalyse de la vitamine A en RA par les DC CD103⁺ est cruciale dans la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs vers un phénotype Treg, impliquant aussi la sécrétion de TGF-β²⁸¹⁻²⁸⁴. Leur champ d'action peut s'étendre tant à la lamina propria qu'aux ganglions mésentériques, via leur expression de CCR7, contrairement aux DC CX3CR1⁺^{269,285}. Sur place, elles peuvent y promouvoir, via la sécrétion de RA, l'expression de CCR9 et d'α4β7 sur les lymphocytes T et B activées, récepteurs des chimiokines liées à l'appel aux muqueuses TECK et MAdCAM-1, respectivement. Les DC CD103⁺ sont alors en mesure d'imprégner aux lymphocytes T et B activés leur établissement au niveau de la muqueuse intestinale, en plus de favoriser la sécrétion d'IgA par les lymphocytes B²⁸⁶⁻²⁹¹ (voir section 4.1.5). Des études ont démontré que la présence de RA *in vitro* est impliquée dans la génération d'un phénotype tolérogénique et mucosal sur des DC dérivées de monocytes (Mo-DC) et de la moelle osseuse^{292,293}.

En présence de stimuli inflammatoires, les DC CD103⁻CX3CR1⁺ induisent une différenciation des Th17, afin de répondre aux agents pathogènes^{269,285}, en plus d'échantillonner le lumen via la formation de protusions ou dendrites transépithéliales^{294,295}. Le maintien de la balance entre la mise en place d'une réponse immunitaire face à des pathogènes et la tolérance envers le soi et la flore commensale est capital, où une défaillance peut soit mener à des manifestations auto-immunes ou une réponse inflammatoire excessive, soit à l'établissement d'infections chroniques ou l'induction de cancers²⁹⁶.

3.1.4. Cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les pDC sont surtout retrouvées au niveau du sang ainsi que dans les tissus lymphoïdes, et entrent dans les ganglions lymphatiques par la circulation sanguine. Ces cellules expriment peu de CMH-II, de CD11c ainsi que de molécules de co-stimulation en situation d'homéostasie, mais expriment les marqueurs CD303 (BDCA2) et CD304 (BDCA4)²⁹⁷. Elles expriment les récepteurs TLR7 et TLR9, qui reconnaissent l'ARN simple brin et l'ADN double brin viraux, respectivement²⁹⁸. De par leur expression constitutive d'IRF7, elles possèdent une capacité à produire rapidement de très grande quantité d'interféron de type I, principalement l'IFN- α , essentiel lors d'une réponse antivirale²⁹⁹. Elle participe à la tolérance via l'expression de l'indoléamine 2,3-désoxygénase (IDO), qui permet la différenciation de cellules T CD4⁺ naïves en Treg³⁰⁰.

3.1.5. Cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans, qui sont dérivées de la moelle osseuse, sont retrouvées au niveau de l'épiderme et des muqueuses. Elles y font une surveillance constante par le biais d'échantillonnage régulier de l'environnement par phagocytose et macropinocytose^{301,302}. Elles expriment les récepteurs CD45, CMH-II, l'E-cadhérine, la molécule d'adhésion cellulaire épithéliale (EpCAM), CD1a, ainsi que de grande quantité de la lectine langérine^{revue par 303}. Les granules de Birbeck, organelles intracytoplasmiques, sont impliquées dans le recyclage endosomal et la dégradation des pathogènes endocytosés³⁰⁴.

3.2. Les cellules dendritiques dans le contexte d'une infection au VIH

3.2.1. Impact du VIH-1 sur les monocytes et les précurseurs de DC

Bien que les monocytes expriment les récepteurs et corécepteurs nécessaires à l'infection productive du VIH-1, ils sont relativement résistants à l'infection par le virus *in vitro*, et cela est dû à la présence de mécanismes de restriction post-entrée, tel qu'APOBEC3G³⁰⁵. Cependant, la permissivité à l'infection est variable selon l'expression des récepteurs CD14 et CD16, où la population CD14⁺⁺CD16⁺, exprimant le plus de CCR5, serait associée à une plus grande permissivité^{306,307}. *In vitro*, la différenciation des monocytes, porteurs du génome viral, en macrophages ou DC peut enclencher l'infection productive dans la cellule^{308,309}. La

progression du VIH-1 est associée à une augmentation en fréquence des monocytes CD16⁺, particulièrement CD14⁺⁺CD16⁺³¹⁰. Des études *in vitro* ont permis de souligner certains aspects de l'implication du virus et de ses facteurs dérivés au niveau des monocytes. La protéine Tat augmente la survie des monocytes via l'expression accrue de la protéine anti-apoptotique Bcl-2³¹¹, et induit aussi, ainsi que Nef et gp160, la production d'IL-10³¹²⁻³¹⁴. Nef est également en mesure d'inhiber la production d'IL-12p40 induite par la présence de LPS³¹⁵. La protéine de la matrice p17 peut se lier au récepteur membranaire p17R, et provoquer la sécrétion de MCP-1 par les monocytes³¹⁶.

3.2.2. Infection et transinfection des cellules dendritiques

Les mDC résidant aux muqueuses sont parmi les premières cellules à rencontrer le VIH lors de l'infection³⁰⁹. Les mDC, les pDC et les cellules de Langerhans sont potentiellement susceptibles à l'infection par le VIH-1, de par leur l'expression de CD4, ainsi que des niveaux variables des corécepteurs CCR5, CXCR4, CCR3, CCR8, CCR9 et CXCR6⁸⁴. Des études *in vitro* ont démontré que l'infection au VIH-1 est possible au niveau des DC immatures³¹⁷⁻³²¹. Toutefois, les cellules de Langerhans sont résistantes à l'infection via l'expression de la langérine à sa surface, causant l'internalisation des particules virales, et bloquant ainsi la transmission^{322,323}. Les pDC sont très peu infectées par le VIH-1, en raison de la présence de facteurs de restriction³²⁴. Il est à noter que le virus peut aussi pénétrer les cellules par endocytose via son interaction avec des lectines de type C, tel que DC-SIGN³²⁵. De plus, les mDC facilitent la dissémination virale via la transmission du virus suite au contact avec les cellules T permissives par un processus nommé la transinfection. La transinfection implique la liaison de la gp120 aux lectines de type C, tel que DC-SIGN, et le complexe DC-SIGN-particule virale est soit internalisé, puis amené à la surface, ou directement transporté au niveau du site de contact entre la DC et la cellule T. Ce site de contact est la synapse infectieuse, où se regroupent également les récepteurs et co-récepteurs du VIH-1, des molécules d'adhésion intercellulaires, et des intégrines. La transinfection peut être réalisée par les DC immatures, mais son efficacité est augmentée avec la maturation des DC revue par 309.

3.2.3. Impact du VIH-1 sur les cellules dendritiques myéloïdes

Lors d'une infection au VIH-1, les mDC se trouvent affectées tant au niveau de leur nombre que de leur phénotype et leur fonction^{revue par 326-330}. D'abord, la fréquence des mDC diminue rapidement, dès la phase aiguë de l'infection et est maintenue au long de la progression de l'infection. La cause de cette diminution n'est pas encore élucidée, mais il a été démontré que la gp120, libre ou en complexes immuns dans le sérum, peut mener à l'apoptose accélérée des DC via sa liaison à DC-SIGN³³¹. Également, une accumulation des mDC dans les tissus lymphoïdes et aux sites d'inflammation a été démontrée³³². La restauration du nombre de mDC suite à l'initiation de la thérapie antirétrovirale est controversée; certains ont démontré un rétablissement des DC, alors que dans d'autres cas, elle reste incomplète^{333,334}. Ensuite, plusieurs études ont pu souligner une altération au niveau de la fonction des mDC, où le consensus reste difficile à atteindre quant à l'impact du VIH-1 sur les DC, ceci s'expliquant en partie par l'utilisation de populations de DC *ex vivo* ou de DC dérivées *in vitro*, ainsi que le type et le stade de progression clinique des patients infectés au VIH-1. Les mDC provenant d'individus infectés ont démontré un niveau d'activation partiel, c'est-à-dire une légère augmentation des molécules de co-stimulation CD40, CD80, CD83, CD86 ainsi que le CMH-II suite à l'exposition au VIH-1³²⁶. Cependant, une accumulation de mDC dans les tissus lymphoïdes, présentant une maturation incomplète, a été associée à un niveau élevée de Treg. *In vitro*, les mDC en présence de VIH-1 sécrète l'IL-10, provoquant ainsi une maturation incomplète des mDC, induisant plutôt un phénotype tolérogénique^{335,336}. Ces mDC semi-matures sont également associées à une augmentation de leur apoptose³²⁶. Au niveau chronique, les mDC ont démontrées des altérations dans la sécrétion d'IL-12, cytokine impliquée dans la différenciation des cellules T CD4⁺ naïves en Th1, mais elles ont démontré une récupération partielle de leur capacité à sécréter l'IL-12 chez des patients sous thérapie antirétrovirale³³⁷. Les études divergent quant à la conservation des DC au niveau de sa fonction d'APC, certaines études démontrant un maintien dans la capacité de stimuler les cellules T après une exposition au VIH-1, alors que d'autres démontrent une diminution de ces fonctions^{321,324,338-341}. *In vitro*, la présence de Vpr avec des Mo-DC inhibe l'expression des molécules de co-stimulation CD80, CD83 et CD86, ainsi que l'IL-12, mais est accompagnée d'une production d'IL-10^{342,343}. La présence de gp120 sur les Mo-DC augmente l'expression

de ces mêmes molécules de co-stimulation, accompagnée d'une augmentation de CD40 et du CMH-II et d'une diminution de la fonction phagocytaire³⁴⁴. Tel que mentionné précédemment, Nef est en mesure de provoquer des altérations phénotypiques observées chez les mDC.

3.2.4. Impact du VIH-1 sur les cellules dendritiques plasmacytoïdes

Comme pour les mDC, la fréquence des pDC du sang est diminuée dès la phase aigüe de l'infection au VIH-1, et la restauration des pDC suite au traitement antirétroviral est également controversée^{324,333,334}. Un niveau élevé ou stable de pDC est associé au contrôle de la progression³⁴⁵. Aussi, le VIH-1 active les pDC via la stimulation de TLR7, résultant à une production d'IFN- α ^{346,347}. Cependant, dans le contexte de l'infection au VIH-1, des altérations dans la production d'IFN- α sont associés à la progression clinique et à l'apparition de maladies opportunistes, et sont en lien avec la diminution des pDC³⁴⁸. Une concentration élevée d'IFN- α est associée avec la chronicité de l'infection et l'activation immune dont les pDC seraient responsables³²⁵. De plus, une augmentation de TRAIL à la surface des pDC peut causer l'apoptose des lymphocytes T CD4^{+349,350}. D'autre part, les pDC sont importantes dans la suppression de la réponse immunitaire face au VIH-1 via l'expression de l'IDO induite par le VIH-1, et où des taux élevés sont associés à la progression clinique. Via ce mécanisme, les pDC ont un effet inhibiteur sur la prolifération des lymphocytes T CD4⁺, mais sont en mesure d'induire la différenciation de cellules T CD4⁺ naïves en Treg^{300,324,351,352}.

4. Lymphocytes B

4.1. Différenciation des lymphocytes B et fonctions des différentes populations

Tout au long du développement et de la différenciation des lymphocytes B, des points de contrôle sont présents afin de contrôler le « pool » de lymphocytes autoréactifs, tant au niveau de la moelle osseuse (tolérance centrale) qu'au niveau des OLS (tolérance périphérique).

4.1.1. Développement des cellules B dans la moelle osseuse

Le développement des lymphocytes B débute au niveau de la moelle osseuse, où le progéniteur lymphoïde commun génère des cellules pro-B, qui subissent un réarrangement des segments D et J de la chaîne lourde au niveau des gènes des Ig, puis un réarrangement des

segments V et D-J. La cellule est nommée pré-B une fois la chaîne lourde du BCR réarrangé. Alors, celle-ci est exprimée à la surface sous forme de pré-BCR, avec une chaîne substitut constituée de VpreB et $\lambda 5$, et CD79 (Ig α et Ig β). Le pré-BCR doit permettre la signalisation via une stimulation tonique indépendante des antigènes. Si tel est le cas, il y a arrêt du réarrangement de la chaîne lourde, et enclenchement du réarrangement des segments V-J de la chaîne légère. Une fois le développement du BCR sous forme IgM complété, les cellules B sont nommées immatures/de transition (TI)^{revue par 353-355}. À ce stade du développement, il est reconnu que le BCR possède un fort potentiel d'auto-réactivité, c'est-à-dire qu'il est en mesure de reconnaître et de se lier aux antigènes du soi. Afin d'instaurer une tolérance centrale, les cellules B TI subissent un premier point de contrôle par sélection négative avant de quitter la moelle osseuse, et ce, basé sur l'avidité de son récepteur. Si le BCR ne reconnaît pas d'antigène du soi, la cellule B quitte la moelle osseuse vers les OLS situés en périphérie. Par contre, lorsque le BCR se lie avec une très grande affinité à un auto-antigène, une correction peut s'effectuer via l'édition du récepteur, un processus de réarrangements successifs des segments V-J de la chaîne légère. Si l'auto-réactivité persiste malgré tout, il y a délétion clonale de la cellule B, qui entrera en apoptose^{revue par 356,357}.

4.1.2. Maturation dans les organes lymphoïdes secondaires

Une fois quitté la moelle osseuse, les cellules B TI se dirigent, via la circulation sanguine, vers les OLS situés en périphérie, c'est-à-dire la rate, les ganglions, les amygdales et les plaques de Peyer au niveau de l'intestin, où aura lieu leur maturation. Ces cellules constituent une population hétérogène, se divisant en plusieurs groupes et/ou stades de différenciation basés sur différents marqueurs phénotypiques et caractéristiques fonctionnelles, soit T1, T2 et T3^{358,359}. Les populations T1 et T2 expriment le marqueur CD10 contrairement à la population T3. Au cours de la différenciation de T1 vers T2, puis T3, il y a augmentation et diminution progressive du marqueur d'activation CD21 (CR2, récepteur du complément 2) et d'IgM, respectivement. D'autres marqueurs sont également utilisés pour caractériser ces populations immatures, tel que CD27, CD23 (Fc ϵ RIII), CD24 et CD38³⁶⁰⁻³⁶³. La molécule de co-stimulation CD27, membre de la famille des récepteurs de TNF, se lie à CD70³⁶⁴, et CD38 est associée, entre autres, à l'activation et la prolifération des cellules B³⁶⁵. La maturation des

cellules B TI génère les cellules B naïves (CD19⁺CD27⁻), dont fait partie les cellules B folliculaires (IgM^{int/lo} IgD^{hi}) et les cellules B de la zone marginale (IgM^{hi}IgD^{lo} CD21^{hi}CD23^{lo}CD1c+). Les cellules B folliculaires, localisées aux follicules des OLS, forment une partie importante du « pool » des cellules B, et participent à la réponse immune adaptative via une coopération avec les lymphocytes T (section 4.1.3)^{360,366}. Quant aux cellules B de la zone marginale, elles sont abordées dans la section 4.1.4. Les cellules B naïves n'ont pas encore rencontré leur antigène spécifique et complètent leur différenciation au niveau des OLS, et sont caractérisées par leur recirculation dans le compartiment sanguin. Lors de certaines conditions pathologiques, les cellules B naïves se différencient de façon préférentielle en cellules B de la zone marginale^{264,360} (voir section 4.1.4).

Dès le stade T2 des cellules B, une signalisation tonique via le BCR, c'est-à-dire indépendante d'un antigène, en plus de la liaison de BLyS à son récepteur BAFF-R sont essentiels à leur maturation en plus de leur survie³⁶⁷. Effectivement, en absence de signal de survie, les cellules ne peuvent persister et meurent par apoptose après trois à quatre jours. Le facteur de croissance/cytokine BLyS, aussi appelé BAFF, est retrouvé sous forme membranaire ou soluble, et est produit par plusieurs types cellulaires de nature hématopoïétique ou non. Les neutrophiles, les monocytes, les macrophages et les DC sont toutefois les producteurs principaux de BLyS^{revue dans 368}. Les récepteurs de cette cytokine sont l'antigène de maturation des cellules B (BCMA), « transmembrane activator, calcium modulator, and cyclophilin ligand interactor » (TACI) ainsi que le récepteur de BAFF (BAFF-R)³⁶⁹, retrouvés à différents niveaux d'expression sur les cellules B selon leur stade de maturation, de différenciation et leur localisation^{370,371}. Le rôle de BLyS et de son récepteur BAFF-R ont été mis en lumière chez les souris déficientes en BLyS ainsi que BAFF-R, où la maturation des cellules B est arrêtée au niveau du stade T1, et sont caractérisées par l'absence de cellules B matures folliculaires et de la zone marginale³⁷²⁻³⁷⁴. De plus, le stade T2 des cellules B a été démontré comme étant très réceptif et sensible quant à l'activation par BLyS^{375,376}. Dans la population B TI, il a été démontré que plus de la moitié d'entre elles possède un potentiel autoréactif³⁷⁷. En conditions homéostatiques, une stimulation faible du BCR ou une signalisation tonique de celui-ci est balancé par la liaison de BLyS à BAFF-R, permettant donc la survie de la cellule B. Cependant, lorsqu'il y a une stimulation trop élevée

du BCR, qui peut être associée à la liaison de ce dernier à un antigène du soi, cela entraîne une cascade de signalisation menant à son apoptose, et qui ne peut être contrebalancée par la liaison de BLyS à BAFF-R^{revue dans 371,378}. Par contre, ils existent des conditions pathologiques où BLyS est retrouvée en excès telles que dans les maladies autoimmunes suivantes : lupus érythémateux systémique (SLE), syndrome de Sjögren, arthrite rhumatoïde. Alors, les signaux de survie entraînés par BLyS via BAFF-R viennent à bout des signaux d'apoptose causés par la liaison du BCR à un antigène du soi, provoquant par le fait même la survie et l'activation de cellules B autoréactives³⁷⁹⁻³⁸³. Dans d'autres cas, si l'affinité pour l'antigène du soi est faible et/ou en absence de co-stimulation, la cellule B peut entrer dans un état d'anergie, devenant ainsi réfractaire aux signaux d'activation induit par la reconnaissance d'antigène et présente une diminution dans sa durée de vie, malgré la rétention de sa capacité à lier un antigène. L'anergie participe donc à l'établissement de la tolérance périphérique³⁵⁶. Cependant, il est à noter que cet état est transitoire, et la cellule B peut être réactivée lorsqu'elle n'est plus en présence de son antigène, ou bien en présence de signaux activateurs et/ou de survie élevées, telle qu'une surexpression de BLyS³⁸⁴⁻³⁸⁶.

L'architecture des différents OLS permet des interactions avec plusieurs types cellulaires. Le développement et le maintien de ces structures immunitaires sont basés sur l'expression de cytokines, particulièrement celles provenant de la famille des TNF et de leurs récepteurs. TNF- α permet la formation des centres germinatifs et LT- α est impliqué dans le développement des ganglions lymphatiques et des plaques de Peyer dans l'intestin, tout comme TRANCE³⁸⁷⁻³⁸⁹. La localisation des cellules B à l'intérieur même des OLS est médiée par l'interaction de chimiokines et de leurs récepteurs. Les DC folliculaires (FDC) et les cellules réticulaires marginales sécrètent CXCL13, permettant ainsi aux cellules B exprimant CXCR5 d'accéder aux follicules. L'expression de CXCL13 est dépendante de la cytokine LT- α 1 β 2, sécrétée par les cellules B, contribuant ainsi à une production maximale de CXCL13, et d'une maturation du réseau de FDC. Quant à elles, les cellules T utilisent CCR7 pour se nicher au niveau de la zone T via l'expression de CCL19 et CCL21. Les cellules B naïves exprimant moins de CCR7, mais plus de CXCR4 et CXCR5, elles peuvent pénétrer les OLS à partir du sang et se localiser au niveau de la zone B. Ces organes sont importants dans la production d'anticorps spécifiques et dans la génération de la mémoire immunitaire^{revue dans 390}.

4.1.3. Réponse T-dépendante

L'activation des lymphocytes B de façon T-dépendante nécessite l'implication des DC et de lymphocytes T auxiliaires activés. Le premier signal nécessaire à la réponse T-dépendante est la reconnaissance du lymphocyte T, via son TCR, à son antigène spécifique présenté par le CMH-II d'une DC. Simultanément, la liaison de l'antigène natif apparenté au BCR de la cellule B naïve permet son activation et sa migration vers la jonction des zones des cellules B et des cellules T. Ensuite, des signaux sont fournis via les molécules de présentation et de co-stimulation entre les cellules B et les cellules T, et les cellules T et les DC, tel que la liaison entre le CD40L présent sur les cellules T et le CD40 sur les cellules B et les DC. *In vivo*, il a été démontré que le signal fourni via le BCR module la cellule B de manière à être permissive à la signalisation de CD40-CD40L donnée par le lymphocyte T CD4⁺ auxiliaire³⁹¹. Les cytokines sécrétées constituent un troisième signal d'activation. C'est la signalisation par la molécule CD40 qui permet la formation des centres germinatifs, la commutation isotypique de classe, l'hypermutation somatique et la différenciation des cellules B naïves en plasmablastes, puis en plasmocytes³⁹²⁻³⁹⁵. Tout ce processus est hautement influencé par la nature et la dose de l'antigène, de la spécificité et de l'affinité du BCR, en plus de l'environnement cytokinique. En général, une forte affinité du BCR pour son antigène conduira la cellule B à se différencier en plasmocytes producteurs d'anticorps à courte durée de vie, alors que l'affinité moyenne initiera une différenciation en plasmocytes à plus longue durée de vie. Ces plasmocytes génèrent des anticorps de type IgM, mais peuvent être soumis à la commutation isotypique de classe dans les sites tels que les amygdales ou la muqueuse intestinale. Si l'affinité est faible, les cellules subiront une maturation d'affinité de leur BCR ainsi que la commutation de classe au niveau des centres germinatifs^{392,393,396,397}.

Les centres germinatifs sont des structures transitoires et dynamiques, et permettent une maturation de l'affinité et de l'avidité du BCR par l'interaction entre les cellules B, les lymphocytes T folliculaires auxiliaires (T_{FH}) et les FDC. Ils sont divisés en deux zones, soit la zone sombre et la zone claire. La zone sombre est caractérisée par une accumulation de cellules B présentant une très grande prolifération, appelées centroblastes, en plus d'être le lieu où se produit la commutation isotypique de classe et la mutation hypersomatique. Les centroblastes, cessant de se diviser, migrent ensuite à la zone claire et portent le nom de

centrocytes, exprimant alors à leur surface un BCR ayant subi une maturation. La zone claire contient également les FDC et les T_{FH}, ces dernières étant impliquées dans la sélection et génération de cellules mémoires et de plasmocytes à longue durée de vie. À ce stade, les centrocytes présentent une très grande sensibilité à l'apoptose, et nécessitent plusieurs signaux fournis via le BCR, les FDC et les T_{FH}, afin d'assurer leur survie et leur sélection ^{revue par 398-401}. Les FDC interagissent avec les centrocytes via la synapse immunologique, impliquant la reconnaissance du BCR à l'antigène sous sa forme native lié à des complexes immuns à la surface des FDC, ainsi que l'interaction entre les molécules d'adhésion LFA-1 et ICAM-1⁴⁰². Les FDC sécrètent de l'IL-6 et BLyS, facteurs de croissance et de survie pour les cellules B⁴⁰³⁻⁴⁰⁵, en plus de délivrer des signaux importants dans la structure des centres germinatifs, tel CXCL13, où ces derniers nécessitent la présence de LT- α et de CXCL13 pour leur développement^{400,406,407}. Une fois activées, les T_{FH}, qui expriment de hauts niveaux de CXCR5, ICOS et BCL-6, sécrètent des cytokines et des facteurs possédant un potentiel de sélection, de croissance et de survie pour les cellules B, c'est-à-dire IL-4, IL-21 et CD40L^{408,409}. Les lymphocytes T_{FH} sont impliqués dans la génération des cellules B mémoires via l'interaction de différentes molécules, telles que CD28/CD86, CD40L/CD40, ICOS/ICOSL, CD84/CD84, ainsi que la production d'IL-21^{408,410}.

Les cellules mémoires (CD27⁺IgM⁻) vont ainsi patrouiller entre les OLS en quête de leur antigène, ce qui engendrera éventuellement un processus similaire de différenciation³⁹². Ils semblent exister plusieurs types de cellules B mémoires, où des cellules B exprimant IgM ont été trouvées circulant dans le sang, mais n'exprimant très peu ou pas d'IgD, contrairement aux cellules B naïves folliculaires IgM^{int/lo}IgD^{hi}⁴¹¹. Il est intéressant de noter que ces cellules B mémoires IgM sont apparentées aux cellules B de la zone marginale⁴¹². Une proportion de plasmocytes à long terme ira se loger notamment dans la moelle osseuse et assurera un titre en anticorps spécifiques, ce dernier processus étant dépendant de la disponibilité de facteurs de survie et impliquant une compétition pour le maintien d'une niche³⁹².

4.1.4. Cellules B de la zone marginale

Tel que mentionné précédemment, certaines cellules B immatures, plutôt que se différencier en cellules B folliculaires, deviendront des cellules B de la zone marginale^{264,413}.

Elles ont été appelées ainsi d'après leur localisation dans les sinus marginaux de la rate de la souris. Malgré l'absence de ces structures au niveau de la rate chez l'humain, il y a tout de même existence d'une zone marginale qui se situe entre le follicule et la zone périfolliculaire^{264,414}. De par leur localisation, ces cellules possèdent un contact étroit avec des DC et des granulocytes en plus des antigènes transportés par le sang⁴¹⁴⁻⁴¹⁶. Des cellules B partageant des caractéristiques similaires à celles-ci ont été trouvées au niveau de la paroi intérieure des sinus subcapsulaires des ganglions lymphatiques, l'épithélium des cryptes des amygdales et des plaques de Peyer⁴¹³. Elles ont été démontrées comme étant recirculantes chez l'humain, contrairement à la souris^{412,417}. Les cellules B de la zone marginale font partie d'une population hétérogène, qui sont caractérisées par les marqueurs suivants : $IgM^{hi}IgD^{low}CD1c^{+}CD21^{hi}CD23^{-}CD27^{+}$ ^{412,416,418}. Elles constituent une réponse rapide de première ligne. Leur activation peut se produire par le contact avec un antigène circulant dans le sang, ou par les DC présentant l'antigène dans sa forme native. Une fois activées, elles prolifèrent et se différencient très rapidement en plasmablastes de courte durée de vie sécrétant des IgM^{415,416,419,420}. Elles sont également en mesure de produire des IgG et des IgA via la commutation isotypique de classe par un mécanisme de réponse T-indépendante^{421,422}, abordé dans la prochaine section, et peuvent subir l'hypermutation somatique^{423,424}. Ces cellules présentent un BCR polyréactif qui est en mesure de reconnaître plusieurs motifs moléculaires des pathogènes, s'apparentant ainsi aux TLR, ces derniers étant d'ailleurs nombreux chez ces cellules B⁴²⁵. De plus, elles sont impliquées dans l'immunité face à des pathogènes possédant une capsule de polysaccharides tels que *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* et *Neisseria meningitidis*⁴²⁶⁻⁴²⁸. Les cellules B de la zone marginale répondent préférentiellement de façon T-indépendante face aux pathogènes, mais sont également en mesure de répondre de façon T-dépendante⁴²⁹⁻⁴³². Elles démontrent une plus grande indépendance face aux signaux induits par CD40, mais en contrepartie, nécessite des signaux via les TLRs ou TACI. Effectivement, les patients ayant des déficiences dans des molécules de signalisation des TLRs et TACI, tels que MyD88, TIRAP ou IRAK4, ont démontré une perte sélective en cellules B de la zone marginale^{425,433,434}.

4.1.5. Réponse T-indépendante

Certains antigènes ont la capacité d'initier la différenciation des cellules B sans l'aide des cellules T auxiliaires, et sont divisé en deux groupes, soit TI-1 et TI-2. Les antigènes du groupe TI-1 induisent la prolifération et la différenciation en cellules B sécrétrices d'anticorps indépendamment du BCR, tel que le LPS par la stimulation du TLR4 chez la souris, et l'ODN par la stimulation du TLR9 chez l'humain⁴³⁵. La différenciation et l'activation des cellules B par les antigènes appartenant au groupe TI-2 requièrent une signalisation via le BCR ainsi que via les PRR. Tous les types de cellules B naïves et mémoires peuvent répondre de manière extra-folliculaire aux antigènes TI-1, mais il n'y a que les cellules B de la zone marginale et les cellules B-1 qui sont en mesure de le faire avec les antigènes de type TI-2^{revue dans 393,435,436}.

Contrairement à la réponse T-dépendante qui peut prendre de cinq à sept jours à se développer, la réponse T-indépendante enclenche le développement de plasmablastes à courte durée de vie sécrétant des anticorps de type IgM, IgG ou IgA de faible affinité à l'intérieur de un à trois jours après l'exposition d'un antigène dans la circulation sanguine^{419,437,438}. Les DC, les macrophages et les neutrophiles produisent les cytokines BlyS et APRIL toutes deux apparentées, qui promeuvent la survie des cellules B, la production des anticorps ainsi que la commutation isotypique de classe^{416,425,439-442}. Les DC augmentent la production de ces cytokines en réponse aux TLR, ainsi qu'aux IFN de type I et IFN γ ^{441,443}. Chez la souris, la production de BlyS via la stimulation par l'IFN γ implique la voie de signalisation de STAT1, et est régulé de façon négative par le facteur de transcription AIRE⁴⁴⁴. BlyS et APRIL agissent comme molécules de co-stimulation via leur liaison avec TACI, fortement exprimé au niveau des cellules B de la zone marginale, et augmenté en réponse aux TLRs. TACI peut, d'une part, agir avec les TLR afin d'induire la commutation isotypique de classe et la production d'anticorps via MyD88, IRAK1, IRAK4 et les protéines TRAF, et d'une autre part, interagir avec le BCR et CD40^{425,445}. La maturation des plasmablastes est complétée par la présence de l'IL-6, des IFNS de type I et de CXCL10^{446,447}.

4.1.6. Réponse des lymphocytes B aux muqueuses

Une majorité du « pool » de lymphocytes B et T se situe aux tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT), un vaste réseau interconnecté dont fait partie le GALT. La

réponse des cellules B aux muqueuses a été principalement étudiée au niveau du GALT et des plaques de Peyer chez la souris, et au niveau des amygdales chez l'humain. Tel que mentionné précédemment, l'établissement d'une balance entre l'immunité et la tolérance est capitale au niveau des muqueuses, de par l'interaction avec la flore commensale ainsi que des pathogènes. Les lymphocytes B y participent également via la mise en place de réponses T-dépendantes et T-indépendantes, où l'isotype dominant aux muqueuses intestinales est de loin l'IgA^{revue dans 448}. Une particularité de la réponse aux muqueuses est la compartimentalisation de la réponse immune mucosale au niveau des ganglions mésentériques, sans qu'elle n'atteigne la circulation sanguine, la rate ou le foie, qui se précarise si l'homéostasie est altérée.⁴⁴⁹⁻⁴⁵².

Tel que décrit précédemment, lors d'une réponse T-indépendante, les DC au niveau de la lamina propria sont en mesure de présenter l'antigène non-processé aux cellules B, permettant leur activation via le BCR ou les TLR. En présence de leurs ligands, les TLR induisent la production de BLyS et APRIL, via la signalisation par NF- κ B, par les DC, les monocytes, les macrophages et les cellules épithéliales^{425,439,441,443}. La commutation de classe et la production d'IgA est induite lors de la liaison de ces cytokines au récepteur TACI⁴⁵³⁻⁴⁵⁶. Les cellules épithéliales sont en mesure de produire TSLP, qui favorise la sécrétion d'APRIL et de BLyS, ainsi que la sécrétion de TGF- β et d'IL-10 par les DC, qui sont des facteurs importants dans la modulation de l'activation des cellules B^{275,443,457-459}. RA ainsi que l'IL-6 produit par les DC CD103⁺ est nécessaire dans la génération de plasmocytes IgA⁺²⁸⁹. L'activation des cellules B par RA permet une expression élevée des récepteurs de rétention aux muqueuses α 4 β 7 et CCR9^{460,461}. La réponse T-indépendante aux muqueuses nécessitent donc une interaction étroite entre les cellules épithéliales, les DC et les cellules B⁴⁶². Quant à elle, la réponse T-dépendante de l'immunité mucosale s'effectue notamment au niveau des Plaques de Peyer, structure lymphoïde contenant des centres germinatifs. Le maintien de ces centres germinatifs requiert une exposition constante aux divers antigènes. Effectivement, le nombre de centres germinatifs diminuent drastiquement après l'élimination de la flore commensale par l'antibiothérapie, et sont carrément inexistant chez le modèle murin ne possédant aucun germe (*germ free mice*)⁴⁶³. Ils est intéressant de noter qu'il est proposé que la formation de centres germinatifs au niveau des Plaques de Peyer est indépendante de la spécificité du BCR, mais serait plutôt induite par la stimulation de la voie des TLR, impliquant

potentiellement MyD88^{464,465}. Les lymphocytes T CD4⁺FoxP3⁺ régulatrices sont nécessaires quant à la formation des centres germinatifs des Plaques de Peyer, où elles sont dérivées en lymphocytes T_{FH}^{466,467}. La génération préférentielle de plasmablastes IgA⁺ demande la présence de TGF-β1, ainsi que celle de CD40L. L'IL-21 sécrétée par les T_{FH} agit en synergie avec TGF-β1 afin d'augmenter la prolifération et la différenciation des plasmablastes IgA⁺. L'interaction entre les cellules épithéliales et les DC, et les produits métaboliques et cytokines qui en résultent contribuent également à l'élaboration d'une réponse IgA⁺ T-dépendante^{229,462,468}.

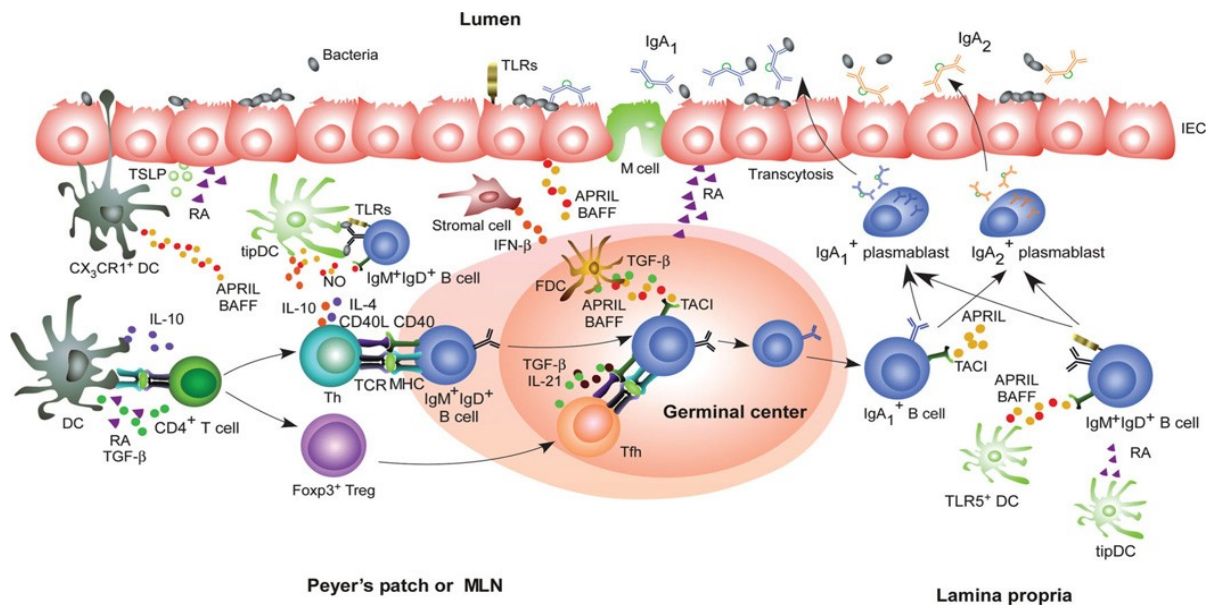


Figure 5. Réponse T-dépendante et T-indépendante aux muqueuses. Tirée de Cerutti *et al*, Ann NY Acad Sci, copyright 2011⁴⁵⁵, et reproduit avec l'autorisation de John Wiley and Sons.

Macpherson et collègues ont investigué la mémoire mucoale via l'utilisation d'un modèle murin ne portant aucun germe, et par la mono-colonisation de ce dernier. Ils ont déterminé que la génération de plasmocytes IgA⁺ spécifiques est possible, mais nécessite une dose importante d'antigènes commensaux. De plus, en présence d'un seul antigène, la persistance d'un plasmocyte IgA⁺ est possible sur une longue durée, mais sa durée de vie diminue drastiquement dès lors qu'il y a introduction d'autres agents commensaux induisant la génération de nouveaux plasmocytes IgA⁺^{448,469}. La génération de la mémoire aux muqueuses pour un antigène donné est conservée seulement de par son exposition constante, car elle est perdue en cas de bris de cette exposition. La flore commensale induit une stimulation

constante du GALT, façonnant ainsi le répertoire des plasmocytes IgA⁺ en fonction des micro-organismes présents en grande quantité, et contribue au maintien de ces populations B de la niche mucoale, de par leur grande pression sélective sur celles-ci^{448,469-471}.

4.1.7. Fonctions des lymphocytes B

4.1.7.1. Fonctions effectrices des anticorps

En bref, les IgM sécrétées sont des Ig pentamériques et sont principalement retrouvés au niveau du sang. Ils sont responsables de la réponse primaire, due au fait qu'ils peuvent être produits sans la commutation isotypique de classe, et présentent une haute avidité lors d'une première rencontre antigénique. Ces Ig sont particulièrement efficaces dans l'activation du système du complément, entraînant ainsi la cytolysse des agents pathogènes, l'opsonisation permettant la phagocytose et l'activation du système immunitaire^{472,473}. Les IgD sont peu sécrétées et possèdent une fonction de régulation de l'activation des cellules B, et ont un rôle dans l'activation des basophiles et des mastocytes⁴⁷⁴. La commutation isotypique de classe est un réarrangement de la région constante des Ig, permettant ainsi de changer la fonction de l'anticorps. Les IgG sont générées après une première étape de commutation de classe, et sont également les principales retrouvés dans le sang. Contrairement aux IgM, les IgG sont en grande partie issues de centres germinatifs et ont subi des hypermutations somatiques, ce qui a permis d'augmenter leur affinité face à l'antigène⁴⁷⁵. En plus de l'activation du système du complément et de l'opsonisation, cette Ig possède une fonction de neutralisation, lui permettant de bloquer l'entrée de bactéries, de virus ou de toxines, et celle d'induire la cytotoxicité cellulaire dépendante d'un anticorps (ADCC) via la liaison de la portion Fc de l'IgG à la cellule infectée⁴⁷⁶. Les IgA monomériques sont retrouvées dans le sang alors qu'au niveau des muqueuses ainsi qu'au niveau du lait maternel elles sont dimériques, soit deux Ig d'isotype A qui sont jointes via la chaîne sécrétoire, et sont associées à une protection et/ou un contrôle face aux pathogènes ou à la flore commensale, respectivement^{477,478}. Les IgA dimériques sont principalement retrouvés au niveau du mucus, et peuvent se lier à leur antigène, favorisant son évacuation naturelle en plus de bloquer sa transcytose, qui consiste à traverser les cellules épithéliales⁴⁷⁹. Les IgE sont associés à une réponse antiparasitaire reliées aux fonctions effectrices des éosinophiles, ainsi qu'aux allergies⁴⁸⁰.

4.1.7.2. Cellules B régulatrices « Breg »

Les cellules B sont connues pour leur production d'anticorps, mais elles sont également des APC, et peuvent moduler les réponses des lymphocytes T via l'expression de molécules et la production de cytokines effectrices ou régulatrices selon le contexte immunitaire⁴⁸¹. Les cellules B ont démontré des capacités immunorégulatrices par la production de la cytokine IL-10. Cependant, il n'existe actuellement pas de marqueurs propres aux Breg qui permettent de les identifier exclusivement. Toutefois, plusieurs études tentant de caractériser cette population convergent vers des populations immatures et/ou de la zone marginale, ou même mémoires présentant l'expression des marqueurs phénotypiques tels que CD19⁺CD21^{hi}CD23^{hi}CD24^{hi}IgD^{hi}IgM^{hi}CD1d^{hi}CD38^{hi}CD5⁺CD10⁻CD1c⁺^{482,483}. Le groupe de Lampropoulou a proposé que les Breg prennent origine des cellules B naïves folliculaires, où ces dernières gagneraient un phénotype suppresseur par des signaux venant de la stimulation des TLR, amplifié par l'engagement du CD40 et du BCR⁴⁸⁴. Ce modèle est en contradiction avec d'autres expériences qui ont démontrées que les cellules B folliculaires sont la population produisant le moins d'IL-10 et ne possédant pas de fonction suppressive⁴⁸⁵. De plus, des études menées sur la souris déficiente en Gai2, soit déficiente en cellules de la zone marginale et T2-MZP, c'est-à-dire les cellules B TI de stade T2 précurseur de la zone marginale, ont démontrées que cette dernière développe une colite spontanée, malgré un nombre et une fréquence normale de cellules B folliculaires⁴⁸⁶. Le groupe de Mauri propose donc que les Breg proviennent d'un progéniteur commun, soit les T2-MZP⁴⁸³. Ces cellules sont à un stade immature du développement, programmées pour répondre rapidement et ont un fort potentiel autoréactif⁴⁸⁷.

Les fonctions des Breg sont intimement liées aux fonctions de sa cytokine produite, l'IL-10. Tout d'abord, l'IL-10 permet la suppression de l'inflammation en diminuant la production de cytokines proinflammatoires telles que l'IFN- γ et l'IL-17, ainsi que la diminution de l'expression du CMH-II⁴⁸⁸. L'IL-10 est également nécessaire au maintien de l'expression de Foxp3 et des fonctions des Treg^{489,490}. La relation entre les Breg et les Treg a d'ailleurs été soulignée dans plusieurs modèles murins⁴⁹¹⁻⁴⁹³.

Dans des pathologies inflammatoires et autoimmunes chez des modèles murins, les Breg sont associées à un maintien de la balance au niveau des réponses Th1 et Th17 et des réponses Treg, ainsi qu'à une diminution de l'inflammation accompagnée d'un délai dans le

déclenchement des pathologies. Chez des souris déficientes en Breg, il a été démontré qu'elles développaient une arthrite plus sévère, où l'absence des Breg est associée à une réduction du nombre de Treg et de l'expression de Foxp3, et ce, en faveur d'une réponse arthritogénique Th17 et Th1 au niveau des ganglions lymphatiques et au site de l'inflammation. C'est seulement par le transfert de T2-MZP exprimant IL-10, mais non des cellules B folliculaires, qu'il a été possible de rétablir le nombre de Treg dans ces souris⁴⁹⁴. Également, chez le modèle murin EAE pour la sclérose en plaques, une déficience pour la production d'IL-10 seulement au niveau des lymphocytes B a provoqué chez ces dernières une aggravation des symptômes de la maladie, caractérisée par une augmentation de la réponse Th1⁴⁹⁵.

Au niveau de l'humain, les Breg semblent présenter un phénotype et une fonction similaire à celle retrouvée chez son homologue murin. Elles ont été étudiées dans les maladies autoimmunitaires telles que la sclérose en plaques, où le nombre et la fonction semblent faire défaut^{496,497}, et contribuent à la réponse Th2 induite par une infection aux helminthes⁴⁹⁸. Le tableau devient plus complexe dans le cas du SLE ou de l'arthrite rhumatoïde, où les cellules B produisent plus d'IL-10 que chez les individus sains^{499,500}. Par contre, les cellules B CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} isolées des patients atteints de SLE sont incapables de produire de l'IL-10 *in vitro* en réponse à une stimulation via le CD40, mais sont en mesure de le faire suite à une stimulation de l'agoniste du TLR9, et ne peuvent inhiber la réponse Th1⁵⁰¹. Dans un contexte d'infection virale, une étude a démontré que les Breg semblaient associées à une diminution de la réponse T CD8⁺, ce qui est favorable pour l'agent infectieux viral⁵⁰².

4.2. Lymphocytes B dans le contexte d'une infection au VIH

4.2.1. Infection des lymphocytes B et transmission

Certaines études *in vitro* ont démontré que les lymphocytes B peuvent être infectés par le VIH-1, ou transmettre le virus aux lymphocytes T. Cependant, la réplication virale du VIH-1 *in vitro* dans les cellules B nécessite une stimulation via CD40^{503,504}. Le VIH-1 peut se lier aux lymphocytes B via son récepteur CD21, ainsi qu'au récepteur DC-SIGN, pouvant faciliter la transmission aux lymphocytes T⁵⁰⁵⁻⁵⁰⁷. Toutefois, aucune étude à ce jour n'a pu démontrer une réplication productive du virus au niveau des lymphocytes B *in vivo*.

4.2.2. Activation polyclonale

La dérégulation des cellules B survient tôt lors de l'infection au VIH-1. L'activation polyclonale se manifeste entre autre par l'hypergammaglobulinémie, particulièrement de type IgG1, et par la présentation d'un «pool» d'anticorps polyréactifs et autoréactifs^{214,508-511}. L'activation est également reflétée par une augmentation du taux de renouvellement cellulaire et par l'augmentation de marqueurs d'activation, tels que CD70, CD71, CD80 et CD86⁵¹²⁻⁵¹⁵. L'augmentation de ces marqueurs est associée à une production plus élevée d'IgG^{513,516}. Aussi, l'expression de la cytidine deaminase induisant l'activation (AID), nécessaire à la commutation isotypique de classe et la mutation hypersomatique, est augmentée chez les individus infectés au VIH-1 en phase chronique⁵¹⁷. De plus, l'activation polyclonale se manifeste par la présence de marqueurs d'épuisement, qui sera abordé dans la section 4.2.4.

Plusieurs paramètres sont susceptibles de contribuer à l'activation des cellules B. Des études ont démontré que la gp120 est en mesure de se lier à DC-SIGN et au récepteur CD21, entraînant son activation^{506,507}. Aussi, l'interaction entre la gp120 et DC-SIGN est associée à l'induction de la commutation isotypique de classe, et la présence d'un excès de BLYS favorise une production d'anticorps non-spécifique et indépendante à CD40^{518,519}. Toutefois, la fréquence faible de cellules B interagissant directement avec les virions ne peut expliquer l'importance des dérégulations du compartiment des cellules B⁵⁰⁶. Nef est également en mesure d'interagir avec les cellules B, tel qu'abordé dans la section 1.3. Ensuite, la stimulation via les TLR peut aussi induire une activation importante des cellules B. Effectivement, les cellules B mémoires expriment de façon constitutive TLR9, et la stimulation de ce dernier par son ligand est en mesure d'induire la prolifération, la production de cytokines et la sécrétion d'immunoglobulines indépendamment de l'activation du BCR⁵²⁰⁻⁵²³. Les cellules B naïves, quant à elles, nécessitent la stimulation du BCR afin d'augmenter l'expression de TLR9, ce qui est compatible dans le contexte du VIH-1 où ces cellules sont activées de façon polyclonale^{513,520,521,524}. La production élevée des cytokines IFN α , TNF α , IL-6, IL-10 et BLYS dans le contexte du VIH-1 est également associée à l'hyperactivation des cellules B ainsi que la production d'auto-anticorps^{519,525-527}. Donc, les mécanismes d'activation polyclonale peuvent avoir lieu de façon spécifique ou non au VIH-1 et/ou au BCR.

4.2.3. Altération de la mémoire immunologique

Lors de la phase chronique de l'infection, il est possible de constater une diminution importante de la fréquence ainsi que de la fonction des cellules B mémoires⁵²⁸⁻⁵³¹. Effectivement, il est observé chez les individus infectés au VIH-1 une perte de protection contre des antigènes vaccinaux, autant au niveau du vaccin pour le virus de l'influenza, de la rougeole et de la toxine tétanique qui nécessite la réponse T-dépendante, qu'au niveau du vaccin contre *Streptococcus pneumoniae*, résultant d'une réponse T-indépendante. Ceci est reflété par une diminution du taux d'anticorps spécifiques dans le sang des patients, ainsi que par une diminution de la capacité des cellules B mémoires à répondre à leur antigène *in vitro*^{428,513,530,532}. Ceci est dû en partie par l'augmentation du CD95 augmentant du coup la susceptibilité de ces cellules à l'apoptose^{513,530}, ainsi que par l'altération des structures lymphoïdes. Dès la phase aiguë de l'infection au VIH-1, plus de la moitié des centres germinatifs se trouvant au niveau du GALT sont perdus, autant au niveau des plaques de Peyer que les nodules lymphoïdes isolés⁵³³. La destruction de ces structures pose comme conséquence un handicap sérieux à l'établissement de la réponse T-dépendante. La diminution dans la stimulation des molécules de co-stimulation ou de CD40L à la surface des T_{FH} provoque une altération quant à la réponse T-dépendante des cellules B^{512,534,535}. Une étude récente de Haddad et collègues a démontré que malgré une augmentation des T_{FH} dans le contexte d'une infection au VIH-1, la liaison de PD-1 des cellules T_{FH} au PD-1L des cellules B des centres germinatif entraîne une diminution dans la capacité proliférative, dans la survie et dans la sécrétion des cytokines des T_{FH}, reflétée par une diminution de l'expression d'ICOS et de la production d'IL-21. *In vitro*, une co-culture des cellules T_{FH} et des cellules B des centres germinatifs de ces patients VIH⁺ ont démontré l'importance d'IL-21, où son ajout permet de restaurer la production d'IgG⁵³⁶. De plus, la diminution des récepteurs à chimiokines CCR7, CD62L, CXCR4 et CXCR5 altèrent la migration vers les centres germinatifs et le mouvement des cellules à l'intérieur même de ceux-ci^{399,537}. La perturbation de la réponse T-dépendante a aussi pour conséquence une dérégulation de la réponse face à des antigènes naturels ou des antigènes provenant d'une vaccination, tels la varicelle ou le cytomegalovirus^{513,538}. Des études menées chez des singes infectés au SIV et des individus infectés au VIH-1 ont permis de démontrer, en phase chronique de l'infection dans les tissus

mucosaux, une réponse faible dans la production d'IgA spécifiques au VIH ainsi que d'IgA dirigés contre les pathogènes mucosaux^{455,539-541}.

4.2.4. Perturbation de la dynamique des populations de lymphocytes B

Lors de l'infection chronique, il est possible d'observer un déséquilibre au niveau de la dynamique des cellules B. Chez les individus sains, les populations de cellules B du sang périphérique se composent essentiellement de cellules quiescentes naïves ou mémoires, exprimant surtout IgM. Chez les individus infectés au VIH-1, il y a une augmentation de la fréquence des populations de cellules B TI, de cellules B avec un phénotype d'épuisement, de cellules B matures activées ainsi que de plasmablastes CD138⁺ (Syndecan-1) IgG⁺ et IgA^{+517,537}. Toutefois, les cellules B mémoires sont diminuées, tel que mentionné précédemment. Une augmentation en fréquence de cellules B TI est en corrélation avec un excès d'IL-7 et associée à la progression de la maladie⁵⁴². Ces cellules ont démontré une susceptibilité accrue à l'apoptose intrinsèque de par la diminution de l'expression de facteurs anti-apoptotiques de la famille Bcl-2⁵⁴³. L'augmentation d'une population hétérogène exprimant de faibles niveaux de CD21, indiquant ainsi son activation, survient avec la chronicité de l'infection, où celle-ci est en mesure de sécréter de façon spontanée des anticorps *in vitro*. Une bonne proportion de cette population CD21^{low} est une population subissant l'épuisement, caractérisée par de hauts niveaux de récepteurs inhibiteurs PD-1 et CTLA-4. Ces cellules ont également démontré une susceptibilité accrue à l'apoptose due à une augmentation du récepteur CD95^{171,190,543-545}. Également, une population B mémoire « tissulaire » est détectée dans le sang de patients infectés au VIH-1. Cette population est enrichie quant à la réponse spécifique au VIH-1, mais démontre aussi des signes d'épuisement.

4.2.5. Effet de la thérapie sur la restauration du compartiment B

La restauration du compartiment B suite à l'initiation de la thérapie antirétrovirale est controversée. Plusieurs groupes ont démontré une diminution de l'hyperactivation des cellules B et une diminution de l'hyperglobulinémie^{508,510,546}. Toutefois, une autre étude a démontré que malgré une HAART sur 28 mois, près de la moitié des individus d'une cohorte de patients infectés au VIH-1 ont conservé un taux élevé d'IgG sérique⁵⁴⁷. La fréquence des cellules B TI

est également normalisée, mais la fréquence diminuée des cellules B IgM⁺ mémoires persistent malgré l'instauration de la thérapie⁵⁴⁸⁻⁵⁵⁰. Au niveau de la mémoire immunologique, un grand nombre d'études ont démontrés que la thérapie ne permet pas sa restauration, puisque la perte des cellules mémoires persiste, accompagnée d'une incapacité à rétablir les réponses mémoires spécifiques au VIH-1^{revue par 551}. Malgré la prise de la thérapie antirétrovirale, il est tout de même possible d'observer chez les individus infectés au VIH-1 et traités efficacement des manifestations autoimmunes ainsi que des lymphomes⁵⁵²⁻⁵⁵⁸. Une étude conduite par l'équipe de Moir et collègues a permis la comparaison entre l'initiation d'un traitement tôt dans l'infection avec l'initiation du traitement en phase chronique de l'infection. Les individus traités plus tôt possédaient une fréquence et un profil fonctionnel de leur cellules B mémoires quiescentes plus élevés que les individus traités tardivement⁵⁴⁸.

4.3. Importance de la réponse B dans le contexte de l'infection au VIH-1

Lors d'études portant sur les HESN, plusieurs groupes ont pu observer une association des IgA de la muqueuse génitale avec la « résistance » face à l'infection au VIH-1. Ces IgA ont démontré des propriétés biologiques protectrices *in vitro* telles qu'un blocage de l'entrée du VIH-1 dans les cellules T CD4⁺, une inhibition de la transcytose, ainsi qu'une neutralisation de plusieurs clades. Les IgA neutralisants ont été trouvés au niveau du tractus génital ainsi qu'au niveau de la salive. Également, la chimiokine CCL28 (MEC), qui permet le recrutement de plasmablastes se différenciant en plasmocytes sécrétant des IgA, est augmentée dans la salive et le lait maternel des HESN^{210,559-561}. Dans cet ordre d'idée, l'équipe de Bomsel et collègues a utilisé un modèle de vaccination mucosale via le tractus génital du singe, avec un virosome contenant la gp41 du VIH-1. De cette immunisation ont été générés des IgG et IgA mucosaux possédant la capacité de bloquer la transcytose à travers la barrière épithéliale, ainsi qu'une augmentation de l'efficacité de l'ADCC^{562,563}. Également, le groupe de Plummer a effectué une caractérisation du répertoire d'immunoglobulines systémique et cervicale d'une femme HESN. Ils ont ainsi pu démontrer l'établissement d'une réponse locale au niveau de la muqueuse génitale, possédant une régulation de la tolérance et de la mémoire locale. De plus, celle-ci est accompagnée par un recrutement de cellules B post-centre germinatif provenant du compartiment systémique⁵⁶⁴.

Depuis quelques années, plusieurs essais vaccinaux ont eu lieu, avec des résultats modestes ou peu concluants pour la majorité d'entre eux. L'essai vaccinal RV144, ayant eu lieu en Thaïlande, a démontré une efficacité de 31.2% face à l'infection au VIH-1. Des études portant sur les corrélats de protection de ce vaccin ont démontré une diminution du risque d'infection associée aux IgG plasmatiques se liant aux régions variables V1/V2 de l'enveloppe du virus, et une augmentation du risque associée aux IgA plasmatiques se liant à l'enveloppe. Ces IgA plasmatiques semblent bloquer l'activité d'ADCC médiée par les IgG, cette dernière étant également un corrélat de protection de RV144^{565,566}. Toutefois, l'absence d'échantillons mucosaux ne permet pas dresser un portrait complet des facteurs impliqués dans la protection face à l'infection au VIH-1 suivant la vaccination, où les IgA semblent y jouer un rôle selon les données obtenues des études portant sur les HESN.

La détection d'anticorps neutralisants à large spectre a lancé la communauté scientifique sur de nouvelles pistes pour l'élaboration d'un vaccin. Ceux-ci, générés dans le contexte d'une infection au VIH-1, partagent certaines caractéristiques qui conduiraient normalement les cellules qui les produisent à l'apoptose lors de la différenciation du stade transitionnel, tel qu'une longue chaîne du CDR3 ainsi qu'une spécificité polyclonale présentant des composantes autoréactives⁵⁶⁷⁻⁵⁶⁹. Les clones B porteurs de ces anticorps ne peuvent persister lorsque la tolérance périphérique entre en jeu⁵⁷⁰. Les anticorps monoclonaux neutralisants à large spectre dirigés contre le VIH-1 connus (2F5, 4^E10, 2G12, 1b12, VRC01, HJ16, PG9, PG16) sont des IgG et contiennent un haut taux de mutation, indiquant une grande maturation de leur affinité et/ou plusieurs cycles de maturation en raison de la chronicité de l'infection⁵⁶⁶. Le virus possède la capacité de masquer par glycosylation une partie de ses épitopes immunogéniques, tel le site de liaison au CD4, via l'acquisition de carbohydrates de l'hôte, ce qui peut engendrer une tolérance chez les cellules B qui réagissent aux protéines du soi. Ces anticorps ont subi beaucoup de mutations dans la chaîne lourde et sont souvent polyréactifs et autoréactifs. Ils seraient principalement issus d'une altération au niveau de la régulation de la tolérance et l'immunité, et trouvés dans les populations de cellules B mémoires épuisées⁵⁷¹. Aussi, les cellules B de la zone marginale expriment le segment IGHV1-2*02, qui a été trouvé dans plusieurs études codant pour ces anticorps, tel VRCO1⁵⁷²⁻⁵⁷⁴. Une vaccination efficace doit permettre la production plus grande d'anticorps neutralisants que de non-neutralisants, et

cela nécessite la participation de populations B spécifiques. Le phénotype des cellules B permettant la génération de ces anticorps neutralisants à large spectre reste encore inconnu à ce jour, mais certaines études permettent de supposer que les cellules B de la zone marginale peuvent jouer un rôle dans la génération de tels anticorps, puisqu'elles sont en mesure de monter une réponse rapide par la production d'anticorps polyréactifs dirigés contre des épitopes répétés et qui ne dépendent pas nécessairement d'une réponse T-dépendante⁵⁷⁵. Une étude a été menée sur l'immunisation d'une souris par un vaccin contenant des glycoprotéines de l'enveloppe conjointement avec la cytokine BLyS, importante dans la survie des cellules au stade transitionnel immature et de la zone marginale. L'équipe d'Hedestam et collègue ont ainsi démontré que l'utilisation de BLyS augmente la survie des cellules TI, augmente le nombre de cellules B de la zone marginale, en plus d'augmenter la fréquence et le potentiel de réponse par la neutralisation⁵⁷⁶.

5. Implication des DC dans la dérégulation du compartiment des cellules B dans le contexte d'une infection au VIH

5.1. Modèle murin VIH transgénique

Ma co-directrice Dre Johanne Poudrier a préalablement instigué des projets portant sur l'implication des DC dans la dérégulation du compartiment des cellules B en utilisant le modèle murin VIH transgénique établi par les Drs Zaher Hanna et Paul Jolicoeur (IRCM, Montréal, Canada). Le sujet de ce mémoire découle directement de ses observations, qui forment le pilier de mon projet. Des souris transgéniques exprimant les gènes du VIH sous le contrôle du promoteur CD4 humain dans les lymphocytes T CD4+, les DC et les macrophages développent une pathologie similaire au SIDA, et ce de façon dépendante de la protéine virale Nef⁵⁷⁷⁻⁵⁷⁹. Le domaine d'attachement SH3 de Nef est essentiel pour le développement de la maladie, révélant ainsi l'importance des ligands de SH3, les tyrosines kinases de la famille Src^{37,580}. Une accumulation des cellules B s'effectue au niveau des ganglions et de la rate, où un élargissement de la zone marginale est observable, et où les mDC tendent à s'accumuler malgré une perte de ces dernières en nombre absolu au niveau des ganglions et de la rate^{577,578,581,582}. Également, une activation polyclonale des cellules B est observable, de par la présence d'hyperglobulinémie, d'anticorps anti-ADN double brin, et la sécrétion spontanée

d'IgM *in vitro*⁵⁸¹. De plus, ces souris démontrent des altérations au niveau de l'immunité humorale. Elles ne peuvent générer de réponse T-dépendante et leur capacité de former des centres germinatifs est déficiente, menant ainsi à une commutation isotypique de classe absente et une altération au niveau des réseaux de FDC⁵⁸¹. Les DC présentent un phénotype immature, qu'elles soient purifiées des OLS ou générées *in vitro* de précurseurs de la moelle osseuse. Leur capacité est altérée au niveau de la présentation antigénique et de la stimulation des réponses T⁵⁸². Ensuite, le transcrit d'ARNm de l'IL-10 est augmenté au niveau des DC, et les lymphocytes Treg sont augmentés (Chrobak, Poudrier, Hanna, Jolicoeur *et al*, accepté J Immunol). Le transfert des DC transgéniques chez les souris contrôles non transgéniques favorise la différenciation des lymphocytes T vers un phénotype régulateur (Chrobak, Poudrier, Hanna, Jolicoeur *et al*, accepté J Immunol). De plus, BLyS est augmenté dans le sérum (Poudrier *et al*, non publié). Il est à noter que lorsque cette souris est croisée avec une souris déficiente en lymphocytes T (CD3^{-/-}), et où les DC sont des principales à exprimer le transgène, le modèle murin transgénique développe toujours la pathologie similaire au SIDA, et présente des nombres élevés de cellules B en périphérie de même que des niveaux élevés d'anticorps anti-ADN double brin (Poudrier *et al*, non publié). Donc, indépendamment de la présence des lymphocytes T, la souris VIH-Tg développe une maladie semblable au SIDA humain. Ces observations mettent en lumière l'importance et l'implication de la dérégulation des cellules B dans le développement de la maladie reliée à l'infection au VIH-1.

Certains rapprochements peuvent être observés entre la souris transgénique pour le gène Nef et la souris transgénique pour BLyS quant aux altérations des compartiments DC et B. Chez ces souris, la production excessive de BLyS est associée à l'élargissement de la zone marginale de la rate, à la suractivation des cellules B de la zone marginale ainsi que du développement d'une pathologie de type auto-immune, similaire au lupus⁵⁸³. Ce phénotype est également retrouvé chez la souris déficiente en AIRE, qui régule notamment l'activité de STAT1, où BLyS est élevé dans le sérum et surexprimé par les DC CD11c⁺ périphériques et dérivées de la moelle osseuse^{444,584}.

5.2. Étude longitudinale sur une cohorte de patients infectés au VIH

Afin de réconcilier les résultats obtenus chez la souris VIH-Tg avec la pathogénèse au VIH chez l'humain, nous avons entrepris une caractérisation longitudinale du compartiment des DC, des cellules B ainsi qu'une évaluation du profil inflammatoire dans le sang d'individus infectés au VIH-1 et présentant différents profils de progression de leur maladie. Ces individus ont été recrutés dans les cohortes de primo-infection et de LTNP du Réseau-FRQS-SIDA et sont les mêmes que j'ai moi-même étudiés dans le cadre de mon projet. D'abord, nous avons caractérisé des individus infectés au VIH-1 d'après leur profil de progression établi d'après leur taux de cellules T CD4⁺ et les niveaux de charge virale plasmatique. Les progresseurs rapides sont les individus pour qui les taux de cellules T CD4⁺ sont descendus sous 250 cellules/mm³ lors des deux premières années de l'infection. Les prélèvements ont été effectués à quatre moments, soit lors de la phase aiguë (zéro à trois mois suivant l'infection), précoce (cinq à huit mois suivant l'infection), et de trois à six mois et de neuf à douze mois suite à l'initiation de la thérapie. Les progresseurs classiques sont les individus ayant conservé des taux de cellules T CD4⁺ au-delà de 500 cellules/mm³ durant les deux premières années suivant l'infection. Les prélèvements ont été effectués à trois moments dans la progression de l'infection, soit dans la phase aiguë, précoce ainsi que chronique (24 mois suivant l'infection). Les progresseurs lents sont les individus provenant de la cohorte LTNP et vivant avec le VIH-1 depuis au moins sept ans, et ayant maintenu des taux de cellules T CD4⁺ supérieurs à 500 cellules/mm³, et ce, en absence de thérapie antirétrovirale. Ils pouvaient être subdivisés en deux groupes; les patients virémiques, ou présentant une charge virale détectable, et les avirémiques, également connus sous l'appellation de contrôleurs élités. Des donneurs sains ne présentant pas de facteur de risque d'infection par le VIH-1 constituaient le groupe contrôle.

Dans le sang des progresseurs rapides et classiques, une diminution précoce dans la fréquence relative des différentes populations et/ou stades de différenciation de mDC, soit celles désignées par les phénotypes CD11c⁺CD16⁻, CD11c⁺CD16⁺ et CD11c⁺⁺CD123^{lo}, a été observée. De plus, les fréquences relatives de ces populations n'ont pas été restaurées après l'initiation de la thérapie ART⁵⁸⁵. Une concentration élevée des chimiokines DC-tropiques MCP-1, MIP-3 α et MIP-3 β ont été mesurées dans le plasma, suggérant un drainage des DC en

direction des sites périphériques⁵⁸⁶. Le niveau de maturation de ces mDC, tel que défini par l'expression de HLA-DR, CD86, et de CD11c, est diminué en contexte de progression rapide, mais est rétabli suite à ART. Les pDC quant à elles sont diminués, mais sont restaurées après ART⁵⁸⁵. L'expression de BLyS est augmentée dès la phase aigüe et tout au long de l'infection, ainsi qu'au-delà de l'initiation de la thérapie, au niveau des mDC et de leurs précurseurs, principalement CD16⁻. Les monocytes CD16⁻ surexpriment également BLyS à leur surface, mais n'est pas maintenu au long du suivi de ces individus, contrairement à ce qui est observé avec les mDC⁵⁸⁷. Une concentration élevée de BLyS a également été mesuré dans le plasma de ces individus de même que pour les facteurs APRIL, IL-6 et IL-10⁵⁸⁷. La translocation microbienne, signe d'altération aux muqueuses, a également été détectée de part des niveaux élevés de LPS, LBP et de sCD14 dans le plasma des progresseurs rapides et classiques⁵⁸⁷. L'évaluation des populations B a permis de révéler une augmentation de la fréquence relative de cellules B matures activées ainsi que des cellules B de la zone marginale présentant un phénotype précurseur dans le sang de ces mêmes individus⁵⁸⁷.

Dans le contexte du contrôle de la progression, les fréquences dans le sang des mDC ainsi que des pDC sont préservées à des niveaux similaires à ceux retrouvés chez les individus sains⁵⁸⁵, comme ce qui est observé pour l'expression de BLyS à la surface des mDC, de leurs précurseurs et des monocytes⁵⁸⁷. Les progresseurs lents virémiques démontrent tout de même une augmentation de la fréquence relative des populations B matures activées ainsi que celles de la zone marginale avec phénotype précurseur. De plus, ils présentent une augmentation des chimiokines MCP-1, MIP-3 α et MIP-3 β ainsi que de BLyS et de sCD14^{586,587}. Chez les progresseurs lents avirémiques, les compartiments DC et B sont préservés, tout comme l'expression de BLyS au niveau soluble et membranaire, sans mesure d'indication de translocation microbienne⁵⁸⁵⁻⁵⁸⁷. Il est intéressant de noter que dans ces deux groupes de contrôleurs, la fréquence relative dans le sang des cellules B de la zone marginale présentant un phénotype mature est diminuée comparativement aux individus non infectés.

Hypothèse 1

Les observations obtenues avec le modèle murin transgénique pour le VIH-1 ont permis de mettre en lumière des altérations au niveau des cellules dendritiques et des cellules B qui contribuent à la maladie. De plus, l'accumulation des DC au niveau de la zone marginale de la rate, zone enrichie en cellules B de première ligne, ainsi qu'une production accrue de BLyS/BAFF suggèrent une implication des DC dans les anomalies observées dans le compartiment B de façon T-indépendante.

L'étude longitudinale sur une cohorte de patients infectés au VIH-1 présentant différents rythmes de progression de la maladie a pu valider certaines des observations du modèle murin. Nous avons pu démontrer que les dérégulations du compartiment B sont concomitantes avec la surexpression de BLyS/BAFF par les mDC sanguines ainsi que le niveau de BLyS/BAFF sérique, et ce, dès la phase aiguë de l'infection et au-delà de la thérapie antirétrovirale.

Ces observations nous ont donc amené à poser l'hypothèse que chez les patients infectés au VIH-1, l'altération au niveau des DC est impliquée dans la dérégulation du compartiment des cellules B. De par la pathogénèse dépendante de Nef observée avec le modèle murin VIH-Tg, nous pensons que les facteurs dérivés du VIH-1 pourraient être en cause dans la surexpression de BLyS/BAFF par les mDCs.

Objectif 1

1.1 Évaluer de façon longitudinale la présence de Nef soluble dans le plasma ainsi qu'au niveau des mDC et mDC précurseurs du sang, selon le niveau de progression de la maladie des individus infectés au VIH-1.

La présence de Nef soluble dans le plasma d'individus infectés au VIH-1 a déjà été évaluée par un groupe en 1996, mais sans tenir compte du stade et degré de progression de l'infection et depuis, l'expérience n'a pas été répétée. Pourtant, plusieurs études portant sur les effets de Nef sur différents types cellulaires ont été effectuées à l'aide de Nef exogène. Nef a toutefois été détectée dans le sang de patients infectés au VIH, associé à des exosomes ou microvésicules. La détection de Nef au sein des populations sanguine de mDC et en lien avec le profil inflammatoire n'a jamais été investigué. L'évaluation de Nef dans un contexte de progression au VIH-1, de thérapie antirétrovirale et de contrôle de la virémie n'a jamais été effectuée, et pourrait être un indicateur de la progression et/ou de la présence de réservoirs latents.

1.2 Déterminer l'effet direct de Nef sur la production de BLyS/BAFF par les cellules dendritiques dérivées de monocytes *in vitro*.

Dans des travaux précédents, il a été démontré que la protéine virale soluble Nef peut être internalisée par les monocytes, DC et les macrophages. Elle est également apte à induire une maturation des DC ainsi que la sécrétion de cytokines proinflammatoires dont TNF- α .

Hypothèse 2

Les cellules B de la zone marginale constituent une population B hétérogène, et ont la particularité de recirculer à travers la circulation sanguine chez l'humain, contrairement à son homologue murin²⁶⁴. Récemment, ces cellules ont été associées à la production d'IL-10 et à la fonction de cellules B régulatrices, autant chez l'humain que la souris⁴⁸³.

Chez la souris, des concentrations basses de BLyS/BAFF induisent la production d'IL-10 par les cellules B de la zone marginale possédant les marqueurs d'identification du phénotype Breg, alors que des concentrations élevées de BLyS/BAFF sont associées à l'activation et la différenciation des cellules B de la zone marginale⁵⁸⁸.

Chez l'humain, la fréquence des populations de cellules B présentant des attributs des Breg sont augmentées dans le sang de patients atteints de lupus systémique érythémateux, de sclérose en plaques et d'arthrite rhumatoïde. Suivant une stimulation *in vitro*, ces « Breg » ont produit moins d'IL-10 et ont fait défaut quant à leur capacité suppressive⁴⁸³.

L'étude longitudinale sur une cohorte de patients infectés au VIH-1 présentant différents rythmes de progression de la maladie a permis de démontrer, entre autre, une augmentation de la fréquence relative des cellules B de la zone marginale présentant un phénotype précurseur chez les progresseurs rapides et classiques. Chez les progresseurs lents, la fréquence relative dans le sang des cellules B de la zone marginale présentant un phénotype mature est diminuée comparativement aux individus non infectés.

Ces observations nous ont donc amené à poser l'hypothèse que chez les individus contrôlant la progression clinique due au VIH-1, la préservation du compartiment des cellules B va se refléter au niveau du potentiel « Breg » des populations de la zone marginale.

Objectif 2

2.1 Caractériser les populations des cellules B d'après leur expression des cytokines IL-10 et LT- α , selon le niveau de progression d'individus infectés au VIH-1.

Dans le contexte d'une infection au VIH-1, la caractérisation des cellules B d'après leur potentiel régulateur (IL-10) ou effecteur (LT- α), et leur implication dans la pathogénèse reste encore à élucider. Le débalancement des populations vers un phénotype ou l'autre pourrait être révélateur quant à la progression ou au contrôle de la maladie.

Article 1

HIV Nef promotes B_{Ly}S/BAFF expression by blood dendritic cells during the course of infection in humans

Josiane Chagnon-Choquet, Julie Gauvin, Julien Roger, Julie Fontaine, Johanne Poudrier*, Michel Roger* for the Montreal Primary HIV Infection and Slow Progressor Study Groups.

* J.P. and M. R. are senior co-authors

Statut : Article soumis pour *PloS Pathogens*

Contribution des co-auteurs :

Josiane Chagnon-Choquet a effectué les analyses de quantification de Nef sur les spécimens, les analyses de cytométrie en flux et les essais *in vitro*, a aussi réalisé les analyses statistiques des résultats et a participé à la rédaction de l'article. Julie Gauvin a participé aux analyses de quantification de RA sur les spécimens. Julien Roger a participé aux analyses de quantification de B_{Ly}S/BAFF sur les essais *in vitro*. Julie Fontaine a participé aux analyses de quantification de B_{Ly}S/BAFF sur les spécimens. Johanne Poudrier a participé à l'élaboration de l'étude, a supervisé les expériences et a participé à la rédaction de l'article. Michel Roger a participé à la rédaction de l'article et a coordonné les différents aspects de l'étude.

HIV Nef promotes BLYS/BAFF expression by blood dendritic cells during the course of infection in humans

Josiane Chagnon-Choquet^{1,2}, Julie Gauvin^{1,2}, Julien Roger¹, Julie Fontaine^{1,2,3}, Johanne Poudrier^{1,2*}, Michel Roger^{1,2*} for the Montreal Primary HIV Infection and Slow Progressor Study Groups.

¹ Laboratoire d'immunogénétique, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Canada, ² Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie de l'Université de Montréal, Montréal, Canada, ³ present address Charles Rivers Laboratories, Senneville, Canada.

* J.P. and M. R. are senior co-authors

Word count in the text: 4 489

Word count in abstract: 278

Running head: HIV Nef promotes BLYS/BAFF over-expression

Number of figures and tables: Figures: 5, Table: 1, Supplemental Figure: 1

Reference count: 50

Word count in Author Summary: 194

Part of this work was presented at the Keystone Symposium on B-cell Development and Function joint with HIV vaccines, February 10th-15th 2013, CO, USA.

The members of the Montreal Primary HIV Infection and Slow Progressor Study Groups are Anne Vassal and Mario Legault (coordinators); Jean Pierre Routy (principal investigator Primary HIV Study), Cécile Tremblay (principal investigator Slow Progressor Study), Réjean Thomas, Benoit Trottier, Sylvie Vézina, Louise Charest, Catherine Milne, Jason Friedman,

Emmanuelle Huchet (Clinique médicale l'Actuel), Jean-Guy Baril, Pierre Côté, Bernard Lessard, Serge Dufresne, Marc-André Charron (Clinique médicale du Quartier Latin). Roger LeBlanc (Clinique médicale urbaine OPUS), Louise Labrecque, Danielle Rouleau, Claude Fortin, Marie Munoz, Julie Bruneau (UHRESS Hôtel-Dieu, Notre-Dame, St-Luc), Norbert Gilmore, Richard Lalonde, Martin Potter, Marina Klein, Alexandra de Pokomandy, Jason Szabo, Nicole Bernard (UHRESS thoracique & Hôpital général de Montréal)



Abstract

Dendritic cells (DCs) modulate B-cell survival and differentiation, mainly through production of growth factors such as B lymphocyte stimulator (BLyS/BAFF). In recent longitudinal studies involving HIV-1-infected individuals with different rates of disease progression, we have shown that DCs were altered in number and phenotype in the context of HIV-1 disease progression and B-cell dysregulations were associated with increased BLyS/BAFF expression in plasma and by blood myeloid DCs (mDCs) in rapid and classic progressors but not in HIV-1-elite controllers (EC). In previous work with HIV-transgenic mice, B-cell dysregulations were associated with altered mDCs and were dependant on the SH3-Binding Domain of the HIV negative factor (Nef). As such, we report herein that HIV-1 Nef is significantly detected in plasma and in BLyS/BAFF over-expressing blood mDCs and mDC precursors of HIV-1-infected rapid and classic progressors, early on infection and despite successful therapy. However low to undetectable levels of Nef are observed in plasma or in mDC populations of EC. *In vitro*, recombinant soluble HIV-1-Nef (sNef) drives monocyte-derived DCs (Mo-DC) towards a high BLyS/BAFF and TNF- α pro-inflammatory profile, through a process involving STAT-1. Importantly, the effect of sNef on BLyS/BAFF expression by Mo-DCs is counteracted in presence of all-trans retinoic acid (RA). Taken together, our results demonstrate that Nef contributes to the increased BLyS/BAFF expression levels found in plasma and blood mDC populations of HIV-1-infected individuals. Blocking of Nef and/or excess BLyS/BAFF could be envisaged as an adjunct treatment to standard HIV therapy to restore immune homeostasis and effectiveness by reducing pro-inflammatory conditions and viral reservoirs. Furthermore, our results suggest there may be interest in exploring the metabolism of vitamin A and RA in regulating the inflammatory context associated with HIV-1.

Author Summary

Studies with rare individuals presenting natural “resistance” to HIV-infection emphasize the importance of B-cell immunity in the battle against the virus. Unfortunately, B-cell responses are impeded in the majority of HIV-infected individuals. Dendritic cells (DCs) modulate B-cell differentiation mainly through production of growth factors such as B lymphocyte stimulator (BLyS/BAFF). As such, we have recently shown that B-cell dysregulations in HIV-1-infected rapid and classic progressors are associated with BLyS/BAFF over-expression in plasma and by blood myeloid DCs (mDCs) but not in HIV-1-elite controllers. We now report that the protein “negative factor” (Nef) of HIV-1 is detected in plasma and in BLyS/BAFF over-expressing blood mDCs of viremic HIV-infected individuals, early-on infection and despite successful therapy. Nef however could not be significantly measured in plasma or in mDCs of HIV-1-elite controllers. Furthermore, *in vitro* experiments demonstrate that Nef directly drives BLyS/BAFF over-expression by monocyte-derived DCs, and this is counteracted by the vitamin A metabolite retinoic acid. Altogether, our observations suggest that targeting Nef, BLyS/BAFF or vitamin A metabolism could be envisaged as adjunct treatment to standard HIV therapy to reduce both HIV target cells and systemic immune activation that are the hallmarks of HIV-1 disease progression.

Introduction

Based on the study of natural correlates of protection against HIV-infection and on promising vaccine strategies, B-cell responses are considered to be major players in the battle against HIV [1-7]. Unfortunately, most HIV-1-infected individuals who progress with disease present B-cell dysregulations, which are not fully restored by therapy, promoting the preservation of HIV reservoirs and often underlying autoimmune components and malignancy. The mechanisms which trigger and promote B-cell dysregulations have yet to be identified but appear to involve both direct and indirect effects of HIV-1, and to be partly related to viral load and alteration of the CD4⁺ T-cell compartment [reviewed in 8].

Dendritic cells (DCs) are involved in the outcome of B-cell development, differentiation and survival, mainly through production of factors such as B lymphocyte stimulator (BLyS/BAFF) [9-12]. DCs have been reported to be altered in number, phenotype and function in HIV-1 disease progression [13-16]. In a recent longitudinal study, we have shown that myeloid DC (mDC) frequencies were reduced in the blood of HIV-1-infected rapid and classic progressors, beginning in the acute phase of infection and persisting throughout the course of disease despite successful therapy [17]. This correlated with increased serum levels of DC-tropic chemokines, suggesting drainage to peripheral sites [18]. Most importantly, these observations were accompanied by increased levels of BLyS/BAFF expression in the plasma and on the surface of mature blood mDCs and CD11c⁺CD14⁺ monocytic DC-precursors, which were concomitant with B-cell dysregulations in these individuals [19]. In contrast, HIV-1-elite controllers (EC) had normal levels of BLyS/BAFF expression in their blood, and presented unaltered blood DC and B-cell compartments [19]. These observations suggest that the extent to which HIV-1 disease progression is controlled may be linked to the integrity of the DC compartment, BLyS/BAFF expression status and the capacity to orchestrate B-cell population dynamics and responses [20].

In previous work with HIV-transgenic (Tg) mice that develop a disease similar to human AIDS [21], B-cell dysregulations were associated with altered mDCs [22-23], which accumulated in enlarged splenic marginal zones (MZ), likely contributing to MZ expansion, polyclonal B-cell activation and breakage of tolerance through delivery of “altered and/or excessive” factors such as BLyS/BAFF [22-23]. In these HIV-Tg mice, disease was dependant

on the 25–34 kDa myristoylated viral accessory protein “negative factor” (Nef) [21]. The SH3 binding domain of Nef was shown to be essential for disease development [24], as non-receptor tyrosine kinases of the Src family have emerged as important intracellular targets for Nef [25].

In humans, Nef has been known to play a critical role in HIV disease progression, notably by boosting viral replication, enhancing infectivity and virus spread. Moreover, individuals infected with a nef mutated virus present slower disease progression [25, 26-28]. Nef action includes reduction of host cell actin dynamics and recirculation of T lymphocytes [29], as well as modulation of expression of cell-surface proteins such as HLAs, CD4 and chemokine receptors [25]. Nef has also been found to be released and has been measured in the blood of HIV-1-infected individuals, either as a soluble form or within exosomes or microvesicles [30-32]. As such, Nef has been shown to penetrate and affect several cell populations [25], such as DC maturation and function [13]. STAT1-3 signalling paths have been shown to be used by Nef to promote a pro-inflammatory profile by human monocyte-derived macrophages [33-35] and likely in modulation of the over-expression of tumor necrosis factor (TNF)- α by human monocyte-derived DCs (Mo-DCs) [36]. Of note, high levels of BLYS/BAFF were found in serum and on DCs of mice deficient for autoimmune-regulatory (AIRE), which is involved in regulation of STAT1 signalling [37-38]. Interestingly, as for HIV-Tg mice, AIRE-deficient mice present enlarged splenic MZ, B-cell hyperactivity and autoimmunity, a phenotype also shared by BLYS/BAFF-Tg mice [39]. Thus, Nef appears to modulate STAT1-3 dependent signalling, shown to be involved in BLYS/BAFF expression and release [40].

The battle against HIV largely occurs at mucosal sites of intrusion and propagation for the virus. There, DCs are one of the earliest cell types to be exposed to HIV, and present an inherent capacity to orchestrate a homeostatic balance between tolerance and protection [13-16]. The metabolism of vitamin A into retinoic acid (RA) in DCs is pivotal to modulation of mucosal immune homeostasis, notably by shaping B- and T-cell responses, through regulation of the activation of a number of transcription factors, such as STAT1 [reviewed by 41].

Given these observations, we now report that Nef directly contributes to the increased BLyS/BAFF expression levels found on mDC populations of viremic HIV-1-infected individuals, through a process involving STAT1. Importantly, *in vitro* studies demonstrate that the effect of Nef on BLyS/BAFF over-expression is counteracted by RA.

Materials and Methods

Ethics Statement.

Written informed consent was obtained from all subjects, and the research conformed to ethical guidelines and was approved by the Ethics Review board of the Centre de Recherche du CHUM. The reference number for the project is: SL 05.028.

Subjects

Thirty male HIV-1-infected subjects were selected from the Montreal Primary HIV Infection cohort: 13 were classified as rapid and 17 as classic progressors. The date of infection was estimated on the basis of clinical and laboratory results using criteria established by the Acute HIV Infection and Early Disease Research Program (NIAID, Bethesda, MD). Rapid progressors had blood CD4⁺ T-cell counts below 250 cells/mm³ within 2 years of infection. Blood samples were taken at the following time points: in the acute (0-3 months) and/or early (5-8 months) phases of infection, and at 3-6 and 9-12 months after initiation of antiretroviral therapy (ART). Classic progressors were ART-naive individuals whose blood CD4⁺ T-cell counts remained above 500 cells/mm³ for the 2 year follow-up. Blood samples were obtained in the acute (0-3 months), early (5-8 months) and chronic (24 months) phases of infection. Moreover, blood samples from 13 slow progressors were obtained from the Montreal Long Term Non Progressors (LTNP) cohort, where patients were infected for 8 years or more with blood CD4⁺ T-cell counts above 500 cells/mm³ and presented low (7 viremic patients) to undetectable (6 aviremic patients, also referred to as EC) viral loads in absence of ART. Blood samples from 20 age- and sex-matched HIV-negative volunteers were also obtained. HIV viral loads were determined in the plasma using Versant HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown, NY). Blood CD4⁺ T-cell counts were determined as previously reported [42]. None of the study subjects had syphilis, hepatitis B or C.

Detection of HIV-1 Nef in blood mDC and monocytic mDC precursor populations by Flow Cytometry.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated after whole blood centrifugation on Ficoll gradients. Cells were resuspended in heat-inactivated fetal bovine serum (hi-FBS) with 10% of dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored in liquid nitrogen until use. Cells were thawed, washed in RPMI and resuspended in 1x phosphate-buffered saline (PBS). One million PBMCs per sample were used for extracellular and intracellular stainings. Cells were labelled with Aqua-LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain (Invitrogen Life technologies, Eugene, OR, USA) for the discrimination between dead and live cells. Non-specific Ig binding sites were blocked by incubation for 10 minutes on ice with fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer (1x PBS, 2% hi-FBS, and 0.1% sodium azide) supplemented with 20% hi-FBS and 10µg of total mouse IgG (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) per million PBMCs. Cells were labelled with the following cocktail of mouse anti-human monoclonal antibodies: APC-H7-conjugated anti-HLA-DR, PE-Cy7-conjugated anti-CD11c, FITC-conjugated anti-CD3, FITC-conjugated anti-CD19, FITC-conjugated anti-CD56 (Becton Dickinson (BD) Biosciences, San Jose, CA, USA), AlexaFluor700-conjugated anti-CD14 (BioLegend, San Diego, CA, USA) and PE-conjugated anti-BLyS (eBioscience, San Diego, CA, USA). For detection of HIV-1 Nef, we used the biotin-conjugated mouse anti-HIV-1 Nef monoclonal antibody (Immunodiagnosics), followed by APC-conjugated streptavidin (BD Biosciences). Intracellular labelling was performed using the Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization kit and 1x BD perm/wash buffer (BD Biosciences). Cells were kept in 1.25% paraformaldehyde (PFA) for 18 hours prior to analysis. Data acquisition of 10^5 events per sample was performed on a BD LSRFortessa apparatus, and analysis was done with the FlowJo 7.6.3 software (TreeStar, Ashland, OR, USA). All antibody stainings were compared to that of fluorescence minus one (FMO) values and isotype controls. Anti-mouse Ig (κ) Compbeads were used to optimize fluorescence compensation settings and CS&T Beads (BD Biosciences) were used for the calibration of the BD LSRFortessa.

Culture and stimulation of Mo-DCs.

Culture and stimulation of Mo-DCs were done according to a protocol provided by Dnal-Invitrogen and as reported by Quaranta and colleagues [36]. Briefly, PBMCs were isolated from a healthy donor after whole blood centrifugation on Lymphoprep (Axis-Shield, Dundee, Scotland) gradients. CD14⁺ monocytes were enriched by negative selection using immunomagnetic based technology (Dnal-Invitrogen Life technologies), and cultured at 5×10^5 cells/ml in Iscoves' Medium (IMDM) supplemented with 10% hi-FBS, 2% antibiotics (penicillin/streptomycin) and 10^{-4} 2-Mercaptoethanol. Recombinant human IL-4 (100 ng/ml) and GM-CSF (250 ng/ml) (Invitrogen Life technologies) were added on initiation and at 3 days of culture. After 6 days, cells were negative for CD14 and lineage (LIN) (CD3, CD19, CD56) expression markers, and were 85-95% HLA-DR⁺CD11c⁺ Mo-DCs as assessed by flow cytometry analysis. Recombinant soluble HIV-1 Nef (sNef) protein (NIH-AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS NIAID, cat # 11478) and/or all trans-RA (Sigma-Aldrich) were used at 1µg/ml and at 1µM, respectively, and added either on initiation and at 3 days of culture, and/or after 6 days of Mo-DC maturation, for another 24 hours. The recombinant HIV-1 sNef protein was filtered with a high-capacity endotoxin removal resin (Pierce-Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) and tested endotoxin-free using the Limulus Amebocyte Lysate assay (Lonza, Walkersville, MD, USA) according to the manufacturer's protocol. For the sNef blocking assay, a mouse monoclonal anti-Nef antibody (EH1, NIH AIDS Research and Reference Reagent Program from Dr. James Hoxie) was added at 1µg/ml at the same time as sNef to the Mo-DCs culture. We have used LPS at 2µg/ml as control. On day 6 or 7, Brefeldin A (BFA) (BD Biosciences) was added for the last 6 hours of the culture period. Cells were then harvested, washed in IMDM and processed for analysis by flow cytometry following the same protocol as mentioned above. Cells were labelled with the following cocktail of mouse anti-human monoclonal antibodies: PE-Cy7-conjugated anti-HLA-DR, APC-conjugated anti-CD11c, FITC-conjugated anti-CD86, PacificBlue-conjugated anti-CD16 (BD Biosciences), as well as PE-conjugated anti-BLyS/BAFF (eBioscience) and AlexaFluor700-conjugated anti-TNF-α (BD Biosciences). For detection of internalized sNef, note that bound extracellular sNef may also be detectable using this method, cells were first fixed/permealized, and then non-specific Ig binding sites were blocked by incubation on ice

for 10 minutes with 1x BD Perm/Wash buffer, 20% hi-FBS and 20% hi-fetal goat serum. Cells were then labelled with mouse anti-Nef and subsequently with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (BD Biosciences), prior to staining with the cocktail. All antibody stainings were compared to that of FMO values and isotype controls. Cells were kept in 1.25% PFA as mentioned previously. Data acquisition of 10^5 events per sample was performed by FACS and analyzed as mentioned above.

Determination of HIV-1 Nef, RA and BLyS/BAFF concentrations.

Plasma levels of HIV-1 Nef and RA were measured using commercially available ELISA kits from Immunodiagnosics (Woburn, MA, USA) and MyBioSource (San Diego, CA, USA), respectively, and performed according to the manufacturers' protocols. Supernatants from Mo-DC cultures, described above, were collected after 6 days and assessed for their soluble BLyS/BAFF content by using a commercially available anti-human BLyS/BAFF ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), and performed according to the manufacturer's protocol.

Flow Cytometry analysis of phosphorylation status of STAT1.

Unstimulated Mo-DCs were collected after 6 days of culture, and incubated at a concentration of 1×10^5 cells/ml for 15, 30, 60 and 120 minutes at 37°C in presence or absence of sNef and/or RA at 1µg/ml and 1µM, respectively. Using the BD PhosFlow technology, cells were then fixed with Cytifix buffer (BD Biosciences) for 10 min at 37°C, and permeabilized in ice-cold Perm-III buffer (BD Biosciences) for 30 min. Then, cells were stained in Stain buffer (BD Biosciences) with PE-conjugated mouse anti-human STAT1 (Y701) (BD Biosciences) for 1 hour at room temperature. All antibody stainings were compared to that of FMO values and isotype controls. Cells were kept in 1.25% PFA as mentioned previously. Data acquisition of 10^5 events per sample was performed by FACS and analyzed as mentioned above.

Statistical analyses.

The statistical significance of differences between groups was assessed with Fisher exact test for categorical variables and unpaired Student's *t* test or one-way analysis of variance when

continuous variables were normally distributed or with Mann-Whitney U test otherwise. Wilcoxon signed-rank test was used for pairwise comparisons of different phases of infection within each group. Spearman rank test was used to determine correlations between continuous variables. Analyses were performed using GraphPad PRISM 5.0 for Windows (GraphPad Software Inc).

Results

Socio-demographic and clinical characteristics of HIV-1-infected individuals.

The socio-demographic and clinical characteristics of the HIV-1-infected individuals are shown in Table 1, and the longitudinal assessment of blood CD4⁺ T-cell counts and viral loads during the course of HIV-1-infection are depicted in Figure 1A and 1B. There was no significant correlation between blood CD4⁺ T-cell counts or viral loads and DC populations, Nef and RA levels studied here either within groups or among all subjects during early or chronic infection (data not shown).

Nef is detected in plasma and in blood mDCs and monocytic mDC precursors throughout the course of infection in HIV-1 progressors.

Because Nef cell levels might be influenced by the fluctuations in DC population frequencies, data are expressed as percentages of Nef bearing cells within each population. As expected, Nef could not be detected in the plasma or in blood mDC populations of HIV-negative donors (Figures 1C, 2B and 2C, all panels). Relative frequencies of mDC and monocytic mDC precursors bearing Nef in HIV-1-infected rapid and classic progressors were significantly elevated throughout the course of infection (Figures 2B and 2C, left and middle panels). Similarly, plasma Nef levels were also elevated in these individuals (Figure 1C, left and middle panels). Interestingly, levels of plasma Nef remained elevated in rapid progressors despite significant reduction in plasma viral loads after initiation of ART (Figure 1B, left panel). Importantly, percentages of Nef bearing cells within blood mDC populations and levels of Nef in the plasma of both viremic and aviremic slow progressors (EC) were either low or similar to those measured in HIV-negative donors. (Figures 1C, 2B and 2C, right panels).

Nef is associated with BLYS/BAFF over-expression in plasma and by blood mDCs and mDC precursors of HIV-1-infected individuals.

Levels of Nef correlated significantly with those of BLYS/BAFF in the plasma of classic progressors during the acute phase of infection (Figure 3A). The levels of BLYS/BAFF surface expression by blood mDC populations were higher in cells bearing Nef when compared to those not bearing Nef (Figures 3B and 3C). The impact of Nef on BLYS/BAFF expression is of particular importance for the monocytic mDC precursor population, where levels of BLYS/BAFF were significantly higher in cells bearing Nef in all HIV-1-infected individuals, as soon as in the acute phase and throughout the course of infection, regardless of the rate of disease progression and ART.

Recombinant HIV-1 Nef promotes high levels of BLYS/BAFF and TNF- α expression by Mo-DCs.

To assess whether Nef contributes to the increased BLYS/BAFF expression levels found on mDC populations of HIV-1-infected individuals, day 6 Mo-DCs were stimulated *in vitro* with recombinant soluble Nef (sNef) for 24 hours. Unstimulated Mo-DCs, which were HLA-DR⁺ CD11c⁺ and CD86⁺, expressed basic levels of BLYS/BAFF and TNF- α (Figure 4A, left panels) and data not shown. Mo-DCs stimulated with sNef presented no significant difference in HLA-DR and CD11c expression levels, but expressed increased levels of CD86 as did Mo-DCs stimulated for 24 hours with LPS (Figure 4B). Importantly, Mo-DCs stimulated with sNef had significant increased expression levels of BLYS/BAFF and TNF- α (Figure 4C). Moreover, we found a significant increased percentage of a Mo-DC population expressing very high levels of BLYS/BAFF (BLYS/BAFF^{hi}) when cells were stimulated with sNef or LPS (Figure 4D). When stimulated with both sNef and LPS, Mo-DCs had an increase in TNF- α expression that was similar to that obtained with either of sNef or LPS used alone, but we observed however a higher increase in BLYS/BAFF expression levels and in the percentage of BLYS/BAFF^{hi} expressing cells (data not shown). Mo-DCs cultured for the entire 6 days in presence of recombinant sNef also had higher BLYS/BAFF and TNF- α expression levels when compared to unstimulated Mo-DCs (data not shown), and increased levels of BLYS/BAFF were measured in cell culture supernatants (Figure 4E).

To confirm that recombinant sNef can bind and likely penetrate Mo-DCs, unstimulated cells were collected at day 6 and incubated in presence of recombinant sNef for periods of 1 and 6 hours. After an exposition to sNef for 1 hour, it was possible to detect an accumulation of sNef by flow cytometry (Figure 4F, middle panel), but the signal was not detectable after 6 hours (Figure 4F, right panel).

To assess whether the effect of recombinant sNef on the increased BLYS/BAFF and TNF- α expression observed in Mo-DCs was specific to sNef, an anti-Nef antibody was added to day 6 Mo-DC cultures in presence or absence of recombinant sNef, for a period of 24 hours. The effect of recombinant sNef on BLYS/BAFF and TNF- α expression levels by Mo-DCs was blocked by the addition of the anti-Nef in a dose-dependent effect (Figure 4G). The anti-Nef antibody did not affect the profile of Mo-DCs nor their BLYS/BAFF and TNF- α expression levels when cultured in absence of recombinant sNef (data not shown). The same culture set-up using an isotype matched control antibody had no effect on BLYS/BAFF and TNF- α expression levels (data not shown). Given that Nef has been shown to directly modulate monocytic populations through a process involving STAT1 [33-36], we have assessed whether the effect of sNef on BLYS/BAFF expression by Mo-DCs could also involve STAT1. As such, sNef promoted a Y-hyperphosphorylated STAT1 pattern following 15 minutes incubation with Mo-DCs (Figure 5G). Altogether, these results demonstrate that recombinant sNef promotes BLYS/BAFF and TNF- α over-expression by Mo-DCs through a process involving STAT1.

The effect of sNef on BLYS/BAFF over-expression by Mo-DCs is counteracted by RA.

The main battle with HIV takes place at mucosal sites, where RA is pivotal to modulation of immune homeostasis and control of inflammation [41]. Deriving Mo-DCs in presence of RA promoted a rather anti-inflammatory DC profile, as previously demonstrated [43]. Indeed, comparisons of geometric mean fluorescence intensities (geoMFI) obtained by flow cytometry analysis revealed that Mo-DCs derived for 6 days in presence of RA presented significantly lower surface expression levels of HLA-DR and CD86 when compared to Mo-DCs derived in absence of RA (Figure 5A). However, the viability and percentage of CD11c⁺HLA-DR⁺ Mo-DCs obtained after 6 days of culture were unaffected by RA (data not shown). Importantly,

BLyS/BAFF geoMFI was also significantly lower when Mo-DCs were derived in presence of RA (Figure 5B, upper panel). We also found a trend for lower expression levels of TNF- α as well as lower percentages of BLyS/BAFF^{hi} Mo-DCs in cultures containing RA (Figure 5B, lower panel, and 5C respectively). Mo-DCs derived in absence of RA did not modulate their expression levels of BLyS/BAFF or TNF- α following 24 hour incubation with RA (Figures 5D-E). Importantly, the increased levels of BLyS/BAFF and TNF- α expression by Mo-DCs stimulated 24 hours with sNef alone (Figure 4C), were not observed in presence of RA (Figures 5D-F and not shown). Concomitantly, as shown in Figure 5G, Y-hyperphosphorylation of STAT1 modulated by sNef in Mo-DCs, was not significantly observed in presence of RA. Also, sNef did not promote BLyS/BAFF and TNF- α expression or STAT1 Y-hyperphosphorylation by Mo-DCs which had been derived in presence of RA (data not shown).

Given our observations with RA *in vitro*, we have longitudinally measured RA levels in the plasma of HIV-1-infected individuals and compared them to that of healthy donors. We found that levels of RA were significantly increased following therapy in rapid progressors (Supplemental Figure 1, left panel). Importantly, levels of RA in the plasma of aviremic slow progressors (EC) were significantly lower when compared to that of healthy donors (Supplemental Figure 1, right panel).

Discussion

Levels of Nef in the blood of HIV-1-infected individuals may be indicative of disease progression and viral reservoir status. Indeed, Nef remained elevated in both the plasma and in blood mDCs and mDC precursors of rapid and classic progressors, as soon as in the acute phase of infection, throughout chronicity and notably, after successful therapy. The Nef we detected in plasma is likely to represent mostly its soluble form, as the samples were not processed to measure Nef associated with microvesicles [32]. It is unlikely that Nef detected within mDC populations reflects the extent of infected cells, as soluble Nef can penetrate this cell type [13]. These observations are in sharp contrast to that observed with HIV-1-infected slow progressors, in which levels of Nef were low to undetectable. Therefore it appears that control of disease progression is associated with low to undetectable levels of Nef in plasma

and blood mDC populations. These findings are in agreement with previous observations showing that these HIV-1-infected slow progressors have relatively preserved blood DC and B-cell compartments with low-inflammatory and BLYS/BAFF expression patterns [19]. On the other hand, the presence of high levels of Nef in the blood of HIV-1-infected rapid and classic progressors might contribute to the altered DC compartment [17], pro-inflammatory profile and BLYS/BAFF over-expression status, all of which is concomitant with B-cell dysregulations previously observed in these individuals [19 and Chagnon-Choquet et al Submitted].

Nef has been reported to penetrate DCs *in vitro* and to alter their maturation and function, and to induce distinct cytokine/chemokine secretion patterns [13]. Accordingly, our observations also suggest that sNef penetrates Mo-DCs, and furthermore sNef directly modulates a high BLYS/BAFF and TNF- α expression profile. These are in line with findings showing Nef-mediated over-expression of TNF- α by human monocyte-derived DCs [36]. Importantly, our observations support the notion that Nef detected within blood mDCs and mDC precursors of viremic HIV-1-infected individuals directly contributes to their high BLYS/BAFF pro-inflammatory profile, early on infection and lasting throughout disease progression despite therapy. Although we found that Nef may be directly involved in this process, the overall inflammatory context as well as elements of microbial translocation, such as LPS, have been measured in the plasma of these individuals [19] and likely also contribute to their BLYS/BAFF expression status. As such, we found LPS to also modulate BLYS/BAFF expression levels of Mo-DCs *in vitro*, and moreover LPS and sNef synergized for even greater levels of BLYS/BAFF expression.

Our results suggest that Nef is involved in the driving and persistence of B-cell dysregulations in HIV-1-infected individuals by promoting BLYS/BAFF over-expression by populations such as mDCs. Nef can also penetrate B-cells and/or be propelled via macrophage protrusions, and directly modulate their responsiveness, such as by altering class switch recombination (CSR) in response to CD40 signalling [44-45], which operates through TNF receptor associated factors (TRAFs). It remains to be established as to whether propelling of Nef operates in the context of DC collaboration with B-cells. The direct effects of Nef on B-cells are likely to vary with the status and activation requirements of different B-cell

populations, and factors such as levels of BLYS/BAFF may modulate these responses accordingly.

The effects of Nef on BLYS/BAFF expression levels are likely to result from its capacity to hijack the cellular signalling machinery, as demonstrated by the hyper-tyrosine phosphorylation of STAT1 following incubation of Mo-DCs with sNef. This is consistent with that reported for human monocyte-derived macrophages, where Nef has been shown to interact with TRAF-2, and manipulate both the TRAF/NF- κ B and TRAF/IRF-3 signalling paths [46], thereby promoting a pro-inflammatory profile and activation of STAT1-3 [33-34]. Interestingly, we demonstrate that the effect of sNef on BLYS/BAFF expression status of Mo-DCs is counteracted by RA, which prevented sNef mediated STAT1 hyperphosphorylation. These observations are consistent with the low-expression profile of HLA-DR and CD86 as well as BLYS/BAFF and TNF- α we found for Mo-DCs derived with RA, and with the report demonstrating that signals delivered via receptors for RA may be anti-inflammatory and promote a “tolerogenic” profile [47]. RA regulates several nuclear receptors such as peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR), induced during monocyte-derived DC development and which are potent regulators of inflammation that can regulate the activation of a number of transcription factors, such as NF- κ B, AP-1 and STAT1 [43].

The capacity of RA to counteract the effects of sNef on BLYS/BAFF over-expression by Mo-DCs suggest that the metabolism of vitamin A into RA in DCs is likely to be of prime importance in the battle against HIV. A process mainly taking place at mucosal sites, where RA is pivotal to regulation of mucosal immune homeostasis [41]. The latter, which we find to be altered in the context of HIV-1 disease progression, as revealed by the elements of microbial translocation measured in the blood of rapid and classic progressors [19]. Interestingly, we found elevated plasma levels of RA in patients under protease inhibitor-containing ART regimens. It has been suggested that in the context of therapy, enhanced RALDH activity and/or gene expression by protease inhibitors could increase RA plasma concentrations [48]. Also, in a recent study, monocytes isolated from HIV-infected patients expressed altered patterns of nuclear receptors, characterized by a profound reduction in the expressions of RA and PPAR receptors. Of interest, this was not restored under therapy and

was linked to an altered expression of genes which supports both an immune activation and altered lipid metabolism [49].

Interestingly, we found plasma levels of RA to be lower in EC when compared to healthy donors. Whether this is a genetic benefit and/or linked with active mucosal control remains to be established. Nevertheless, this finding suggests that the capacity to maintain low levels of RA at the systemic level is beneficial to the host and control of disease progression. Overall, these suggest that the capacity to maintain a certain immune homeostasis at mucosal sites probably allows for better control of inflammation and disease progression.

We believe incomplete therapeutic restoration of immune competence and sustained chronic inflammation may be related to persistence of HIV-1 factors such as Nef, which likely results from HIV-1 reservoirs, and can be released systemically, independently of viral replication as recently reported for astrocytes in the brain reservoir [50]. The fact that soluble Nef can penetrate and/or be propelled to cell populations and hijack signalling routes, suggest that blocking of Nef could be envisaged as adjunct to current therapeutic advices in view of reducing remaining reservoir activities. In this view, blocking of excess BLyS/BAFF, proven successful in remission of autoimmunity, may also be contemplated as an adjunct therapy in the battle against HIV, by lowering the inflammatory burden and restoring immune effectiveness. Furthermore, there may be interest in exploring the metabolism of vitamin A and RA in regulating the inflammatory context associated with HIV. Indeed, it is becoming increasingly evident that members of the nuclear hormone receptor superfamily are involved in the regulation of DC biology. Moreover, activators of nuclear receptors are widely used in clinical practice, for example, ligands of the PPAR γ (rosiglitazone and pioglitazone) are frequently used as immunosuppressive agents.

Acknowledgments

We are grateful to the participants of the Montreal PHI and Slow Progressors study groups. We also thank Dr Dominique Gauchat and Christian Charbonneau for invaluable flow cytometry and bio-imaging expertise, respectively. Marie-Pierre Boisvert, Maryse Lainesse, Rebecca Bordi, Véronique Lafontaine, Bader Yassine-Diab and Younes Chouick for

processing the blood samples. We are grateful to all our healthy volunteers for blood donations.

Author Contributions

JCC performed the experiments, analyzed the data and wrote the article. JG, JR and JF performed part of the experiments. JP and MR designed the experiments, analyzed the data and wrote the article.

Conflict of interest declaration: The authors declare no conflict of interest

Financial support: This work was supported by grant # CHR-126633 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and by the Réseau SIDA from the Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS). Josiane Chagnon-Choquet holds a Studentship from the Fondation Gabriel Marquis.

References

1. Poudrier J, Chagnon-Choquet J, Roger M. (2012) Influence of Dendritic cells on B-cell Responses during HIV Infection. *Clin Dev Immunol* doi:10.1155/2012/592187
2. Borrow P. (2011) Innate immunity in acute HIV-1 infection. *Curr Opin HIV AIDS* 6(5): 353–363.
3. McElrath MJ. (2011) Standing Guard at the Mucosa. *Immunity* 34: 146-148.
4. Tomaras GD, Haynes BF. (2010) Strategies for eliciting HIV-1 inhibitory antibodies. *Curr Opin HIV and AIDS* 5:421–427.
5. Tudor D, Derrien M, Diomedea L, Drillet AS, Houimel M, et al. (2009) HIV-1 gp41-specific monoclonal mucosal IgAs derived from highly exposed but IgG-seronegative individuals block HIV-1 epithelial transcytosis and neutralize CD4(+) cell infection: an IgA gene and functional analysis. *Mucosal Immunol* 2: 412-426.
6. Bomsel M, Tudor D, Drillet AS, Alfsen A, Ganor Y, et al. (2011) Immunization with HIV-1 gp41 subunit virosomes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges. *Immunity* 34: 269-280.
7. Gaudet RG, Breden F, Plummer F, Berry JD. (2011) Molecular characterization of the cervical and systemic B-cell repertoire: unique, yet overlapping, immune compartments of an HIV resistant individual. *MAbs* 3:181-191.
8. Moir S, Fauci AS. (2009) B cells in HIV infection and disease. *Nat Rev Immunol* 9: 235-245.
9. Batista FD, Harwood NE (2009) The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol* 9: 15-27.

10. Macpherson G, Kushnir N, Wykes M (1999) Dendritic cells, B cells and the regulation of antibody synthesis. *Immunol Rev* 172: 325-34.
11. Varin MM, Le Pottier L, Youinou P, Saulep D, Mackay F, et al. (2010) B-cell tolerance breakdown in Sjögren's syndrome: focus on BAFF. *Autoimmunity Rev* 9(9):604-8.
12. Cerutti A, Puga I, Cols M. (2011) Innate control of B cell responses. *Trends in Immunol*, 32(5):202-211.
13. Derby N, Martinelli E, Robbiani M. (2011) Myeloid dendritic cells in HIV-1 infection. *Curr Opin HIV AIDS* 6: 379–384.
14. van der Vlist M, van der Aar AMG, Gringhuis SI, Geijtenbeek TBH. (2011) Innate signaling in HIV-1 infection of dendritic cells. *Curr Opin HIV AIDS* 6: 348–352.
15. Smed-Sörensen A, Loré K. (2011) Dendritic cells at the interface of innate and adaptive immunity to HIV-1. *Curr Opin HIV AIDS* 6: 405–410.
16. Blanchet F, Moris A, Mitchell JP, Piguet V. (2011) A look at HIV journey: from dendritic cells to infection spread in CD4R T cells. *Curr Opin HIV AIDS* 6: 391–397.
17. Fontaine J, Coutlée F, Tremblay C, Routy JP, Poudrier J, et al. (2009) HIV infection affects blood myeloid dendritic cells after successful therapy and despite nonprogressing clinical disease. *J Infect Dis* 199: 1007-1018.
18. Fontaine J, Poudrier J, Roger M (2011) Persistence of high blood levels of the chemokines CCL2, CCL19 and CCL20 during the course of HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 27:655-657.

19. Fontaine J, Chagon-Choquet J, Valcke HS, Poudrier J, Roger M. (2011) High expression levels of B Lymphocyte Stimulator (BLyS) by dendritic cells correlate with HIV-related B cell disease progression in humans. *Blood* 117: 145-155.
20. Poudrier J, Roger M. (2011) Dendritic Cell Status Modulates the Outcome of HIV-Related B Cell Disease Progression. *PLoS Pathog* 7(8): e1002154. doi:10.1371/journal.ppat.1002154.
21. Hanna Z, Kay DG, Rebai N, Guimond A, Jothy S, et al. (1998) Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice. *Cell* 95: 163-175.
22. Poudrier J, Weng X, Kay DG, Paré G, Calvo EL, et al. (2001) The AIDS disease of CD4C/HIV transgenic mice shows impaired germinal centers and autoantibodies and develops in the absence of IFN-gamma and IL-6. *Immunity* 15: 173-185.
23. Poudrier J, Weng X, Kay DG, Hanna Z, Jolicoeur P. (2003) The AIDS-like disease of CD4C/human immunodeficiency virus transgenic mice is associated with accumulation of immature CD11bHi dendritic cells. *J Virol* 77: 11733-11744.
24. Hanna Z, Weng X, Kay DG, Poudrier J, Lowell C et al. (2001) The Pathogenicity of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 Nef in CD4C/HIV Transgenic Mice Is Abolished by Mutation of Its SH3-Binding Domain, and Disease Development Is Delayed in the Absence of Hck. *J Virol*. 75(19):9378-92.
25. Laguette N, Bregnard C, Benichou S, Basmaciogullari S. (2010) Human immunodeficiency virus (HIV) type-1, HIV-2 and simian immunodeficiency virus Nef proteins. *Mol Aspects Med*. 31(5):418-33.
26. Deacon NJ, Tsykin A, Solomon A, Smith K, Ludford-Menting M, et al. (1995) Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 270(5238):988-991.

27. Kestler HW 3rd, Ringler DJ, Mori K, Panicali DL, Sehgal PK, et al. (1991) Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* 65(4):651-662.
28. Kirchhoff F, Greenough TC, Brettler DB, Sullivan JL, Desrosiers RC. (1995) Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N Engl J Med* 332(4):228-232.
29. Stolp B, Imle A, Coelho FM, Hons M, Gorina R, et al. (2012) HIV-1 Nef interferes with T-lymphocyte circulation through confined environments in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6;109(45):18541-6.
30. Fujii Y, Otake K, Tashiro M, Adachi A. (1996) Soluble NEF antigen of HIV-1 is cytotoxic for human CD4+ T cells. *FEBS Letters* 393: 93-96.
31. Gould SJ, Booth AM, Hildreth JE (2003) The Trojan exosome hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(19):10592-10597
32. Raymond AD, Campbell-Sims TC, Khan M, Lang M, Huang MB. (2011) HIV Type 1 Nef Is Released from Infected Cells in CD45 β Microvesicles and Is Present in the Plasma of HIV-Infected Individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 27(2):167-178.
33. Federico M, Percario Z, Olivetta E, Fiorucci G, Muratori C, et al.(2001) HIV-1 Nef activates STAT1 in human monocytes/macrophages through the release of soluble factors. *Blood* 98: 2752-2761.
34. Mangino G, Percario ZA, Fiorucci G, Vaccari G, Manrique S, et al. (2007) In vitro treatment of human monocytes/macrophages with myristoylated recombinant NEF of human immunodeficiency virus type 1 leads to the activation of mitogen-activated protein kinases, I κ B kinases, and interferon regulatory factor 3 and to the release of beta interferon. *J Virol* 81: 2777-2791.

35. Percario Z, Olivetta E, Fiorucci G, Mangino G, Peretti S, et al. (2003) Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Nef activates STAT3 in primary human monocyte/macrophages through the release of soluble factors: involvement of Nef domains interacting with the cell endocytotic machinery. *J Leukoc Biol.* 74(5):821-32.
36. Quaranta MG, Tritarelli E, Giordani L, Viora M. (2002) HIV-1 Nef induces dendritic cell differentiation: a possible mechanism of uninfected CD4 (+) T cell activation. *Exp Cell Res* 275: 243-254.
37. Hässler S, Ramsey C, Karlsson MC, Larsson D, Herrmann B, et al. (2006) AIRE-deficient mice develop haematopoietic irregularities and marginal zone B-cell lymphoma. *Blood* 108:1941-1948.
38. Lindh E, Lind SM, Lindmark E, Hässler S, Perheentupa J, et al. (2008) AIRE regulates T-cell-independent B-cell responses through BAFF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 18466-18471.
39. Mackay F, Figgett WA, Saulep D, Lepage M, Hibbs ML. (2010) B-cell stage and context-dependent requirements for survival signals from BAFF and the B-cell receptor. *Immunol Rev* 237(1):205-225.
40. Kim KS, Park J-Y, Park SM. (2009) Functional implication of BAFF synthesis and release in gangliosides-stimulated microglia. *J Leuko Biol* 86:349-359.
41. S Manicassamy S, B Pulendran B. (2009) Retinoic acid-dependent regulation of immune responses by dendritic cells and macrophages. *Seminars in Immunol* 21:22–27.
42. Mercier F, Boulassel MR, Yassine-Diab B, Tremblay C, Bernard NF, et al. (2008) Persistent human immunodeficiency virus-1 antigenaemia affects the expression of interleukin-7Ralpha on central and effector memory CD4+ and CD8+ T cell subsets. *Clin Exp Immunol* 152: 72-80.

43. Szatmari I, Nagy L. (2008) Nuclear receptor signalling in dendritic cells connects lipids, the genome and immune function. *EMBO* 27:2353–2362.
44. Qiao X, He B, Chiu A, Knowles DM, Chadburn A, et al. (2006) Human immunodeficiency virus 1 Nef suppresses CD40-dependent immunoglobulin class switching in bystander B cells. *Nature Immunol* 7: 302-310.
45. Xu W, Santini PA, Sullivan JS, He B, Shan M, et al.(2009) HIV-1 Evades virus-specific IgG2 and IgA responses by targeting systemic and intestinal B cells via long-range intercellular conduits. *Nature Immunol* 10: 1008-1017.
46. Mangino G, Percario ZA, Fiorucci G, Vaccari G, Acconcia F, et al. (2011) HIV-1 Nef Induces Proinflammatory State in Macrophages through Its Acidic Cluster Domain: Involvement of TNF Alpha Receptor Associated Factor 2. *PLoS ONE* 6(8): e22982. doi:10.1371/journal.pone.0022982
47. Wojtal KA, Wolfram L, Frey-Wagner I, Lang S, Scharl M, et al. (2013) The effects of vitamin A on cells of innate immunity in vitro. *Toxicology in Vitro* 27:1525–1532
48. Toma E, Devost D, Chow Lan N, Bhat PV. (2001). HIV-protease inhibitors alter retinoic acid synthesis. *AIDS* 15:1979-1984
49. Renga B, Francisci D, D'Amore C, Schiaroli E, Carino A, et al. (2012) HIV-1 infection is associated with changes in nuclear receptor transcriptome, pro-inflammatory and lipid profile of monocytes. *BMC Infectious Diseases* 12:274-280.
50. Chompre G, Cruz E, Maldonado L, Rivera-Amill V, Porter JT, et al. (2013) Astrocytic expression of HIV-1 Nef impairs spatial and recognition memory. *Neurobiology of Disease* 49: 128–136

Table 1. Sociodemographic and clinical characteristics of HIV-1-infected individuals

Characteristics	Viremic				P
	Rapid progressors (n = 13)	Classic progressors (n = 17)	slow progressors (n = 7)	Aviremic slow progressors (n = 6)	
Age at first visit (years)	34 ± 7	38 ± 8	46 ± 9	44 ± 9	0.005 ^a
Sex (male/female)	12/1	17/0	7/0	3/3	0.005
Race (white/other)	12/1	16/1	6/1	5/1	NS
Route of transmission	8/5	16/1	6/1	3/3	0.045
CD4+ T cells/mm³					
Acute phase	533 ± 140	781 ± 213	na	na	0.0023
Early phase	446 ± 40	714 ± 46	na	na	0.0008
Chronic phase	443 ± 193	629 ± 244	562 ± 122	888 ± 122	0.0108 ^b
Nadir	254 ± 118	432 ± 140	506 ± 129	506 ± 175	0.0005 ^c
Viremia, x 10³ copies/ml^d					
Acute phase	366 ± 705	76 ± 126	na	na	NS
Early phase	121 ± 186	71 ± 190	na	na	NS
Chronic phase	7.65 ± 15.3	37.7 ± 62.3	3.01 ± 1.86	< 0.05 ^d	0.0033 ^e
Peak	570 ± 808	202 ± 236	8.5 ± 6.5	0.065 ± 0.027	0.0001 ^f

Age, CD4 and viremia are expressed as mean ± SD. Sex, race and route of transmission were compared using Fisher exact test. Pairwise comparisons of CD4 and viremia for early phases were performed using unpaired Student's *t* tests. Comparisons among all groups (age at first visit, CD4, viremia in the chronic phase, nadir CD4) were performed with the one-way analysis of variance test. MSM, men who have sex with men; n, numbers; NS, not significant; na, not available.

^aP = 0.004 and 0.05 for the comparison of age between rapid and viremic slow progressors, and classic and viremic slow progressors, respectively, as determined by the Mann-Whitney test.

^bP = 0.0079 for the comparison of CD4+ T cells/mm³ in chronic phase between rapid progressors and aviremic slow progressors, as determined by the Mann-Whitney test.

^cP = 0.0008 and 0.001 and 0.02 nadir CD4 for the comparison between rapid and classic progressors, rapid and viremic slow progressors, and rapid and aviremic slow progressors, respectively, as determined by the Mann-Whitney test.

^dFifty copies/ml corresponds to the detection threshold of the viral load test.

^eP = 0.002 and 0.002 for the comparison of viremia in chronic phase between classic progressors and aviremic slow progressors, and viremic and aviremic slow progressors, respectively, as determined by the Mann-Whitney test.

^fP = 0.006, 0.0007, 0.0005, 0.0004 and 0.001 for the comparison of peak viremia between rapid progressors and viremic slow progressors, rapid progressors and aviremic slow progressors, classic progressors and viremic slow progressors, classic progressors and aviremic slow progressors, and viremic and aviremic slow progressors, respectively, as determined by the Mann-Whitney test.

Figure legends

Figure 1. Longitudinal variations of CD4⁺ T-cell counts, viral loads and levels of Nef in the blood of HIV-1-infected individuals. (A) Blood CD4⁺ T-cell counts (cell/mm³) were determined by flow cytometry in rapid progressors (left panel), classic progressors (middle panel), and slow progressors (right panel). (B) Viral loads (log copies/ml) were quantified by *in vitro* signal amplification nucleic acid probe assay of HIV-1 RNA (bDNA) in the plasma of rapid progressors (left panel), classic progressors (middle panel), and slow progressors (right panel). (C) Plasma Nef concentrations (ng/ml) were quantified by ELISA in rapid progressors (left panel), classic progressors (middle panel), and slow progressors (right panel). Cell populations, viral loads and plasma Nef concentrations were compared using the Wilcoxon signed-rank test and Mann-Whitney U test for pairwise comparisons of different phases of infection within each group and between the study groups, respectively. Significance levels are shown as * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$. PI, postinfection; ART, antiretroviral therapy.

Figure 2. Detection of Nef in blood myeloid dendritic cell (mDC) populations of HIV-1 infected individuals. (A) Cells were gated on total live peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) followed by exclusion of LIN (CD3, CD19, CD56)⁺ populations. Cells were then discriminated upon CD14 expression and selected for HLA-DR and CD11c expression. monocytic mDC precursors were determined as LIN⁻ CD14⁺ HLA-DR⁺ CD11c⁺ and mDCs as LIN⁻ CD14⁻ HLA-DR⁺ CD11c⁺. Quadrants are set based on FMO and isotype controls. Extracellular and/or intracellular Nef was then characterized in these populations. Measurement of background Nef in HIV-negative donors was subtracted from measurements of all HIV-1 infected individuals for statistical analysis. Relative percentages of (B) mDC and (C) monocytic mDC precursors bearing Nef in rapid progressors (left panel), classic progressors (middle panel), and slow progressors (right panel). The same values for HIV-negative donors in the left, middle and right panels are used as a control group. Cell population frequencies were compared using the Wilcoxon signed-rank test and the Mann-Whitney U test for pairwise comparisons of different phases of infection within each group and between the study groups, respectively. Data shown are mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$. PI, postinfection; ART, antiretroviral therapy.

Figure 3. BLyS/BAFF expression by blood myeloid dendritic cells (mDCs) and monocytic mDC precursors bearing HIV-1 Nef. (A) Spearman correlation between plasma BLyS/BAFF and Nef concentrations within the 0-3 months postinfection stage of classic progressors. (B) Fold-increase of BLyS/BAFF expression levels by mDCs (LIN (CD3, CD19, CD56)⁻ CD14⁻ HLA-DR⁺ CD11c⁺) bearing HIV-1 Nef over that of mDCs not bearing HIV-1 Nef, in rapid progressors (left panel), classic progressors (middle panel) and slow progressors (right panel). (C) Fold-increase of BLyS/BAFF expression levels by monocytic mDC precursors (LIN (CD3, CD19, CD56)⁻ CD14⁺ HLA-DR⁺ CD11c⁺) bearing HIV-1 Nef over that of mDC precursors not bearing HIV-1 Nef, in rapid progressors (left panel), classic progressors (middle panel) and slow progressors (left panel). (B-C) Data are represented as mean \pm SEM, and compared to a fold-increase of one. Membrane BLyS/BAFF expression levels were determined with geometric mean fluorescence intensity (GeoMFI) by flow cytometry. The fold-increase in BLyS/BAFF expression levels were compared using the unpaired Student's *t* test within each phase of infection and within each study group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$. PI, postinfection; ART, antiretroviral therapy.

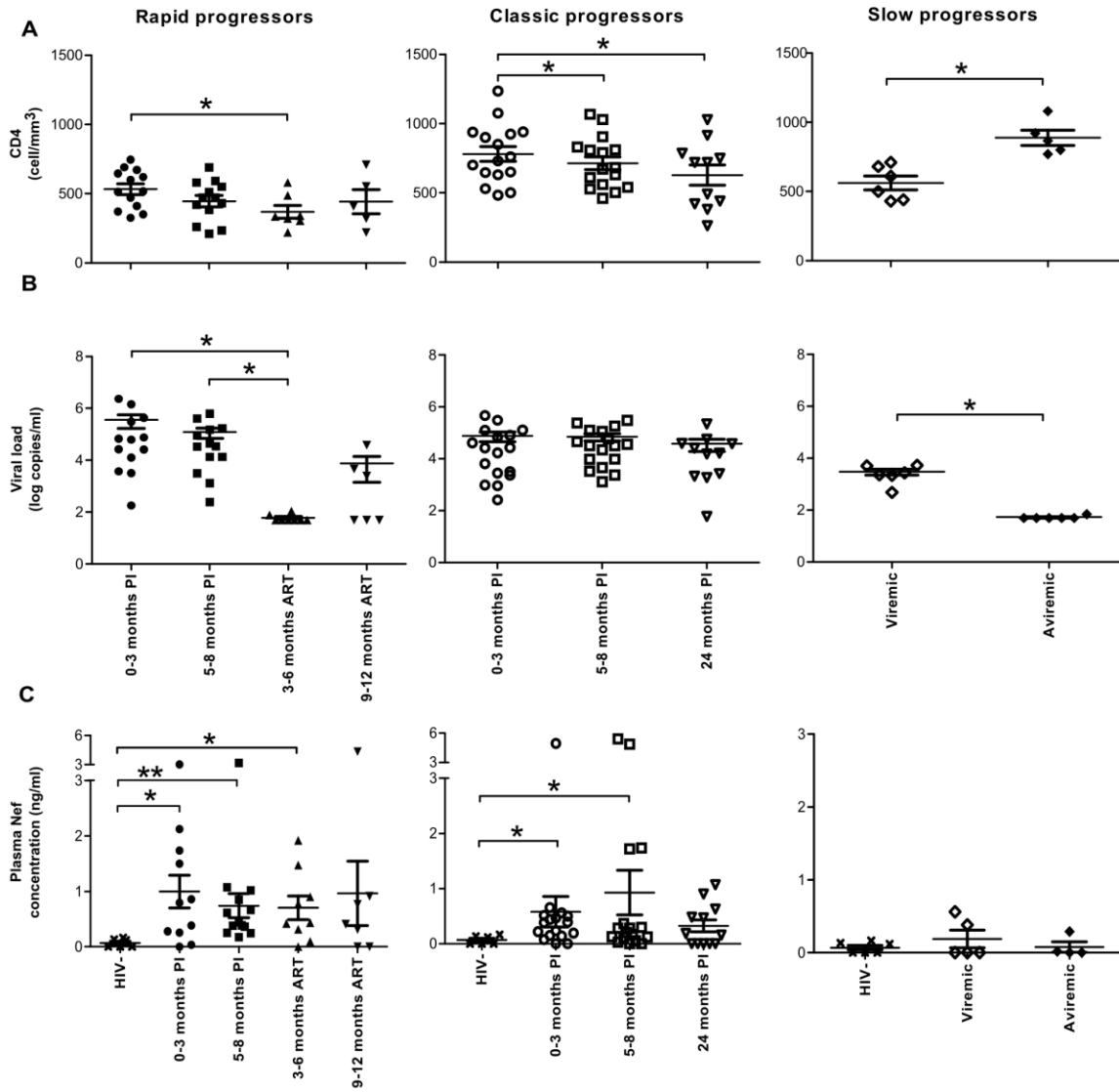
Figure 4. Effect of recombinant soluble HIV-1 Nef (sNef) on BLyS/BAFF expression by monocyte derived dendritic cells (Mo-DCs). CD14⁺ monocytes were negatively enriched from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of a healthy donor and cultured in presence of recombinant human GM-CSF and IL-4 for 6 days. Cells recovered were 85-95% HLA-DR⁺ CD11c⁺ LIN (CD3, CD19, CD56)⁻ as assessed by multicolour flow cytometry analysis. Mo-DCs were then stimulated or not for 24 hours with sNef at 1 μ g/ml and/or LPS at 2 μ g/ml, and subsequently processed for flow cytometry. (A) Dot plots show live gate on HLA-DR⁺ CD11c⁺ Mo-DCs and analysis for BLyS/BAFF and TNF- α expression patterns by Mo-DCs cultured with either medium alone (left panels) or in presence of sNef (right panels). Quadrants are set based on FMO and isotype controls. (B-D) Data are representative of 10 independent experiments which are cumulated in histograms showing: B) HLA-DR (upper panel), CD11c (middle panel), CD86 (lower panel), and (C) BLyS/BAFF (upper panel) and TNF- α (lower panel) fold-increase expression levels, as determined by geometric mean fluorescence intensity (geoMFI), when cultured in presence of sNef or LPS over that of

medium alone. (D) Fold-increase frequencies of high BLYS/BAFF-expressing Mo-DCs, when cultured in presence of sNef or LPS over that of medium alone. (B-D) Data are compared to a fold-increase of one. (E) Soluble BLYS/BAFF concentrations (pg/ml) in day 6 supernatants of Mo-DCs, cultured in presence or absence of sNef, were quantified by ELISA (n=10). (F) Dot plots show Nef detection in live day-6 HLA-DR⁺ CD11c⁺ Mo-DCs incubated in medium alone (left panel) or with sNef at 1µg/ml for 1 hour (middle panel) and for 6 hours (right panel) (n=3). (G) Dot plots represent BLYS/BAFF and TNF-α expression patterns by live day-6 HLA-DR⁺ CD11c⁺ Mo-DCs cultured for 24 hours in presence of sNef at 1µg/ml (left panel), and anti-Nef antibody at 1µg/ml (middle panel) or at 5µg/ml (right panel) (n=3). Statistical analyses were done using the unpaired Student's *t* test.

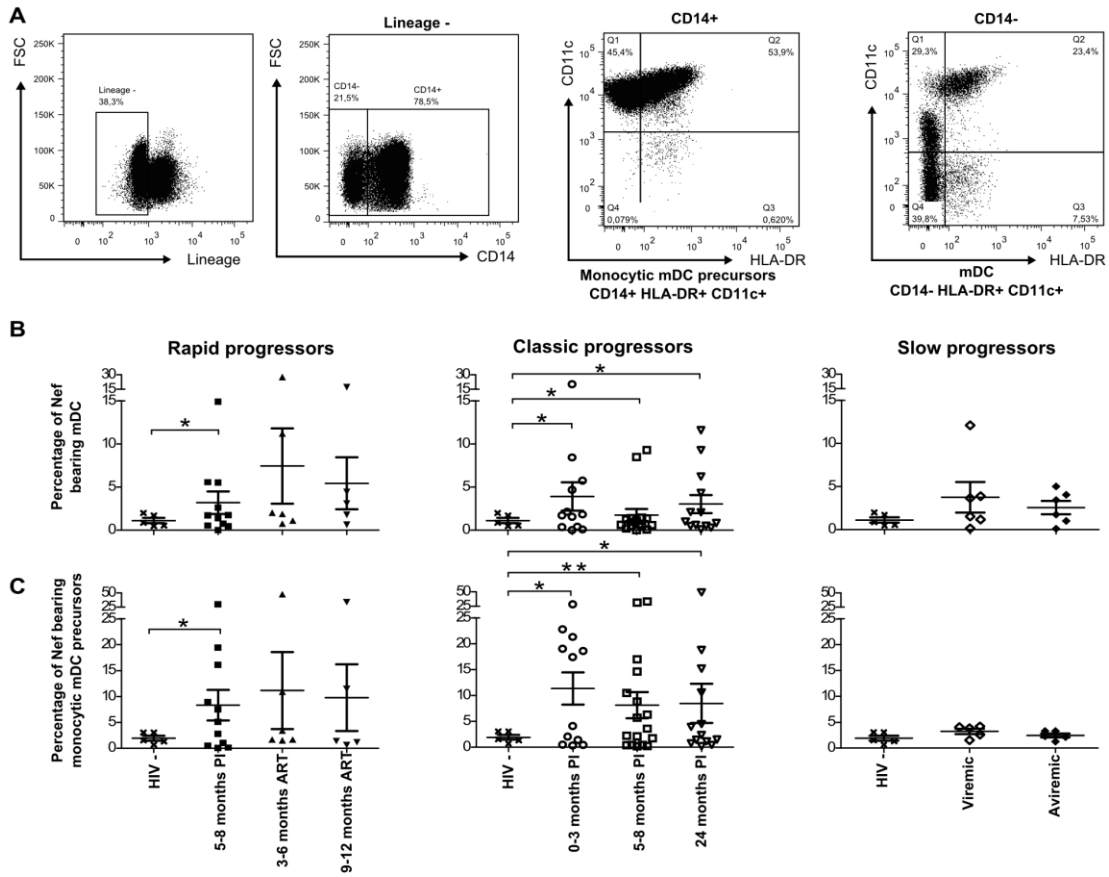
Figure 5. Effect of Retinoic acid (RA) on BLYS/BAFF expression by monocyte derived dendritic cells (Mo-DCs). CD14⁺ monocytes were negatively enriched from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of a healthy donor and cultured in presence of recombinant human GM-CSF and IL-4 for 6 days, with or without RA at 1µM. Cells recovered were 85-95% HLA-DR⁺ CD11c⁺ LIN (CD3, CD19, CD56)⁻ as assessed by multicolour flow cytometry analysis. (A-D) Six independent experiments are cumulated in histograms showing: (A) HLA-DR (upper panel), CD11c (middle panel), CD86 (lower panel), and (B) BLYS/BAFF (upper panel) and TNF-α (middle panel) fold-increase expression levels, as determined by geometric mean fluorescence intensities (geoMFI), when cultured in presence of RA vs medium alone. (C) Fold-increase frequencies of high BLYS/BAFF-expressing Mo-DCs, when cultured in presence vs absence of RA for 6 days. (D) Day-6 Mo-DCs derived in absence of RA were stimulated or not for 24 hours with either of sNef at 1µg/ml or RA at 1µM, or both. Representative dot plots show live gate on HLA-DR⁺ CD11c⁺ Mo-DCs and analysis for BLYS/BAFF and TNF-α expression patterns by Mo-DCs cultured with either medium alone (upper left panel), sNef (upper right panel), RA (lower left panel) or both sNef and RA (lower right panel). Quadrants are set based on FMO and isotype controls. Cumulative histograms show (E) BLYS/BAFF fold-increase expression levels as determined by geoMFI, and (F) fold-increase frequencies of high BLYS/BAFF-expressing Mo-DCs, when cultured in presence vs absence of sNef and/or RA for 24 hours over that of medium alone (effects of sNef, n = 10;

RA and sNef + RA, n = 3). G) Fold-increase frequencies of STAT1-tyrosine (Y701) phosphorylation, as assessed by multicolour flow cytometry analysis of day-6 Mo-DCs which were incubated in presence vs absence of sNef and/or RA for 15 minutes over that of 0 min (30, 60, and 120 min not shown) (n=4). (E-G) Data are compared to a fold-increase of one. Statistical analyses were made using the unpaired Student's *t* test.

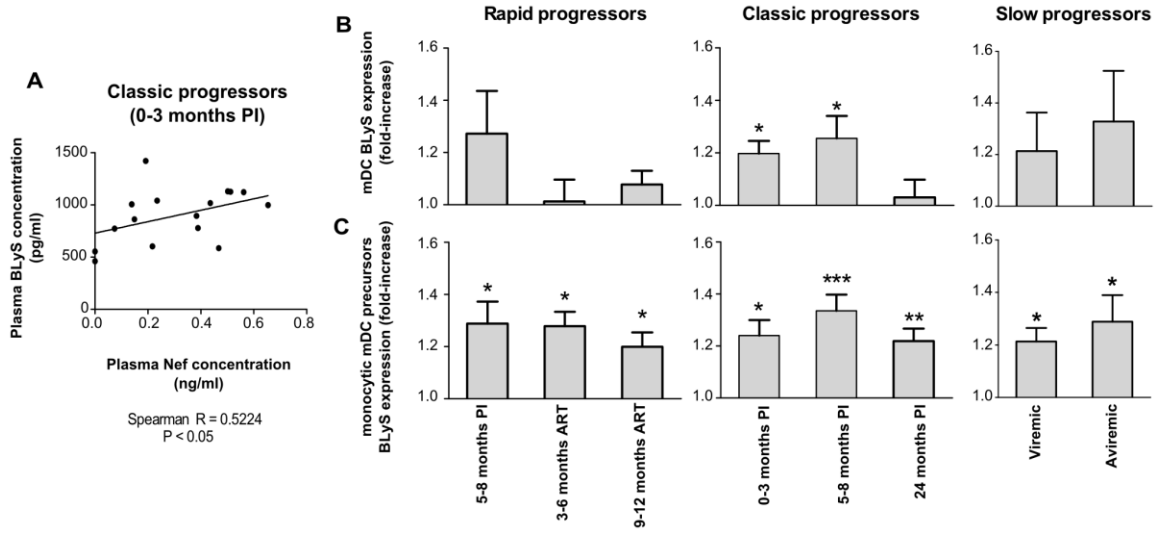
Article 1 - Figure 1



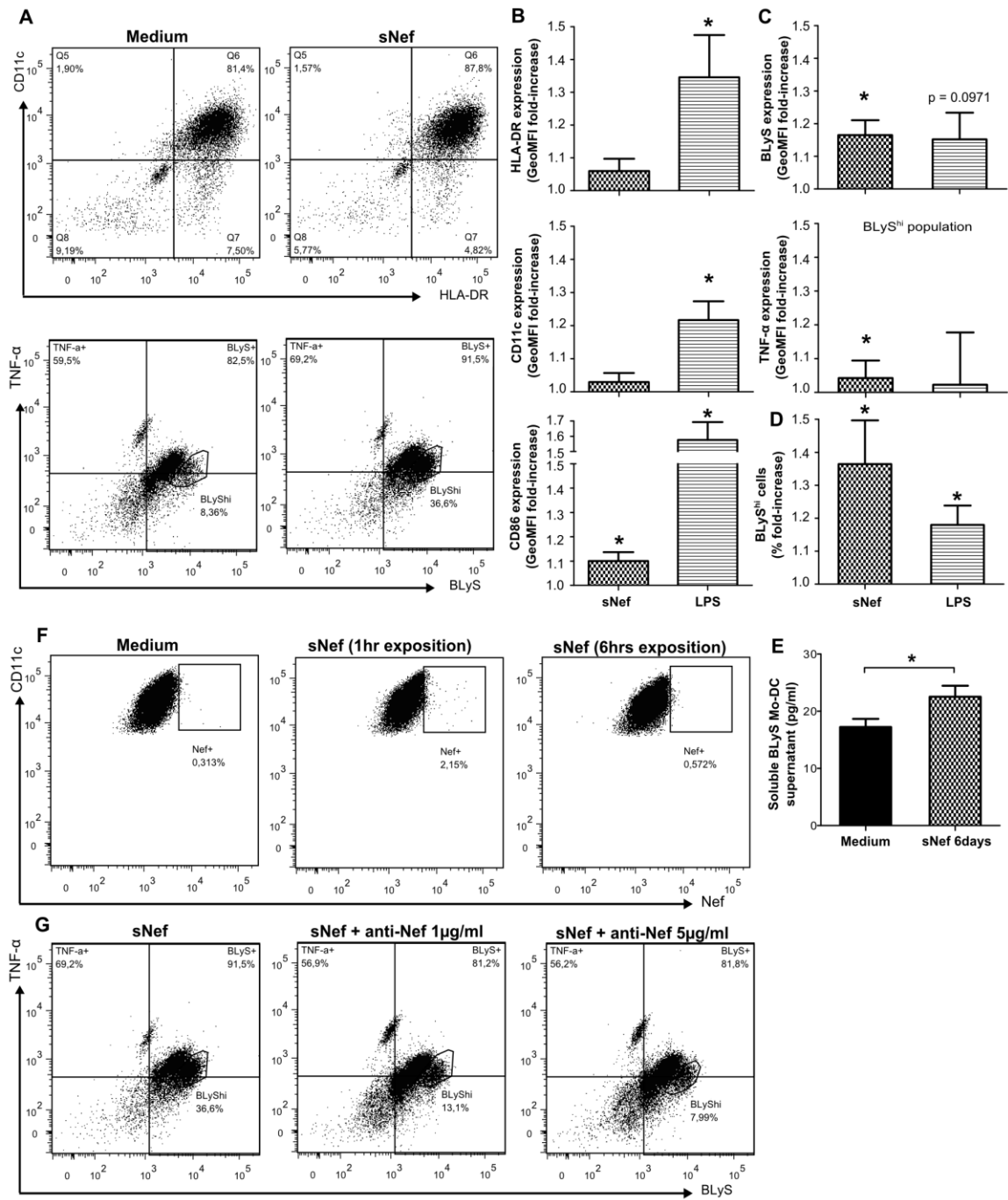
Article 1 – Figure 2



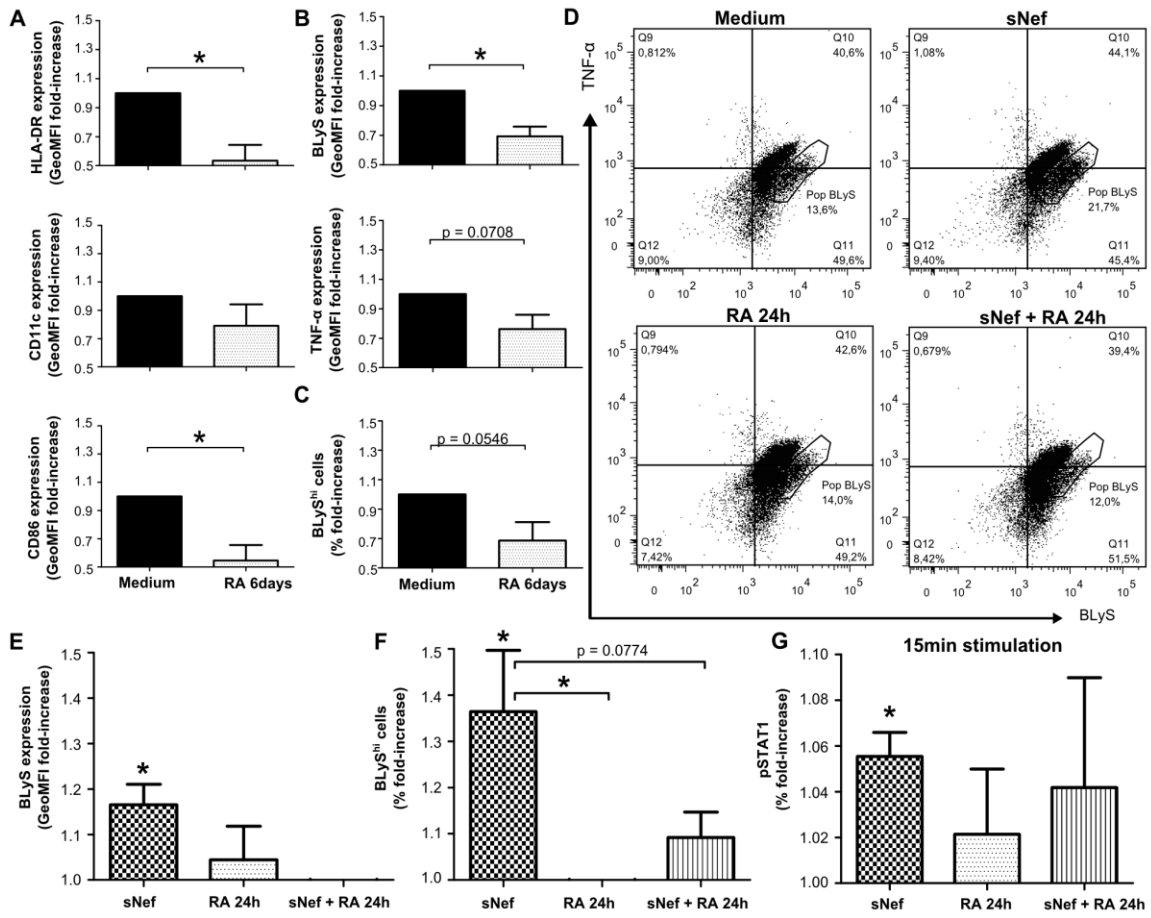
Article 1 – Figure 3



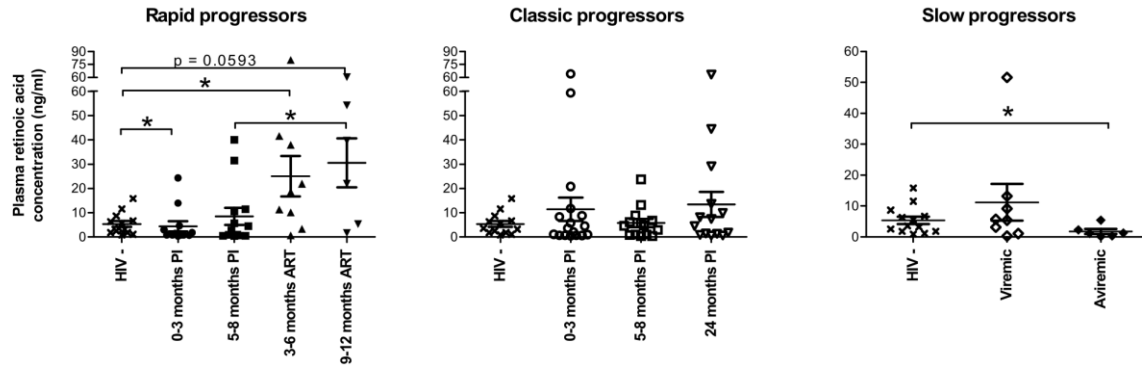
Article 1 – Figure 4



Article 1 – Figure 5



Article 1 – Figure Supplemental 1



Plasma Retinoic acid (RA) concentrations (ng/ml) were quantified by ELISA in rapid progressors (left panel), classic progressors (middle panel), and slow progressors (right panel). RA concentrations were compared using the Wilcoxon matched pair test and Mann-Whitney U test for pairwise comparisons of different phases of infection within each group and between the study groups, respectively. Significance levels are shown as * $p < 0.05$. PI, postinfection; ART, antiretroviral therapy.

Article 2

IL-10 and Lymphotoxin- α Expression Profiles within Marginal Zone-like B-cell Populations are Associated with Control of HIV-Disease Progression

Josiane Chagnon-Choquet, Julie Fontaine, Johanne Poudrier*, Michel Roger* for the Montreal Primary HIV Infection and Slow Progressor Study Groups. * co-senior authors

Statut : Article soumis pour *PloS One*.

Contribution des co-auteurs :

Josiane Chagnon-Choquet a effectué les analyses de quantification de LT- α sur les spécimens, et les analyses de cytométrie en flux, a aussi réalisé les analyses statistiques des résultats et a participé à la rédaction de l'article. Julie Fontaine a participé aux analyses de quantification d'IL-10 sur les spécimens. Johanne Poudrier a participé à l'élaboration de l'étude, a supervisé les expériences et a participé à la rédaction de l'article. Michel Roger a participé à la rédaction de l'article et a coordonné les différents aspects de l'étude.

IL-10 and Lymphotoxin- α Expression Profiles within Marginal Zone-like B-cell Populations are Associated with Control of HIV-1 Disease Progression

Josiane Chagnon-Choquet^{1,2}, Julie Fontaine^{1,2,3}, Johanne Poudrier^{1,2*}, Michel Roger^{1,2*} for the Montreal Primary HIV Infection and Slow Progressor Study Groups.

¹Laboratoire d'immunogénétique, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Montréal, Canada, ²Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie de l'Université de Montréal, Montréal, Canada, ³present address Charles Rivers Laboratories, Senneville, Canada.

*JP and MR are senior co-authors

Word count in text: 3780

Word count in abstract: 169

Short Title: Marginal Zone-like B-cells in HIV infection

Number of figures and tables: Figures 5, Supplemental Figures 3, Table 1.

Reference count: 41

Part of this work was presented at Keystone symposium on B cell Development and Function joint with HIV vaccines, February 10th-15th 2013, CO, USA.

The members of the Montreal Primary HIV Infection and Slow Progressor Study Groups are Anne Vassal and Mario Legault (coordinators); Jean Pierre Routy (principal investigator Primary HIV Study), Cécile Tremblay (principal investigator Slow Progressor Study), Réjean Thomas, Benoit Trottier, Sylvie Vézina, Louise Charest, Catherine Milne, Jason Friedman, Emmanuelle Huchet (Clinique médicale l'Actuel), Jean-Guy Baril, Pierre Côté, Bernard Lessard, Serge Dufresne, Marc-André Charron (Clinique médicale du Quartier Latin). Roger LeBlanc (Clinique médicale urbaine OPUS), Louise Labrecque, Danielle Rouleau, Claude Fortin, Marie Munoz, Julie Bruneau (UHRESS Hôtel-Dieu, Notre-Dame, St-Luc), Norbert Gilmore, Richard Lalonde, Martin Potter, Marina Klein, Alexandra de Pokomandy, Jason Szabo, Nicole Bernard (UHRESS thoracique & Hôpital général de Montréal).

██
██
██
██
██

Abstract

Understanding how the immune system facilitates or controls HIV-1 disease progression has important implications for the design of effective interventions. We report that although B-cell dysregulations associated with HIV-1 disease progression are accompanied by an overall decrease in the percentage of total blood B-cells, we observe an increase in relative frequencies of cells presenting characteristics of both transitional immature and first-line marginal zone (MZ) B-cell populations, we designated as precursor MZ-like B-cells. B-cells with similar attributes have been associated with IL-10 expression and “regulatory” potential. As such, the relative frequencies of precursor MZ-like B-cells expressing IL-10 are increased in the blood of viremic HIV-1-infected individuals when compared to HIV-negative subjects. Importantly, in aviremic HIV-1 Elite-Controllers (EC), we found unaltered relative percentages of precursor MZ-like B-cells which presented normal IL-10 expression patterns. Furthermore, EC had increased relative frequencies of blood MZ-like B-cells expressing LT- α . Thus in contrast to viremic HIV-1-infected individuals, EC present MZ-like B-cell populations which IL-10 and LT- α expression profiles may favour homeostasis of immune responses and lymphoid microenvironments.

Introduction

It is well known that the contribution of the B-cell compartment to effective viral control is impeded in the vast majority of HIV-1-infected individuals. Indeed, B-cell dysregulations are observed early, persist throughout the course of infection, and are not fully restored by therapy. These B-cell alterations favour the overall inflammatory burden and often lead to autoimmune manifestations and malignancies [reviewed in 1-2].

We have previously shown that HIV-transgenic (Tg)-mice, which develop a negative factor (Nef)-dependant AIDS-like disease [3], present B-cell dysregulations that are similar to that reported for HIV-infected individuals [4]. Strikingly, these animals present an enlarged splenic marginal zone (MZ), in which accumulated myeloid dendritic cells (mDCs) likely contribute to MZ expansion, polyclonal B-cell activation and breakage of tolerance through delivery of excessive signals such as B lymphocyte stimulator (BLyS/BAFF) [4-5]. A similar B-cell profile was reported for BLyS/BAFF-Tg [6] and autoimmune-regulatory-(AIRE)-deficient mice, in which BLyS/BAFF is elevated in serum and over-expressed by DCs [7-8]. Accordingly, DCs play a pivotal role in regulating B-cell development, activation and survival mainly through production of growth factors such as BLyS/BAFF [9-11], known to highly influence the transitional immature (TI) and MZ B-cell pools [reviewed in 12-13].

MZ B-cells constitute early first-line defence against invading pathogens. In humans, they likely constitute a heterogeneous niche that is not restricted to the spleen, as they have been found in blood, lymphoid organs and mucosal-associated structures [reviewed in 12-13]. Reminiscent of that observed in HIV-Tg mice [4], we found that B-cell dysregulations in HIV-1-infected rapid and classic progressors were accompanied by increased relative frequencies within total blood B-cells of a population presenting features shared by both TI and MZ B-cells, which we designated “precursor” MZ-like B-cells. Concomitantly, these individuals presented increased BLyS/BAFF levels in blood and on surface of blood mDCs [14]. In contrast, relative frequencies of precursor MZ-like B-cells as well as BLyS/BAFF expression status were unaltered in HIV-1 Elite-Controllers (EC) [14]. Instead, decreased frequencies of more “mature” MZ-like B-cells were observed in the blood B-cell compartment of EC.

B-cells are involved in regulating the development, proliferation and maintenance of CD4⁺ T-cell populations, through both contact and/or cytokine mediated effector and

regulatory functions [15]. Regulatory “Breg” potential has not yet been attributed to a particular B-cell population and relies rather on IL-10 expression/production and function. Both precursor and mature B-cells with MZ attributes as well as TI and memory populations have been ascribed such Breg potential [16-17]. This has prompted us to assess whether IL-10 expression profiles by precursor and mature MZ-like as well as TI and memory B-cell populations are modulated during HIV-1 infection. In addition, the fact that high levels of Lymphotoxin (LT)- α have been associated with autoimmune and inflammatory contexts [18], and that increased LT- α to IL-10 B-cell expression ratios have been observed in patients with multiple sclerosis [19], prompted us to also assess B-cell LT- α expression profiles.

Materials and Methods

Ethics Statement

Written informed consent was obtained from all subjects, and the research conformed to ethical guidelines and was approved by the Ethics Review board of the Centre de Recherche du CHUM. The reference number for the project is: SL 05.028.

Subjects

Thirty male HIV-1-infected subjects were selected from the Montreal Primary HIV Infection (PHI) cohort: 13 were classified as rapid and 17 as classic progressors. The date of infection was estimated using criteria established by the Acute HIV Infection and Early Disease Research Program (NIAID, Bethesda, MD). Rapid progressors had blood CD4⁺ T-cell counts below 250 cells/mm³ within 2 years of infection. Blood samples were taken in acute (0-3 months) and/or early (5-8 months) phases of infection, and 3-6 and 9-12 months after initiation of antiretroviral therapy (ART). Classic progressors were ART-naive individuals whose blood CD4⁺ T-cell counts remained above 500 cells/mm³ for the 2 year follow-up. Blood samples were obtained in the acute, early and chronic (24 months) phases of infection. Moreover, blood samples from 13 slow progressors were obtained from the Slow Progressors cohort, where patients were infected for 8 years or more with blood CD4⁺ T-cell counts above 500 cells/mm³ and presented low (7 viremic patients) to undetectable (6 aviremic patients/EC) viral loads in absence of ART. Blood samples from 20 age- and sex-matched HIV-negative

healthy volunteers were also obtained. HIV viral loads were determined in plasma using Versant HIV-1 RNA 3.0 Assay (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown, NY). Blood CD4⁺ T-cell counts were determined as reported [20]. None of the subjects had syphilis, hepatitis B or C. Written informed consent was obtained from all subjects, and the research conformed to ethical guidelines and was approved by the Ethics Review board of the Centre de Recherche du CHUM.

Evaluation of plasma IL-10 and LT- α concentrations

Plasma levels of IL-10 were determined using the Cytometric Bead Array Human Inflammation Kit (BD-Biosciences, San Jose, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Data were acquired on a FACS Aria and analysed with the FCAP software (BD-Biosciences). Plasma levels of LT- α were measured with the Milliplex Map magnetic bead kit (Millipore, Billerica, MA, USA) according to the manufacturer's protocol using the Luminex 200 Total System (Luminex Corporation, Austin, TX, USA).

Evaluation of blood B-cell populations by flow-cytometry

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated on Ficoll gradient, resuspended in heat-inactivated fetal bovine serum (hi-FBS) containing 10% dimethyl sulfoxide and stored in liquid nitrogen. One million PBMCs per sample were used for staining. Live/dead exclusion was performed using Aqua-LIVE/DEAD Fixable Stain (Invitrogen Life technologies, Eugene, OR, USA). Non-specific binding sites were blocked using fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer (1x PBS, 2% hi-FBS, and 0.1% sodium azide) supplemented with 20% hi-FBS and 10 μ g mouse IgG (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). The following conjugated mouse anti-human monoclonal antibodies were used: PacificBlue-anti-CD19, APC-Cy7-anti-CD10 (BioLegend, San Diego, CA, USA), AlexaFluor700-anti-CD27, FITC-anti-IgM, PE-anti-CD21 (BD-Biosciences), PerCP-eFluor710-anti-CD1c (eBioscience, San Diego, CA, USA), APC-anti-LT- α (LifeSpan BioSciences, Seattle, WA, USA), and rat anti-human PE-Cy7-anti-IL-10 (BioLegend). Intracellular labelling was performed using the Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization kit and perm/wash buffer (BD-Biosciences). Intracellular non-specific binding sites were blocked using perm/wash buffer containing 20% hi-FBS, 50% rat

serum and 20 μ g mouse IgG. Cells were kept at 4°C in 1.25% paraformaldehyde for 18 hours prior to analysis. Data acquisition of 10⁵ events per sample was performed with LSRFortessa (BD-Biosciences), and analysis was done with FlowJo7.6.3 software (TreeStar, Ashland, OR, USA). All stainings were compared to that of fluorescence minus one (FMO) values and isotype controls. Anti-mouse Ig(κ) Compbeads and CS&T Beads (BD-Biosciences) were used to optimize fluorescence compensation settings and calibrate the LSRFortessa, respectively.

Statistical analyses

The statistical significance of differences between groups was assessed with Fisher exact test for categorical variables and unpaired Student t test or one-way analysis of variance when continuous variables were normally distributed or with Mann-Whitney U test otherwise. Wilcoxon signed rank test was used for pairwise comparisons of different phases of infection within each group. Spearman rank test was used to determine correlations between continuous variables. Analyses were performed using GraphPad Prism 5.03 for Windows (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA).

Results

Socio-demographic and clinical characteristics of HIV-1-infected individuals

The socio-demographic and clinical characteristics of the HIV-1-infected individuals are shown in Table 1, and the longitudinal assessment of blood CD4⁺ T-cell counts and viral loads are depicted in Figure S1A-B. There were no significant correlations between blood CD4⁺ T-cell counts or viral loads and B-cell populations, LT- α and IL-10 plasma levels studied here either within groups or among all subjects during early or chronic infection (data not shown).

Longitudinal monitoring of blood B-cell populations in HIV-1-infected individuals with different rates of disease progression

We have previously reported that blood precursor and mature MZ-like B-cell populations are differentially modulated in the context of HIV disease progression vs. control [14]. To further the characterization of these B-cells, we have adapted our staining cocktail for detection of intracellular expression of IL-10 and LT- \square (see below). The analyses of B-cell populations

using this modified staining strategy confirm previous observations and are depicted in Figure 1. The mean percentages of total live blood CD19⁺ B-cells in all HIV-1-infected individuals were lower throughout the course of infection than those observed in HIV-negative donors, reaching statistical significance in both rapid and classic progressors (Figure 1B). Upon analysis for variations in the relative frequencies of different B-cell populations, we observed that the mean relative percentages of mature activated (CD19⁺CD27⁺IgM⁻CD21^{lo}CD10⁻) and precursor MZ-like B-cells (CD19⁺CD27⁺IgM^{hi}CD21^{lo}CD1c⁺CD10⁺), were significantly above normal levels in rapid and classic progressors (Figure 1C, E). There was a trend for increased relative frequencies of TI B-cells (CD19⁺CD27⁻IgM⁺CD21⁺CD10⁺) in chronically HIV-1-infected classic progressors (Figure 1G). In contrast, the relative frequency of the more mature MZ-like B-cell population (CD19⁺CD27⁺IgM^{hi}CD21^{hi}CD1c⁺CD10⁻) within total blood B-cells remained unaltered in both rapid and classic progressors (Figure 1F, left and middle panels), whereas the percentages were significantly below normal levels in both viremic and aviremic slow progressors, the latter also referred herein as EC (Figure 1F, right panel). The relative frequencies of resting switched memory B-cells (CD19⁺CD27⁺IgM⁻CD21^{hi}CD10⁻) were below normal levels in chronically infected classic progressors (Figure 1D, middle panel). Naïve resting B-cells (CD19⁺CD27⁻IgM⁺CD21^{hi}CD10⁻), were slightly below normal levels in all HIV-1-infected individuals (data not shown).

Longitudinal monitoring of IL-10 expression by blood B-cell populations in HIV-1-infected individuals with different rates of disease progression

Blood B-cell populations presented in Figure 1 were assessed *ex vivo* for intracellular IL-10 expression based on the same strategy of flow-cytometry analysis depicted in Figure 1A. Figure 2A shows a representative profile of total live B-cells expressing IL-10 and their distribution within IgM and CD27 quadrants of expression. Note that the majority of IL-10 expressing B-cells are IgM⁺ (Figure 2A). Because IL-10 expression might be influenced by the fluctuations in B-cell population frequencies shown in Figure 1, data are expressed as percentages of IL-10 expressing cells within each B-cell population. Frequencies of total B-cells expressing IL-10 in all viremic HIV-1-infected individuals were significantly higher than those observed in HIV-negative donors (Figure 2B). The percentages of total B-cells

expressing IL-10 were restored to normal levels following therapy in rapid progressors (Figure 2B, left panel). Similar patterns of IL-10 expression were observed for precursor MZ-like and TI B-cell populations in all viremic HIV-1-infected individuals (Figure 2E, G), as well as for mature activated and resting switched memory B-cells in viremic slow progressors (Figure 2C-D). Relative frequencies of resting switched memory B-cells expressing IL-10 were increased in classic progressors during the early phase of infection (Figure 2D, middle panel), whereas that of mature MZ-like B-cells expressing IL-10 were elevated in viremic slow progressors (Figure 2F, right panel). Importantly, percentages of IL-10 expression in all B-cell populations of aviremic slow progressors/EC were similar to those observed in HIV-negative donors, except for resting switched memory and TI B-cells, in which the relative frequencies of IL-10 expressing cells were significantly increased (Figure 2D, G, right panels). The frequencies of naïve resting B-cells expressing IL-10 remained unaltered in all HIV-infected individuals (data not shown). We did not detect changes in IL-10 expression levels following analysis of geometric mean fluorescence intensities (geoMFI) (data not shown). Figure S2 shows a recapitulative analysis of B-cell IL-10 expression profiles. The contribution to IL-10 expression from B-cell populations not analyzed herein will require further investigation.

Data were plotted in order to compare the percentage of IL-10 expressing cells between each B-cell population, within each patient group at various time points (Figure 3). Amongst the B-cell populations analysed, the precursor MZ-like B-cells were the main expressors of IL-10 during the early phase of infection in both the rapid and classic progressor groups (Figure 3A, left panel; B, middle panel). This was also true for classic progressors in the chronic phase of infection (Figure 3B, right panel). All B-cell populations contributed equally to IL-10 expression in the slow progressor and HIV-negative donor groups (Figure 3C). Of note, plasma levels of IL-10 were found to be elevated throughout follow-up in all HIV-1-infected individuals, including ART-treated rapid progressors and aviremic slow progressors/EC (Figure S1C).

Overall, frequencies of total blood B-cells expressing IL-10 in all viremic HIV-1-infected individuals were significantly higher than those observed in HIV-negative donors. Amongst the B-cell populations analysed, the relative percentage of IL-10 expressing cells is significantly increased within the precursor MZ-like, TI and memory populations. The most

significant increase in cells expressing IL-10 was within the precursor MZ-like population. Importantly, we found unaltered percentages of total and of MZ-like B-cells expressing IL-10 in aviremic slow progressors/EC.

Longitudinal monitoring of LT- α expression by blood B-cell populations in HIV-1-infected individuals with different rates of disease progression

Blood B-cell populations presented in Figure 1 were assessed *ex vivo* for intracellular LT- α expression based on the same strategy of flow-cytometry analysis depicted in Figure 1A. Figure 4A shows a representative profile of total live B-cells expressing LT- α and distribution within IgM and CD27 quadrants of expression. The data are presented as percentages of LT- α expressing cells within each B-cell population. There was a significant increase in frequencies of total B-cells expressing LT- α in the blood of both classic and slow progressors when compared to HIV-negative donors (Figure 4B). There was a trend for increased frequencies of total B-cells expressing LT- α following therapy in rapid progressors (Figure 4B, left panel). Similar patterns of LT- α expression were observed in mature activated, precursor MZ-like, mature MZ-like and TI B-cell populations (Figure 4C, E-G). The relative frequencies of resting switched memory B-cells expressing LT- α were not significantly affected (Figure 4D), as were those of naïve resting B-cells (data not shown). We did not detect changes in LT- α expression levels following analysis of geoMFI (data not shown). A recapitulative analysis of B-cell LT- α expression profiles is provided in Figure S3.

Data were plotted in order to compare the percentage of LT- α expressing cells between each B-cell population, within each patient group at various time points (Figure 5). Amongst the B-cell populations analysed, the precursor MZ-like and TI B-cells were the main contributors of LT- α expression during the acute, early and chronic phases of infection in all viremic HIV-1-infected individuals (Figure 5A-B; C, left panel). The precursor MZ-like B-cells were the main contributors of LT- α expression in the aviremic slow progressor/EC and HIV-negative groups (Figure 5C). Plasma levels of LT- α in all HIV-infected individuals were similar to those observed in HIV-negative donors (Figure S1D). Overall, increased relative frequencies of precursor MZ-like B-cells expressing LT- α appear associated with a better control of disease progression.

Discussion

The percentages of total live blood CD19⁺ B-cells were lower in all HIV-1-infected individuals when compared to those observed in HIV-negative donors. However, despite the fact that precursor MZ-like B-cells may represent only a small fraction of circulating B-cells, their increased relative frequencies in the blood of HIV-1-infected rapid and classic progressors, may underlie an important effect on the ability to mount efficient B-cell responses and/or on disease progression. Indeed, given the frequent auto-reactive and cross-reactive repertoires of MZ type populations [12-13], the increase relative frequency of these cells may likely be associated with polyclonal B-cell activation and hyperglobulinemia reported for these individuals [14], as well as lead to breakage of tolerance and autoimmune manifestations. Moreover, it is envisagable that their increased relative proportions and activity disturb B-cell population dynamics and niche homeostasis, preventing establishment of more efficient and protective anti-HIV B-cell responses.

The relative increase of such B-cells may reflect the host response to lymphopenia [21] and the overall inflammation and high levels of BLyS/BAFF [22-26] previously found in the plasma and on surface of blood mDCs in these individuals [14]. Indeed, as previously suggested in the context of autoimmune disorders, excessive BLyS/BAFF conditions may contribute to increased survival of TI B-cells and favoured selection into a MZ-like “first line” B-cell pool [22-26], which responsiveness is also highly influenced by BLyS/BAFF [12-13]. Furthermore, the fact that these individuals experience microbial translocation [14], is in line with human MZ B-cells being particularly solicited in response to encapsulated bacteria [27]. In contrast, in EC, relative blood levels of precursor MZ-like B-cells were similar to those observed in HIV-negative donors [14]. Moreover, EC had low-inflammatory profiles, unaltered levels of BLyS/BAFF and undetectable elements of microbial translocation [14], suggesting they are able to maintain a certain degree of immune integrity.

Interestingly, both viremic and aviremic slow progressors/EC had decreased relative frequencies of more mature MZ-like B-cells within their blood B-cell compartment when compared to both rapid and classic progressors, and HIV-negative donors. This finding could suggest that the capacity to recruit this population to peripheral sites may be beneficial to the “control” of disease progression. Intriguingly, a decrease in blood CD27⁺IgM⁺IgD⁺ MZ type

B-cells has been recently reported in patients with MyD88, IRAK4, and TIRAP deficiencies [27]. Therefore, signalling involving these factors, such as TLR and the BLyS/BAFF receptor TACI [11-13, 27], may be involved in homeostasis of MZ type B-cells. As such, whether there is a relation with the reduced frequencies of mature MZ-like B-cells we observe in slow progressors warrants further investigation.

Although our sample number was limited, we were able to accurately and reproducibly measure *ex vivo* IL-10 expression by blood B-cells. We found that in the context of detectable viremia, the percentages of total blood B-cells expressing IL-10 were increased when compared to HIV-negative individuals (Figure 2B). Amongst the B-cell populations analysed, the percentage of IL-10 expressing cells were significantly increased within the precursor MZ-like, TI and switched memory populations. Moreover, the most significant increase in cells expressing IL-10 was within the precursor MZ-like population. Importantly, the relative increase in precursor MZ-like B-cells expressing IL-10 correlated with high levels of serum IgG1 and IgG3 in the early phase of HIV-1-infection in classic progressors ($p = 0.0184$; $p = 0.0499$, respectively), and with high levels of serum IgA in chronic classic progressors ($p = 0.0479$). These are likely to reflect polyclonal B-cell activation in relation to the overall inflammatory condition we observed in HIV-1 progressors [14, 28], as B-cell IL-10 production has been shown to be modulated by various signals, such as delivered via TLR, CD40 and the B-cell receptor (BCR) [16-17]. Our findings could also suggest an attempt from the host to dampen the overwhelming inflammatory burden by soliciting regulatory functions from various B-cell populations, such as switched memory, TI and MZ-like B-cells, which have been variably associated with Breg capacity [16-17]. Of course, we cannot rule out that precursor MZ-like B-cells are more permissive to modulation by the overall HIV condition, but it may be that they represent a population more prone to Breg potential. Frequencies of populations with similar characteristics and Breg attributes have been shown to be increased in the blood of systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA) patients, albeit these cells were refractory to *in vitro* stimulation, produced less IL-10 and lacked suppressive activity [16]. Likewise, it is possible that in the context of HIV disease progression, populations ascribed to Breg potential may have exhausted and/or dysregulated regulatory capacities.

Similarly to that encountered in HIV pathogenesis [14, 29-30], the aberrant expression of BLyS/BAFF and/or its receptors is often linked to autoimmune diseases such as SLE and RA [22-26]. BLyS/BAFF promotes IL-10 production by *in vitro* human activated B-cells [31], and IL-10 production and regulatory functions by murine splenic MZ B-cells [32]. The increased levels of BLyS/BAFF observed in HIV and autoimmunity contexts are thus consistent with the increased frequencies of B-cells expressing IL-10. Nevertheless, the overall outcome of increased frequencies of B-cells expressing IL-10 may well be to sustain chronic B-cell activation and dysregulation, and lead to imbalanced Treg/Teffector ratios [15] associated with HIV disease progression [33]. Furthermore, high level of Breg activity was recently shown to be involved in suppression of antiviral T effector functions *in vitro* during HIV [34] and chronic hepatitis B [35] infections, thus impeding viral eradication.

In contrast, in the context of HIV disease control, such as encountered in EC, normal blood levels of BLyS/BAFF [14] are associated with the unaltered frequencies of total and MZ-like B-cells expressing IL-10. Although, increased frequencies of resting switched memory and TI blood B-cells expressing IL-10 were found in EC, these were lesser than that found in the MZ-like populations. These findings suggest that EC are capable, to a certain extent, to contain their IL-10 expression status and possibly “Breg” activity, and this may help in maintaining homeostasis of immune responses associated with HIV control.

Although high levels of LT- α have been associated with autoimmune and inflammatory conditions [18], plasma levels of LT- α in all HIV-1-infected subjects were similar to those found in HIV-negative donors. Amongst the B-cell populations analyzed, the precursor MZ-like B-cells were the main contributors to LT- α expression in all subjects regardless of HIV-1 infection and rate of disease progression. The percentages of IL-10 expressing cells were significantly greater than that of LT- α within most B-cell populations except for precursor MZ-like and TI B-cells, where frequencies of IL-10 and LT- α expression were similar. Importantly, EC had increased frequencies of MZ-like B-cells expressing LT- α resulting in higher LT- α to IL-10 expression ratios. Studies in the murine system have elegantly shown the importance of LT- α in the organization and maintenance of lymphoid structures, as well as modulation of immune responses (reviewed in [18]), through a process involving a positive CXCL13 feedback loop [36]. Interestingly, plasma levels of CXCL13

were higher in all viremic individuals when compared to those observed in EC and HIV-negative donors (Chagnon-Choquet J unpublished data), suggesting that the higher relative percentages of MZ-like B-cells expressing LT- α in EC may help maintaining CXCL13 levels and a certain lymphoid homeostasis.

The first-line MZ-like B-cells described herein likely contribute directly to generation of HIV-specific Abs. Indeed, human MZ B-cells express IGHV1-2*02, which has been repeatedly found to encode mutated HIV broadly neutralizing Abs (bNAbs), such as VRC01 [37]. Interestingly, the recent characterization of transient Gp41-specific IgA in mucosal genital fluids from patients within the first weeks after HIV transmission, suggest these Abs might have originated from first-line B-cell populations [38]. Of note, BLyS/BAFF was elevated immediately preceding the appearance of these Abs. Interestingly, repeated treatment of mice with BLyS/BAFF increased the MZ compartment, and generated an increased response to Env immunization and bNAbs from these animals [39]. Understanding the dynamics of BLyS/BAFF and its role in homeostasis of immune responsiveness appears pivotal to the design of vaccine strategies soliciting protective B-cell responses. Based on our observations, the capacity to contain BLyS/BAFF expression levels seems associated with control of disease progression, whereas excessive BLyS/BAFF may promote immune dysregulation and disease progression [40].

The findings reported herein are in line with growing evidence suggesting that first-line B-cell responses are involved in the battle against HIV [41], and with the importance of MZ type B-cells in health and disease [12-13]. Although further characterization is required to identify the exact nature of the MZ-like B-cells described herein, they certainly deserve further interest.

Acknowledgments

We are grateful to the participants of the Montreal PHI and Slow Progressors study groups. We also thank Dr Dominique Gauchat and Christian Charbonneau for invaluable flow cytometry and bio-imaging expertise, respectively. Marie-Pierre Boisvert, Maryse Lainesse, Rebecca Bordi, Véronique Lafontaine, Bader Yassine-Diab and Younes Chouick for processing the blood samples.

Author Contributions

JCC performed the experiments, analyzed the data and wrote the article. JF performed the plasma IL-10 measurements. JP and MR designed the experiments, analyzed the data and wrote the article.

Conflict of interest declaration: The authors declare no conflict of interest

Financial support: This work was supported by grant # CHR-126633 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and by the Réseau SIDA from the Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS). Josiane Chagnon-Choquet holds a Studentship from the Fondation Gabriel Marquis.

References

1. Moir S, Fauci AS. (2009) B cells in HIV infection and disease. *Nat Rev Immunol* 9: 235-245.
2. Poudrier J, Chagnon-Choquet J, Roger M. (2012) Influence of Dendritic cells on B-cell Responses during HIV Infection. *Clin Dev Immunol* doi:10.1155/2012/592187
3. Hanna Z, Kay DG, Rebai N, Guimond A, Jothy S, et al. (1998) Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice. *Cell* 95: 163-175.
4. Poudrier J, Weng X, Kay DG, Paré G, Calvo EL, et al. (2001) The AIDS disease of CD4C/HIV transgenic mice shows impaired germinal centers and autoantibodies and develops in the absence of IFN-gamma and IL-6. *Immunity* 15: 173-185.
5. Poudrier J, Weng X, Kay DG, Hanna Z, Jolicoeur P. (2003) The AIDS-like disease of CD4C/human immunodeficiency virus transgenic mice is associated with accumulation of immature CD11bHi dendritic cells. *J Virol* 77: 11733-11744.
6. Mackay F, Figgett WA, Saulep D, Lepage M, Hibbs ML. (2010) B-cell stage and context-dependent requirements for survival signals from BAFF and the B-cell receptor. *Immunol Rev* 237: 205-225.
7. Hässler S, Ramsey C, Karlsson MC, Larsson D, Herrmann B, et al. (2006) AIRE-deficient mice develop haematopoietic irregularities and marginal zone B-cell lymphoma. *Blood* 108:1941-1948.
8. Lindh E, Lind SM, Lindmark E, Hässler S, Perheentupa J, et al. (2008) AIRE regulates T-cell-independent B-cell responses through BAFF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 18466-18471.

9. Batista FD, Harwood NE. (2009) The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol* 9: 15-27.
10. Macpherson G, Kushnir N, Wykes M. (1999) Dendritic cells, B cells and the regulation of antibody synthesis. *Immunol Rev* 172: 325-34.
11. Cerutti A, Puga I, Cols M. (2011) Innate control of B cell responses. *Trends in Immunol* 32 (5):202-211.
12. Cerutti A, Cols M, Puga I. (2013) Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 13: 118-132.
13. Weill JC, Weller S, Reynaud CA. (2009) Human Marginal Zone B cells. *Annu Rev Immunol* 27:267-85.
14. Fontaine J, Chagnon-Choquet J, Valcke HS, Poudrier J, Roger M. (2011) High expression levels of B Lymphocyte Stimulator (BLyS) by dendritic cells correlate with HIV-related B cell disease progression in humans. *Blood* 117: 145-155.
15. Lund FE, Randall TD. (2010) Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity. *Nat Rev Immunol* 10: 236-47.
16. Mauri C, Bosma A. (2012) Immune Regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol* 30: 221-241.
17. Gray D, Gray M. (2010) What are Regulatory B cells? *Eur J Immunol* 40: 2677-2679.
18. Calmon-Hamaty F, Combe B, Hahne M, Morel J. (2011) Lymphotoxin α revisited: general features and implications in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 13: 232-236.

19. Bar-Or A, Fawaz L, Fan B, Ghorayeb C, Calabresi PA, et al. (2010) Abnormal B cell cytokine responses a trigger of T cell-mediated disease in MS? *Annals of Neurology* 67(4):452-61.
20. Mercier F, Boulassel MR, Yassine-Diab B, Tremblay C, Bernard NF, et al. (2008) Persistent human immunodeficiency virus-1 antigenaemia affects the expression of interleukin-7Ralpha on central and effector memory CD4+ and CD8+ T cell subsets. *Clin Exp Immunol* 152: 72-80.
21. Malaspina A, Moir S, Chaitt DG, Rehm CA, Kottlilil S, et al. (2007) Idiopathic CD4+ T lymphocytopenia is associated with increases in immature/transitional B cells and serum levels of IL-7. *Blood* 109: 2086-2088.
22. Thien M, Phan TG, Gardam S, Amesbury M, Basten A, et al. (2004) Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity* 20: 785-798.
23. Varin MM, Le Pottier L, Youinou P, Saulep D, Mackay F, et al. (2010) B-cell tolerance breakdown in Sjögren's syndrome: focus on BAFF. *Autoimmunity Rev* 9(9):604-8.
24. Cancro MP, D'Cruz DP, Khamashta MA. (2009) The role of B Lymphocyte Stimulator (BLyS) in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 119 : 1066-73.
25. Tangye SG, Bryant VL, Cuss AK, Good KL. (2006) BAFF, APRIL and human B cell disorders. *Seminars in Immunol* 18: 305-317.
26. Liu Z, Davidson A. (2011) BAFF and selection of autoreactive B cells. *Trends Immunol* 32: 388-394.

27. Weller S, Bonnet M, Delagreverie H, Israel L, Chrabieh M, et al. (2012) IgM+IgD+CD27+ B cells are markedly reduced in IRAK-4-, MyD88-, and TIRAP- but not UNC-93B-deficient patients. *Blood* 120(25):4992-5001.
28. Fontaine J, Coutlée F, Tremblay C, Routy JP, Poudrier J, et al. (2009) HIV infection affects blood myeloid dendritic cells after successful therapy and despite nonprogressing clinical disease. *J Infect Dis* 199: 1007-1018.
29. Stohl W, Cheema GS, Briggs WS, Xu D, Sosnovtseva S, et al. (2002) B lymphocyte stimulator protein-associated increase in circulating autoantibody levels may require CD4+ T cells: lessons from HIV-infected patients. *Clin Immunol* 104: 115-122.
30. Rodriguez B, Valdez H, Freimuth W, Butler T, Asaad R, et al. (2003) Plasma levels of B-lymphocyte stimulator increase with HIV disease progression. *AIDS* 17: 1983-2000.
31. Yehudai D, Snir A, Peri R, Halasz K, Haj T, et al. (2012) B cell-activating factor enhances interleukin-6 and interleukin-10 production by ODN-activated human B cells. *Scand J Immunol.* 76(4):371-7.
32. Yang M, Sun L, Wang S, Ko KH, Xu H et al. (2010) Novel function of B cell-activating factor in the induction of IL-10-producing regulatory B cells. *J Immunol* 184 (7):3321-5.
33. Klatt NR, Funderburg NT, Brenchley JM. (2013) Microbial translocation, immune activation, and HIV disease. *Trends Microbiol* 21 (1): 6-13.
34. Siewe B, Stapleton JT, Martinson J, Keshavarzian A, Kazmi N, et al. (2013) Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV CD8-T cell function in vitro. *J Leuk Biol* Epub ahead of print February 22, 2013 - doi:10.1189/jlb.0912436

35. Das JI, Ellis G, Pallant C, Ross Lopes A, Khanna P, et al. (2012) IL-10–Producing Regulatory B Cells in the Pathogenesis of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *J Immunol* 189: 3925–3935.
36. Mark Ansel K, Ngo VN, Hyman PL, Luther SA, Förster R, et al. (2000) A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* 406: 309-314.
37. Pujanauski LM, Edward N. Janoff EN, Pelanda R, Torres RM. (2013) Mouse marginal zone B cells harbor specificities similar to human broadly neutralizing HIV antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(4):1422-1427.
38. Yates NL, Stacey AR, Nolen TL, Vandergrift NA, Moody MA, et al. (2013) HIV-1 gp41 envelope IgA is frequently elicited after transmission but has an initial short response half-life. *Mucosal Immunol* doi:10.1038/mi.2012.107.
39. Dosenovic P, Soldemo M, Scholz JL, O'Dell S, Grasset EK, et al. (2012) BLYS-Mediated Modulation of Naive B Cell Subsets Impacts HIV Env-Induced Antibody Responses. *J Immunol* 188:6018-6026.
40. Poudrier J, Roger M. (2011) Dendritic Cell Status Modulates the Outcome of HIV-Related B Cell Disease Progression. *PLoS Pathog* 7(8): e1002154. doi:10.1371/journal.ppat.1002154.
41. Borrow P. (2011) Innate immunity in acute HIV-1 infection. *Curr Opin HIV AIDS* 6(5): 353–363. doi:10.1097/COH.0b013e3283495996.

Figure Legends

Figure 1. Longitudinal analysis of blood B-cell populations of HIV-1 infected individuals.

(A) Representative plot showing gating strategy on live PBMCs. Total CD19⁺ B-cells were selected based on expression of CD27 and/or IgM, and levels of CD21. CD1c and CD10 expression were used for further characterisation of blood MZ and TI B-cell populations respectively, as reported [13]. Quadrants were set based on the expression values obtained with fluorescence minus one (FMO) and isotype controls. Mature activated B-cells are defined as CD19⁺CD27⁺IgM⁻CD21^{lo}CD1c⁻CD10⁻, resting switched memory B-cells are CD19⁺CD27⁺IgM⁻CD21^{hi}CD10⁻, precursor marginal-zone (MZ)-like B-cells are CD19⁺CD27⁺IgM⁺CD21^{lo}CD1c⁺CD10⁺, mature MZ-like B-cells are CD19⁺CD27⁺IgM⁺CD21^{hi}CD1c⁺CD10⁻ and transitional immature (TI) B-cells are CD19⁺CD27⁺IgM⁺CD21^{hi}CD1c⁻CD10⁺. The graphs present (B) percentages of total B-cells, and the relative frequencies of (C) mature activated, (D) resting switched memory, (E) precursor MZ-like (F) mature MZ-like and (G) TI B-cell populations in the blood of rapid progressors (left panels), classic progressors (middle panels), and viremic and aviremic slow progressors (EC) (right panels). The same values for HIV-negative donors in the left, middle and right panels are used as a control group. Cell population frequencies were compared using the Wilcoxon signed rank test and the Mann-Whitney U test for pairwise comparisons of different phases of infection within each group and between the study groups, respectively. Data shown are mean ± SEM. * p < 0.05. PI, post-infection; ART, antiretroviral therapy.

Figure 2. IL-10 expression by blood B-cell populations. (A) Representative plot showing gating strategy on live total CD19⁺ B-cells expressing IL-10. Frequencies of cells expressing IL-10 within (B) total, (C) mature activated, (D) resting switched memory, (E) precursor marginal zone (MZ)-like, (F) mature MZ-like and (G) transitional immature (TI) B-cell populations in rapid progressors (left panels), classic progressors (middle panels), and slow progressors (right panels). The same values for HIV-negative donors in the left, middle and right panels are used as a control group. Data are expressed as percentages of IL-10 expression within each B-cell population. Cell population frequencies were compared using the Wilcoxon

signed rank test and the Mann-Whitney U test for pairwise comparisons of different phases of infection within each group and between the study groups, respectively. Data shown are mean \pm SEM. * $p < 0.05$. PI, postinfection; ART, antiretroviral therapy.

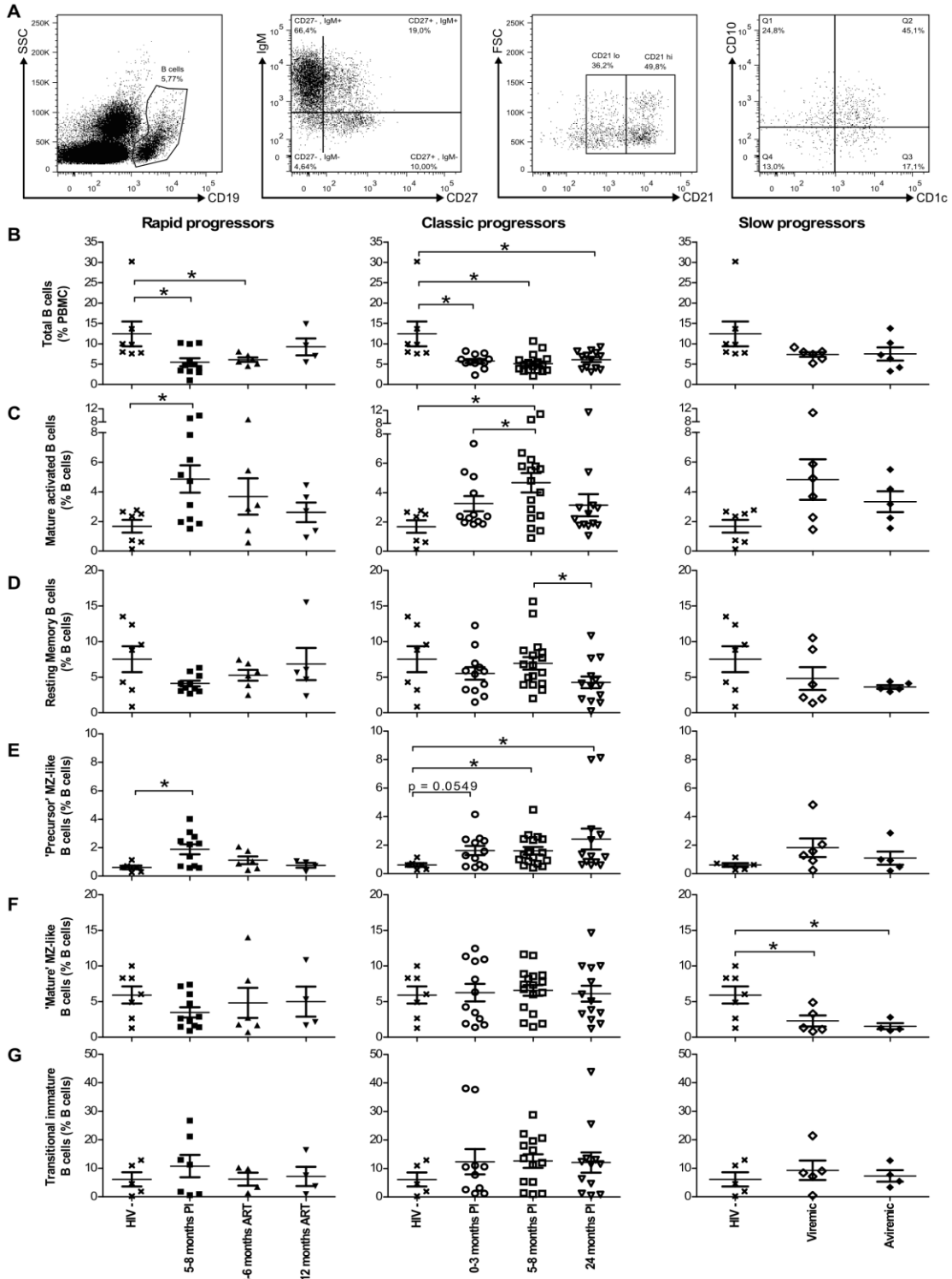
Figure 3. Percentage of IL-10 expressing cells for each B-cell population, within each patient group. Percentages of IL-10 expressing cells within mature activated, resting switched memory, precursor marginal zone (MZ)-like, mature MZ-like and transitional immature (TI) B-cells within (A) rapid progressors, (B) classic progressors, (C) slow progressors, and HIV-negative individuals. Percentages were compared using the Mann-Whitney U test between the B-cell populations. Data shown are mean \pm SEM. * $p < 0.05$. PI, postinfection; ART, antiretroviral therapy.

Figure 4. LT- α expression by blood B-cell populations. A) Representative plot showing gating strategy on live total CD19⁺ B-cells expressing LT- α . Frequencies of cells expressing LT- α within (B) total, (C) mature activated, (D) resting switched memory, (E) precursor marginal zone (MZ)-like, (F) mature MZ-like and (G) transitional immature (TI) B-cells expressing LT- α in rapid progressors (left panels), classic progressors (middle panels), and slow progressors (right panels). The same values for HIV-negative donors in the left, middle and right panels are used as a control group. Data are expressed as percentages of LT- α expression within each B-cell population. Cell population frequencies were compared using the Wilcoxon signed rank test and the Mann-Whitney U test for pairwise comparisons of different phases of infection within each group and between the study groups, respectively. Data shown are mean \pm SEM. * $p < 0.05$. PI, postinfection; ART, antiretroviral therapy.

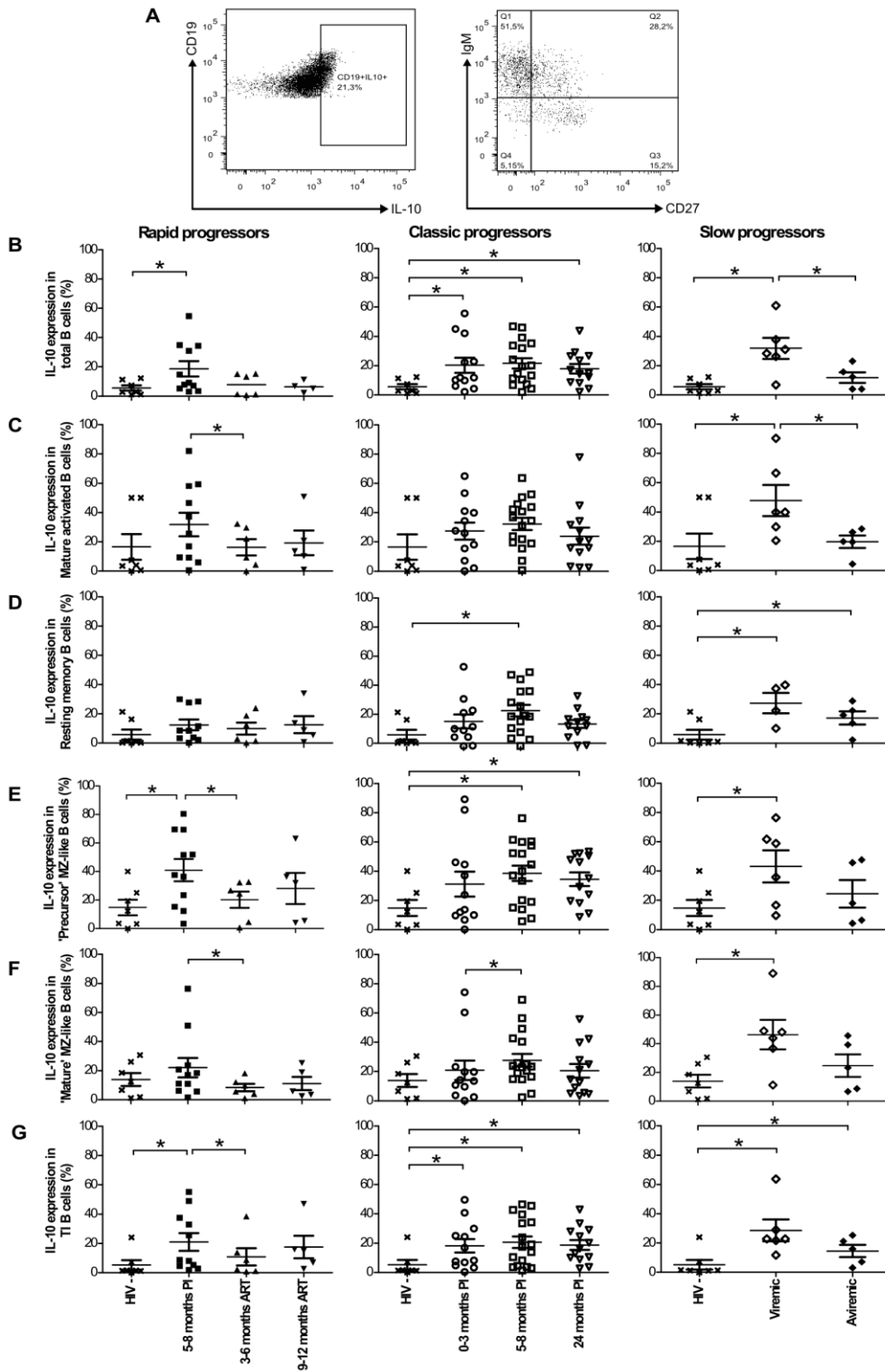
Figure 5. Percentage of LT- α expressing cells for each B-cell population, within each patient group. Percentages of LT- α expressing cells within mature activated, resting switched memory, precursors marginal zone (MZ)-like, mature MZ-like and transitional immature (TI) B-cells within (A) rapid progressors, (B) classic progressors, (C) slow progressors, and HIV-negative individuals. Percentages were compared using the Mann-Whitney U test between the

B-cell populations. Data shown are mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$. PI, postinfection; ART, antiretroviral therapy.

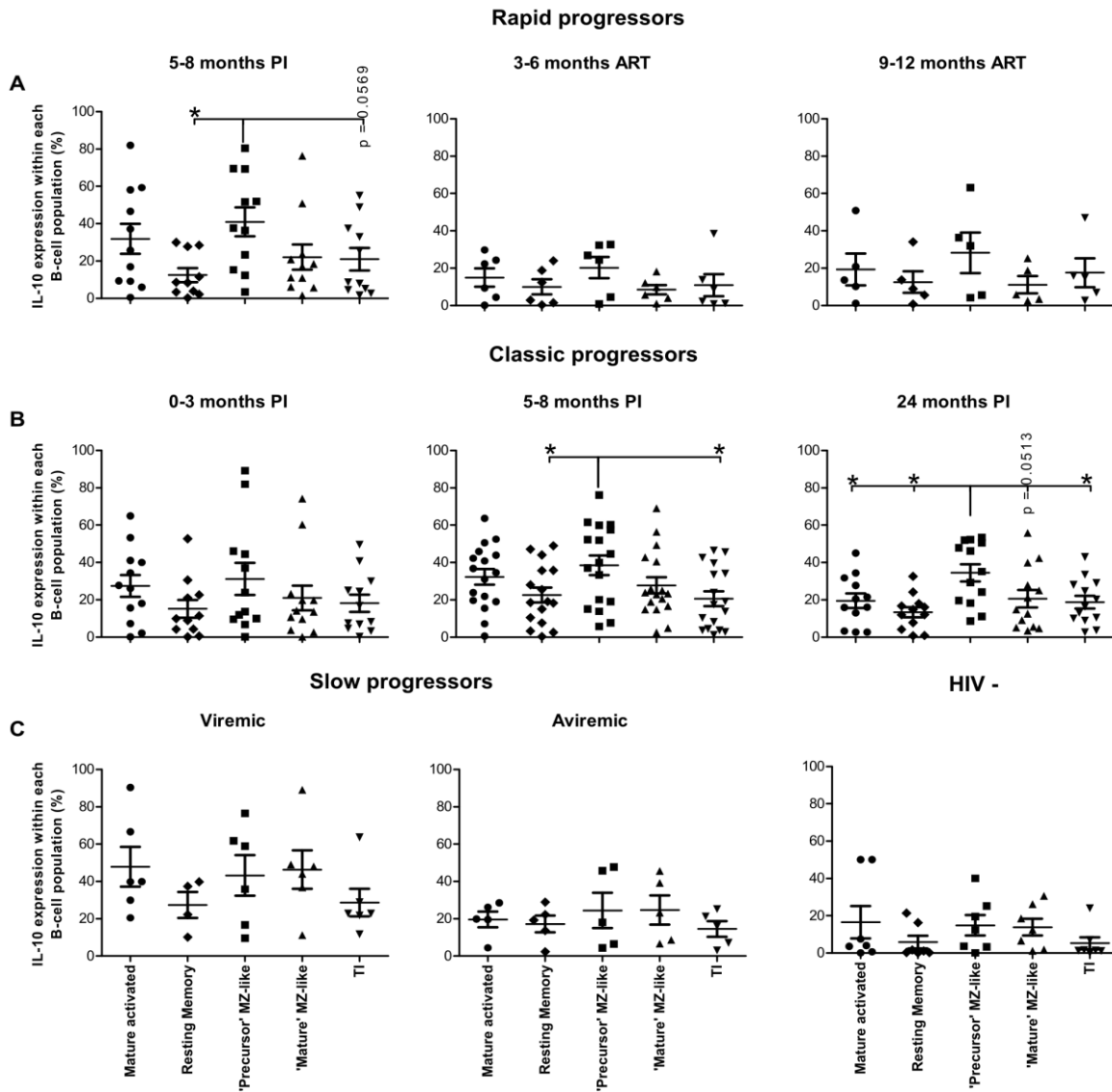
Article 2 - Figure 1



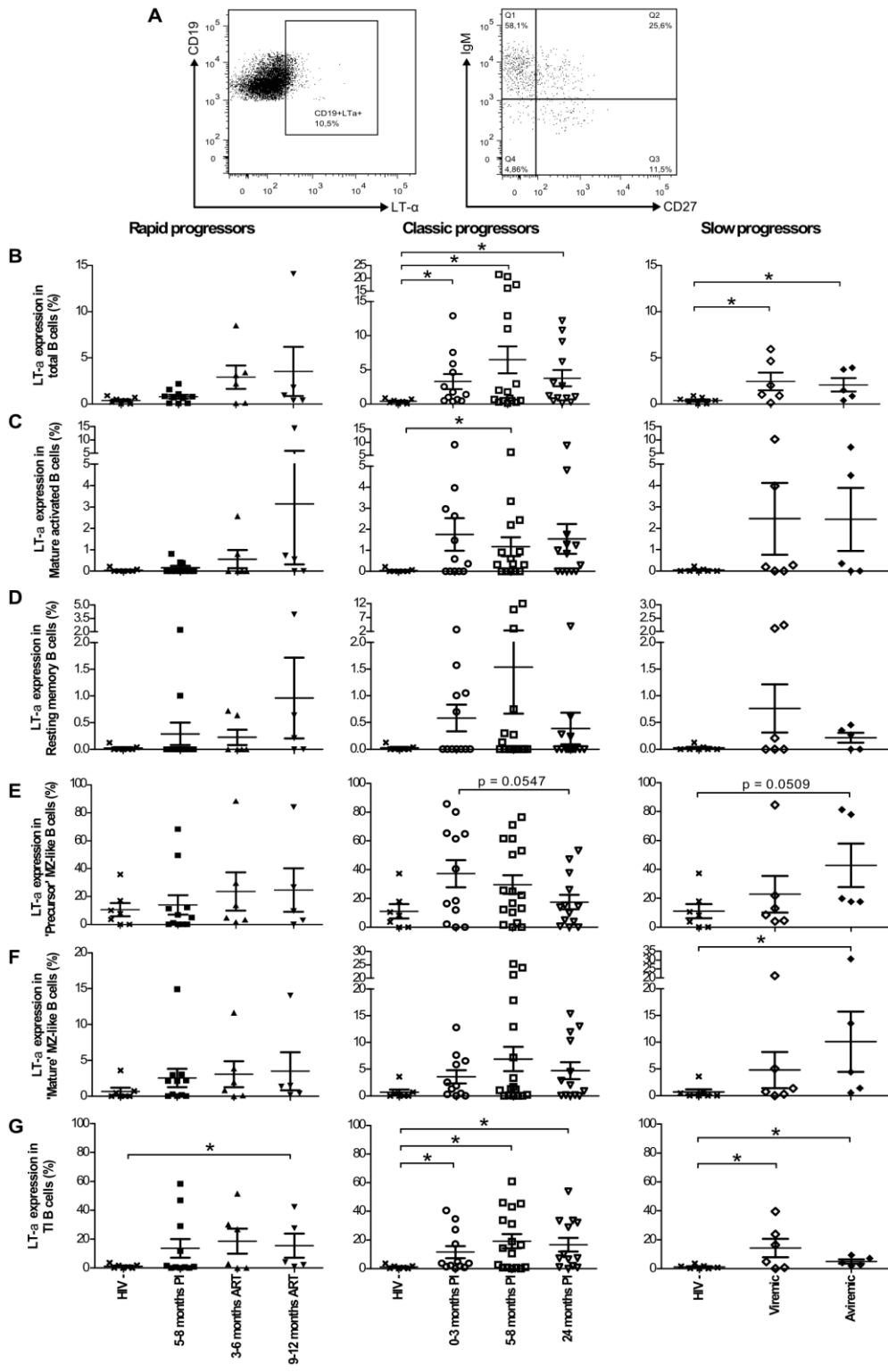
Article 2 - Figure 2



Article 2 - Figure 3



Article 2 - Figure 4



Article 2 - Figure 5

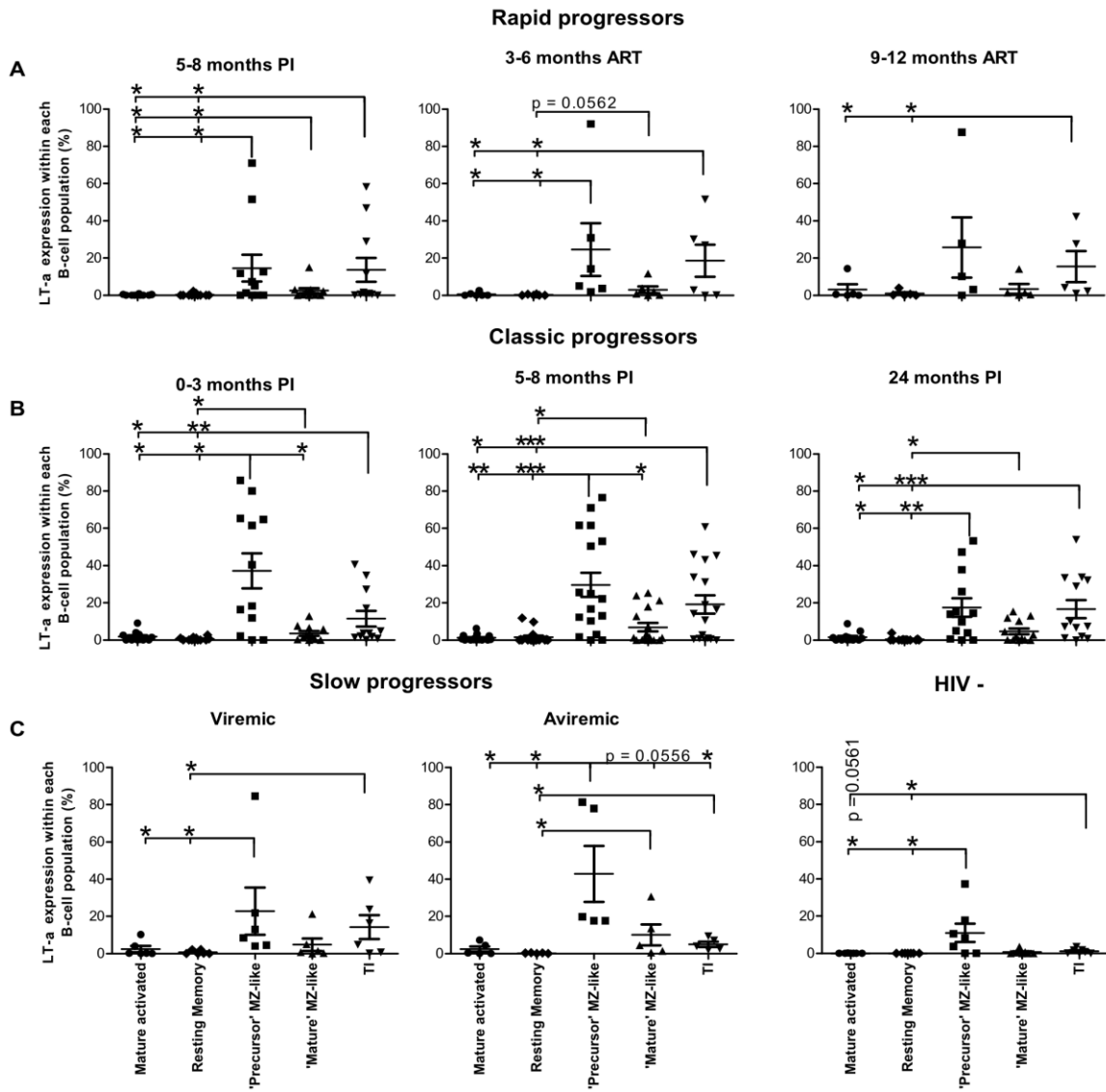


Table 1. Sociodemographic and clinical characteristics of HIV-infected individuals

	Rapid progressors	Classic progressors	Viremic slow progressors	Aviremic slow progressors	<i>P</i>
Characteristics	(n = 13)	(n = 17)	(n = 7)	(n = 6)	
Age at first visit (years)	34 ± 7	38 ± 8	46 ± 9	44 ± 9	0.005 ^a
Sex (male/female)	12/1	17/0	7/0	3/3	0.005
Race (white/other)	12/1	16/1	6/1	5/1	NS
CD4+ T cells/mm³					
Acute phase	533 ± 140	781 ± 213	na	na	0.002
Early phase	446 ± 40	714 ± 46	na	na	0.0008
Chronic phase	443 ± 193	629 ± 244	562 ± 122	888 ± 122	0.011 ^b
Nadir	254 ± 118	432 ± 140	506 ± 129	506 ± 175	0.0005 ^c
Viremia, x 10³ copies/ml^d					
Acute phase	366 ± 705	76 ± 126	na	na	NS
Early phase	121 ± 186	71 ± 190	na	na	NS
Chronic phase	7.65 ± 15.3	37.7 ± 62.3	3.01 ± 1.86	< 0.05 ^d	0.003 ^e
Peak	570 ± 808	202 ± 236	8.5 ± 6.5	0.065 ± 0.027	0.0001 ^f

Age, CD4 and viremia are expressed as mean ± SD. Sex and race were compared using Fisher exact test. Pairwise comparisons of CD4 and viremia for early phases were performed using unpaired Student's *t* tests. Comparisons among all groups (age at first visit, CD4, viremia in the chronic phase, nadir CD4) were performed with the one-way analysis of variance test. n, numbers; NS, not significant; na, not available.

^a*P* = 0.004 and 0.050 for the comparison of age between rapid and viremic slow progressors, and classic and viremic slow progressors, respectively, as determined by the Mann-Whitney test.

^b*P* = 0.008 for the comparison of CD4+ T cells/mm³ in chronic phase between rapid progressors and aviremic slow progressors, as determined by the Mann-Whitney test.

^cP = 0.0008 and 0.001 and 0.020 nadir CD4 for the comparison between rapid and classic progressors, rapid and viremic slow progressors, and rapid and aviremic slow progressors, respectively, as determined by the Mann-Whitney test.

^dFifty copies/ml corresponds to the detection threshold of the viral load test.

^eP = 0.002 and 0.002 for the comparison of viremia in chronic phase between classic progressors and aviremic slow progressors, and viremic and aviremic slow progressors, respectively, as determined by the Mann-Whitney test.

^fP = 0.006, 0.0007, 0.0005, 0.0004 and 0.001 for the comparison of peak viremia between rapid progressors and viremic slow progressors, rapid progressors and aviremic slow progressors, classic progressors and viremic slow progressors, classic progressors and aviremic slow progressors, and viremic and aviremic slow progressors, respectively, as determined by the Mann-Whitney test.

Article 2 – Figure supplémentaire 1

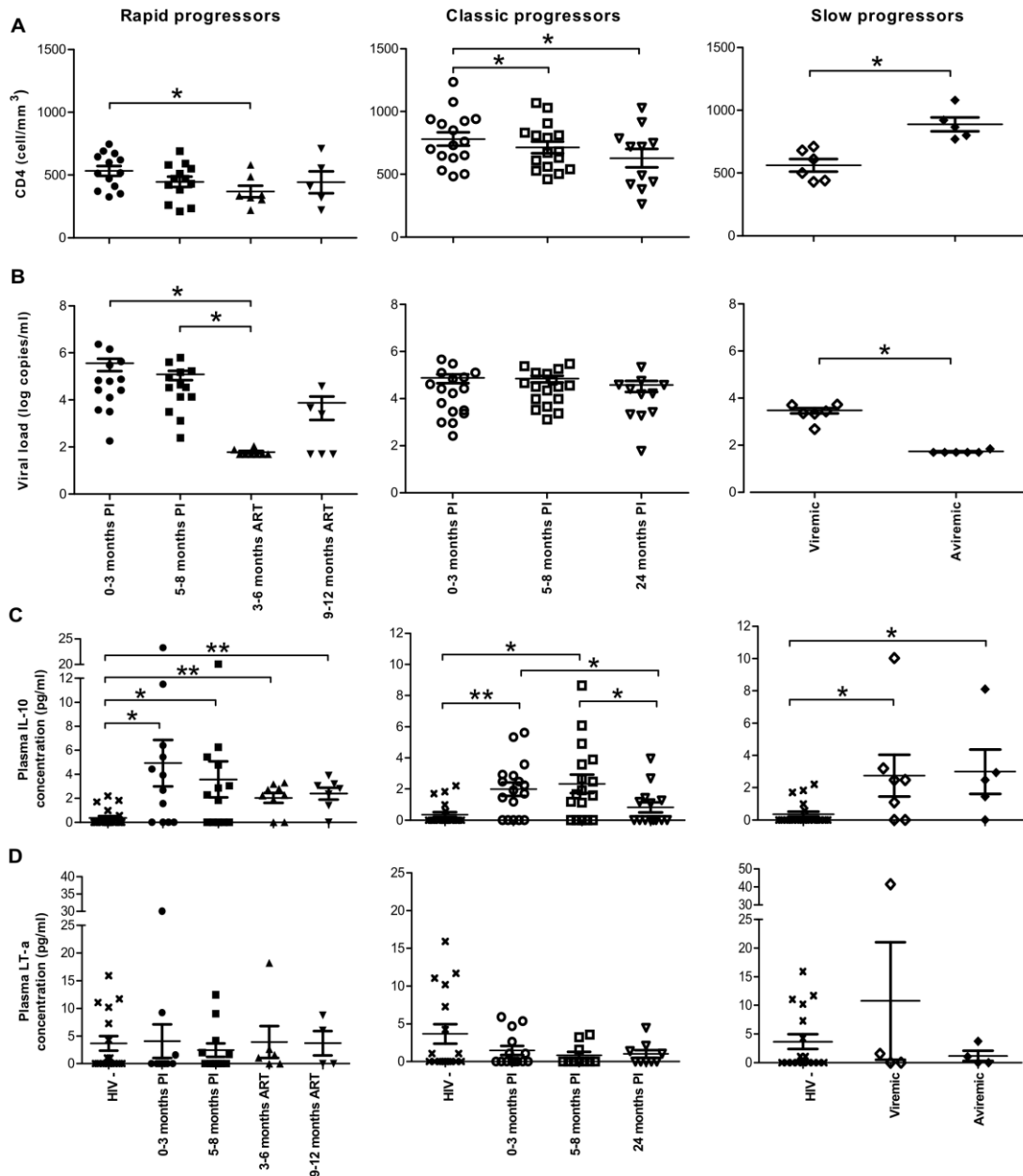


Figure S1. Longitudinal variations of blood CD4+ T-cell counts, viral loads and IL-10 and LT- α concentrations of HIV-1 infected individuals. (A) Blood CD4+ T-cell counts (cell/mm³) were determined by flow cytometry in rapid progressors (left panel), classic progressors (middle panel), and slow progressors (right panel). (B) Viral loads (log copies/ml) were quantified by *in vitro* signal amplification nucleic acid probe assay of HIV-1 RNA (bDNA) in the plasma of rapid progressors (left panel), classic progressors (middle panel), and slow progressors (right panel). Concentrations of (C) and (D) LT- α measured longitudinally in the plasma of rapid progressors (left panels), classic progressors (middle panels) and slow progressors (right panels). The same values for HIV-negative donors in the left, middle and right panels are used as a control group. Cell populations, viral loads and plasma concentrations were compared using the Wilcoxon signed-rank test and Mann-Whitney U test for pairwise comparisons of different phases of infection within each group and between the study groups, respectively. Data shown are mean \pm SEM. Significance levels are shown as * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$. PI, post-infection; ART, antiretroviral therapy.

Article 2 – Figure supplémentaire 2

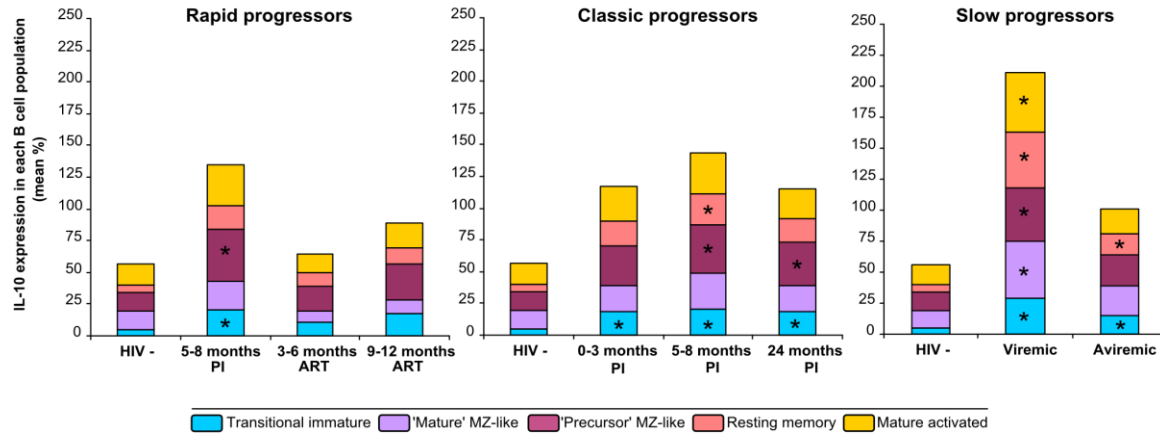


Figure S2. Contribution of each blood B-cell sub-population to IL-10 expression. Percentages of IL-10 expression within each B-cell population; 'mature' marginal zone (MZ)-like B-cells (purple), 'precursor' MZ-like B cells (cherry red), mature activated B-cells (yellow), transitional immature (TI) B-cells (blue) and resting memory B-cells (orange), for rapid progressors (left panel), classic progressors (middle panel), and slow progressors (right panel). The same value for HIV-negative donors in the left, middle and right panels are used as a control group. Cell population frequencies were compared using the Mann-Whitney U test between the study groups. Data shown are mean \pm SEM. * $p < 0.05$. PI, post-infection; ART, antiretroviral therapy.

Article 2 – Figure supplémentaire 3

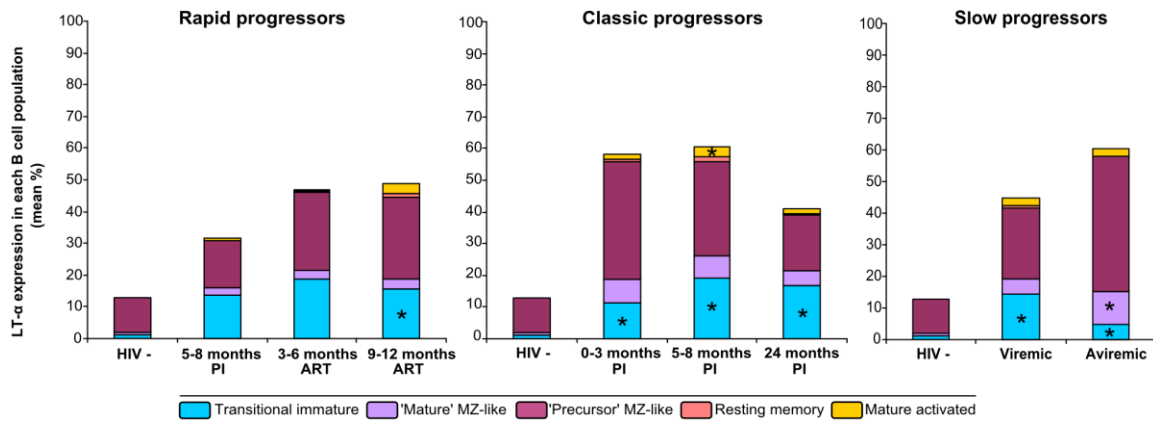


Figure S2. Contribution of each blood B-cell sub-population to LT- α expression. Percentages of LT- α expression within each B-cell population; 'mature' marginal zone (MZ)-like B-cells (purple), 'precursor' MZ-like B cells (cherry red), mature activated B-cells (yellow), transitional immature (TI) B-cells (blue) and resting memory B-cells (orange), for rapid progressors (left panel), classic progressors (middle panel), and slow progressors (right panel). The same value for HIV-negative donors in the left, middle and right panels are used as a control group. Cell population frequencies were compared using the Mann-Whitney U test between the study groups. Data shown are mean \pm SEM. * $p < 0.05$. PI, post-infection; ART, antiretroviral therapy.

DISCUSSION

Il est maintenant bien connu que dans le contexte d'une infection au VIH-1, les effets direct ou indirect du virus et de ses produits dérivés s'étendent au-delà des lymphocytes T CD4⁺, principales cellules cibles de ce dernier. En ce sens, des dérégulations du compartiment des cellules B ont été maintes fois répertoriées, et se définissent principalement par une activation polyclonale, une perturbation de la dynamique des populations, un épuisement cellulaire, une destruction des centres germinatifs et des structures folliculaires, ainsi qu'une perte de la capacité à générer et maintenir une mémoire immunitaire, contribuant au développement de syndromes auto-immunitaires et de lymphomes et d'une altération de l'immunité humorale⁵³⁷. De plus, il a été démontré que les DC sont également altérées dans le contexte du VIH-1, tant au niveau de leur nombre, leur phénotype, et leur fonction³²⁶. De par la capacité des DC à moduler le développement, l'activation et la différenciation des cellules B, l'objectif de cette présente étude était de poursuivre l'évaluation de l'impact des DC dans cette dérégulation des cellules B observée dans le contexte d'une infection au VIH-1. Basées sur des résultats préalablement obtenus avec le modèle murin VIH-Tg, des études conduites dans notre laboratoire ont permis la caractérisation longitudinale du profil inflammatoire, principalement BLyS/BAFF, ainsi que des populations des cellules B et des DC chez des individus infectés au VIH-1 présentant différents profils de progression clinique, tel que décrit dans la section 5.2 de la revue de littérature⁵⁸⁵⁻⁵⁸⁷.

Dans le cadre de ce projet de maîtrise, la caractérisation de ces mêmes individus a donc été poursuivie afin 1) de détecter/quantifier la présence de la protéine virale Nef, qui a été trouvée déterminante dans l'établissement de la maladie similaire au SIDA humain chez le modèle murin VIH-Tg lors d'études antérieures réalisées par Dre Poudrier^{580-582,589}. Ainsi, les résultats obtenus ont permis de démontrer que la détection de Nef est en lien avec la surexpression de BLyS/BAFF par les DC de ces mêmes individus, ainsi que par des DC dérivées de monocytes lors d'essais *in vitro*. Parallèlement 2), la poursuite de l'étude de la dérégulation des populations de cellules B de ces individus a permis de démontrer que l'expression des cytokines IL-10 et LT- α permet de leur associer un potentiel régulateur ou effecteur.

1. Observations en relation avec un contexte de progression clinique du VIH-1

1.1. Évaluation longitudinale de Nef

Les mécanismes impliqués dans le développement des dérégulations des cellules B dans le contexte d'une infection au VIH-1 restent encore à élucider, mais l'implication d'une charge virale élevée et de l'altération du compartiment des lymphocytes T ont été suggérés. Toutefois, l'initiation de la thérapie antirétrovirale ne rétablit pas complètement le statut des cellules B, suggérant ainsi l'apport de facteurs autres ou complémentaires^{537,547,587,590-592}. Le modèle murin VIH-Tg dépendant de Nef, précédemment décrit, démontre une persistance dans le titre élevé en auto-anticorps et de la maladie similaire au SIDA humain même lorsque croisé avec un modèle murin déficient en lymphocytes T (CD3^{-/-}), suggérant l'implication de cellules autres que les lymphocytes T dans la pathogénèse associée au VIH.

Mis à part les résultats obtenus avec le modèle VIH-Tg, plusieurs observations nous ont menées à l'établissement d'un lien entre Nef et les altérations du compartiment des cellules B. La protéine virale Nef a précédemment été détectée dans le sérum d'individus infectés au VIH-1, mais sans égard quant au stade de progression de la maladie⁴⁹. Elle peut s'y retrouver au niveau soluble ou au niveau des exosomes^{49,51} ou des microvésicules⁵⁰. Nef semble en mesure de pénétrer les cellules B non infectées ainsi que d'être projetée via des protubérances provenant de macrophages. De plus, cette protéine virale est en mesure d'interférer dans la voie de signalisation de CD40 et, de ce fait, de taire la commutation isotypique de classe permettant la génération de réponse T-dépendante de haute affinité^{61,63}. Il reste à déterminer s'il y a utilisation de telles protubérances pour propulser Nef dans le contexte de la collaboration entre les DC et les lymphocytes B⁵⁹³. Il faut toutefois préciser que les effets directs de Nef sur les lymphocytes B varient probablement selon l'activation et le phénotype de celles-ci, et où les signaux dérivés des DC sont probablement en mesure de moduler ces paramètres. Également, Nef peut être internalisé par plusieurs autres types

cellulaires dont les monocytes, les macrophages ainsi que les DC, potentiellement par pinocytose ou endocytose⁵³⁻⁵⁵.

Nous avons été en mesure de détecter la présence de la protéine virale Nef dans le plasma d'individus infectés au VIH-1, et ce, dès la phase aiguë de l'infection et au-delà de la thérapie antirétrovirale chez les progressseurs rapides et classiques. Il en va de même pour la détection de Nef chez les mDC et précurseurs d'origine monocyttaire, où la présence de Nef est moins grande après l'initiation de la thérapie antirétrovirale chez les progressseurs rapides, mais qui perdure en contexte de chronicité chez les progressseurs classiques. La détection de Nef pourrait être un indicateur de la progression clinique du VIH-1, ainsi que le reflet du statut du réservoir, étant donné sa présence après traitement, ce dernier ayant démontré une réduction efficace de la charge virale. Toutefois, il est impossible d'attribuer entièrement la présence de Nef au niveau des populations de DC à une infection productive de ces cellules, puisque la protéine virale a été démontrée comme étant capable de pénétrer ces dernières⁵³⁻⁵⁵. De plus, Nef peut être relarguée sans réplication virale⁵².

1.2. Association de Nef et de la surexpression de BLyS/BAFF par les DC

À partir de ces observations, nous avons été en mesure d'associer la présence de Nef à une augmentation de l'expression membranaire de BLyS/BAFF dans les populations de mDC chez les individus présentant un profil de progression rapide et classique, et ce rapidement après l'infection et persistant en phase chronique, même malgré la prise de la thérapie antirétrovirale. De ce fait, nous avons également démontré que Nef soluble pénètre les DC dérivées de monocytes (Mo-DC) *in vitro*, et que la protéine virale induit l'augmentation de l'expression de BLyS/BAFF et de TNF- α , contribuant ainsi de façon directe à un phénotype proinflammatoire des DC.

Nos observations rejoignent la littérature quant aux effets de Nef où *in vitro*, Nef soluble, ou exogène, est en mesure d'altérer la maturation et la fonction des DC, ainsi que d'induire la sécrétion de cytokines et chimiokines telles que TNF- α ^{58,330}.

Nef possédant une capacité étonnante à détourner la machinerie cellulaire à l'avantage du VIH-1, l'augmentation de l'expression de BLyS/BAFF et de TNF- α est probablement en lien avec l'augmentation de la phosphorylation de la tyrosine 701 de STAT1 que nous avons observée en présence de Nef soluble. En effet, il a été démontré que la voie de signalisation de JAK /STAT, particulièrement les STAT1 et STAT3, est impliquée dans l'expression de BLyS/BAFF⁵⁹⁴. De plus, ceci est en accord avec le fait que Nef peut interagir avec TRAF-2, trafiquant du même coup les voies de signalisations TRAF/NF- κ B et TRAF/IRF-3, permettant ainsi l'activation de STAT1 et STAT3 et la promotion d'un profil proinflammatoire chez des macrophages dérivés de monocytes^{34,57,595}.

Ainsi, nos résultats suggèrent un effet direct de Nef quant à une augmentation de BLyS/BAFF et de TNF- α par les DC. Toutefois, il ne faut pas négliger dans ce profil d'expression, la contribution du contexte inflammatoire ainsi que la présence d'éléments liés à la translocation microbienne qui ont d'ailleurs été mis en évidence dans le plasma des individus infectés au VIH-1, dès la phase aiguë de l'infection et perdurant tout au long de la progression malgré l'initiation de la thérapie antirétrovirale⁵⁸⁷. Dans cet ordre d'idée, nous avons démontré que l'indicateur de translocation microbienne LPS est également en mesure de moduler l'expression de BLyS/BAFF des Mo-DC *in vitro*, et une stimulation conjointe de Nef et LPS permet une expression plus grande de BLyS/BAFF.

La persistance de Nef tout au long de la progression clinique s'ajoute donc à un tableau de marqueurs en lien avec la progression de la maladie et la dérégulation du compartiment B chez ces individus, et où figurent un profil de cytokines et chimiokines proinflammatoires, des marqueurs de translocation microbienne, ainsi que des altérations dans le compartiment des DC, dont la surexpression de BLyS/BAFF, et ce malgré un contrôle de la réplication virale due à la thérapie antirétrovirale^{585,587}.

Nous avons mentionné ultérieurement que cette dérégulation des lymphocytes B est caractérisée entre autre par une hyperglobulinémie sanguine ainsi que par la perturbation des

fréquences relatives des populations B, dont l'augmentation d'une population possédant des caractéristiques de transitionnelles immatures et de cellules B de la zone marginale que nous avons nommé les cellules B précurseurs de la zone marginale⁵⁸⁷. Les cellules B transitionnelles immatures, qui sont très sensibles à la présence de BLyS/BAFF³⁸², ont démontré une différenciation préférentielle pour les cellules B de la zone marginale en conditions de lymphopénie associée à la pathogénèse⁵⁹⁶. Cela suggère donc que les populations de mDC exprimant de plus hauts niveaux de BLyS/BAFF pourraient contribuer à une augmentation de la survie des cellules B transitionnelles immatures, et favoriser la génération de cellules B de la zone marginale, ces dernières étant également fortement influencées par la présence de BLyS/BAFF⁵⁹⁷. De par leur nature intrinsèque, ces cellules B dite de première ligne possèdent un potentiel de réponse naturellement plus autoréactif, et sont impliquées dans de nombreuses conditions pathologiques associées à des infections, des lymphomes et des maladies autoimmunes^{382,413,426,427,554}. La surexpression de BLyS/BAFF et/ou de ses récepteurs, est d'ailleurs associée à un bris des mécanismes de tolérance centrale et périphérique, est aussi observée lors de conditions pathologiques de cette nature^{382,384,385,598–601}

Également, il est possible que la surexpression de BLyS/BAFF influence la prolifération, l'activation et la différenciation des lymphocytes T CD4⁺. En effet, BLyS/BAFF est connu pour son rôle auprès des différentes populations de cellules B, mais ce facteur agit également comme une molécule de co-stimulation pour les lymphocytes T CD4⁺^{602,603}. Ces derniers expriment TACI et BAFF-R, où la liaison BAFF/BAFF-R semblent primer^{602–604}. BLyS/BAFF est aussi en mesure d'induire la prolifération des lymphocytes T via la diminution de la phosphorylation de FOXO3A et l'activation des cyclines D2 et D3⁶⁰⁵. Dans un modèle murin reproduisant l'arthrite rhumatoïde, la surexpression de BLyS/BAFF par les DC promeut l'expansion des cellules Th17, et l'inactivation du gène codant pour BLyS/BAFF *in vitro* prévient la différenciation des Th17⁶⁰⁶. Cela suggère que la surexpression de BLyS/BAFF retrouvée dans le contexte d'une infection au VIH-1 pourrait promouvoir une différenciation préférentielle des lymphocytes T CD4⁺ naïves vers un phénotype Th17, qui sont caractérisées comme étant les cellules cibles du VIH-1^{166,167,607,608}.

La diminution de la fréquence des mDC ainsi que l'augmentation des chimiokines DC-tropiques MCP-1, MIP-3 α et MIP-3 β dans le sang de ces mêmes individus observées lors d'études précédentes au laboratoire suggèrent le recrutement des mDC au niveau des sites périphériques. Les DC aux muqueuses sont parmi les premières cellules à rencontrer le virus et à le disséminer au niveau systémique³⁰⁹. Ces dernières, affichant un phénotype proinflammatoire de par la surexpression de BLYS/BAFF et de TNF- α , peuvent donc contribuer à la modulation de la survie, différenciation et/ou activation des cellules B, et des lymphocytes T. Ces signaux peuvent donc provoquer un débalancement dans l'homéostasie des populations tolérogéniques et inflammatoires au niveau des muqueuses, entraînant une modulation dans la réponse des cellules B mucoales, en plus d'altérer l'équilibre des lymphocytes Trégulateurs et Teffecteurs. Ces observations suggèrent donc une implication des DC dans le déclenchement et la persistance des dérégulations des cellules B retrouvées chez les individus infectés au VIH-1, et où nos résultats démontrent l'implication de la protéine virale Nef dans ce processus.

1.3. Altération des populations de cellules B

L'augmentation de facteurs à potentiel de croissance pour les lymphocytes B⁵⁸⁷, la présence d'activation immune et d'inflammation^{382,384,597} ainsi que la lymphopénie⁶⁰⁹ sont tous des acteurs potentiels de l'altération des lymphocytes B, tant au niveau de leur dynamique que de leur fonction.

Chez les individus infectés au VIH-1 à progression rapide et classique, les niveaux élevés de BLYS/BAFF dans le plasma et sur les mDC sanguines sont concomitantes à une augmentation de la fréquence de la population de cellules B précurseurs de la zone marginale⁵⁸⁷. La translocation microbienne ayant lieu chez ces individus, il est possible de penser que les cellules B de la zone marginale sont influencées par cette dernière étant donné son expression de TLR10, un récepteur permettant la reconnaissance de bactéries encapsulées⁴³³. La stimulation de TLR9 a également été démontrée comme étant impliquée

dans la différenciation préférentielle des cellules B transitionnelles immatures en cellules B de la zone marginale⁶¹⁰.

Les cellules B possèdent le potentiel de réguler le développement, la prolifération et le maintien des populations T CD4⁺, que ce soit par contact direct ou par la sécrétion de facteurs solubles⁴⁸¹. Les cellules B régulatrices, ou Breg, sont caractérisées d'après leur expression et leur production d'IL-10, et leur potentiel régulateur. Ce phénotype n'est pas attribué, à ce jour, à une population de cellule B en particulier. Les cellules B de la zone marginale, tant précurseur que mature, ainsi que les cellules B transitionnelles immatures se sont vues particulièrement attribuer le potentiel de Breg^{483,611}.

Dans le contexte où la charge virale est détectable chez les patients, soit ici dans notre étude chez les progresseurs rapides, classiques et lents virémiques, nous avons observé que la fréquence de cellules B totales exprimant IL-10 est augmentée en comparaison aux progresseurs lents avirémiques, ou contrôleurs élites, et aux individus non infectés. De plus, parmi les différentes populations de cellules B que nous avons analysées, celle présentant l'augmentation la plus marquée dans sa fréquence d'expression d'IL-10 est la population précurseur de la zone marginale. Il est intéressant de noter que ceci est en corrélation avec de hauts niveaux sériques d'IgG et d'IgA chez les progresseurs classiques. Malgré tout, il faut souligner le fait qu'en contexte de progression clinique du VIH-1, toutes les populations de cellules B observées ont une grande capacité à exprimer de l'IL-10. Il est possible que de ces populations, certaines d'entre elles ne possèdent tout de même pas un potentiel régulateur, mais cela reste à déterminer.

Ces observations reflètent potentiellement l'activation polyclonale constatée dans les conditions inflammatoires retrouvées chez nos individus progresseurs^{585,587}, puisque la production d'IL-10 par les cellules est modulée par plusieurs signaux, tels que provenant des TLR, du CD40 et du BCR⁴⁸³. Également, nos résultats suggèrent une tentative de la part de l'hôte de contenir les conditions inflammatoires observées chez les progresseurs en sollicitant les fonctions régulatrices de différentes populations de cellules B, dont les mémoires, les

transitionnelles immatures et celle de la zone marginale autant précurseur que mature, où ces populations ont été associées dans une certaine mesure à une capacité régulatrice^{483,611}. Toutefois, nos résultats démontrent que la population B présentant le plus de caractéristiques associées au potentiel Breg est la cellule B précurseur de la zone marginale. Dans un contexte de pathogénèse, la fréquence de populations ayant un phénotype similaire accompagnée d'attributs de Breg a été démontrée augmentée dans le sang d'individus souffrant de lupus systémique érythémateux et d'arthrite rhumatoïde, mais ces cellules étaient réfractaires à une stimulation *in vitro*, produisant moins d'IL-10 et étant dépourvues de fonction suppressive⁴⁸³. Il est donc possible que dans le contexte de la progression du VIH-1, les populations assignées au phénotype Breg démontrent des capacités régulatrices dérégulées.

L'excès de BLYS/BAFF, tel que retrouvé chez nos individus progressseurs, et/ou de ses récepteurs est fréquemment associé à des manifestations auto-immunitaires tel le lupus systématique érythémateux ou l'arthrite rhumatoïde^{382,599}. La présence de BLYS/BAFF est en mesure de promouvoir la production d'IL-10 *in vitro* par des lymphocytes B activées chez l'humain⁵²², et des lymphocytes B de la zone marginale de la rate chez la souris, ces dernières présentant également des fonctions régulatrices⁵⁸⁸. Toutefois, les conséquences d'une augmentation de cellules produisant de l'IL-10 peuvent contribuer à l'activation chronique des cellules B et à leur dérégulation, et peuvent mener à un déséquilibre des ratios Treg/Teff, associé à la progression du VIH-1^{99,481}. Récemment, il a été démontré que dans le contexte d'une infection au VIH-1 et d'hépatite B chronique, une augmentation dans l'activité des Breg est associée à une suppression des fonctions T effectrices antivirales^{502,612,613}.

Une présence élevée de LT- α a été associée à un contexte inflammatoire et autoimmunitaire⁶¹⁴, et un ratio LT- α pour IL-10 en faveur de LT- α a été observé chez des patients atteints de la sclérose en plaque⁶¹⁵. Tous les individus de notre étude ayant une charge virale détectable ont présenté des niveaux similaires de LT- α dans le plasma à ce qui est retrouvé chez les individus non infectés. Lors de l'analyse comparative de la fréquence relative des populations de cellules B exprimant LT- α , nous avons pu constater que les cellules B précurseurs de la zone marginale représentent la population contribuant le plus à l'expression de LT- α , et ceci chez

tous les individus étudiés, peu importe leur statut d'infection ou de progression clinique. Il faut tout de même noter que chez les progresseurs rapides, classiques et lents virémiques, cette contribution à l'expression de LT- α est partagée avec les cellules B transitionnelles immatures, contrairement à ce qui est observé pour les progresseurs lents avirémiques et les individus sains. Les fréquences de populations de cellules B exprimant l'IL-10 sont, de façon majoritaire, plus élevées que celles pour les populations de cellules B exprimant LT- α , mis à part pour les cellules B précurseurs de la zone marginale et les transitionnelles immatures, dont les fréquences sont similaires.

2. Observations en relation avec un contexte de contrôle de la progression clinique du VIH-1

Contrairement à ce qui a été observé dans le contexte de progression clinique du VIH-1, la présence de Nef chez les progresseurs lents a été détecté à des niveaux faibles ou indétectables, tant chez les individus virémiques qu'avirémiques et tant dans le plasma que dans les populations de mDC. Le contrôle de la progression clinique est donc associé à une présence faible à indétectable de Nef, tant dans le plasma qu'au niveau des populations de DC. Ces mêmes individus présentent peu d'inflammation ainsi que des niveaux de BLyS/BAFF similaires à ce qui est retrouvé chez des individus sains, reflétant ainsi la conservation des compartiments DC et B.

Les fréquences relatives de la plupart des populations de lymphocytes B sont conservées chez les progresseurs lents virémiques et surtout avirémiques, à des niveaux similaires à ceux retrouvés chez les individus non infectés. Cette observation est constante avec le profil peu inflammatoire de ces individus, ainsi qu'un niveau normal de BLyS/BAFF et une absence de détection d'éléments de translocation microbienne, reflétant une certaine préservation de l'intégrité immune.

Malgré tout, une population est diminuée de façon significative chez les progresseurs lents, soit celle des lymphocytes B de la zone marginale présentant un phénotype plus mature, en comparaison avec les progresseurs rapides et classiques, et les individus sains. Cela pourrait suggérer que la capacité de recruter ces cellules aux sites périphériques soit associée à un contrôle de la progression clinique du VIH-1. Il est intéressant de noter qu'une diminution semblable d'une population de cellule B de la zone marginale du sang ayant un phénotype CD27⁺IgM⁺IgD⁺ a été rapportée chez des patients présentant des déficiences pour MyD88, IRAK4 et TIRAP⁴³³. Ces facteurs sont impliqués dans plusieurs voies de signalisation, dont les TLR et le récepteur de BLyS/BAFF TACI, et ces observations proposent leur implication dans le maintien de l'homéostasie de cette population.

Dans le contexte du contrôle de la progression clinique, les niveaux conservés de BLyS/BAFF sont conséquents avec la préservation des fréquences des cellules B totales ainsi que des cellules B précurseurs de la zone marginale exprimant l'IL-10. Malgré une augmentation des fréquences relatives de cellules B mémoires quiescentes et transitionnelles immatures exprimant l'IL-10, le profil de la capacité d'exprimer l'IL-10 par les cellules B suggèrent un certain maintien de la part des contrôleurs élites.

Dans le contexte de la progression de la maladie, le rapport entre les cellules B précurseur de la zone marginale exprimant l'IL-10 et celles exprimant LT- α est similaire, mais chez les contrôleurs élite, nous avons retrouvé ce rapport en faveur de l'expression de LT- α . Ces observations démontrent que les populations de la zone marginale observées chez les contrôleurs élite peuvent être impliquées dans le contrôle de la progression du VIH-1, potentiellement par une modulation des réponses immunes et de l'homéostasie des microenvironnements lymphoïdes. En ce sens, des études sur un modèle murin ont démontré l'importance de la LT- α dans l'organisation et le maintien des structures lymphoïdes, ainsi qu'une modulation des réponses immunes⁶¹⁴. Puis, il a été démontré que les cellules B exprimant la LT- α favorisaient une différenciation des cellules T CD4⁺ naïves en un phénotype de type Th2, et ce, dans un processus dépendant des DC⁶¹⁶. Également, les cellules B exprimant la LT- α sont impliquées dans le développement et l'homéostasie des follicules

des organes lymphoïdes chez la souris, dans un processus impliquant une boucle de rétroaction positive avec CXCL13⁴⁰⁷. Nous avons observé des niveaux plasmatiques élevés de CXCL13 chez tous les individus présentant une charge virale détectable en comparaison avec les contrôleurs élités et les individus non infectés, suggérant ainsi que la population de cellules B précurseur de la zone marginale exprimant la LT- α peut aider au contrôle de CXCL13 et l'intégrité des organes lymphoïdes (voir figure annexe 1). Le fait que les cellules B de la zone marginale peuvent se déplacer dans la zone folliculaire de la rate⁶¹⁷ et promouvoir la génération de centres germinatifs⁴¹³ suggère que leur profil d'expression d'IL-10 et de LT- α , retrouvé chez les contrôleurs élités, pourrait être impliqué dans la préservation des réponses adaptatives générées dans le contexte d'un contrôle de la progression du VIH-1.

La population de cellules B précurseur de la zone marginale pourrait être impliquée dans la génération d'anticorps spécifiques au VIH-1. Effectivement, il a été démontré que les cellules B de la zone marginale, chez l'humain, répondent aux polysaccharides de la capsule de *S. pneumoniae* et *H. influenzae*^{412,426,618} et présentent des immunoglobulines ayant subies de l'hypermutation somatique^{413,619-622}. De plus, les cellules B de la zone marginale expriment le segment IGHV1-2*02, qui a été maintes fois retrouvé encodant pour les anticorps neutralisants à large spectre dirigés contre le VIH-1, tel que VRC01⁵⁷⁵. En ce sens, la capacité de certains individus infectés au VIH-1 à produire de tels anticorps neutralisants à large spectre est associée à un certain corrélat de prévention dans la progression de la maladie^{623,624}. De plus, la caractérisation récente d'IgA spécifiques à la gp41, au niveau de lavages cervicovaginaux de la muqueuse génitale, a été observée dans les premières semaines suivant la transmission, et suggère une implication des populations des cellules B de première ligne dans leur génération⁶²⁵. Il est important de mentionner que les niveaux de BLyS/BAFF étaient élevés précédemment à l'apparition de ces anticorps. En accord avec ces observations, dans un modèle murin, des doses répétées de BLyS/BAFF ont augmenté le compartiment de la zone marginale et généré une augmentation de la réponse dirigée contre Env ainsi que des anticorps neutralisants à large spectre⁵⁷⁶. La dynamique de BLyS/BAFF semble donc importante dans l'homéostasie de la réponse immunitaire, et nous croyons qu'elle doit être considérée lors des designs de vaccins.

En résumé, nous avons émis l'hypothèse que chez les individus contrôlant la progression clinique due au VIH-1, la préservation du compartiment des cellules B se refléterait par l'acquisition d'un potentiel « Breg » par les populations de la zone marginale. Contrairement à cela, nous avons observé que les populations B de la zone exprimant l'IL-10 chez les contrôleurs élités se sont conservées au même niveau que chez les individus non infectés. Cette observation peut démontrer, dans une certaine mesure, un contrôle de l'expression d'IL-10 et de l'activité des Breg, dans un contexte où il y a contrôle de la production de BLYS/BAFF. Au contraire, ce sont les progresseurs qui ont affiché une augmentation de cellules B exprimant IL-10, plus particulièrement par les cellules B de première ligne. Cela peut illustrer une tentative de l'hôte de contrôler le fardeau inflammatoire caractéristique de la progression de la maladie, mais pourrait résulter en un soutien de l'activation chronique des cellules B, en plus d'un déséquilibre entre les phénotypes régulateur et effecteur des lymphocytes T, dans un environnement en excès de BLYS/BAFF. De plus amples investigations sont évidemment nécessaires afin de valider l'implication de ces populations dans le contexte du contrôle et de la progression de la maladie.

3. Implication des DC au niveau des muqueuses

L'environnement mucosal est le lieu où peut s'établir une réponse immunitaire efficace face au VIH-1, étant la porte d'entrée de ce virus. Les DC sont essentielles dans le maintien de l'intégrité périphérique, de par leur étroite collaboration avec les cellules épithéliales, les cellules B et les lymphocytes T, permettant la modulation et la génération de réponses B et T en conditions homéostatiques ou inflammatoires. Tel que mentionné précédemment, les mDC CD103⁺ possèdent une capacité tolérogénique intrinsèque, de par leur capacité à induire la génération et la rétention des plasmocytes IgA⁺ au niveau des muqueuses via, entre autre, la production de RA. De plus, de par la production de RA et de TGF- β 1, les mDC CD103⁺ modulent les lymphocytes T CD4⁺ en un phénotype de Treg. De l'autre côté, les mDC CD103⁻ semblent impliquées dans la génération d'une réponse immunitaire, de par la production de cytokines proinflammatoires et la génération de lymphocytes T

effecteurs^{269,271,284,460}. Aux muqueuses, la majorité des plasmocytes IgA⁺ sont générés via une réponse T-dépendante, mais une certaine proportion d'entre eux sont générés via la réponse T-indépendante, qui implique la présence RA et de BLyS/BAFF et/ou APRIL produites par les DC^{462,626}. Globalement, ces deux populations contribuent à une homéostasie de l'immunité et de la tolérance mucoale à la flore commensale. En ce sens, il est probable que le métabolisme lié à la génération de RA à partir de la vitamine A est d'une très grande importance dans l'immunité face au VIH-1, qui prend majoritairement place au niveau des muqueuses. Dans le sang, RA est retrouvée de façon constitutive en faible concentration dans des conditions homéostatiques⁶²⁷.

Toutefois, dans le contexte d'une infection au VIH-1, le virus et ses produits dérivés, tel que Nef, pourrait induire un débalancement de ces populations de DC en faveur d'un phénotype plus inflammatoire, c'est-à-dire par l'expression de BLyS/BAFF et TNF- α . Les conséquences qui s'en suivent pourraient être caractérisées par un déséquilibre du phénotype Treg/Teffecteur en faveur des lymphocytes Th17, ces dernières étant les cellules cibles du VIH, en plus d'une possibilité d'un bris dans la tolérance périphérique dans le compartiment B, reflété par l'activation polyclonale et l'autoréactivité.

Nous avons observé que la présence simultanée de Nef et RA avec les Mo-DC a démontré une action inhibitrice de RA sur l'effet de Nef quant à l'augmentation de BLyS/BAFF, et que RA diminue la phosphorylation de STAT1 induite par Nef. Ces observations sont en accord avec une étude qui a démontré des effets anti-inflammatoires et la promotion d'un phénotype plus tolérogénique des Mo-DC en présence de RA⁶²⁸. Nous avons effectivement observé, lorsque les Mo-DC étaient dérivées en présence de RA, une diminution de la molécule HLA-DR et de la molécule de costimulation CD86, conjointement à une baisse d'expression de BLyS/BAFF et de TNF- α . RA est en mesure de moduler plusieurs récepteurs nucléaires, tel que les PPAR (récepteur activé proliférateur du peroxyosome) qui sont induit lors du développement des Mo-DC, et sont des régulateurs potentiels de l'inflammation via la régulation de l'activation tel NF- κ B, AP-1 et STAT1⁶²⁹. D'autre part, nous avons mesuré un niveau inférieur de RA dans le plasma des contrôleurs élites comparativement à la

concentration retrouvée chez les individus sains. À savoir si cela représente un avantage génétique et/ou si cela est lié à un contrôle actif au niveau de la réponse mucosale reste à déterminer, mais nos observations démontrent tout de même que leur capacité de maintenir de très bas niveaux de RA au niveau systémique est en lien avec un contrôle de la progression clinique. Dans cette optique, l'effet anti-inflammatoire de RA sur l'effet proinflammatoire de Nef *in vitro*, ainsi que les bas niveaux de RA dans le plasma des contrôleurs élites, suggèrent que RA est lié au contrôle de la progression clinique de la maladie.

Par contre, dans le contexte de la progression au VIH-1, l'immunité mucosale est altérée de par la détection d'éléments liés à la translocation microbienne⁵⁸⁷. Nous avons constaté une certaine augmentation de RA dans le plasma des progresseurs en phase chronique, ainsi qu'une augmentation franche dès l'initiation de la thérapie antirétrovirale, ce qui pourrait être lié à la perturbation de leurs muqueuses. Cela pourrait également représenter une tentative de restaurer l'homéostasie de la muqueuse, mais pourrait résulter, entre autre, en une contribution à l'inflammation et l'expansion de Th17, cellules ciblées par le VIH-1^{166,167,607}. Les DC sécrètent les cytokines nécessaires à la différenciation des Th17 en présence de RA et de ligands de TLR, qui sont augmentés dans le contexte du VIH-1 de par la translocation microbienne^{587,630}. Récemment, les monocytes isolés de patients infectés au VIH-1 ont démontré une altération de leurs récepteurs nucléaires liés au métabolisme de production de RA, et sont caractérisés par une diminution marquée dans l'expression des récepteurs PPAR et de RA. L'induction de la thérapie antirétrovirale n'a pas été en mesure d'effectuer une restauration de l'expression de ces récepteurs chez ces individus, et cela a été lié à une altération de l'expression de gènes supportant l'activation immunitaire et le métabolisme des lipides⁶³¹. L'effet de la thérapie sur l'augmentation de RA pourrait également démontrer un effet direct des agents antirétroviraux sur le métabolisme de la vitamine A. Il a été démontré que les inhibiteurs de la protéase augmentent l'activité de la RALDH, impliqué dans la synthèse de RA à partir de rétinol, augmentant du coup le niveau de RA retrouvé dans le sang⁶³².

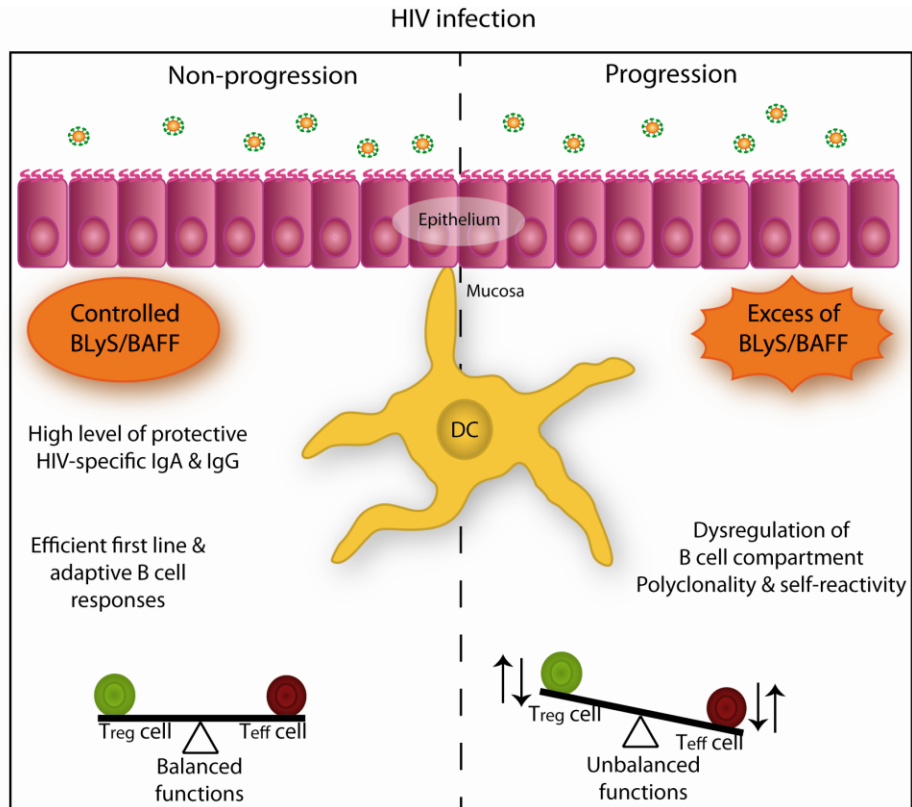


Figure 6. L'implication de l'expression de BlyS/BAFF dans la modulation de réponses spécifiques au VIH-1. Le contrôle de l'infection est reflété par une capacité à réguler l'expression de BlyS/BAFF au niveau des sites mucosaux, permettant la promotion de réponses efficaces B et T spécifiques au VIH-1, en vue de bloquer l'invasion systémique du virus et de compartimentaliser l'infection. Au contraire, un bris dans l'intégrité systémique et la progression de l'infection par le VIH-1 sont caractérisés par une incapacité de contrôler les niveaux de BlyS/BAFF dans les sites mucosaux, entre autre de part une surexpression de BlyS/BAFF par les DC causée par des facteurs tels que Nef. Ceci mène à la dérégulation des réponses B et T, et à l'altération de la génération d'une immunité protectrice face au VIH-1. Tiré de Poudrier et al, Clinical Dev and Immunol, 2012 (voir annexe 2).

Conclusion

Les objectifs de cette étude étaient, d'une part, de déterminer l'impact de facteurs dérivés du VIH-1 sur les dérégulations des lymphocytes B observées dans le contexte d'une infection au VIH-1, via l'implication des DC, et, d'autre part, de poursuivre l'investigation de ces dérégulations par le biais d'une caractérisation des phénotypes des lymphocytes B.

Dans cette optique, nos observations sur la présence de la protéine virale Nef, malgré la suppression de la virémie par l'application de la thérapie antirétrovirale, est indicatrice de la présence de réservoirs, et l'avons trouvée directement responsable d'une expression augmentée de B_{LyS}/BAFF par les mDC, contribuant ainsi au phénotype inflammatoire déjà observé chez ces individus. De par sa capacité à pénétrer les cellules directement ou via des protubérances cellulaires, et de ses interactions avec de multiples voies de signalisation, il serait intéressant d'envisager le blocage de Nef en addition à la thérapie actuelle.

Les cellules B de la zone marginale présentent une capacité naturelle à l'autoréactivité de par leur potentiel intrinsèque à la polyréactivité, mais sont restreintes dans cette autoréactivité en conditions homéostatiques de par leur sensibilité accrue au facteur de survie, de prolifération et de différenciation B_{LyS}/BAFF. Toutefois, un excès de B_{LyS}/BAFF, tel qu'observé lors de la progression clinique du VIH-1, est en mesure de contrecarrer cette tolérance périphérique. Dès lors, B_{LyS}/BAFF peut favoriser la survie de ces cellules, dont les cellules B « précurseurs » de la zone marginale que nous avons trouvées augmentées dans la progression clinique du VIH-1. Ces dernières peuvent contribuer à l'activation polyclonale et aux manifestations d'autoréactivité, entre autres par la production d'auto-anticorps polyréactif et polyspécifique et ce, potentiellement au détriment d'une réponse spécifique au VIH-1.

La quête aux anticorps neutralisants à large spectre ne doit pas s'effectuer sans se poser de questions quant à l'origine de ceux-ci. Détectés dans un stade plus avancé de la progression de l'infection au VIH-1, ces anticorps sont suspectés être produits entre autres par des cellules B de première ligne telles les cellules B de la zone marginale, étant donné certaines

caractéristiques au niveau de leur structure et de leur spécificité polyclonale présentant des composantes autoréactives. Ils seraient principalement issus d'une altération au niveau de la régulation de la tolérance et l'immunité. Malheureusement, ces anticorps sont inefficaces dans le cadre de la progression de la maladie, puisqu'ils sont générés beaucoup trop tard pour leur permettre d'instaurer une protection face au VIH-1.

L'espoir de déclencher une réponse B en vue de générer ce type d'anticorps neutralisants à large spectre dans le cadre d'une vaccination doit se faire prudemment, en plus de s'avérer une tâche colossale. En conditions homéostatiques, les anticorps générées à partir de clones B à caractère autoréactif ne seront pas conservés, et il sera difficile dans ce cas de promouvoir une mémoire immunologique sans compromettre la tolérance.

Finalement, nous proposons que l'utilisation d'agents thérapeutiques en vue de contrôler la concentration de BLyS/BAFF en addition à la thérapie actuelle, où cela pourrait permettre à la fois la réduction de cellules cibles du VIH-1 et la réduction de l'activation du système immunitaire.

Perspectives

La caractérisation des cellules B dans le cadre d'une progression versus un contrôle de la maladie dans le contexte d'une infection au VIH-1 doit se poursuivre. En ce sens, la mesure de l'expression de gènes (« gene expression array ») permettrait d'identifier l'expression différentielle de gènes entre les progresseurs et les contrôleurs au niveau des populations de cellules B de première ligne. De plus, il serait également intéressant de procéder à des essais de stimulations *in vitro* de ces cellules B par BlyS/BAFF et gp120, suivant une courbe de concentration, afin de donner une indication quant à l'activité de ces cellules, ainsi que leur implication dans la production d'anticorps.

Également, nous avons observé une implication anti-inflammatoire de RA dans l'effet proinflammatoire de Nef. Toutefois, nous devons procéder à d'autres essais *in vitro* portant sur des intermédiaires de la voie de signalisation de RA, tel que PPAR γ , pouvant expliquer les mécanismes derrière cette observation.

Bibliographie

1. Turner, B.G., and Summers, M.F. (1999). Structural biology of HIV. *J. Mol. Biol.* 285, 1–32.
2. Weiss, R.A. (2000). Getting to know HIV. *Trop. Med. Int. Health* 5, A10–5.
3. Fanales-Belasio, E., Raimondo, M., Suligoi, B., and Buttò, S. (2010). HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann. dell’Istituto ...* 46, 5–14.
4. Emerman, M., and Malin, M.H. (1998). HIV-1 Regulatory/Accessory Genes: Keys to Unraveling Viral and Host Cell Biology. *Science* (80-.). 280, 1880–1884.
5. Li, L., Li, H.S., Pauza, C.D., Bukrinsky, M., and Zhao, R.Y. (2005). Roles of HIV-1 auxiliary proteins in viral pathogenesis and host-pathogen interactions. *Cell Res.* 15, 923–934.
6. Freed, E.O., and Martin, M.A. (2007). HIVs and Their Replication. In *Fields Virology*, L.W.& Wilkins, ed. (Philadelphia), pp. 2107–2167.
7. Malim, M.H., and Emerman, M. (2008). HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell Host Microbe* 3, 388–398.
8. Kogan, M., and Rappaport, J. (2011). HIV-1 accessory protein Vpr: relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention. *Retrovirology* 8, 25.
9. De Silva, S., Planelles, V., and Wu, L. (2012). Differential effects of Vpr on single-cycle and spreading HIV-1 infections in CD4+ T-cells and dendritic cells. *PLoS One* 7, e35385.
10. Neil, S.J.D., Zang, T., and Bieniasz, P.D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451, 425–430.
11. Deacon, N.J., Tsykin, A., Solomon, A., Smith, K., Ludford-Menting, M., Hooker, D.J., McPhee, D.A., Greenway, A.L., Ellett, A., Chatfield, C., et al. (1995). Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 270, 988–991.
12. Schindler, M., Münch, J., Kutsch, O., Li, H., Santiago, M.L., Bibollet-Ruche, F., Müller-Trutwin, M.C., Novembre, F.J., Peeters, M., Courgnaud, V., et al. (2006). Nef-mediated suppression of T cell activation was lost in a lentiviral lineage that gave rise to HIV-1. *Cell* 125, 1055–1067.
13. Foster, J.L., Denial, S.J., Temple, B.R.S., and Garcia, J.V. (2011). Mechanisms of HIV-1 Nef function and intracellular signaling. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 6, 230–246.

14. Briggs, S.D., Scholtz, B., Jacque, J.M., Swingler, S., Stevenson, M., and Smithgall, T.E. (2001). HIV-1 Nef promotes survival of myeloid cells by a Stat3-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* *276*, 25605–25611.
15. Pene-Dumitrescu, T., Shu, S.T., Wales, T.E., Alvarado, J.J., Shi, H., Narute, P., Moroco, J. a, Yeh, J.I., Engen, J.R., and Smithgall, T.E. (2012). HIV-1 Nef interaction influences the ATP-binding site of the Src-family kinase, Hck. *BMC Chem. Biol.* *12*, 1.
16. Venzke, S., Michel, N., Allespach, I., Fackler, O.T., and Keppler, O.T. (2006). Expression of Nef downregulates CXCR4, the major coreceptor of human immunodeficiency virus, from the surfaces of target cells and thereby enhances resistance to superinfection. *J. Virol.* *80*, 11141–11152.
17. Levesque, K., Finzi, A., Binette, J., and Cohen, E. a (2004). Role of CD4 receptor down-regulation during HIV-1 infection. *Curr. HIV Res.* *2*, 51–59.
18. Lama, J. (2003). The physiological relevance of CD4 receptor down-modulation during HIV infection. *Curr. HIV Res.* *1*, 167–184.
19. Benson, R.E., Sanfridson, A., Ottinger, J.S., Doyle, C., and Cullen, B.R. (1993). Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection. *J. Exp. Med.* *177*, 1561–1566.
20. Wildum, S., Schindler, M., Münch, J., and Kirchhoff, F. (2006). Contribution of Vpu, Env, and Nef to CD4 down-modulation and resistance of human immunodeficiency virus type 1-infected T cells to superinfection. *J. Virol.* *80*, 8047–8059.
21. Greenway, A.L., Holloway, G., McPhee, D. a, Ellis, P., Cornall, A., and Lidman, M. (2003). HIV-1 Nef control of cell signalling molecules: multiple strategies to promote virus replication. *J. Biosci.* *28*, 323–335.
22. Michel, N., Allespach, I., Venzke, S., Fackler, O.T., and Keppler, O.T. (2005). The Nef protein of human immunodeficiency virus establishes superinfection immunity by a dual strategy to downregulate cell-surface CCR5 and CD4. *Curr. Biol.* *15*, 714–723.
23. Hrecka, K., Swigut, T., Schindler, M., Kirchhoff, F., and Skowronski, J. (2005). Nef proteins from diverse groups of primate lentiviruses downmodulate CXCR4 to inhibit migration to the chemokine stromal derived factor 1. *J. Virol.* *79*, 10650–10659.
24. Roeth, J.F., and Collins, K.L. (2006). Human immunodeficiency virus type 1 Nef: adapting to intracellular trafficking pathways. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *70*, 548–563.
25. Kamp, W., Berk, M.B., Visser, C.J., and Nottet, H.S. (2000). Mechanisms of HIV-1 to escape from the host immune surveillance. *Eur. J. Clin. Invest.* *30*, 740–746.

26. Swigut, T., Shohdy, N., and Skowronski, J. (2001). Mechanism for down-regulation of CD28 by Nef. *EMBO J.* *20*, 1593–1604.
27. Chaudhry, A., Das, S.R., Hussain, A., Mayor, S., George, A., Bal, V., Jameel, S., and Rath, S. (2005). The Nef protein of HIV-1 induces loss of cell surface costimulatory molecules CD80 and CD86 in APCs. *J. Immunol.* *175*, 4566–4574.
28. Mann, J., Patrick, C.N., Cragg, M.S., Honeychurch, J., Mann, D.A., and Harris, M. (2005). Functional analysis of HIV type 1 Nef reveals a role for PAK2 as a regulator of cell phenotype and function in the murine dendritic cell line, DC2.4. *J. Immunol.* *175*, 6560–6569.
29. Shinya, E., Owaki, A., Shimizu, M., Takeuchi, J., Kawashima, T., Hidaka, C., Satomi, M., Watari, E., Sugita, M., and Takahashi, H. (2004). Endogenously expressed HIV-1 nef down-regulates antigen-presenting molecules, not only class I MHC but also CD1a, in immature dendritic cells. *Virology* *326*, 79–89.
30. Stumptner-Cuvelette, P., Morchoisne, S., Dugast, M., Le Gall, S., Raposo, G., Schwartz, O., and Benaroch, P. (2001). HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 12144–12149.
31. Schindler, M., Würfl, S., Benaroch, P., Greenough, T.C., Daniels, R., Easterbrook, P., Brenner, M., Münch, J., and Kirchhoff, F. (2003). Down-modulation of mature major histocompatibility complex class II and up-regulation of invariant chain cell surface expression are well-conserved functions of human and simian immunodeficiency virus nef alleles. *J. Virol.* *77*, 10548–10556.
32. Petit, C., Buseyne, F., Boccaccio, C., Abastado, J.P., Heard, J.M., and Schwartz, O. (2001). Nef is required for efficient HIV-1 replication in cocultures of dendritic cells and lymphocytes. *Virology* *286*, 225–236.
33. Sol-Foulon, N., Moris, A., Nobile, C., Boccaccio, C., Engering, A., Abastado, J.-P., Heard, J.-M., van Kooyk, Y., and Schwartz, O. (2002). HIV-1 Nef-induced upregulation of DC-SIGN in dendritic cells promotes lymphocyte clustering and viral spread. *Immunity* *16*, 145–155.
34. Percario, Z., and Olivetta, E. (2003). Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Nef activates STAT3 in primary human monocyte/macrophages through the release of soluble factors: involvement of. *J. Leukoc. ...* *74*, 821–832.
35. Swingler, S., Mann, A., Jacqué, J., Brichacek, B., Sasseville, V.G., Williams, K., Lackner, A.A., Janoff, E.N., Wang, R., Fisher, D., et al. (1999). HIV-1 Nef mediates lymphocyte chemotaxis and activation by infected macrophages. *Nat. Med.* *5*, 997–103.

36. Thoulouze, M.I., Sol-Foulon, N., Blanchet, F., Dautry-Varsat, A., Schwartz, O., and Alcover, A. (2006). Human immunodeficiency virus type-1 infection impairs the formation of the immunological synapse. *Immunity* *24*, 547–561.
37. Laguette, N., Brégnard, C., Benichou, S., and Basmaciogullari, S. (2010). Human immunodeficiency virus (HIV) type-1, HIV-2 and simian immunodeficiency virus Nef proteins. *Mol. Aspects Med.* *31*, 418–433.
38. Fenard, D., Yonemoto, W., de Noronha, C., Cavrois, M., Williams, S.A., and Greene, W.C. (2005). Nef is physically recruited into the immunological synapse and potentiates T cell activation early after TCR engagement. *J. Immunol.* *175*, 6050–6057.
39. Fortin, J.-F., Barat, C., Beauséjour, Y., Barbeau, B., and Tremblay, M.J. (2004). Hyper-responsiveness to stimulation of human immunodeficiency virus-infected CD4⁺ T cells requires Nef and Tat virus gene products and results from higher NFAT, NF-kappaB, and AP-1 induction. *J. Biol. Chem.* *279*, 39520–39531.
40. Arendt, C.W., and Littman, D.R. (2001). HIV: master of the host cell. *Genome Biol.* *2*, REVIEWS1030.
41. Das, S., and Jameel, S. (2005). Biology of the HIV Nef protein. *Indian J Med Res* 315–332.
42. Tribble, R.P., Emert-Sedlak, L., and Smithgall, T.E. (2006). HIV-1 Nef selectively activates Src family kinases Hck, Lyn, and c-Src through direct SH3 domain interaction. *J. Biol. Chem.* *281*, 27029–27038.
43. Briggs, S.D. (1997). SH3-mediated Hck Tyrosine Kinase Activation and Fibroblast Transformation by the Nef Protein of HIV-1. *J. Biol. Chem.* *272*, 17899–17902.
44. Hiyoshi, M., Suzu, S., Yoshidomi, Y., Hassan, R., Harada, H., Sakashita, N., Akari, H., Motoyoshi, K., and Okada, S. (2008). Interaction between Hck and HIV-1 Nef negatively regulates cell surface expression of M-CSF receptor. *Blood* *111*, 243–250.
45. Parsons, S.J., and Parsons, J.T. (2004). Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* *23*, 7906–7909.
46. Bromann, P.A., Korkaya, H., and Courtneidge, S.A. (2004). The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases. *Oncogene* *23*, 7957–7968.
47. Xu, X.N., Laffert, B., Screatton, G.R., Kraft, M., Wolf, D., Kolanus, W., Mongkolsapay, J., McMichael, A.J., and Baur, A.S. (1999). Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor zeta chain. *J. Exp. Med.* *189*, 1489–1496.

48. Saxena, S.K., Shrivastava, G., Tiwari, S., Swamy, M.A., and Nair, M.P. (2012). Modulation of HIV pathogenesis and T-cell signaling by HIV-1 Nef. *Future Virol.* 7, 609–620.
49. Fujii, Y., Otake, K., Tashiro, M., and Adachi, A. (1996). Soluble Nef antigen of HIV-1 is cytotoxic for human CD4+ T cells. *FEBS Lett.* 393, 93–96.
50. Raymond, a D., Campbell-Sims, T.C., Khan, M., Lang, M., Huang, M.B., Bond, V.C., and Powell, M.D. (2011). HIV Type 1 Nef is released from infected cells in CD45(+) microvesicles and is present in the plasma of HIV-infected individuals. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 27, 167–178.
51. Gould, S.J., Booth, A.M., and Hildreth, J.E.K. (2003). The Trojan exosome hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10592–10597.
52. Chompre, G., Cruz, E., Maldonado, L., Rivera-Amill, V., Porter, J.T., and Noel, R.J. (2012). Astrocytic expression of HIV-1 Nef impairs spatial and recognition memory. *Neurobiol. Dis.* 49C, 128–136.
53. 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.
54. Quaranta, M.G., Mattioli, B., Giordani, L., and Viora, M. (2006). The immunoregulatory effects of HIV-1 Nef on dendritic cells and the pathogenesis of AIDS. *FASEB J.* 20, 2198–2208.
55. Alessandrini, L., Santarcangelo, A.C., Olivetta, E., Ferrantelli, F., d’Aloja, P., Pugliese, K., Pelosi, E., Chelucci, C., Mattia, G., Peschle, C., et al. (2000). T-tropic human immunodeficiency virus (HIV) type 1 Nef protein enters human monocyte-macrophages and induces resistance to HIV replication: a possible mechanism of HIV T-tropic emergence in AIDS. *J. Gen. Virol.* 81, 2905–2917.
56. Olivetta, E., Percario, Z., Fiorucci, G., Mattia, G., Schiavoni, I., Dennis, C., Jäger, J., Harris, M., Romeo, G., Affabris, E., et al. (2003). HIV-1 Nef induces the release of inflammatory factors from human monocyte/macrophages: involvement of Nef endocytotic signals and NF-kappa B activation. *J. Immunol.* 170, 1716–1727.
57. Federico, M., Percario, Z., Olivetta, E., Fiorucci, G., Muratori, C., Micheli, A., Romeo, G., and Affabris, E. (2001). HIV-1 Nef activates STAT1 in human monocytes/macrophages through the release of soluble factors. *Blood* 98, 2752–2761.

58. Quaranta, M.G., Tritarelli, E., Giordani, L., and Viora, M. (2002). HIV-1 Nef induces dendritic cell differentiation: a possible mechanism of uninfected CD4(+) T cell activation. *Exp. Cell Res.* 275, 243–254.
59. Quaranta, M.G., Mattioli, B., Spadaro, F., Straface, E., Giordani, L., Ramoni, C., Malorni, W., and Viora, M. (2003). HIV-1 Nef triggers Vav-mediated signaling pathway leading to functional and morphological differentiation of dendritic cells. *FASEB J.* 17, 2025–2036.
60. Messmer, D., Jacqué, J.-M., Santisteban, C., Bristow, C., Han, S.-Y., Villamide-Herrera, L., Mehlhop, E., Marx, P. a, Steinman, R.M., Gettie, A., et al. (2002). Endogenously expressed nef uncouples cytokine and chemokine production from membrane phenotypic maturation in dendritic cells. *J. Immunol.* 169, 4172–4182.
61. Qiao, X., He, B., Chiu, A., Knowles, D.M., Chadburn, A., and Cerutti, A. (2006). Human immunodeficiency virus 1 Nef suppresses CD40-dependent immunoglobulin class switching in bystander B cells. *Nat. Immunol.* 7, 302–310.
62. Chirmule, N., Oyaizu, N., Saxinger, C., and Pahwa, S. (1994). Nef protein of HIV-1 has B-cell stimulatory activity. *AIDS* 8, 733–734.
63. Xu, W., Santini, P.A., Sullivan, J.S., He, B., Shan, M., Ball, S.C., Dyer, W.B., Ketas, T.J., Chadburn, A., Cohen-Gould, L., et al. (2009). HIV-1 evades virus-specific IgG2 and IgA responses by targeting systemic and intestinal B cells via long-range intercellular conduits. *Nat. Immunol.* 10, 1008–1017.
64. Coiras, M., López-Huertas, M.R., Pérez-Olmeda, M., and Alcamí, J. (2009). Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 798–812.
65. Nisole, S., and Saïb, A. (2004). Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology* 1, 9.
66. Bieniasz, P.D. (2009). The cell biology of HIV-1 virion genesis. *Cell Host Microbe* 5, 550–558.
67. Cohen, M., Shaw, G., McMchael, A., and Haynes, B. (2011). Acute HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* 364, 1943–1954.
68. Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Paul, W.E., and Picker, L.J. (2006). Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat. Med.* 12, 289–295.
69. Hladik, F., and McElrath, M.J. (2008). Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 447–457.

70. McMichael, A.J., Borrow, P., Tomaras, G.D., Goonetilleke, N., and Haynes, B.F. (2010). The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 11–23.
71. Moir, S., Chun, T.-W., and Fauci, A.S. (2011). Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu. Rev. Pathol.* *6*, 223–248.
72. Haase, A.T. (2011). Early events in sexual transmission of HIV and SIV and opportunities for interventions. *Annu. Rev. Med.* *62*, 127–139.
73. Centlivre, M., Sala, M., Wain-Hobson, S., and Berkhout, B. (2007). In HIV-1 pathogenesis the die is cast during primary infection. *AIDS* *21*, 1–11.
74. Tindall, B., and Cooper, D.A. (1991). Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *AIDS* *5*, 1–14.
75. Kahn, J.O., and Walker, B.D. (1998). Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* *339*, 33–39.
76. Pantaleo, G., and Fauci, A. (1996). Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu. Rev. Microbiol.* *50*, 825–854.
77. Fiebig, E.W., Wright, D.J., Rawal, B.D., Garrett, P.E., Schumacher, R.T., Peddada, L., Heldebrant, C., Smith, R., Conrad, A., Kleinman, S.H., et al. (2003). Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS* *17*, 1871–1879.
78. Koup, R.A., Safrit, J.T., Cao, Y., Andrews, C.A., McLeod, G., Borkowsky, W., Farthing, C., and Ho, D.D. (1994). Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J. Virol.* *68*, 4650–4655.
79. Moore, J.P., Cao, Y., Ho, D.D., and Koup, R.A. (1994). Development of the anti-gp120 antibody response during seroconversion to human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* *68*, 5142–5155.
80. Lyles, R.H., Muñoz, A., Yamashita, T.E., Bazmi, H., Detels, R., Rinaldo, C.R., Margolick, J.B., Phair, J.P., and Mellors, J.W. (2000). Natural history of human immunodeficiency virus type 1 viremia after seroconversion and proximal to AIDS in a large cohort of homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study. *J. Infect. Dis.* *181*, 872–880.
81. McCutchan, J. a (1990). Virology, immunology, and clinical course of HIV infection. *J. Consult. Clin. Psychol.* *58*, 5–12.

82. Chu, C., and Selwyn, P.A. (2011). Complications of HIV infection: a systems-based approach. *Am. Fam. Physician* 83, 395–406.
83. Blankson, J.N., Persaud, D., and Siliciano, R.F. (2002). The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu. Rev. Med.* 53, 557–593.
84. Coleman, C.M., and Wu, L. (2009). HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs. *Retrovirology* 6, 51.
85. Schacker, T., Little, S., Connick, E., Gebhard-Mitchell, K., Zhang, Z.Q., Krieger, J., Pryor, J., Havlir, D., Wong, J.K., Richman, D., et al. (2000). Rapid accumulation of human immunodeficiency virus (HIV) in lymphatic tissue reservoirs during acute and early HIV infection: implications for timing of antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* 181, 354–357.
86. Burton, G.F., Keele, B.F., Estes, J.D., Thacker, T.C., and Gartner, S. (2002). Follicular dendritic cell contributions to HIV pathogenesis. *Semin. Immunol.* 14, 275–284.
87. Haase, A.T., Henry, K., Zupancic, M., Sedgewick, G., Faust, R.A., Melroe, H., Cavert, W., Gebhard, K., Staskus, K., Zhang, Z.Q., et al. (1996). Quantitative image analysis of HIV-1 infection in lymphoid tissue. *Science* 274, 985–989.
88. Eisele, E., and Siliciano, R.F. (2012). Redefining the viral reservoirs that prevent HIV-1 eradication. *Immunity* 37, 377–388.
89. Zink, M.C., Brice, A.K., Kelly, K.M., Queen, S.E., Gama, L., Li, M., Adams, R.J., Bartizal, C., Varrone, J., Rabi, S.A., et al. (2010). Simian immunodeficiency virus-infected macaques treated with highly active antiretroviral therapy have reduced central nervous system viral replication and inflammation but persistence of viral DNA. *J. Infect. Dis.* 202, 161–170.
90. Chun, T.-W., Nickle, D.C., Justement, J.S., Meyers, J.H., Roby, G., Hallahan, C.W., Kottlil, S., Moir, S., Mican, J.M., Mullins, J.I., et al. (2008). Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* 197, 714–720.
91. OMS | Traitement antirétroviral de l'infection à VIH chez l'adulte et l'adolescent.
92. Mehandru, S., Poles, M.A., Tenner-Racz, K., Jean-Pierre, P., Manuelli, V., Lopez, P., Shet, A., Low, A., Mohri, H., Boden, D., et al. (2006). Lack of Mucosal Immune Reconstitution during Prolonged Treatment of Acute and Early HIV-1 Infection. *PLoS Med.* 3, e484.
93. Guadalupe, M., Reay, E., Sankaran, S., Prindiville, T., Flamm, J., McNeil, A., and Dandekar, S. (2003). Severe CD4⁺ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary

human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J. Virol.* 77, 11708–11717.

94. Tincati, C., Biasin, M., Bandera, A., Violin, M., Marchetti, G., Piacentini, L., Vago, G.L., Balotta, C., Moroni, M., Franzetti, F., et al. (2009). Early initiation of highly active antiretroviral therapy fails to reverse immunovirological abnormalities in gut-associated lymphoid tissue induced by acute HIV infection. *Antivir. Ther.* 14, 321–330.

95. Kamat, A., Misra, V., Cassol, E., Ancuta, P., Yan, Z., Li, C., Morgello, S., and Gabuzda, D. (2012). A plasma biomarker signature of immune activation in HIV patients on antiretroviral therapy. *PLoS One* 7, e30881.

96. Ancuta, P., Kamat, A., Kunstman, K.J., Kim, E.-Y., Autissier, P., Wurcel, A., Zaman, T., Stone, D., Mefford, M., Morgello, S., et al. (2008). Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients. *PLoS One* 3, e2516.

97. Barqasho, B., Nowak, P., Tjernlund, A., Kinloch, S., Goh, L.-E., Lampe, F., Fisher, M., Andersson, J., and Sönnberg, A. (2009). Kinetics of plasma cytokines and chemokines during primary HIV-1 infection and after analytical treatment interruption. *HIV Med.* 10, 94–102.

98. Hunt, P.W. (2007). Role of immune activation in HIV pathogenesis. *Curr. HIV/AIDS Rep.* 4, 42–47.

99. Klatt, N.R., Funderburg, N.T., and Brenchley, J.M. (2013). Microbial translocation, immune activation, and HIV disease. *Trends Microbiol.* 21, 6–13.

100. Brenchley, J.M., Price, D.A., and Douek, D.C. (2006). HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat. Immunol.* 7, 235–239.

101. Esté, J. a, and Cihlar, T. (2010). Current status and challenges of antiretroviral research and therapy. *Antiviral Res.* 85, 25–33.

102. Phair, J.P. (1994). Keynote address: variations in the natural history of HIV infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10, 883–885.

103. Audigé, A., Taffé, P., Rickenbach, M., Battegay, M., Vernazza, P., Nadal, D., and Speck, R.F. (2010). Low postseroconversion CD4 count and rapid decrease of CD4 density identify HIV+ fast progressors. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 26, 997–1005.

104. Farzadegan, H., Henrard, D.R., Kleeberger, C.A., Schragar, L., Kirby, A.J., Saah, A.J., Rinaldo, C.R., O’Gorman, M., Detels, R., Taylor, E., et al. (1996). Virologic and serologic markers of rapid progression to AIDS after HIV-1 seroconversion. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 13, 448–455.

105. Khanlou, H., Salmon-Ceron, D., and Sicard, D. (1997). [Characteristics of rapid progressors in HIV infection]. *Ann. Med. Interne (Paris)*. *148*, 163–166.
106. Deeks, S.G., and Walker, B.D. (2007). Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity* *27*, 406–416.
107. Walker, B.D., and Yu, X.G. (2013). Unravelling the mechanisms of durable control of HIV-1. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 487–498.
108. 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.
109. Poropatch, 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.
110. Tomescu, C., Abdulhaqq, S., and Montaner, L.J. (2011). Evidence for the innate immune response as a correlate of protection in human immunodeficiency virus (HIV)-1 highly exposed seronegative subjects (HESN). *Clin. Exp. Immunol.* *164*, 158–169.
111. Siliciano, J.D., and Siliciano, R.F. (2010). Biomarkers of HIV replication. *Curr. Opin. HIV AIDS* *5*, 491–497.
112. Weiser, B., Philpott, S., Klimkait, T., Burger, H., Kitchen, C., Bürgisser, P., Gorgievski, M., Perrin, L., Piffaretti, J.-C., and Ledergerber, B. (2008). HIV-1 coreceptor usage and CXCR4-specific viral load predict clinical disease progression during combination antiretroviral therapy. *AIDS* *22*, 469–479.
113. Gorry, P.R., McPhee, D.A., Verity, E., Dyer, W.B., Wesselingh, S.L., Learmont, J., Sullivan, J.S., Roche, M., Zaunders, J.J., Gabuzda, D., et al. (2007). Pathogenicity and immunogenicity of attenuated, nef-deleted HIV-1 strains in vivo. *Retrovirology* *4*, 66.
114. Alexander, L., Weiskopf, E., Greenough, T.C., Gaddis, N.C., Auerbach, M.R., Malim, M.H., O’Brien, S.J., Walker, B.D., Sullivan, J.L., and Desrosiers, R.C. (2000). Unusual polymorphisms in human immunodeficiency virus type 1 associated with nonprogressive infection. *J. Virol.* *74*, 4361–4376.
115. Blankson, J.N., Bailey, J.R., Thayil, S., Yang, H.-C., Lassen, K., Lai, J., Gandhi, S.K., Siliciano, J.D., Williams, T.M., and Siliciano, R.F. (2007). Isolation and characterization of replication-competent human immunodeficiency virus type 1 from a subset of elite suppressors. *J. Virol.* *81*, 2508–2518.

116. Mologni, D., Citterio, P., Menzaghi, B., Zanone Poma, B., Riva, C., Broggin, V., Sinicco, A., Milazzo, L., Adorni, F., Rusconi, S., et al. (2006). Vpr and HIV-1 disease progression: R77Q mutation is associated with long-term control of HIV-1 infection in different groups of patients. *AIDS* 20, 567–574.
117. Wissing, S., Galloway, N.L.K., and Greene, W.C. (2010). HIV-1 Vif versus the APOBEC3 cytidine deaminases: an intracellular duel between pathogen and host restriction factors. *Mol. Aspects Med.* 31, 383–397.
118. Alexander, L., Cuchura, L., Simpson, B.J., and Andiman, W.A. (2006). Virologic and host characteristics of human immunodeficiency virus type 1-infected pediatric long term survivors. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 25, 135–141.
119. Rangel, H.R., Garzaro, D., Rodríguez, A.K., Ramírez, A.H., Ameli, G., Del Rosario Gutiérrez, C., and Pujol, F.H. (2009). Deletion, insertion and stop codon mutations in vif genes of HIV-1 infecting slow progressor patients. *J. Infect. Dev. Ctries.* 3, 531–538.
120. Cruz, N.V.G., Amorim, R., Oliveira, F.E., Speranza, F.A.C., and Costa, L.J. (2013). Mutations in the nef and vif genes associated with progression to AIDS in elite controller and slow-progressor patients. *J. Med. Virol.* 85, 563–574.
121. Zhang, L., Huang, Y., Yuan, H., Tuttleton, S., and Ho, D.D. (1997). Genetic characterization of vif, vpr, and vpu sequences from long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Virology* 228, 340–349.
122. Dubé, M., Bego, M.G., Paquay, C., and Cohen, É.A. (2010). Modulation of HIV-1-host interaction: role of the Vpu accessory protein. *Retrovirology* 7, 114.
123. Schindler, M., Rajan, D., Banning, C., Wimmer, P., Koppensteiner, H., Iwanski, A., Specht, A., Sauter, D., Dobner, T., and Kirchhoff, F. (2010). Vpu serine 52 dependent counteraction of tetherin is required for HIV-1 replication in macrophages, but not in ex vivo human lymphoid tissue. *Retrovirology* 7, 1.
124. Potter, S.J., Lacabaratz, C., Lambotte, O., Perez-Patrigéon, S., Vingert, B., Sinet, M., Colle, J.-H., Urrutia, A., Scott-Algara, D., Boufassa, F., et al. (2007). Preserved central memory and activated effector memory CD4+ T-cell subsets in human immunodeficiency virus controllers: an ANRS EP36 study. *J. Virol.* 81, 13904–13915.
125. Stephens, J.C., Reich, D.E., Goldstein, D.B., Shin, H.D., Smith, M.W., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G.A., Allikmets, R., Schriml, L., et al. (1998). Dating the origin of the CCR5-Delta32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 1507–1515.

126. Piacentini, L., Biasin, M., Fenizia, C., and Clerici, M. (2009). Genetic correlates of protection against HIV infection: the ally within. *J. Intern. Med.* 265, 110–124.
127. Yang, X., Jiao, Y., Wang, R., Ji, Y., Zhang, H., Zhang, Y., Chen, D., Zhang, T., and Wu, H. (2012). High CCR5 density on central memory CD4+ T cells in acute HIV-1 infection is mostly associated with rapid disease progression. *PLoS One* 7, e49526.
128. Kalinkovich, A., Weisman, Z., and Bentwich, Z. (1999). Chemokines and chemokine receptors: role in HIV infection. *Immunol. Lett.* 68, 281–287.
129. Dolan, M.J., Kulkarni, H., Camargo, J.F., He, W., Smith, A., Anaya, J.-M., Miura, T., Hecht, F.M., Mamtani, M., Pereyra, F., et al. (2007). CCL3L1 and CCR5 influence cell-mediated immunity and affect HIV-AIDS pathogenesis via viral entry-independent mechanisms. *Nat. Immunol.* 8, 1324–1336.
130. Gonzalez, E., Kulkarni, H., Bolivar, H., Mangano, A., Sanchez, R., Catano, G., Nibbs, R.J., Freedman, B.I., Quinones, M.P., Bamshad, M.J., et al. (2005). The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science* 307, 1434–1440.
131. Liu, H., Chao, D., Nakayama, E.E., Taguchi, H., Goto, M., Xin, X., Takamatsu, J.K., Saito, H., Ishikawa, Y., Akaza, T., et al. (1999). Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 4581–4585.
132. An, P., Nelson, G.W., Wang, L., Donfield, S., Goedert, J.J., Phair, J., Vlahov, D., Buchbinder, S., Farrar, W.L., Modi, W., et al. (2002). Modulating influence on HIV/AIDS by interacting RANTES gene variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 10002–10007.
133. Carrington, M., and O'Brien, S.J. (2003). The influence of HLA genotype on AIDS. *Annu. Rev. Med.* 54, 535–551.
134. Carrington, M., Nelson, G.W., Martin, M.P., Kissner, T., Vlahov, D., Goedert, J.J., Kaslow, R., Buchbinder, S., Hoots, K., and O'Brien, S.J. (1999). HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science* 283, 1748–1752.
135. Tang, J., Costello, C., Keet, I.P., Rivers, C., Leblanc, S., Karita, E., Allen, S., and Kaslow, R.A. (1999). HLA class I homozygosity accelerates disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 15, 317–324.
136. Klein, M.R., van der Burg, S.H., Hovenkamp, E., Holwerda, A.M., Drijfhout, J.W., Melief, C.J., and Miedema, F. (1998). Characterization of HLA-B57-restricted human immunodeficiency virus type 1 Gag- and RT-specific cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 9), 2191–2201.

137. Goulder, P.J., Bunce, M., Krausa, P., McIntyre, K., Crowley, S., Morgan, B., Edwards, A., Giangrande, P., Phillips, R.E., and McMichael, A.J. (1996). Novel, cross-restricted, conserved, and immunodominant cytotoxic T lymphocyte epitopes in slow progressors in HIV type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *12*, 1691–1698.
138. Gillespie, G.M.A., Kaul, R., Dong, T., Yang, H.-B., Rostron, T., Bwayo, J.J., Kiama, P., Peto, T., Plummer, F.A., McMichael, A.J., et al. (2002). Cross-reactive cytotoxic T lymphocytes against a HIV-1 p24 epitope in slow progressors with B*57. *AIDS* *16*, 961–972.
139. Goulder, P.J., Phillips, R.E., Colbert, R.A., McAdam, S., Ogg, G., Nowak, M.A., Giangrande, P., Luzzi, G., Morgan, B., Edwards, A., et al. (1997). Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat. Med.* *3*, 212–217.
140. Kelleher, A.D., Long, C., Holmes, E.C., Allen, R.L., Wilson, J., Conlon, C., Workman, C., Shaunak, S., Olson, K., Goulder, P., et al. (2001). Clustered mutations in HIV-1 gag are consistently required for escape from HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Exp. Med.* *193*, 375–386.
141. Migueles, S.A., and Connors, M. (2010). Long-term nonprogressive disease among untreated HIV-infected individuals: clinical implications of understanding immune control of HIV. *JAMA* *304*, 194–201.
142. Saksena, N.K., Rodes, B., Wang, B., and Soriano, V. Elite HIV controllers: myth or reality? *AIDS Rev.* *9*, 195–207.
143. González, A., Rebmann, V., LeMaoult, J., Horn, P.A., Carosella, E.D., and Alegre, E. The immunosuppressive molecule HLA-G and its clinical implications. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* *49*, 63–84.
144. Lajoie, J., Fontaine, J., Tremblay, C., Routy, J.-P., Poudrier, J., and Roger, M. (2009). Persistence of high levels of blood soluble human leukocyte antigen-G is associated with rapid progression of HIV infection. *AIDS* *23*, 1437–1440.
145. Knuchel, M.C., Spira, T.J., Neumann, A.U., Xiao, L., Rudolph, D.L., Phair, J., Wolinsky, S.M., Koup, R.A., Cohen, O.J., Folks, T.M., et al. (1998). Analysis of a biallelic polymorphism in the tumor necrosis factor alpha promoter and HIV type 1 disease progression. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *14*, 305–309.
146. Edwards-Smith, C.J., Jonsson, J.R., Purdie, D.M., Bansal, A., Shorthouse, C., and Powell, E.E. (1999). Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Hepatology* *30*, 526–530.

147. Shin, H.D., Winkler, C., Stephens, J.C., Bream, J., Young, H., Goedert, J.J., O'Brien, T.R., Vlahov, D., Buchbinder, S., Giorgi, J., et al. (2000). Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL10. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 14467–14472.
148. Erikstrup, C., Kallestrup, P., Zinyama-Gutsire, R.B., Gomo, E., Butterworth, A.E., Pedersen, B.K., Ostrowski, S.R., Gerstoft, J., and Ullum, H. (2007). Reduced mortality and CD4 cell loss among carriers of the interleukin-10 -1082G allele in a Zimbabwean cohort of HIV-1-infected adults. *AIDS* 21, 2283–2291.
149. Jin, X., Wu, H., and Smith, H. (2007). APOBEC3G levels predict rates of progression to AIDS. *Retrovirology* 4, 20.
150. Vázquez-Pérez, J.A., Ormsby, C.E., Hernández-Juan, R., Torres, K.J., and Reyes-Terán, G. (2009). APOBEC3G mRNA expression in exposed seronegative and early stage HIV infected individuals decreases with removal of exposure and with disease progression. *Retrovirology* 6, 23.
151. An, P., Bleiber, G., Duggal, P., Nelson, G., May, M., Mangeat, B., Alobwede, I., Trono, D., Vlahov, D., Donfield, S., et al. (2004). APOBEC3G genetic variants and their influence on the progression to AIDS. *J. Virol.* 78, 11070–11076.
152. Towers, G.J. (2007). The control of viral infection by tripartite motif proteins and cyclophilin A. *Retrovirology* 4, 40.
153. Javanbakht, H., An, P., Gold, B., Petersen, D.C., O'Huigin, C., Nelson, G.W., O'Brien, S.J., Kirk, G.D., Detels, R., Buchbinder, S., et al. (2006). Effects of human TRIM5alpha polymorphisms on antiretroviral function and susceptibility to human immunodeficiency virus infection. *Virology* 354, 15–27.
154. Nakajima, T., Nakayama, E.E., Kaur, G., Terunuma, H., Mimaya, J., Ohtani, H., Mehra, N., Shioda, T., and Kimura, A. (2009). Impact of novel TRIM5alpha variants, Gly110Arg and G176del, on the anti-HIV-1 activity and the susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS* 23, 2091–2100.
155. Ayinde, D., Casartelli, N., and Schwartz, O. (2012). Restricting HIV the SAMHD1 way: through nucleotide starvation. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 675–680.
156. Coon, S., Wang, D., and Wu, L. (2012). Polymorphisms of the SAMHD1 gene are not associated with the infection and natural control of HIV type 1 in Europeans and African-Americans. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 28, 1565–1573.
157. Steinman, R.M., and Banchereau, J. (2007). Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449, 419–426.

158. Janeway, C. a, and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* *20*, 197–216.
159. Piguet, V., and Steinman, R.M. (2007). The interaction of HIV with dendritic cells: outcomes and pathways. *Trends Immunol.* *28*, 503–510.
160. Jetten, A.M. (2009). Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl. Recept. Signal.* *7*, e003.
161. Luckheeram, R.V., Zhou, R., Verma, A.D., and Xia, B. (2012). CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clin. Dev. Immunol.* *2012*, 925135.
162. Mai, J., Wang, H., and Yang, X.-F. (2010). Th 17 cells interplay with Foxp3⁺ Tregs in regulation of inflammation and autoimmunity. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* *15*, 986–1006.
163. Corthay, A. (2009). How do regulatory T cells work? *Scand. J. Immunol.* *70*, 326–336.
164. Ancuta, P., Liu, K.-Y., Misra, V., Wacleche, V.S., Gosselin, A., Zhou, X., and Gabuzda, D. (2009). Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16⁺ and CD16⁻ monocyte subsets. *BMC Genomics* *10*, 403.
165. Macal, M., Sankaran, S., Chun, T.-W., Reay, E., Flamm, J., Prindiville, T.J., and Dandekar, S. (2008). Effective CD4⁺ T-cell restoration in gut-associated lymphoid tissue of HIV-infected patients is associated with enhanced Th17 cells and polyfunctional HIV-specific T-cell responses. *Mucosal Immunol.* *1*, 475–488.
166. Favre, D., Lederer, S., Kanwar, B., Ma, Z.-M., Proll, S., Kasakow, Z., Mold, J., Swainson, L., Barbour, J.D., Baskin, C.R., et al. (2009). Critical loss of the balance between Th17 and T regulatory cell populations in pathogenic SIV infection. *PLoS Pathog.* *5*, e1000295.
167. Brenchley, J.M., Paiardini, M., Knox, K.S., Asher, A.I., Cervasi, B., Asher, T.E., Scheinberg, P., Price, D.A., Hage, C.A., Kholi, L.M., et al. (2008). Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood* *112*, 2826–2835.
168. Douek, D.C., Picker, L.J., and Koup, R. a (2003). T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu. Rev. Immunol.* *21*, 265–304.
169. Gougeon, M.-L. (2005). To kill or be killed: how HIV exhausts the immune system. *Cell Death Differ.* *12 Suppl 1*, 845–854.
170. Khaitan, A., and Unutmaz, D. (2011). Revisiting immune exhaustion during HIV infection. *Curr. HIV/AIDS Rep.* *8*, 4–11.

171. Kaufmann, D.E., Kavanagh, D.G., Pereyra, F., Zaunders, J.J., Mackey, E.W., Miura, T., Palmer, S., Brockman, M., Rathod, A., Piechocka-Trocha, A., et al. (2007). Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat. Immunol.* 8, 1246–1254.
172. Nilsson, J., Boasso, A., Velilla, P.A., Zhang, R., Vaccari, M., Franchini, G., Shearer, G.M., Andersson, J., and Chougnnet, C. (2006). HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS. *Blood* 108, 3808–3817.
173. Chevalier, M.F., and Weiss, L. (2013). The split personality of regulatory T cells in HIV infection. *Blood* 121, 29–37.
174. Eggena, M.P., Barugahare, B., Jones, N., Okello, M., Mutalya, S., Kityo, C., Mugenyi, P., and Cao, H. (2005). Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. *J. Immunol.* 174, 4407–4414.
175. Kinter, A., McNally, J., Riggin, L., Jackson, R., Roby, G., and Fauci, A.S. (2007). Suppression of HIV-specific T cell activity by lymph node CD25+ regulatory T cells from HIV-infected individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 3390–3395.
176. Aandahl, E.M., Michaëlsson, J., Moretto, W.J., Hecht, F.M., and Nixon, D.F. (2004). Human CD4+ CD25+ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J. Virol.* 78, 2454–2459.
177. Porichis, F., and Kaufmann, D.E. (2011). HIV-specific CD4 T cells and immune control of viral replication. *Curr. Opin. HIV AIDS* 6, 174–180.
178. Card, C.M., McLaren, P.J., Wachihi, C., Kimani, J., Plummer, F.A., and Fowke, K.R. (2009). Decreased immune activation in resistance to HIV-1 infection is associated with an elevated frequency of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells. *J. Infect. Dis.* 199, 1318–1322.
179. Jenkins, M.R., and Griffiths, G.M. (2010). The synapse and cytolytic machinery of cytotoxic T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 308–313.
180. Dustin, M.L., and Long, E.O. (2010). Cytotoxic immunological synapses. *Immunol. Rev.* 235, 24–34.
181. Arens, R., and Schoenberger, S.P. (2010). Plasticity in programming of effector and memory CD8 T-cell formation. *Immunol. Rev.* 235, 190–205.
182. Prlic, M., Williams, M.A., and Bevan, M.J. (2007). Requirements for CD8 T-cell priming, memory generation and maintenance. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 315–319.

183. Cox, M.A., Kahan, S.M., and Zajac, A.J. (2013). Anti-viral CD8 T cells and the cytokines that they love. *Virology* 435, 157–169.
184. Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B.H., Shaw, G.M., and Oldstone, M.B. (1994). Virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 68, 6103–6110.
185. Turnbull, E.L., Wong, M., Wang, S., Wei, X., Jones, N.A., Conrod, K.E., Aldam, D., Turner, J., Pellegrino, P., Keele, B.F., et al. (2009). Kinetics of expansion of epitope-specific T cell responses during primary HIV-1 infection. *J. Immunol.* 182, 7131–7145.
186. Jones, N.A., Wei, X., Flower, D.R., Wong, M., Michor, F., Saag, M.S., Hahn, B.H., Nowak, M.A., Shaw, G.M., and Borrow, P. (2004). Determinants of human immunodeficiency virus type 1 escape from the primary CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte response. *J. Exp. Med.* 200, 1243–1256.
187. Leslie, A.J., Pfafferott, K.J., Chetty, P., Draenert, R., Addo, M.M., Feeney, M., Tang, Y., Holmes, E.C., Allen, T., Prado, J.G., et al. (2004). HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat. Med.* 10, 282–289.
188. Allen, T.M., Altfeld, M., Geer, S.C., Kalife, E.T., Moore, C., O’sullivan, K.M., Desouza, I., Feeney, M.E., Eldridge, R.L., Maier, E.L., et al. (2005). Selective escape from CD8⁺ T-cell responses represents a major driving force of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) sequence diversity and reveals constraints on HIV-1 evolution. *J. Virol.* 79, 13239–13249.
189. Goonetilleke, N., Liu, M.K.P., Salazar-Gonzalez, J.F., Ferrari, G., Giorgi, E., Gantsov, V. V., Keele, B.F., Learn, G.H., Turnbull, E.L., Salazar, M.G., et al. (2009). The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* 206, 1253–1272.
190. Day, C.L., Kaufmann, D.E., Kiepiela, P., Brown, J.A., Moodley, E.S., Reddy, S., Mackey, E.W., Miller, J.D., Leslie, A.J., DePierres, C., et al. (2006). PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443, 350–354.
191. Petrovas, C., Chaon, B., Ambrozak, D.R., Price, D.A., Melenhorst, J.J., Hill, B.J., Geldmacher, C., Casazza, J.P., Chattopadhyay, P.K., Roederer, M., et al. (2009). Differential association of programmed death-1 and CD57 with ex vivo survival of CD8⁺ T cells in HIV infection. *J. Immunol.* 183, 1120–1132.
192. 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.

193. 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.
194. Hersperger, A.R., Pereyra, F., Nason, M., Demers, K., Sheth, P., Shin, L.Y., Kovacs, C.M., Rodriguez, B., Sieg, S.F., Teixeira-Johnson, L., et al. (2010). Perforin expression directly ex vivo by HIV-specific CD8 T-cells is a correlate of HIV elite control. *PLoS Pathog.* *6*, e1000917.
195. 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.
196. 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.
197. Haynes, B.F., Pantaleo, G., and Fauci, A.S. (1996). Toward an understanding of the correlates of protective immunity to HIV infection. *Science* *271*, 324–328.
198. Wei, X., Decker, J.M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J.C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J.F., Salazar, M.G., Kilby, J.M., Saag, M.S., et al. (2003). Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* *422*, 307–312.
199. Richman, D.D., Wrin, T., Little, S.J., and Petropoulos, C.J. (2003). Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 4144–4149.
200. Stamatatos, L., Morris, L., Burton, D.R., and Mascola, J.R. (2009). Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? *Nat. Med.* *15*, 866–870.
201. Gray, E.S., Madiga, M.C., Moore, P.L., Mlisana, K., Abdool Karim, S.S., Binley, J.M., Shaw, G.M., Mascola, J.R., and Morris, L. (2009). Broad neutralization of human immunodeficiency virus type 1 mediated by plasma antibodies against the gp41 membrane proximal external region. *J. Virol.* *83*, 11265–11274.
202. Karlsson Hedestam, G.B., Fouchier, R.A.M., Phogat, S., Burton, D.R., Sodroski, J., and Wyatt, R.T. (2008). The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nat. Rev. Microbiol.* *6*, 143–155.

203. Corti, D., and Lanzavecchia, A. (2013). Broadly neutralizing antiviral antibodies.
204. Cecilia, D., Kleeberger, C., Muñoz, A., Giorgi, J. V, and Zolla-Pazner, S. (1999). A longitudinal study of neutralizing antibodies and disease progression in HIV-1-infected subjects. *J. Infect. Dis.* *179*, 1365–1374.
205. Pilgrim, A.K., Pantaleo, G., Cohen, O.J., Fink, L.M., Zhou, J.Y., Zhou, J.T., Bolognesi, D.P., Fauci, A.S., and Montefiori, D.C. (1997). Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection. *J. Infect. Dis.* *176*, 924–932.
206. 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.
207. Doria-Rose, N.A., Klein, R.M., Daniels, M.G., O’Dell, S., Nason, M., Lapedes, A., Bhattacharya, T., Migueles, S.A., Wyatt, R.T., Korber, B.T., et al. (2010). Breadth of human immunodeficiency virus-specific neutralizing activity in sera: clustering analysis and association with clinical variables. *J. Virol.* *84*, 1631–1636.
208. 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.
209. Bailey, J.R., Lassen, K.G., Yang, H.-C., Quinn, T.C., Ray, S.C., Blankson, J.N., and Siliciano, R.F. (2006). Neutralizing antibodies do not mediate suppression of human immunodeficiency virus type 1 in elite suppressors or selection of plasma virus variants in patients on highly active antiretroviral therapy. *J. Virol.* *80*, 4758–4770.
210. Choi, R.Y., Levinson, P., Guthrie, B.L., Lohman-Payne, B., Bosire, R., Liu, A.Y., Hirbod, T., Kiarie, J., Overbaugh, J., John-Stewart, G., et al. (2012). Cervicovaginal HIV-1-neutralizing immunoglobulin A detected among HIV-1-exposed seronegative female partners in HIV-1-discordant couples. *AIDS* *26*, 2155–2163.
211. Hirbod, T., Kaul, R., Reichard, C., Kimani, J., Ngugi, E., Bwayo, J.J., Nagelkerke, N., Hasselrot, K., Li, B., Moses, S., et al. (2008). HIV-neutralizing immunoglobulin A and HIV-specific proliferation are independently associated with reduced HIV acquisition in Kenyan sex workers. *AIDS* *22*, 727–735.
212. Hazenberg, M.D., Otto, S.A., van Benthem, B.H.B., Roos, M.T.L., Coutinho, R.A., Lange, J.M.A., Hamann, D., Prins, M., and Miedema, F. (2003). Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *AIDS* *17*, 1881–1888.

213. Deeks, S.G., Kitchen, C.M.R., Liu, L., Guo, H., Gascon, R., Narváez, A.B., Hunt, P., Martin, J.N., Kahn, J.O., Levy, J., et al. (2004). Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood* *104*, 942–947.
214. Lane, H.C., Masur, H., Edgar, L.C., Whalen, G., Rook, A.H., and Fauci, A.S. (1983). Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* *309*, 453–458.
215. Hellerstein, M., Hanley, M.B., Cesar, D., Siler, S., Papageorgopoulos, C., Wieder, E., Schmidt, D., Hoh, R., Neese, R., Macallan, D., et al. (1999). Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans. *Nat. Med.* *5*, 83–89.
216. Valdez, H., and Lederman, M.M. Cytokines and cytokine therapies in HIV infection. *AIDS Clin. Rev.* 187–228.
217. Meier, A., Alter, G., Frahm, N., Sidhu, H., Li, B., Bagchi, A., Teigen, N., Streeck, H., Stellbrink, H.-J., Hellman, J., et al. (2007). MyD88-dependent immune activation mediated by human immunodeficiency virus type 1-encoded Toll-like receptor ligands. *J. Virol.* *81*, 8180–8191.
218. Brechley, J.M., and Douek, D.C. (2008). The mucosal barrier and immune activation in HIV pathogenesis. *Curr. Opin. HIV AIDS* *3*, 356–361.
219. Nazli, A., Chan, O., Dobson-Belair, W.N., Ouellet, M., Tremblay, M.J., Gray-Owen, S.D., Arsenaault, a L., and Kaushic, C. (2010). Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PLoS Pathog.* *6*, e1000852.
220. Funderburg, N., Luciano, A.A., Jiang, W., Rodriguez, B., Sieg, S.F., and Lederman, M.M. (2008). Toll-like receptor ligands induce human T cell activation and death, a model for HIV pathogenesis. *PLoS One* *3*, e1915.
221. Tincati, C., Bellistri, G.M., Ancona, G., Merlini, E., d’Arminio Monforte, A., and Marchetti, G. (2012). Role of in vitro stimulation with lipopolysaccharide on T-cell activation in HIV-infected antiretroviral-treated patients. *Clin. Dev. Immunol.* *2012*, 935425.
222. Miller Sanders, C., Cruse, J.M., and Lewis, R.E. (2010). Toll-like receptor and chemokine receptor expression in HIV-infected T lymphocyte subsets. *Exp. Mol. Pathol.* *88*, 26–31.
223. Sandler, N.G., Wand, H., Roque, A., Law, M., Nason, M.C., Nixon, D.E., Pedersen, C., Ruxrungtham, K., Lewin, S.R., Emery, S., et al. (2011). Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *J. Infect. Dis.* *203*, 780–790.

224. Papasavvas, E., Pistilli, M., Reynolds, G., Bucki, R., Azzoni, L., Chehimi, J., Janmey, P. a, DiNubile, M.J., Ondercin, J., Kostman, J.R., et al. (2009). Delayed loss of control of plasma lipopolysaccharide levels after therapy interruption in chronically HIV-1-infected patients. *AIDS* 23, 369–375.
225. Marchetti, G., Tincati, C., and Silvestri, G. (2013). Microbial Translocation in the Pathogenesis of HIV Infection and AIDS. *Clin. Microbiol. Rev.* 2035–2044.
226. Stacey, A.R., Norris, P.J., Qin, L., Haygreen, E.A., Taylor, E., Heitman, J., Lebedeva, M., DeCamp, A., Li, D., Grove, D., et al. (2009). Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *J. Virol.* 83, 3719–3733.
227. Kedzierska, K., and Crowe, S.M. (2001). Cytokines and HIV-1: interactions and clinical implications. *Antivir. Chem. Chemother.* 12, 133–150.
228. Brockman, M. a, Kwon, D.S., Tighe, D.P., Pavlik, D.F., Rosato, P.C., Sela, J., Porichis, F., Le Gall, S., Waring, M.T., Moss, K., et al. (2009). IL-10 is up-regulated in multiple cell types during viremic HIV infection and reversibly inhibits virus-specific T cells. *Blood* 114, 346–356.
229. Cerutti, A., and Rescigno, M. (2008). The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity* 28, 740–750.
230. Reuter, M. a, Pombo, C., and Betts, M.R. (2012). Cytokine production and dysregulation in HIV pathogenesis: lessons for development of therapeutics and vaccines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 23, 181–191.
231. Monteleone, G., Pallone, F., and MacDonald, T.T. (2008). Interleukin-21: a critical regulator of the balance between effector and regulatory T-cell responses. *Trends Immunol.* 29, 290–294.
232. Kuchen, S., Robbins, R., Sims, G.P., Sheng, C., Phillips, T.M., Lipsky, P.E., and Ettinger, R. (2007). Essential role of IL-21 in B cell activation, expansion, and plasma cell generation during CD4+ T cell-B cell collaboration. *J. Immunol.* 179, 5886–5896.
233. Evans, V.A., Khoury, G., Saleh, S., Cameron, P.U., and Lewin, S.R. HIV persistence: chemokines and their signalling pathways. *Cytokine Growth Factor Rev.* 23, 151–157.
234. Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708–712.

235. Damås, J.K., Landrø, L., Fevang, B., Heggelund, L., Frøland, S.S., and Aukrust, P. (2009). Enhanced levels of the CCR7 ligands CCL19 and CCL21 in HIV infection: correlation with viral load, disease progression and response to highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 23, 135–138.
236. Liovat, A.-S., Rey-Cuillé, M.-A., Lécuroux, C., Jacquelin, B., Girault, I., Petitjean, G., Zitoun, Y., Venet, A., Barré-Sinoussi, F., Lebon, P., et al. (2012). Acute plasma biomarkers of T cell activation set-point levels and of disease progression in HIV-1 infection. *PLoS One* 7, e46143.
237. Cameron, P.U., Saleh, S., Sallmann, G., Solomon, A., Wightman, F., Evans, V.A., Boucher, G., Haddad, E.K., Sekaly, R.-P., Harman, A.N., et al. (2010). Establishment of HIV-1 latency in resting CD4+ T cells depends on chemokine-induced changes in the actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 16934–16939.
238. Lajoie, J., Poudrier, J., Massinga Loembe, M., Guédou, F., Leblond, F., Labbé, A.-C., Alary, M., and Roger, M. (2010). Chemokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments are associated with HIV-1 infection in women from Benin. *J. Clin. Immunol.* 30, 90–98.
239. Casazza, J.P., Brenchley, J.M., Hill, B.J., Ayana, R., Ambrozak, D., Roederer, M., Douek, D.C., Betts, M.R., and Koup, R.A. (2009). Autocrine production of beta-chemokines protects CMV-Specific CD4 T cells from HIV infection. *PLoS Pathog.* 5, e1000646.
240. Auffray, C., Sieweke, M.H., and Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 669–692.
241. Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J.M., Liu, Y.-J., MacPherson, G., Randolph, G.J., et al. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, e74–80.
242. Ziegler-Heitbrock, L., and Hofer, T.P.J. (2013). Toward a refined definition of monocyte subsets. *Front. Immunol.* 4, 23.
243. Tacke, F., and Randolph, G.J. (2006). Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* 211, 609–618.
244. Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71–82.
245. Robbins, C.S., and Swirski, F.K. (2010). The multiple roles of monocyte subsets in steady state and inflammation. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 2685–2693.

246. Serbina, N. V, Jia, T., Hohl, T.M., and Pamer, E.G. (2008). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu. Rev. Immunol.* *26*, 421–452.
247. Ancuta, P., Weiss, L., and Haeffner-Cavaillon, N. (2000). CD14+CD16++ cells derived in vitro from peripheral blood monocytes exhibit phenotypic and functional dendritic cell-like characteristics. *Eur. J. Immunol.* *30*, 1872–1883.
248. Wong, K.L., Tai, J.J.-Y., Wong, W.-C., Han, H., Sem, X., Yeap, W.-H., Kourilsky, P., and Wong, S.-C. (2011). Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* *118*, e16–31.
249. Zawada, A.M., Rogacev, K.S., Rotter, B., Winter, P., Marell, R.-R., Fliser, D., and Heine, G.H. (2011). SuperSAGE evidence for CD14++CD16+ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* *118*, e50–61.
250. Wong, K.L., Yeap, W.H., Tai, J.J.Y., Ong, S.M., Dang, T.M., and Wong, S.C. (2012). The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol. Res.* *53*, 41–57.
251. Ziegler-Heitbrock, L. (2007). The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* *81*, 584–592.
252. Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., and Mortha, A. (2013). The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* *31*, 563–604.
253. Alvarez, D., Vollmann, E.H., and von Andrian, U.H. (2008). Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity* *29*, 325–342.
254. Merad, M., Manz, M.G., Karsunky, H., Wagers, A., Peters, W., Charo, I., Weissman, I.L., Cyster, J.G., and Engleman, E.G. (2002). Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat. Immunol.* *3*, 1135–1141.
255. Stumbles, P.A., Strickland, D.H., Pimm, C.L., Proksch, S.F., Marsh, A.M., McWilliam, A.S., Bosco, A., Tobagus, I., Thomas, J.A., Napoli, S., et al. (2001). Regulation of dendritic cell recruitment into resting and inflamed airway epithelium: use of alternative chemokine receptors as a function of inducing stimulus. *J. Immunol.* *167*, 228–234.
256. Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., and Geissmann, F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* *317*, 666–670.
257. Caux, C., Ait-Yahia, S., Chemin, K., de Bouteiller, O., Dieu-Nosjean, M.C., Homey, B., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Zlotnik, A., and Vicari, A. (2000). Dendritic cell biology and

- regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer Semin. Immunopathol.* 22, 345–369.
258. Creagh, E.M., and O’Neill, L.A.J. (2006). TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol.* 27, 352–357.
259. Palm, N.W., and Medzhitov, R. (2009). Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol. Rev.* 227, 221–233.
260. Van Vliet, S.J., den Dunnen, J., Gringhuis, S.I., Geijtenbeek, T.B., and van Kooyk, Y. (2007). Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 435–440.
261. Tisch, R. (2010). Immunogenic versus tolerogenic dendritic cells: a matter of maturation. *Int. Rev. Immunol.* 29, 111–118.
262. Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819–826.
263. Joffre, O., Nolte, M.A., Spörri, R., and Reis e Sousa, C. (2009). Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol. Rev.* 227, 234–247.
264. Weill, J.-C., Weller, S., and Reynaud, C.-A. (2009). Human marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 267–285.
265. Coombes, J.L., and Powrie, F. (2008). Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 435–446.
266. Johansson, C., and Kelsall, B.L. (2005). Phenotype and function of intestinal dendritic cells. *Semin. Immunol.* 17, 284–294.
267. Brigl, M., and Brenner, M.B. (2004). CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 817–890.
268. Angel, C.E., Lala, A., Chen, C.-J.J., Edgar, S.G., Ostrovsky, L.L., and Dunbar, P.R. (2007). CD14⁺ antigen-presenting cells in human dermis are less mature than their CD1a⁺ counterparts. *Int. Immunol.* 19, 1271–1279.
269. Rescigno, M., and Di Sabatino, A. (2009). Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *J. Clin. Invest.* 119, 2441–2450.

270. Varol, C., Vallon-Eberhard, A., Elinav, E., Aychek, T., Shapira, Y., Luche, H., Fehling, H.J., Hardt, W.-D., Shakhar, G., and Jung, S. (2009). Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity* 31, 502–512.
271. Persson, E.K., Scott, C.L., Mowat, A.M., and Agace, W.W. (2013). Dendritic cell subsets in the intestinal lamina propria: Ontogeny and function. *Eur. J. Immunol.* 1–10.
272. Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., Shang, L., Hashimoto, D., Greter, M., Liu, K., Jakubzick, C., Ingersoll, M.A., Leboeuf, M., et al. (2009). Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* 31, 513–525.
273. Mann, E.R., Landy, J.D., Bernardo, D., Peake, S.T.C., Hart, A.L., Al-Hassi, H.O., and Knight, S.C. (2013). Intestinal dendritic cells: their role in intestinal inflammation, manipulation by the gut microbiota and differences between mice and men. *Immunol. Lett.* 150, 30–40.
274. Jakubzick, C., Tacke, F., Ginhoux, F., Wagers, A.J., van Rooijen, N., Mack, M., Merad, M., and Randolph, G.J. (2008). Blood monocyte subsets differentially give rise to CD103+ and CD103- pulmonary dendritic cell populations. *J. Immunol.* 180, 3019–3027.
275. Rescigno, M. (2011). The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. *Trends Immunol.* 32, 256–264.
276. Iliev, I.D., Matteoli, G., and Rescigno, M. (2007). The yin and yang of intestinal epithelial cells in controlling dendritic cell function. *J. Exp. Med.* 204, 2253–2257.
277. Zeuthen, L.H., Fink, L.N., and Frokiaer, H. (2008). Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor-beta. *Immunology* 123, 197–208.
278. Iliev, I., Spadoni, I., Mileti, E., and Matteoli, G. (2009). Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut* 58, 1481–1489.
279. Del Rio, M.-L., Bernhardt, G., Rodriguez-Barbosa, J.-I., and Förster, R. (2010). Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells. *Immunol. Rev.* 234, 268–281.
280. Ginhoux, F., Liu, K., Helft, J., Bogunovic, M., Greter, M., Hashimoto, D., Price, J., Yin, N., Bromberg, J., Lira, S. a, et al. (2009). The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *J. Exp. Med.* 206, 3115–3130.
281. Coombes, J.L., Siddiqui, K.R.R., Arancibia-Cárcamo, C. V, Hall, J., Sun, C.-M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs

- induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* *204*, 1757–1764.
282. Kawaguchi, R., Yu, J., Honda, J., Hu, J., Whitelegge, J., Ping, P., Wiita, P., Bok, D., and Sun, H. (2007). A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science* *315*, 820–825.
283. Sun, C.-M., Hall, J.A., Blank, R.B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J.R., and Belkaid, Y. (2007). Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3⁺ T reg cells via retinoic acid. *J. Exp. Med.* *204*, 1775–1785.
284. Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., and Cheroutre, H. (2007). Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* *317*, 256–260.
285. Rescigno, M. (2010). Functional specialization of antigen presenting cells in the gastrointestinal tract. *Curr. Opin. Immunol.* *22*, 131–136.
286. Hieshima, K., Kawasaki, Y., Hanamoto, H., Nakayama, T., Nagakubo, D., Kanamaru, A., and Yoshie, O. (2004). CC chemokine ligands 25 and 28 play essential roles in intestinal extravasation of IgA antibody-secreting cells. *J. Immunol.* *173*, 3668–3675.
287. Pabst, O., Ohl, L., Wendland, M., Wurbel, M.-A., Kremmer, E., Malissen, B., and Förster, R. (2004). Chemokine receptor CCR9 contributes to the localization of plasma cells to the small intestine. *J. Exp. Med.* *199*, 411–416.
288. Iwata, M., Hirakiyama, A., Eshima, Y., Kagechika, H., Kato, C., and Song, S.-Y. (2004). Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* *21*, 527–538.
289. Mora, J.R., Iwata, M., Eksteen, B., Song, S.-Y., Junt, T., Senman, B., Otipoby, K.L., Yokota, A., Takeuchi, H., Ricciardi-Castagnoli, P., et al. (2006). Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science* *314*, 1157–1160.
290. Mora, J.R., Bono, M.R., Manjunath, N., Weninger, W., Cavanagh, L.L., Roseblatt, M., and Von Andrian, U.H. (2003). Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature* *424*, 88–93.
291. Mora, J. (2008). Homing imprinting and immunomodulation in the gut: role of dendritic cells and retinoids. *Inflamm. Bowel Dis.* *14*, 275–289.
292. Saurer, L., McCullough, K.C., and Summerfield, A. (2007). In vitro induction of mucosa-type dendritic cells by all-trans retinoic acid. *J. ...* *179*, 3504–3514.

293. Feng, T., Cong, Y., Qin, H., Benveniste, E.N., and Elson, C.O. (2010). Generation of mucosal dendritic cells from bone marrow reveals a critical role of retinoic acid. *J. Immunol.* *185*, 5915–5925.
294. Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* *2*, 361–367.
295. Niess, J.H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B.A., Vyas, J.M., Boes, M., Ploegh, H.L., Fox, J.G., et al. (2005). CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* *307*, 254–258.
296. Manicassamy, S., and Pulendran, B. (2011). Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunol. Rev.* *241*, 206–227.
297. Reizis, B., Bunin, A., Ghosh, H.S., Lewis, K.L., and Sisirak, V. (2011). Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 163–183.
298. Altfeld, M., Fadda, L., Frleta, D., and Bhardwaj, N. (2011). DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 176–186.
299. Zhang, Z., and Wang, F.S. (2005). Plasmacytoid dendritic cells act as the most competent cell type in linking antiviral innate and adaptive immune responses. *Cell. Mol. Immunol.* *2*, 411–417.
300. Pallotta, M.T., Orabona, C., Volpi, C., Vacca, C., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Servillo, G., Brunacci, C., Calvitti, M., Biccato, S., et al. (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat. Immunol.* *12*, 870–878.
301. Valladeau, J., and Saeland, S. (2005). Cutaneous dendritic cells. *Semin. Immunol.* *17*, 273–283.
302. Bursch, L.S., Wang, L., Igyarto, B., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Kaplan, D.H., and Hogquist, K.A. (2007). Identification of a novel population of Langerin⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* *204*, 3147–3156.
303. Merad, M., Ginhoux, F., and Collin, M. (2008). Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 935–947.

304. Valladeau, J., Dezutter-Dambuyant, C., and Saeland, S. (2003). Langerin/CD207 sheds light on formation of birbeck granules and their possible function in Langerhans cells. *Immunol. Res.* 28, 93–107.
305. Gorry, P.R., and Ancuta, P. (2011). Coreceptors and HIV-1 pathogenesis. *Curr. HIV/AIDS Rep.* 8, 45–53.
306. Crowe, S.M., and Ziegler-Heitbrock, L. (2010). Editorial: Monocyte subpopulations and lentiviral infection. *J. Leukoc. Biol.* 87, 541–543.
307. Ellery, P.J., Tippett, E., Chiu, Y.-L., Paukovics, G., Cameron, P.U., Solomon, A., Lewin, S.R., Gorry, P.R., Jaworowski, A., Greene, W.C., et al. (2007). The CD16⁺ monocyte subset is more permissive to infection and preferentially harbors HIV-1 in vivo. *J. Immunol.* 178, 6581–6589.
308. Wang, X., Ye, L., Hou, W., Zhou, Y., Wang, Y.-J., Metzger, D.S., and Ho, W.-Z. (2009). Cellular microRNA expression correlates with susceptibility of monocytes/macrophages to HIV-1 infection. *Blood* 113, 671–674.
309. Wu, L., and KewalRamani, V.N. (2006). Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 859–868.
310. Han, J., Wang, B., Han, N., Zhao, Y., Song, C., Feng, X., Mao, Y., Zhang, F., Zhao, H., and Zeng, H. (2009). CD14(high)CD16(+) rather than CD14(low)CD16(+) monocytes correlate with disease progression in chronic HIV-infected patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 52, 553–559.
311. Zheng, L., Yang, Y., Guocai, L., Pauza, C.D., and Salvato, M.S. (2007). HIV Tat protein increases Bcl-2 expression in monocytes which inhibits monocyte apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-induced ligand. *Intervirology* 50, 224–228.
312. Tangsinmankong, N., Day, N.K., Good, R.A., and Haraguchi, S. (2000). Monocytes are target cells for IL-10 induction by HIV-1 Nef protein. *Cytokine* 12, 1506–1511.
313. Ji, J., Sahu, G.K., Braciale, V.L., and Cloyd, M.W. (2005). HIV-1 induces IL-10 production in human monocytes via a CD4-independent pathway. *Int. Immunol.* 17, 729–736.
314. Leghmari, K., Bennasser, Y., and Bahraoui, E. (2008). HIV-1 Tat protein induces IL-10 production in monocytes by classical and alternative NF-kappaB pathways. *Eur. J. Cell Biol.* 87, 947–962.
315. Ma, W., Mishra, S., Gajanayaka, N., Angel, J.B., and Kumar, A. (2009). HIV-1 Nef inhibits lipopolysaccharide-induced IL-12p40 expression by inhibiting JNK-activated NFkappaB in human monocytic cells. *J. Biol. Chem.* 284, 7578–7587.

316. Marini, E., Tiberio, L., Caracciolo, S., Tosti, G., Guzman, C.A., Schiaffonati, L., Fiorentini, S., and Caruso, A. (2008). HIV-1 matrix protein p17 binds to monocytes and selectively stimulates MCP-1 secretion: role of transcriptional factor AP-1. *Cell. Microbiol.* *10*, 655–666.
317. Cameron, P.U., Lowe, M.G., Crowe, S.M., O’Doherty, U., Pope, M., Gezelter, S., and Steinman, R.M. (1994). Susceptibility of dendritic cells to HIV-1 infection in vitro. *J. Leukoc. Biol.* *56*, 257–265.
318. Charbonnier, A.S., Verrier, B., Jacquet, C., Massacrier, C., Fiers, M.M., Mallet, F., Dezutter-Dambuyant, C., and Schmitt, D. In vitro HIV1 infection of CD34+ progenitor-derived dendritic/Langerhans cells at different stages of their differentiation in the presence of GM-CSF/TNF alpha. *Res. Virol.* *147*, 89–95.
319. Granelli-Piperno, A., Delgado, E., Finkel, V., Paxton, W., and Steinman, R.M. (1998). Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *J. Virol.* *72*, 2733–2737.
320. Hladik, F., Sakchalathorn, P., Ballweber, L., Lentz, G., Fialkow, M., Eschenbach, D., and McElrath, M.J. (2007). Initial events in establishing vaginal entry and infection by human immunodeficiency virus type-1. *Immunity* *26*, 257–270.
321. Smed-Sørensen, A., Loré, K., Vasudevan, J., Louder, M.K., Andersson, J., Mascola, J.R., Spetz, A.-L., and Koup, R.A. (2005). Differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J. Virol.* *79*, 8861–8869.
322. De Witte, L., Nabatov, A., Pion, M., Fluitsma, D., de Jong, M.A.W.P., de Gruijl, T., Piguet, V., van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T.B.H. (2007). Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat. Med.* *13*, 367–371.
323. Kawamura, T., Koyanagi, Y., Nakamura, Y., Ogawa, Y., Yamashita, A., Iwamoto, T., Ito, M., Blauvelt, A., and Shimada, S. (2008). Significant virus replication in Langerhans cells following application of HIV to abraded skin: relevance to occupational transmission of HIV. *J. Immunol.* *180*, 3297–3304.
324. Sabado, R.L., O’Brien, M., Subedi, A., Qin, L., Hu, N., Taylor, E., Dibben, O., Stacey, A., Fellay, J., Shianna, K. V, et al. (2010). Evidence of dysregulation of dendritic cells in primary HIV infection. *Blood* *116*, 3839–3852.
325. Miller, E., and Bhardwaj, N. (2013). Dendritic cell dysregulation during HIV-1 infection. *Immunol. Rev.* *254*, 170–189.

326. Smed-Sørensen, A., and Loré, K. (2011). Dendritic cells at the interface of innate and adaptive immunity to HIV-1. *Curr. Opin. HIV AIDS* 6, 405–410.
327. Blanchet, F., Moris, A., Mitchell, J.P., and Piguet, V. (2011). A look at HIV journey: from dendritic cells to infection spread in CD4⁺ T cells. *Curr. Opin. HIV AIDS* 6, 391–397.
328. Pollakis, G., Stax, M.J., and Paxton, W. a (2011). Innate immune factors associated with HIV-1 transmission. *Curr. Opin. HIV AIDS* 6, 341–347.
329. Borrow, P. (2011). Innate immunity in acute HIV-1 infection. *Curr. Opin. HIV AIDS* 6, 353–363.
330. Derby, N., Martinelli, E., and Robbiani, M. (2011). Myeloid dendritic cells in HIV-1 infection. *Curr. Opin. HIV AIDS* 6, 379–384.
331. Chen, Y., Hwang, S.-L., Chan, V.S.F., Chung, N.P.Y., Wang, S.-R., Li, Z., Ma, J., Lin, C.-W., Hsieh, Y.-J., Chang, K.-P., et al. (2013). Binding of HIV-1 gp120 to DC-SIGN promotes ASK-1-dependent activation-induced apoptosis of human dendritic cells. *PLoS Pathog.* 9, e1003100.
332. Dillon, S.M., Robertson, K.B., Pan, S.C., Mawhinney, S., Meditz, A.L., Folkvord, J.M., Connick, E., McCarter, M.D., and Wilson, C.C. (2008). Plasmacytoid and myeloid dendritic cells with a partial activation phenotype accumulate in lymphoid tissue during asymptomatic chronic HIV-1 infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 48, 1–12.
333. Chehimi, J., Azzoni, L., Farabaugh, M., Creer, S.A., Tomescu, C., Hancock, A., Mackiewicz, A., D'Alessandro, L., Ghanekar, S., Foulkes, A.S., et al. (2007). Baseline viral load and immune activation determine the extent of reconstitution of innate immune effectors in HIV-1-infected subjects undergoing antiretroviral treatment. *J. Immunol.* 179, 2642–2650.
334. Siegal, F.P., Fitzgerald-Bocarsly, P., Holland, B.K., and Shodell, M. (2001). Interferon-alpha generation and immune reconstitution during antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus infection. *AIDS* 15, 1603–1612.
335. Alter, G., Kavanagh, D., Rihn, S., Luteijn, R., Brooks, D., Oldstone, M., van Lunzen, J., and Altfeld, M. (2010). IL-10 induces aberrant deletion of dendritic cells by natural killer cells in the context of HIV infection. *J. Clin. Invest.* 120, 1905–1913.
336. Rutella, S., Danese, S., and Leone, G. (2006). Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood* 108, 1435–1440.
337. Miller, E.A., Spadaccia, M.R., O'Brien, M.P., Rolnitzky, L., Sabado, R., Manches, O., Frleta, D., and Bhardwaj, N. (2012). Plasma factors during chronic HIV-1 infection impair IL-

12 secretion by myeloid dendritic cells via a virus-independent pathway. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *61*, 535–544.

338. Moris, A., Pajot, A., Blanchet, F., Guivel-Benhassine, F., Salcedo, M., and Schwartz, O. (2006). Dendritic cells and HIV-specific CD4⁺ T cells: HIV antigen presentation, T-cell activation, and viral transfer. *Blood* *108*, 1643–1651.

339. Donaghy, H., Gazzard, B., Gotch, F., and Patterson, S. (2003). Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. *Blood* *101*, 4505–4511.

340. Donaghy, H., Stebbing, J., and Patterson, S. (2004). Antigen presentation and the role of dendritic cells in HIV. *Curr. Opin. Infect. Dis.* *17*, 1–6.

341. Kawamura, T., Gatanaga, H., Borris, D.L., Connors, M., Mitsuya, H., and Blauvelt, A. (2003). Decreased stimulation of CD4⁺ T cell proliferation and IL-2 production by highly enriched populations of HIV-infected dendritic cells. *J. Immunol.* *170*, 4260–4266.

342. Muthumani, K., Hwang, D.S., Choo, A.Y., Mayilvahanan, S., Dayes, N.S., Thieu, K.P., and Weiner, D.B. (2005). HIV-1 Vpr inhibits the maturation and activation of macrophages and dendritic cells in vitro. *Int. Immunol.* *17*, 103–116.

343. Majumder, B., Janket, M.L., Schafer, E.A., Schaubert, K., Huang, X.-L., Kan-Mitchell, J., Rinaldo, C.R., and Ayyavoo, V. (2005). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr impairs dendritic cell maturation and T-cell activation: implications for viral immune escape. *J. Virol.* *79*, 7990–8003.

344. Williams, M.A., Trout, R., and Spector, S.A. (2002). HIV-1 gp120 modulates the immunological function and expression of accessory and co-stimulatory molecules of monocyte-derived dendritic cells. *J. Hematother. Stem Cell Res.* *11*, 829–847.

345. Almeida, M., Cordero, M., Almeida, J., and Orfao, A. (2005). Different subsets of peripheral blood dendritic cells show distinct phenotypic and functional abnormalities in HIV-1 infection. *AIDS* *19*, 261–271.

346. Fonteneau, J.-F., Larsson, M., Beignon, A.-S., McKenna, K., Dasilva, I., Amara, A., Liu, Y.-J., Lifson, J.D., Littman, D.R., and Bhardwaj, N. (2004). Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *J. Virol.* *78*, 5223–5232.

347. Beignon, A.-S., McKenna, K., Skoberne, M., Manches, O., DaSilva, I., Kavanagh, D.G., Larsson, M., Gorelick, R.J., Lifson, J.D., and Bhardwaj, N. (2005). Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J. Clin. Invest.* *115*, 3265–3275.

348. Feldman, S., Stein, D., Amrute, S., Denny, T., Garcia, Z., Kloser, P., Sun, Y., Megjugorac, N., and Fitzgerald-Bocarsly, P. (2001). Decreased interferon-alpha production in HIV-infected patients correlates with numerical and functional deficiencies in circulating type 2 dendritic cell precursors. *Clin. Immunol.* *101*, 201–210.
349. Chang, J.J., Lacas, A., Lindsay, R.J., Doyle, E.H., Axten, K.L., Pereyra, F., Rosenberg, E.S., Walker, B.D., Allen, T.M., and Altfeld, M. (2012). Differential regulation of toll-like receptor pathways in acute and chronic HIV-1 infection. *AIDS* *26*, 533–541.
350. Benlahrech, A., and Patterson, S. (2011). HIV-1 infection and induction of interferon alpha in plasmacytoid dendritic cells. *Curr. Opin. HIV AIDS* *6*, 373–378.
351. Favre, D., Mold, J., Hunt, P.W., Kanwar, B., Loke, P., Seu, L., Barbour, J.D., Lowe, M.M., Jayawardene, A., Aweeka, F., et al. (2010). Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease. *Sci. Transl. Med.* *2*, 32ra36.
352. Chen, W. (2011). IDO: more than an enzyme. *Nat. Immunol.* *12*, 809–811.
353. Blom, B., and Spits, H. (2006). Development of human lymphoid cells. *Annu. Rev. Immunol.* *24*, 287–320.
354. LeBien, T.W., and Tedder, T.F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* *112*, 1570–1580.
355. Melchers, F. (2005). The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 578–584.
356. Ferry, H., Leung, J.C.H., Lewis, G., Nijnik, A., Silver, K., Lambe, T., and Cornall, R.J. (2006). B-cell tolerance. *Transplantation* *81*, 308–315.
357. Von Boehmer, H., and Melchers, F. (2010). Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. *Nat. Immunol.* *11*, 14–20.
358. Srivastava, B., Lindsley, R.C., Nikbakht, N., and Allman, D. (2005). Models for peripheral B cell development and homeostasis. *Semin. Immunol.* *17*, 175–182.
359. Chung, J.B., Silverman, M., and Monroe, J.G. (2003). Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol.* *24*, 342–348.
360. Pillai, S., and Cariappa, A. (2009). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 767–777.

361. Vossenkämper, A., and Spencer, J. (2011). Transitional B cells: how well are the checkpoints for specificity understood? *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. *59*, 379–384.
362. Suryani, S., Fulcher, D. a, Santner-Nanan, B., Nanan, R., Wong, M., Shaw, P.J., Gibson, J., Williams, A., and Tangye, S.G. (2010). Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells. *Blood* *115*, 519–529.
363. 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.
364. Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* *104*, 487–501.
365. Funaro, A., Morra, M., Calosso, L., Zini, M.G., Ausiello, C.M., and Malavasi, F. (1997). Role of the human CD38 molecule in B cell activation and proliferation. *Tissue Antigens* *49*, 7–15.
366. Allman, D., and Pillai, S. (2008). Peripheral B cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* *20*, 149–157.
367. Mackay, F., Figgett, W.A., Saulep, D., Lepage, M., and Hibbs, M.L. (2010). B-cell stage and context-dependent requirements for survival signals from BAFF and the B-cell receptor. *Immunol. Rev.* *237*, 205–225.
368. Vincent, F.B., Saulep-Easton, D., Figgett, W. a, Fairfax, K.A., and Mackay, F. (2013). The BAFF/APRIL system: emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* *24*, 203–215.
369. Bossen, C., and Schneider, P. (2006). BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. *Semin. Immunol.* *18*, 263–275.
370. Darce, J.R., Arendt, B.K., Wu, X., and Jelinek, D.F. (2007). Regulated expression of BAFF-binding receptors during human B cell differentiation. *J. Immunol.* *179*, 7276–7286.
371. Mackay, F., and Schneider, P. (2009). Cracking the BAFF code. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 491–502.
372. Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Walsh, M.E., Ng, L.G., MacKay, F., Rao, S.P., Kalled, S.L., and Scott, M.L. (2004). B cell-activating factor belonging to the TNF family acts through separate receptors to support B cell survival and T cell-independent antibody formation. *J. Immunol.* *173*, 2331–2341.

373. Schiemann, B., Gommerman, J.L., Vora, K., Cachero, T.G., Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Frew, E., and Scott, M.L. (2001). An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* 293, 2111–2114.
374. 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.
375. Hsu, B.L., Harless, S.M., Lindsley, R.C., Hilbert, D.M., and Cancro, M.P. (2002). Cutting edge: BLyS enables survival of transitional and mature B cells through distinct mediators. *J. Immunol.* 168, 5993–5996.
376. Meyer-Bahlburg, A., Andrews, S.F., Yu, K.O.A., Porcelli, S.A., and Rawlings, D.J. (2008). Characterization of a late transitional B cell population highly sensitive to BAFF-mediated homeostatic proliferation. *J. Exp. Med.* 205, 155–168.
377. Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J.W., Meffre, E., and Nussenzweig, M.C. (2003). Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 301, 1374–1377.
378. Mackay, F., and Browning, J.L. (2002). BAFF: a fundamental survival factor for B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 465–475.
379. Groom, J., Kalled, S.L., Cutler, A.H., Olson, C., Woodcock, S.A., Schneider, P., Tschopp, J., Cachero, T.G., Batten, M., Wheway, J., et al. (2002). Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren’s syndrome. *J. Clin. Invest.* 109, 59–68.
380. Zhang, J., Roschke, V., Baker, K.P., Wang, Z., Alarcón, G.S., Fessler, B.J., Bastian, H., Kimberly, R.P., and Zhou, T. (2001). Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 166, 6–10.
381. Cheema, G.S., Roschke, V., Hilbert, D.M., and Stohl, W. (2001). Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 44, 1313–1319.
382. Varin, M.-M., Le Pottier, L., Youinou, P., Saulep, D., Mackay, F., and Pers, J.-O. (2010). B-cell tolerance breakdown in Sjögren’s syndrome: focus on BAFF. *Autoimmun. Rev.* 9, 604–608.
383. Tangye, S.G., Bryant, V.L., Cuss, A.K., and Good, K.L. (2006). BAFF, APRIL and human B cell disorders. *Semin. Immunol.* 18, 305–317.

384. Thien, M., Phan, T.G., Gardam, S., Amesbury, M., Basten, A., Mackay, F., and Brink, R. (2004). Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity* 20, 785–798.
385. Pers, J.-O., Daridon, C., Devauchelle, V., Jousse, S., Saraux, A., Jamin, C., and Youinou, P. (2005). BAFF overexpression is associated with autoantibody production in autoimmune diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1050, 34–39.
386. Stohl, W., Xu, D., Kim, K.S., Koss, M.N., Jorgensen, T.N., Deocharan, B., Metzger, T.E., Bixler, S.A., Hong, Y.S., Ambrose, C.M., et al. (2005). BAFF overexpression and accelerated glomerular disease in mice with an incomplete genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 52, 2080–2091.
387. Fu, Y.X., and Chaplin, D.D. (1999). Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 399–433.
388. Tumanov, A. V, Kuprash, D. V, and Nedospasov, S.A. The role of lymphotoxin in development and maintenance of secondary lymphoid tissues. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 275–288.
389. Acosta-Rodríguez, E. V, Merino, M.C., Montes, C.L., Motrán, C.C., and Gruppi, A. (2007). Cytokines and chemokines shaping the B-cell compartment. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18, 73–83.
390. Pereira, J.P., Kelly, L.M., and Cyster, J.G. (2010). Finding the right niche: B-cell migration in the early phases of T-dependent antibody responses. *Int. Immunol.* 22, 413–419.
391. Poudrier, J., and Owens, T. (1994). Co-stimulation by anti-immunoglobulin is required for B cell activation by CD40Llow T cells. *Eur. J. Immunol.* 24, 2993–2999.
392. Elgueta, R., de Vries, V.C., and Noelle, R.J. (2010). The immortality of humoral immunity. *Immunol. Rev.* 236, 139–150.
393. Oracki, S. a, Walker, J. a, Hibbs, M.L., Corcoran, L.M., and Tarlinton, D.M. (2010). Plasma cell development and survival. *Immunol. Rev.* 237, 140–159.
394. Batista, F.D., and Harwood, N.E. (2009). The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 15–27.
395. Pape, K.A., Catron, D.M., Itano, A.A., and Jenkins, M.K. (2007). The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles. *Immunity* 26, 491–502.

396. 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.
397. Carrasco, Y.R., and Batista, F.D. (2007). B cells acquire particulate antigen in a macrophage-rich area at the boundary between the follicle and the subcapsular sinus of the lymph node. *Immunity* *27*, 160–171.
398. Tarlinton, D. (2006). B-cell memory: are subsets necessary? *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 785–790.
399. Klein, U., and Dalla-Favera, R. (2008). Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 22–33.
400. Vinuesa, C.G., Sanz, I., and Cook, M.C. (2009). Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 845–857.
401. Victora, G.D., and Nussenzweig, M.C. (2012). Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 429–457.
402. Kosco-Vilbois, M.H., and Scheidegger, D. (1995). Follicular dendritic cells: antigen retention, B cell activation, and cytokine production. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *201*, 69–82.
403. Wu, Y., El Shikh, M.E.M., El Sayed, R.M., Best, A.M., Szakal, A.K., and Tew, J.G. (2009). IL-6 produced by immune complex-activated follicular dendritic cells promotes germinal center reactions, IgG responses and somatic hypermutation. *Int. Immunol.* *21*, 745–756.
404. Hase, H., Kanno, Y., Kojima, M., Hasegawa, K., Sakurai, D., Kojima, H., Tsuchiya, N., Tokunaga, K., Masawa, N., Azuma, M., et al. (2004). BAFF/BLyS can potentiate B-cell selection with the B-cell coreceptor complex. *Blood* *103*, 2257–2265.
405. Suzuki, K., Maruya, M., Kawamoto, S., Sitnik, K., Kitamura, H., Agace, W.W., and Fagarasan, S. (2010). The sensing of environmental stimuli by follicular dendritic cells promotes immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity* *33*, 71–83.
406. Cyster, J.G., Ansel, K.M., Reif, K., Ekland, E.H., Hyman, P.L., Tang, H.L., Luther, S. a, and Ngo, V.N. (2000). Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol. Rev.* *176*, 181–193.
407. Ansel, K.M., Ngo, V.N., Hyman, P.L., Luther, S.A., Förster, R., Sedgwick, J.D., Browning, J.L., Lipp, M., and Cyster, J.G. (2000). A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* *406*, 309–314.

408. Ma, C.S., Deenick, E.K., Batten, M., and Tangye, S.G. (2012). The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J. Exp. Med.* *209*, 1241–1253.
409. Vinuesa, C.G., Tangye, S.G., Moser, B., and Mackay, C.R. (2005). Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 853–865.
410. Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 621–663.
411. Reynaud, C.-A., Descatoire, M., Dogan, I., Huetz, F., Weller, S., and Weill, J.-C. (2012). IgM memory B cells: a mouse/human paradox. *Cell. Mol. Life Sci.* *69*, 1625–1634.
412. Weller, S., Braun, M.C., Tan, B.K., Rosenwald, A., Cordier, C., Conley, M.E., 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. *Blood* *104*, 3647–3654.
413. Cerutti, A., Cols, M., and Puga, I. (2013). Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 118–132.
414. Mebius, R.E., and Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 606–616.
415. Balázs, M., Martin, F., Zhou, T., and Kearney, J. (2002). Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* *17*, 341–352.
416. Puga, I., Cols, M., Barra, C.M., He, B., Cassis, L., Gentile, M., Comerma, L., Chorny, A., Shan, M., Xu, W., et al. (2012). B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat. Immunol.* *13*, 170–180.
417. Berkowska, M.A., Driessen, G.J.A., Bikos, V., Grosserichter-Wagener, C., Stamatopoulos, K., Cerutti, A., He, B., Biermann, K., Lange, J.F., van der Burg, M., et al. (2011). Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *Blood* *118*, 2150–2158.
418. Steiniger, B., Barth, P., and Hellinger, A. (2001). The perifollicular and marginal zones of the human splenic white pulp : do fibroblasts guide lymphocyte immigration? *Am. J. Pathol.* *159*, 501–512.
419. Martin, F., Oliver, A.M., and Kearney, J.F. (2001). Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* *14*, 617–629.

420. Guinamard, R., Okigaki, M., Schlessinger, J., and Ravetch, J. V (2000). Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response. *Nat. Immunol.* *1*, 31–36.
421. Pone, E.J., Zhang, J., Mai, T., White, C.A., Li, G., Sakakura, J.K., Patel, P.J., Al-Qahtani, A., Zan, H., Xu, Z., et al. (2012). BCR-signalling synergizes with TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF- κ B pathway. *Nat. Commun.* *3*, 767.
422. MacLennan, I.C.M., Toellner, K.-M., Cunningham, A.F., Serre, K., Sze, D.M.-Y., Zúñiga, E., Cook, M.C., and Vinuesa, C.G. (2003). Extrafollicular antibody responses. *Immunol. Rev.* *194*, 8–18.
423. Weller, S., Faili, A., Garcia, C., Braun, M.C., Le Deist F, F., de Saint Basile G, G., Hermine, O., Fischer, A., Reynaud, C.A., and Weill, J.C. (2001). CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 1166–1170.
424. Weller, S., Mamani-Matsuda, M., Picard, C., Cordier, C., Lecoeuche, D., Gauthier, F., Weill, J.-C., and Reynaud, C.-A. (2008). Somatic diversification in the absence of antigen-driven responses is the hallmark of the IgM+ IgD+ CD27+ B cell repertoire in infants. *J. Exp. Med.* *205*, 1331–1342.
425. He, B., Santamaria, R., Xu, W., Cols, M., Chen, K., Puga, I., Shan, M., Xiong, H., Bussel, J.B., Chiu, A., et al. (2010). The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. *Nat. Immunol.* *11*, 836–845.
426. Kruetzmann, S., Rosado, M.M., Weber, H., Germing, U., Tournilhac, O., Peter, H.-H., Berner, R., Peters, A., Boehm, T., Plebani, A., et al. (2003). Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen. *J. Exp. Med.* *197*, 939–945.
427. Carsetti, R., Rosado, M.M., Donnanno, S., Guazzi, V., Soresina, A., Meini, A., Plebani, A., Aiuti, F., and Quinti, I. (2005). The loss of IgM memory B cells correlates with clinical disease in common variable immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* *115*, 412–417.
428. Hart, M., Steel, A., Clark, S.A., Moyle, G., Nelson, M., Henderson, D.C., Wilson, R., Gotch, F., Gazzard, B., and Kelleher, P. (2007). Loss of discrete memory B cell subsets is associated with impaired immunization responses in HIV-1 infection and may be a risk factor for invasive pneumococcal disease. *J. Immunol.* *178*, 8212–8220.
429. Dunn-Walters, D.K., Isaacson, P.G., and Spencer, J. (1995). Analysis of mutations in immunoglobulin heavy chain variable region genes of microdissected marginal zone (MGZ) B

cells suggests that the MGZ of human spleen is a reservoir of memory B cells. *J. Exp. Med.* *182*, 559–566.

430. Klein, U., Rajewsky, K., and Küppers, R. (1998). Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J. Exp. Med.* *188*, 1679–1689.

431. Seifert, M., and Küppers, R. (2009). Molecular footprints of a germinal center derivation of human IgM+(IgD+)CD27+ B cells and the dynamics of memory B cell generation. *J. Exp. Med.* *206*, 2659–2669.

432. Chappell, C.P., Draves, K.E., Giltiay, N. V, and Clark, E. a (2012). Extrafollicular B cell activation by marginal zone dendritic cells drives T cell-dependent antibody responses. *J. Exp. Med.* *209*, 1825–1840.

433. Weller, S., Bonnet, M., Delagreverie, H., Israel, L., Chrabieh, M., Maródi, L., Rodriguez-Gallego, C., Garty, B.-Z., Roifman, C., Issekutz, A.C., et al. (2012). IgM+IgD+CD27+ B cells are markedly reduced in IRAK-4-, MyD88-, and TIRAP- but not UNC-93B-deficient patients. *Blood* *120*, 4992–5001.

434. Roll, P., Palanichamy, A., Kneitz, C., Dorner, T., and Tony, H.-P. (2006). Regeneration of B cell subsets after transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *54*, 2377–2386.

435. Browne, E.P. (2012). Regulation of B-cell responses by Toll-like receptors. *Immunology* *136*, 370–379.

436. Rawlings, D.J., Schwartz, M.A., Jackson, S.W., and Meyer-Bahlburg, A. (2012). Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 282–294.

437. Colino, J., Shen, Y., and Snapper, C.M. (2002). Dendritic cells pulsed with intact *Streptococcus pneumoniae* elicit both protein- and polysaccharide-specific immunoglobulin isotype responses in vivo through distinct mechanisms. *J. Exp. Med.* *195*, 1–13.

438. Do, R.K., Hatada, E., Lee, H., Tourigny, M.R., Hilbert, D., and Chen-Kiang, S. (2000). Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response. *J. Exp. Med.* *192*, 953–964.

439. Litinskiy, M.B., Nardelli, B., Hilbert, D.M., He, B., Schaffer, A., Casali, P., and Cerutti, A. (2002). DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL. *Nat. Immunol.* *3*, 822–829.

440. Cols, M., Barra, C.M., He, B., Puga, I., Xu, W., Chiu, A., Tam, W., Knowles, D.M., Dillon, S.R., Leonard, J.P., et al. (2012). Stromal endothelial cells establish a bidirectional crosstalk with chronic lymphocytic leukemia cells through the TNF-related factors BAFF, APRIL, and CD40L. *J. Immunol.* *188*, 6071–6083.
441. Xu, W., He, B., Chiu, A., Chadburn, A., Shan, M., Buldys, M., Ding, A., Knowles, D.M., Santini, P.A., and Cerutti, A. (2007). Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. *Nat. Immunol.* *8*, 294–303.
442. He, B., Qiao, X., and Cerutti, A. (2004). CpG DNA induces IgG class switch DNA recombination by activating human B cells through an innate pathway that requires TLR9 and cooperates with IL-10. *J. Immunol.* *173*, 4479–4491.
443. He, B., Xu, W., Santini, P.A., Polydorides, A.D., Chiu, A., Estrella, J., Shan, M., Chadburn, A., Villanacci, V., Plebani, A., et al. (2007). Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity* *26*, 812–826.
444. Lindh, E., Lind, S.M., Lindmark, E., Hässler, S., Perheentupa, J., Peltonen, L., Winqvist, O., and Karlsson, M.C.I. (2008). AIRE regulates T-cell-independent B-cell responses through BAFF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 18466–18471.
445. Groom, J.R., Fletcher, C.A., Walters, S.N., Grey, S.T., Watt, S. V, Sweet, M.J., Smyth, M.J., Mackay, C.R., and Mackay, F. (2007). BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells. *J. Exp. Med.* *204*, 1959–1971.
446. Jego, G., Palucka, A.K., Blanck, J.-P., Chalouni, C., Pascual, V., and Banchereau, J. (2003). Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* *19*, 225–234.
447. Xu, W., Joo, H., Clayton, S., Dullaers, M., Herve, M.-C., Blankenship, D., De La Morena, M.T., Balderas, R., Picard, C., Casanova, J.-L., et al. (2012). Macrophages induce differentiation of plasma cells through CXCL10/IP-10. *J. Exp. Med.* *209*, 1813–23, S1–2.
448. Macpherson, A.J., Geuking, M.B., Slack, E., Hapfelmeier, S., and McCoy, K.D. (2012). The habitat, double life, citizenship, and forgetfulness of IgA. *Immunol. Rev.* *245*, 132–146.
449. Macpherson, A.J., Gatto, D., Sainsbury, E., Harriman, G.R., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (2000). A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* *288*, 2222–2226.
450. Macpherson, A.J., and Uhr, T. (2004). Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* *303*, 1662–1665.

451. Macpherson, A.J., and Uhr, T. (2004). Compartmentalization of the mucosal immune responses to commensal intestinal bacteria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1029*, 36–43.
452. Konrad, A., Cong, Y., Duck, W., Borlaza, R., and Elson, C.O. (2006). Tight mucosal compartmentation of the murine immune response to antigens of the enteric microbiota. *Gastroenterology* *130*, 2050–2059.
453. Von Bülow, G.U., van Deursen, J.M., and Bram, R.J. (2001). Regulation of the T-independent humoral response by TACI. *Immunity* *14*, 573–582.
454. Castigli, E., Wilson, S.A., Scott, S., Dedeoglu, F., Xu, S., Lam, K.-P., Bram, R.J., Jabara, H., and Geha, R.S. (2005). TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *J. Exp. Med.* *201*, 35–39.
455. Cerutti, A., Cols, M., Gentile, M., Cassis, L., Barra, C.M., He, B., Puga, I., and Chen, K. (2011). Regulation of mucosal IgA responses: lessons from primary immunodeficiencies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1238*, 132–144.
456. Tsuji, M., Suzuki, K., Kitamura, H., Maruya, M., Kinoshita, K., Ivanov, I.I., Itoh, K., Littman, D.R., and Fagarasan, S. (2008). Requirement for lymphoid tissue-inducer cells in isolated follicle formation and T cell-independent immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity* *29*, 261–271.
457. Cerutti, A., Chen, K., and Chorny, A. (2011). Immunoglobulin responses at the mucosal interface. *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 273–293.
458. Ziegler, S.F., and Liu, Y.-J. (2006). Thymic stromal lymphopoietin in normal and pathogenic T cell development and function. *Nat. Immunol.* *7*, 709–714.
459. Massacand, J.C., Kaiser, P., Ernst, B., Tardivel, A., Bürki, K., Schneider, P., and Harris, N.L. (2008). Intestinal Bacteria Condition Dendritic Cells to Promote IgA Production. *PLoS One* *3*, e2588.
460. Mora, J.R., and von Andrian, U.H. (2008). Differentiation and homing of IgA-secreting cells. *Mucosal Immunol.* *1*, 96–109.
461. Mora, J.R., and von Andrian, U.H. (2009). Role of retinoic acid in the imprinting of gut-homing IgA-secreting cells. *Semin. Immunol.* *21*, 28–35.
462. Fagarasan, S., Kawamoto, S., Kanagawa, O., and Suzuki, K. (2010). Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Annu. Rev. Immunol.* *28*, 243–273.

463. Fagarasan, S., Muramatsu, M., Suzuki, K., Nagaoka, H., Hiai, H., and Honjo, T. (2002). Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. *Science* 298, 1424–1427.
464. Pasare, C., and Medzhitov, R. (2005). Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* 438, 364–368.
465. Casola, S., and Rajewsky, K. (2006). B cell recruitment and selection in mouse GALT germinal centers. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 308, 155–171.
466. Tsuji, M., Komatsu, N., Kawamoto, S., Suzuki, K., Kanagawa, O., Honjo, T., Hori, S., and Fagarasan, S. (2009). Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3⁺ T cells in gut Peyer's patches. *Science* 323, 1488–1492.
467. Cong, Y., Feng, T., Fujihashi, K., Schoeb, T.R., and Elson, C.O. (2009). A dominant, coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 19256–19261.
468. Suzuki, K., and Fagarasan, S. (2008). How host-bacterial interactions lead to IgA synthesis in the gut. *Trends Immunol.* 29, 523–531.
469. Hapfelmeier, S., Lawson, M.A.E., Slack, E., Kirundi, J.K., Stoel, M., Heikenwalder, M., Cahenzli, J., Velykoredko, Y., Balmer, M.L., Endt, K., et al. (2010). Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. *Science* 328, 1705–1709.
470. Macpherson, A.J., and McCoy, K.D. (2013). Stratification and compartmentalisation of immunoglobulin responses to commensal intestinal microbes. *Semin. Immunol.* 25, 358–363.
471. Hooper, L. V., Littman, D.R., and Macpherson, A.J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 336, 1268–1273.
472. Holers, V.M. (2005). Complement receptors and the shaping of the natural antibody repertoire. *Springer Semin. Immunopathol.* 26, 405–423.
473. Boes, M. (2000). Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol. Immunol.* 37, 1141–1149.
474. Chen, K., Xu, W., Wilson, M., He, B., Miller, N.W., Bengtén, E., Edholm, E.-S., Santini, P.A., Rath, P., Chiu, A., et al. (2009). Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nat. Immunol.* 10, 889–898.

475. Neuberger, M.S., Ehrenstein, M.R., Rada, C., Sale, J., Batista, F.D., Williams, G., and Milstein, C. (2000). Memory in the B-cell compartment: antibody affinity maturation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355, 357–360.
476. Kenneth Murphy (2012). The Humoral Immune Response. In Janeway's Immunobiology, (New York, USA: Garland Science, Taylor and Francis Group), pp. p.408–423.
477. Mestecky, J., and Russell, M.W. (1986). IgA subclasses. *Monogr. Allergy* 19, 277–301.
478. Underdown, B.J., and Schiff, J.M. (1986). Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface. *Annu. Rev. Immunol.* 4, 389–417.
479. Woof, J.M., and Kerr, M.A. (2006). The function of immunoglobulin A in immunity. *J. Pathol.* 208, 270–282.
480. Snapper, C.M., and Paul, W.E. (1987). Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 236, 944–947.
481. Lund, F.E., and Randall, T.D. (2010). Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 236–247.
482. Mauri, C. (2010). Regulation of immunity and autoimmunity by B cells. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 761–767.
483. Mauri, C., and Bosma, A. (2012). Immune regulatory function of B cells. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 221–241.
484. Lampropoulou, V., Hoehlig, K., Roch, T., Neves, P., Calderón Gómez, E., Sweenie, C.H., Hao, Y., Freitas, A.A., Steinhoff, U., Anderton, S.M., et al. (2008). TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *J. Immunol.* 180, 4763–4773.
485. Evans, J.G., Chavez-Rueda, K.A., Eddaoudi, A., Meyer-Bahlburg, A., Rawlings, D.J., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (2007). Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J. Immunol.* 178, 7868–7878.
486. Cong, Y.Z., Rabin, E., and Wortis, H.H. (1991). Treatment of murine CD5- B cells with anti-Ig, but not LPS, induces surface CD5: two B-cell activation pathways. *Int. Immunol.* 3, 467–476.
487. Su, T.T., Guo, B., Wei, B., Braun, J., and Rawlings, D.J. (2004). Signaling in transitional type 2 B cells is critical for peripheral B-cell development. *Immunol. Rev.* 197, 161–178.
488. Saraiva, M., and O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 170–181.

489. Murai, M., Turovskaya, O., Kim, G., Madan, R., Karp, C.L., Cheroutre, H., and Kronenberg, M. (2009). Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat. Immunol.* *10*, 1178–1184.
490. Darrasse-Jèze, G., Deroubaix, S., Mouquet, H., Victora, G.D., Eisenreich, T., Yao, K., Masilamani, R.F., Dustin, M.L., Rudensky, A., Liu, K., et al. (2009). Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* *206*, 1853–1862.
491. Tadmor, T., Zhang, Y., Cho, H.-M., Podack, E.R., and Rosenblatt, J.D. (2011). The absence of B lymphocytes reduces the number and function of T-regulatory cells and enhances the anti-tumor response in a murine tumor model. *Cancer Immunol. Immunother.* *60*, 609–619.
492. Sun, J.-B., Flach, C.-F., Czerkinsky, C., and Holmgren, J. (2008). B lymphocytes promote expansion of regulatory T cells in oral tolerance: powerful induction by antigen coupled to cholera toxin B subunit. *J. Immunol.* *181*, 8278–8287.
493. Mangan, N.E., Fallon, R.E., Smith, P., van Rooijen, N., McKenzie, A.N., and Fallon, P.G. (2004). Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-producing B cells. *J. Immunol.* *173*, 6346–6356.
494. Carter, N. a, Vasconcellos, R., Rosser, E.C., Tulone, C., Muñoz-Suano, A., Kamanaka, M., Ehrenstein, M.R., Flavell, R. a, and Mauri, C. (2011). Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J. Immunol.* *186*, 5569–5579.
495. Fillatreau, S., Sweenie, C.H., McGeachy, M.J., Gray, D., and Anderton, S.M. (2002). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.* *3*, 944–950.
496. Duddy, M., Niino, M., Adataia, F., Hebert, S., Freedman, M., Atkins, H., Kim, H.J., and Bar-Or, A. (2007). Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J. Immunol.* *178*, 6092–6099.
497. Ramgolam, V.S., Sha, Y., Marcus, K.L., Choudhary, N., Troiani, L., Chopra, M., and Markovic-Plese, S. (2011). B cells as a therapeutic target for IFN- β in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J. Immunol.* *186*, 4518–4526.
498. Harris, N., and Gause, W.C. (2011). To B or not to B: B cells and the Th2-type immune response to helminths. *Trends Immunol.* *32*, 80–88.
499. Lipsky, P.E. (2001). Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nat. Immunol.* *2*, 764–766.

500. Llorente, L., Richaud-Patin, Y., Fior, R., Alcocer-Varela, J., Wijdenes, J., Fourrier, B.M., Galanaud, P., and Emilie, D. (1994). In vivo production of interleukin-10 by non-T cells in rheumatoid arthritis, Sjögren's syndrome, and systemic lupus erythematosus. A potential mechanism of B lymphocyte hyperactivity and autoimmunity. *Arthritis Rheum.* *37*, 1647–1655.
501. Blair, P.A., Noreña, L.Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D.J., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (2010). CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* *32*, 129–140.
502. Das, A., Ellis, G., Pallant, C., Lopes, a R., Khanna, P., Peppia, D., Chen, A., Blair, P., Dusheiko, G., Gill, U., et al. (2012). IL-10-producing regulatory B cells in the pathogenesis of chronic hepatitis B virus infection. *J. Immunol.* *189*, 3925–3935.
503. Moir, S., Lapointe, R., Malaspina, A., Ostrowski, M., Cole, C.E., Chun, T.-W.W., Adelsberger, J., Baseler, M., Hwu, P., and Fauci, A.S. (1999). CD40-Mediated Induction of CD4 and CXCR4 on B Lymphocytes Correlates with Restricted Susceptibility to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection: Potential Role of B Lymphocytes as a Viral Reservoir. *J. Virol.* *73*, 7972–7980.
504. Gras, G., Legendre, C., Krzysiek, R., Dormont, D., Galanaud, P., and Richard, Y. (1996). CD40/CD40L interactions and cytokines regulate HIV replication in B cells in vitro. *Virology* *220*, 309–319.
505. Kacani, L., Prodinger, W.M., Sprinzl, G.M., Schwendinger, M.G., Spruth, M., Stoiber, H., Döpfer, S., Steinhuber, S., Steindl, F., and Dierich, M.P. (2000). Detachment of human immunodeficiency virus type 1 from germinal centers by blocking complement receptor type 2. *J. Virol.* *74*, 7997–8002.
506. 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.
507. Rappocciolo, G., Piazza, P., Fuller, C.L., Reinhart, T.A., Watkins, S.C., Rowe, D.T., Jais, M., Gupta, P., and Rinaldo, C.R. (2006). DC-SIGN on B lymphocytes is required for transmission of HIV-1 to T lymphocytes. *PLoS Pathog.* *2*, e70.
508. Notermans, D.W., de Jong, J.J., Goudsmit, J., Bakker, M., Roos, M.T., Nijholt, L., Cremers, J., Hellings, J.A., Danner, S.A., and de Ronde, A. (2001). Potent antiretroviral therapy initiates normalization of hypergammaglobulinemia and a decline in HIV type 1-specific antibody responses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *17*, 1003–1008.

509. Shearer, W.T., Easley, K.A., Goldfarb, J., Rosenblatt, H.M., Jenson, H.B., Kovacs, A., and McIntosh, K. (2000). Prospective 5-year study of peripheral blood CD4, CD8, and CD19/CD20 lymphocytes and serum Igs in children born to HIV-1 women. The P(2)C(2) HIV Study Group. *J. Allergy Clin. Immunol.* *106*, 559–566.
510. Moir, S., Malaspina, A., Ogwaro, K.M., Donoghue, E.T., Hallahan, C.W., Ehler, L.A., Liu, S., Adelsberger, J., Lapointe, R., Hwu, P., et al. (2001). HIV-1 induces phenotypic and functional perturbations of B cells in chronically infected individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 10362–10367.
511. Kekow, J., Hobusch, G., and Gross, W.L. (1988). Predominance of the IgG1 subclass in the hypergammaglobulinemia observed in pre-AIDS and AIDS. *Cancer Detect. Prev.* *12*, 211–216.
512. Malaspina, A., Moir, S., Kottlil, 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.
513. De Milito, A., Nilsson, A., Titanji, K., Thorstensson, R., Reizenstein, E., Narita, M., Grutzmeier, S., Sönnernborg, A., and Chiodi, F. (2004). Mechanisms of hypergammaglobulinemia and impaired antigen-specific humoral immunity in HIV-1 infection. *Blood* *103*, 2180–2186.
514. Martínez-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.
515. Van der Meijden, M., Gage, J., Breen, E.C., Taga, T., Kishimoto, T., and Martínez-Maza, O. (1998). IL-6 receptor (CD126/IL-6R α) expression is increased on monocytes and B lymphocytes in HIV infection. *Cell. Immunol.* *190*, 156–166.
516. Wolthers, K.C., Otto, S.A., Lens, S.M., Kolbach, D.N., van Lier, R.A., Miedema, F., and Meyaard, L. (1996). Increased expression of CD80, CD86 and CD70 on T cells from HIV-infected individuals upon activation in vitro: regulation by CD4 $^{+}$ T cells. *Eur. J. Immunol.* *26*, 1700–1706.
517. Cagigi, A., Du, L., Dang, L.V.P., Grutzmeier, S., Atlas, A., Chiodi, F., Pan-Hammarström, Q., and Nilsson, A. (2009). CD27(-) B-cells produce class switched and somatically hyper-mutated antibodies during chronic HIV-1 infection. *PLoS One* *4*, e5427.
518. He, B., Qiao, X., Klasse, P.J., Chiu, A., Chadburn, A., Knowles, D.M., Moore, J.P., and Cerutti, A. (2006). HIV-1 envelope triggers polyclonal Ig class switch recombination through a CD40-independent mechanism involving BAFF and C-type lectin receptors. *J. Immunol.* *176*, 3931–3941.

519. Rieckmann, P., Poli, G., Fox, C.H., Kehrl, J.H., and Fauci, A.S. (1991). Recombinant gp120 specifically enhances tumor necrosis factor-alpha production and Ig secretion in B lymphocytes from HIV-infected individuals but not from seronegative donors. *J. Immunol.* *147*, 2922–2927.
520. Bernasconi, N.L., Traggiai, E., and Lanzavecchia, A. (2002). Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* *298*, 2199–2202.
521. Bernasconi, N.L., Onai, N., and Lanzavecchia, A. (2003). A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* *101*, 4500–4504.
522. Yehudai, D., Snir, A., Peri, R., Halasz, K., Haj, T., Odeh, M., and Kessel, a (2012). B cell-activating factor enhances interleukin-6 and interleukin-10 production by ODN-activated human B cells. *Scand. J. Immunol.* *76*, 371–377.
523. Abu-Rish, E.Y., Amrani, Y., and Browning, M.J. (2013). Toll-like receptor 9 activation induces expression of membrane-bound B-cell activating factor (BAFF) on human B cells and leads to increased proliferation in response to both soluble and membrane-bound BAFF. *Rheumatology (Oxford)*. *52*, 1190–1201.
524. Ruprecht, C.R., and Lanzavecchia, A. (2006). Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur. J. Immunol.* *36*, 810–816.
525. Müller, F., Aukrust, P., Nordoy, I., and Froland, S.S. (1998). Possible role of interleukin-10 (IL-10) and CD40 ligand expression in the pathogenesis of hypergammaglobulinemia in human immunodeficiency virus infection: modulation of IL-10 and Ig production after intravenous Ig infusion. *Blood* *92*, 3721–3729.
526. Emilie, D., Zou, W., Fior, R., Llorente, L., Durandy, A., Crevon, M.C., Maillot, M.C., Durand-Gasselín, I., Raphael, M., Peuchmaur, M., et al. (1997). Production and roles of IL-6, IL-10, and IL-13 in B-lymphocyte malignancies and in B-lymphocyte hyperactivity of HIV infection and autoimmunity. *Methods* *11*, 133–142.
527. Emilie, D., Fior, R., Jarrousse, B., Marfaing-Koka, A., Merrien, D., Devergne, O., Crevon, M.C., Maillot, M.C., and Galanaud, P. Cytokines in HIV infection. *Int. J. Immunopharmacol.* *16*, 391–396.
528. De Milito, A., Mörch, C., Sönnernborg, A., and Chiodi, F. (2001). Loss of memory (CD27) B lymphocytes in HIV-1 infection. *AIDS* *15*, 957–964.
529. Titanji, K., Nilsson, A., Mörch, C., Samuelsson, A., Sönnernborg, A., Grutzmeier, S., Zazzi, M., and De Milito, A. (2003). Low frequency of plasma nerve-growth factor detection

is associated with death of memory B lymphocytes in HIV-1 infection. *Clin. Exp. Immunol.* *132*, 297–303.

530. Titanji, K., De Milito, A., Cagigi, A., Thorstensson, R., Grützmeier, S., Atlas, A., Hejdeman, B., Kroon, F.P., Lopalco, L., Nilsson, A., et al. (2006). Loss of memory B cells impairs maintenance of long-term serologic memory during HIV-1 infection. *Blood* *108*, 1580–1587.

531. Nagase, H., Agematsu, K., Kitano, K., Takamoto, M., Okubo, Y., Komiyama, A., and Sugane, K. (2001). Mechanism of hypergammaglobulinemia by HIV infection: circulating memory B-cell reduction with plasmacytosis. *Clin. Immunol.* *100*, 250–259.

532. Malaspina, A., Moir, S., Orsega, S.M., Vasquez, J., Miller, N.J., Donoghue, E.T., Kottlil, S., Gezmu, M., Follmann, D., Vodeiko, G.M., et al. (2005). Compromised B cell responses to influenza vaccination in HIV-infected individuals. *J. Infect. Dis.* *191*, 1442–1450.

533. Levesque, M.C., Moody, M.A., Hwang, K.-K., Marshall, D.J., Whitesides, J.F., Amos, J.D., Gurley, T.C., Allgood, S., Haynes, B.B., Vandergrift, N.A., et al. (2009). Polyclonal B cell differentiation and loss of gastrointestinal tract germinal centers in the earliest stages of HIV-1 infection. *PLoS Med.* *6*, e1000107.

534. Chougnet, C. (2003). Role of CD40 ligand dysregulation in HIV-associated dysfunction of antigen-presenting cells. *J. Leukoc. Biol.* *74*, 702–709.

535. Kornbluth, R.S. (2000). The emerging role of CD40 ligand in HIV infection. *J. Leukoc. Biol.* *68*, 373–382.

536. 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.

537. Moir, S., and Fauci, A.S. (2009). B cells in HIV infection and disease. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 235–245.

538. Bekker, V., Westerlaken, G.H.A., Scherpbier, H., Alders, S., Zaaijer, H., van Baarle, D., and Kuijpers, T. (2006). Varicella vaccination in HIV-1-infected children after immune reconstitution. *AIDS* *20*, 2321–2329.

539. Mestecky, J., Jackson, S., Moldoveanu, Z., Nesbit, L.R., Kulhavy, R., Prince, S.J., Sabbaj, S., Mulligan, M.J., and Goepfert, P.A. (2004). Paucity of antigen-specific IgA responses in sera and external secretions of HIV-type 1-infected individuals. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *20*, 972–988.

540. Scamurra, R.W., Nelson, D.B., Lin, X.M., Miller, D.J., Silverman, G.J., Kappel, T., Thurn, J.R., Lorenz, E., Kulkarni-Narla, A., and Janoff, E.N. (2002). Mucosal plasma cell repertoire during HIV-1 infection. *J. Immunol.* *169*, 4008–4016.
541. Schäfer, F., Kewenig, S., Stolte, N., Stahl-Hennig, C., Stallmach, A., Kaup, F.-J., Zeitz, M., and Schneider, T. (2002). Lack of simian immunodeficiency virus (SIV) specific IgA response in the intestine of SIV infected rhesus macaques. *Gut* *50*, 608–614.
542. Malaspina, A., Moir, S., Ho, J., Wang, W., Howell, M.L., O’Shea, M.A., Roby, G.A., Rehm, C.A., Mican, J.M., Chun, T.-W., et al. (2006). Appearance of immature/transitional B cells in HIV-infected individuals with advanced disease: correlation with increased IL-7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 2262–2267.
543. Ho, J., Moir, S., Malaspina, A., Howell, M.L., Wang, W., DiPoto, A.C., O’Shea, M. a, Roby, G. a, Kwan, R., Mican, J.M., et al. (2006). Two overrepresented B cell populations in HIV-infected individuals undergo apoptosis by different mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 19436–19441.
544. Trautmann, L., Janbazian, L., Chomont, N., Said, E.A., Gimmig, S., Bessette, B., Boulassel, M.-R., Delwart, E., Sepulveda, H., Balderas, R.S., et al. (2006). Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat. Med.* *12*, 1198–1202.
545. Moir, S., Ho, J., Malaspina, A., Wang, W., DiPoto, A.C., O’Shea, M. a, Roby, G., Kottlil, 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.
546. Morris, L., Binley, J.M., Clas, B.A., Bonhoeffer, S., Astill, T.P., Kost, R., Hurley, A., Cao, Y., Markowitz, M., Ho, D.D., et al. (1998). HIV-1 antigen-specific and -nonspecific B cell responses are sensitive to combination antiretroviral therapy. *J. Exp. Med.* *188*, 233–245.
547. Jacobson, M.A., Khayam-Bashi, H., Martin, J.N., Black, D., and Ng, V. (2002). Effect of long-term highly active antiretroviral therapy in restoring HIV-induced abnormal B-lymphocyte function. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *31*, 472–477.
548. Moir, S., Buckner, C.M., Ho, J., Wang, W., Chen, J., Waldner, A.J., Posada, J.G., Kardava, L., O’Shea, M. a, Kottlil, 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.
549. Richard, Y., Amiel, C., Jeantils, V., Mestivier, D., Portier, A., Dhello, G., Feuillard, J., Creidy, R., Nicolas, J.-C., and Raphael, M. (2010). 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.* *202*, 1424–1434.

550. D’Orsogna, L.J., Krueger, R.G., McKinnon, E.J., and French, M.A. (2007). Circulating memory B-cell subpopulations are affected differently by HIV infection and antiretroviral therapy. *AIDS* *21*, 1747–1752.

551. Shen, X., and Tomaras, G.D. (2011). Alterations of the B-cell response by HIV-1 replication. *Curr. HIV/AIDS Rep.* *8*, 23–30.

552. Nguyen, B.Y., and Reveille, J.D. (2009). Rheumatic manifestations associated with HIV in the highly active antiretroviral therapy era. *Curr. Opin. Rheumatol.* *21*, 404–410.

553. Bower, M., Palmieri, C., and Dhillon, T. (2006). AIDS-related malignancies: changing epidemiology and the impact of highly active antiretroviral therapy. *Curr. Opin. Infect. Dis.* *19*, 14–19.

554. Suarez, F., Lortholary, O., Hermine, O., and Lecuit, M. (2006). Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven lymphoproliferation. *Blood* *107*, 3034–3044.

555. Bunn, B.K., and van Heerden, W.F.P. (2012). HIV/AIDS associated malignancies of the head and neck. *SADJ* *67*, 590–592.

556. Gates, A.E., and Kaplan, L.D. (2002). AIDS malignancies in the era of highly active antiretroviral therapy. *Oncology (Williston Park)*. *16*, 441–451, 456, 459.

557. Cheung, M.C., Pantanowitz, L., and Dezube, B.J. AIDS-related malignancies: emerging challenges in the era of highly active antiretroviral therapy. *Oncologist* *10*, 412–426.

558. Gopal, S., Patel, M.R., Yanik, E.L., Cole, S.R., Achenbach, C.J., Napravnik, S., Burkholder, G.A., Reid, E.G., Rodriguez, B., Deeks, S.G., et al. (2013). Temporal trends in presentation and survival for HIV-associated lymphoma in the antiretroviral therapy era. *J. Natl. Cancer Inst.* *105*, 1221–1229.

559. Rainone, V., Dubois, G., Temchura, V., Überla, K., Clivio, A., Nebuloni, M., Lauri, E., Trabattoni, D., Veas, F., and Clerici, M. (2011). CCL28 induces mucosal homing of HIV-1-specific IgA-secreting plasma cells in mice immunized with HIV-1 virus-like particles. *PLoS One* *6*, e26979.

560. Trabattoni, D., Biasin, M., and Clerici, M. (2012). Mucosal immunoglobulin A in HIV-exposed seronegative individuals. *AIDS* *26*, 2247–2250.

561. Shacklett, B.L. (2010). Immune responses to HIV and SIV in mucosal tissues: “location, location, location”. *Curr. Opin. HIV AIDS* 5, 128–134.
562. Bomsel, M., Tudor, D., Drillet, A.-S., Alfsen, A., Ganor, Y., Roger, M.-G., Mouz, N., Amacker, M., Chalifour, A., Diomede, L., et al. (2011). Immunization with HIV-1 gp41 subunit virosomes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges. *Immunity* 34, 269–280.
563. Tudor, D., Derrien, M., Diomede, L., Drillet, A.-S., Houimel, M., Moog, C., Reynes, J.-M., Lopalco, L., and Bomsel, M. (2009). HIV-1 gp41-specific monoclonal mucosal IgAs derived from highly exposed but IgG-seronegative individuals block HIV-1 epithelial transcytosis and neutralize CD4(+) cell infection: an IgA gene and functional analysis. *Mucosal Immunol.* 2, 412–426.
564. Gaudet, R.G., Breden, F., Plummer, F., and Berry, J.D. Molecular characterization of the cervical and systemic B-cell repertoire: Unique, yet overlapping, immune compartments of an HIV-1 resistant individual. *MAbs* 3, 181–191.
565. Haynes, B.F., Gilbert, P.B., McElrath, M.J., Zolla-Pazner, S., Tomaras, G.D., Alam, S.M., Evans, D.T., Montefiori, D.C., Karnasuta, C., Sutthent, R., et al. (2012). Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *N. Engl. J. Med.* 366, 1275–1286.
566. Tomaras, G.D., Ferrari, G., Shen, X., Alam, S.M., Liao, H.-X., Pollara, J., Bonsignori, M., Moody, M.A., Fong, Y., Chen, X., et al. (2013). Vaccine-induced plasma IgA specific for the C1 region of the HIV-1 envelope blocks binding and effector function of IgG. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 9019–9024.
567. Saphire, E.O., Parren, P.W., Pantophlet, R., Zwick, M.B., Morris, G.M., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Stanfield, R.L., Burton, D.R., and Wilson, I.A. (2001). Crystal structure of a neutralizing human IGG against HIV-1: a template for vaccine design. *Science* 293, 1155–1159.
568. Haynes, B.F., Fleming, J., St Clair, E.W., Katinger, H., Stiegler, G., Kunert, R., Robinson, J., Searce, R.M., Plonk, K., Staats, H.F., et al. (2005). Cardioliipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science* 308, 1906–1908.
569. Mouquet, H., Scheid, J.F., Zoller, M.J., Krogsgaard, M., Ott, R.G., Shukair, S., Artyomov, M.N., Pietzsch, J., Connors, M., Pereyra, F., et al. (2010). Polyreactivity increases the apparent affinity of anti-HIV antibodies by heteroligation. *Nature* 467, 591–595.
570. Verkoczy, L., Diaz, M., Holl, T.M., Ouyang, Y.-B., Bouton-Verville, H., Alam, S.M., Liao, H.-X., Kelsoe, G., and Haynes, B.F. (2010). Autoreactivity in an HIV-1 broadly reactive neutralizing antibody variable region heavy chain induces immunologic tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 181–186.

571. 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.
572. Wu, X., Yang, Z., Li, Y., and HogerCorp, C. (2010). Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science* (80-.). 856,.
573. Zhou, T., Georgiev, I., Wu, X., Yang, Z.-Y., Dai, K., Finzi, A., Kwon, Y. Do, Scheid, J.F., Shi, W., Xu, L., et al. (2010). Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science* 329, 811–817.
574. Burton, D., and Weiss, R. (2010). A boost for HIV vaccine design. *Science* (80-.). 770, 10–13.
575. Pujanauski, L., Janoff, E., McCarter, M., Pelanda, R., and Torres, R. (2013). Mouse marginal zone B cells harbor specificities similar to human broadly neutralizing HIV antibodies. *Proc. ...* 110, 1422–1427.
576. Dosenovic, P., Soldemo, M., Scholz, J.L., O’Dell, S., Grasset, E.K., Pelletier, N., Karlsson, M.C.I., Mascola, J.R., Wyatt, R.T., Cancro, M.P., et al. (2012). BLYS-mediated modulation of naive B cell subsets impacts HIV Env-induced antibody responses. *J. Immunol.* 188, 6018–6026.
577. Hanna, Z., Kay, D.G., Cool, M., Jothy, S., Rebai, N., and Jolicoeur, P. (1998). Transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1 in immune cells develop a severe AIDS-like disease. *J. Virol.* 72, 121–132.
578. Hanna, Z., Kay, D.G., Rebai, N., Guimond, A., Jothy, S., and Jolicoeur, P. (1998). Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice. *Cell* 95, 163–175.
579. Hanna, Z., Rebai, N., Poudrier, J., and Jolicoeur, P. (2001). Distinct regulatory elements are required for faithful expression of human CD4 in T cells, macrophages, and dendritic cells of transgenic mice. *Blood* 98, 2275–2278.
580. Hanna, Z., Weng, X., Kay, D.G., Poudrier, J., Lowell, C., and Jolicoeur, P. (2001). The pathogenicity of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 Nef in CD4C/HIV transgenic mice is abolished by mutation of its SH3-binding domain, and disease development is delayed in the absence of Hck. *J. Virol.* 75, 9378–9392.
581. Poudrier, J., Weng, X., Kay, D.G., Paré, G., Calvo, E.L., Hanna, Z., Kosco-Vilbois, M.H., and Jolicoeur, P. (2001). The AIDS disease of CD4C/HIV transgenic mice shows impaired germinal centers and autoantibodies and develops in the absence of IFN-gamma and IL-6. *Immunity* 15, 173–185.

582. Poudrier, J., Weng, X., Kay, D.G., Hanna, Z., and Jolicoeur, P. (2003). The AIDS-Like Disease of CD4C/Human Immunodeficiency Virus Transgenic Mice Is Associated with Accumulation of Immature CD11bHi Dendritic Cells. *J. Virol.* *77*, 11733–11744.
583. Mackay, F., Woodcock, S.A., Lawton, P., Ambrose, C., Baetscher, M., Schneider, P., Tschopp, J., and Browning, J.L. (1999). Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J. Exp. Med.* *190*, 1697–1710.
584. Hässler, S., Ramsey, C., Karlsson, M.C., Larsson, D., Herrmann, B., Rozell, B., Backheden, M., Peltonen, L., Kämpe, O., and Winqvist, O. (2006). Aire-deficient mice develop hematopoietic irregularities and marginal zone B-cell lymphoma. *Blood* *108*, 1941–1948.
585. Fontaine, J., Coutlée, F., Tremblay, C., Routy, J.-P., Poudrier, J., and Roger, M. (2009). HIV infection affects blood myeloid dendritic cells after successful therapy and despite nonprogressing clinical disease. *J. Infect. Dis.* *199*, 1007–1018.
586. Fontaine, J., Poudrier, J., and Roger, M. (2011). Short communication: persistence of high blood levels of the chemokines CCL2, CCL19, and CCL20 during the course of HIV infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *27*, 655–657.
587. Fontaine, J., Chagnon-Choquet, J., Valcke, H.S., Poudrier, J., and Roger, M. (2011). High expression levels of B lymphocyte stimulator (BLyS) by dendritic cells correlate with HIV-related B-cell disease progression in humans. *Blood* *117*, 145–155.
588. Yang, M., Sun, L., Wang, S., Ko, K.-H., Xu, H., Zheng, B.-J., Cao, X., and Lu, L. (2010). Novel function of B cell-activating factor in the induction of IL-10-producing regulatory B cells. *J. Immunol.* *184*, 3321–3325.
589. Hanna, Z., Priceputu, E., Kay, D.G., Poudrier, J., Chrobak, P., and Jolicoeur, P. (2004). In vivo mutational analysis of the N-terminal region of HIV-1 Nef reveals critical motifs for the development of an AIDS-like disease in CD4C/HIV transgenic mice. *Virology* *327*, 273–286.
590. Crawley, E., Kay, R., Sillibourne, J., Patel, P., Hutchinson, I., and Woo, P. (1999). Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *42*, 1101–1108.
591. Calabrese, L.H., Kirchner, E., and Shrestha, R. (2005). Rheumatic complications of human immunodeficiency virus infection in the era of highly active antiretroviral therapy: emergence of a new syndrome of immune reconstitution and changing patterns of disease. *Semin. Arthritis Rheum.* *35*, 166–174.

592. Bekker, V., Scherpbier, H., Pajkrt, D., Jurriaans, S., Zaaijer, H., and Kuijpers, T.W. (2006). Persistent humoral immune defect in highly active antiretroviral therapy-treated children with HIV-1 infection: loss of specific antibodies against attenuated vaccine strains and natural viral infection. *Pediatrics* *118*, e315–22.
593. Wykes, M., Pombo, A., Jenkins, C., and MacPherson, G.G. (1998). Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *J. Immunol.* *161*, 1313–1319.
594. Kim, K.S., Park, J.-Y., Jou, I., and Park, S.M. (2009). Functional implication of BAFF synthesis and release in gangliosides-stimulated microglia. *J. Leukoc. Biol.* *86*, 349–359.
595. Mangino, G., Percario, Z.A., Fiorucci, G., Vaccari, G., Manrique, S., Romeo, G., Federico, M., Geyer, M., and Affabris, E. (2007). In vitro treatment of human monocytes/macrophages with myristoylated recombinant Nef of human immunodeficiency virus type 1 leads to the activation of mitogen-activated protein kinases, IkappaB kinases, and interferon regulatory factor 3 and to the release. *J. Virol.* *81*, 2777–2791.
596. 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.
597. Cancro, M.P., D’Cruz, D.P., and Khamashta, M.A. (2009). The role of B lymphocyte stimulator (BLyS) in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* *119*, 1066–1073.
598. Lesley, R., Xu, Y., Kalled, S.L., Hess, D.M., Schwab, S.R., Shu, H.-B., and Cyster, J.G. (2004). Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity* *20*, 441–453.
599. Liu, Z., and Davidson, A. (2011). BAFF and selection of autoreactive B cells. *Trends Immunol.* *32*, 388–394.
600. Vincent, F.B., Morand, E.F., and Mackay, F. (2012). BAFF and innate immunity: new therapeutic targets for systemic lupus erythematosus. *Immunol. Cell Biol.* *90*, 293–303.
601. Kuo, S.-H., Yeh, P.-Y., Chen, L.-T., Wu, M.-S., Lin, C.-W., Yeh, K.-H., Tzeng, Y.-S., Chen, J.-Y., Hsu, P.-N., Lin, J.-T., et al. (2008). Overexpression of B cell-activating factor of TNF family (BAFF) is associated with Helicobacter pylori-independent growth of gastric diffuse large B-cell lymphoma with histologic evidence of MALT lymphoma. *Blood* *112*, 2927–2934.
602. Huard, B. (2004). BAFF production by antigen-presenting cells provides T cell co-stimulation. *Int. Immunol.* *16*, 467–475.

603. Huard, B., Schneider, P., Mauri, D., Tschopp, J., and French, L.E. (2001). T cell costimulation by the TNF ligand BAFF. *J. Immunol.* *167*, 6225–6231.
604. Ye, Q., Wang, L., Wells, A.D., Tao, R., Han, R., Davidson, A., Scott, M.L., and Hancock, W.W. (2004). BAFF binding to T cell-expressed BAFF-R costimulates T cell proliferation and alloresponses. *Eur. J. Immunol.* *34*, 2750–2759.
605. Ji, F., Chen, R., Liu, B., Zhang, X., Han, J., Wang, H., Shen, G., and Tao, J. (2012). BAFF induces spleen CD4⁺ T cell proliferation by down-regulating phosphorylation of FOXO3A and activates cyclin D2 and D3 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *425*, 854–858.
606. Lai Kwan Lam, Q., King Hung Ko, O., Zheng, B.-J., and Lu, L. (2008). Local BAFF gene silencing suppresses Th17-cell generation and ameliorates autoimmune arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 14993–14998.
607. Kader, M., Wang, X., Piatak, M., Lifson, J., Roederer, M., Veazey, R., and Mattapallil, J.J. (2009). Alpha4(+)-beta7(hi)CD4(+) memory T cells harbor most Th-17 cells and are preferentially infected during acute SIV infection. *Mucosal Immunol.* *2*, 439–449.
608. Arthos, J., Cicala, C., Martinelli, E., Macleod, K., Van Ryk, D., Wei, D., Xiao, Z., Veenstra, T.D., Conrad, T.P., Lempicki, R.A., et al. (2008). HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat. Immunol.* *9*, 301–309.
609. Malaspina, A., Moir, S., Chaitt, D.G., Rehm, C.A., Kottlil, S., Falloon, J., and Fauci, A.S. (2007). Idiopathic CD4⁺ T lymphocytopenia is associated with increases in immature/transitional B cells and serum levels of IL-7. *Blood* *109*, 2086–2088.
610. Guerrier, T., Youinou, P., Pers, J.-O., and Jamin, C. (2012). TLR9 drives the development of transitional B cells towards the marginal zone pathway and promotes autoimmunity. *J. Autoimmun.* *39*, 173–179.
611. Gray, D., and Gray, M. (2010). What are regulatory B cells? *Eur. J. Immunol.* *40*, 2677–2679.
612. Siewe, B., Stapleton, J.T., Martinson, J., Keshavarzian, A., Kazmi, N., Demarais, P.M., French, A.L., and Landay, A. (2013). Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV CD8⁺ T cell function in vitro. *J. Leukoc. Biol.* *93*, 811–818.
613. Siewe, B., and Landay, A. (2012). Effector and regulatory roles for B cells in HIV infection? *Autoimmunity* *45*, 348–352.

614. Calmon-Hamaty, F., Combe, B., Hahne, M., and Morel, J. (2011). Lymphotoxin α revisited: general features and implications in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* *13*, 232.
615. Bar-Or, A., Fawaz, L., Fan, B., Darlington, P.J., Rieger, A., Ghorayeb, C., Calabresi, P.A., Waubant, E., Hauser, S.L., Zhang, J., et al. (2010). Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Ann. Neurol.* *67*, 452–461.
616. León, B., Ballesteros-Tato, A., Browning, J.L., Dunn, R., Randall, T.D., and Lund, F.E. (2012). Regulation of T(H)2 development by CXCR5⁺ dendritic cells and lymphotoxin-expressing B cells. *Nat. Immunol.* *13*, 681–690.
617. Arnon, T.I., Horton, R.M., Grigorova, I.L., and Cyster, J.G. (2013). Visualization of splenic marginal zone B-cell shuttling and follicular B-cell egress. *Nature* *493*, 684–688.
618. Zandvoort, A., and Timens, W. (2002). The dual function of the splenic marginal zone: essential for initiation of anti-TI-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood-borne antigens. *Clin. Exp. Immunol.* *130*, 4–11.
619. Baxendale, H.E., Davis, Z., White, H.N., Spellerberg, M.B., Stevenson, F.K., and Goldblatt, D. (2000). Immunogenetic analysis of the immune response to pneumococcal polysaccharide. *Eur. J. Immunol.* *30*, 1214–1223.
620. Zhou, J., Lottenbach, K.R., Barenkamp, S.J., and Reason, D.C. (2004). Somatic hypermutation and diverse immunoglobulin gene usage in the human antibody response to the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* Type 6B. *Infect. Immun.* *72*, 3505–3514.
621. Scott, M.G., Zachau, H.G., and Nahm, M.H. (1992). The human antibody V region repertoire to the type B capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae*. *Int. Rev. Immunol.* *9*, 45–55.
622. Insel, R.A., Adderson, E.E., and Carroll, W.L. (1992). The repertoire of human antibody to the *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide. *Int. Rev. Immunol.* *9*, 25–43.
623. Mascola, J.R., and Montefiori, D.C. (2010). The role of antibodies in HIV vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* *28*, 413–444.
624. Kwong, P.D., Mascola, J.R., and Nabel, G.J. (2013). Broadly neutralizing antibodies and the search for an HIV-1 vaccine: the end of the beginning. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 693–701.
625. Yates, N.L., Stacey, a R., Nolen, T.L., Vandergrift, N. a, Moody, M. a, Montefiori, D.C., Weinhold, K.J., Blattner, W. a, Borrow, P., Shattock, R., et al. (2013). HIV-1 gp41 envelope

IgA is frequently elicited after transmission but has an initial short response half-life. *Mucosal Immunol.* *6*, 692–703.

626. Cerutti, A., Puga, I., and Cols, M. (2011). Innate control of B cell responses. *Trends Immunol.* *32*, 202–211.

627. Kane, M.A., Folias, A.E., Wang, C., and Napoli, J.L. (2008). Quantitative profiling of endogenous retinoic acid in vivo and in vitro by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* *80*, 1702–1708.

628. Wojtal, K. a, Wolfram, L., Frey-Wagner, I., Lang, S., Scharl, M., Vavricka, S.R., and Rogler, G. (2013). The effects of vitamin A on cells of innate immunity in vitro. *Toxicol. In Vitro* *27*, 1525–1532.

629. Szatmari, I., and Nagy, L. (2008). Nuclear receptor signalling in dendritic cells connects lipids, the genome and immune function. *EMBO J.* *27*, 2353–2362.

630. Brenchley, J.M., Price, D.A., Schacker, T.W., Asher, T.E., Silvestri, G., Rao, S., Kazzaz, Z., Bornstein, E., Lambotte, O., Altmann, D., et al. (2006). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat. Med.* *12*, 1365–1371.

631. Renga, B., Francisci, D., D'Amore, C., Schiaroli, E., Carino, A., Baldelli, F., and Fiorucci, S. (2012). HIV-1 infection is associated with changes in nuclear receptor transcriptome, pro-inflammatory and lipid profile of monocytes. *BMC Infect. Dis.* *12*, 274.

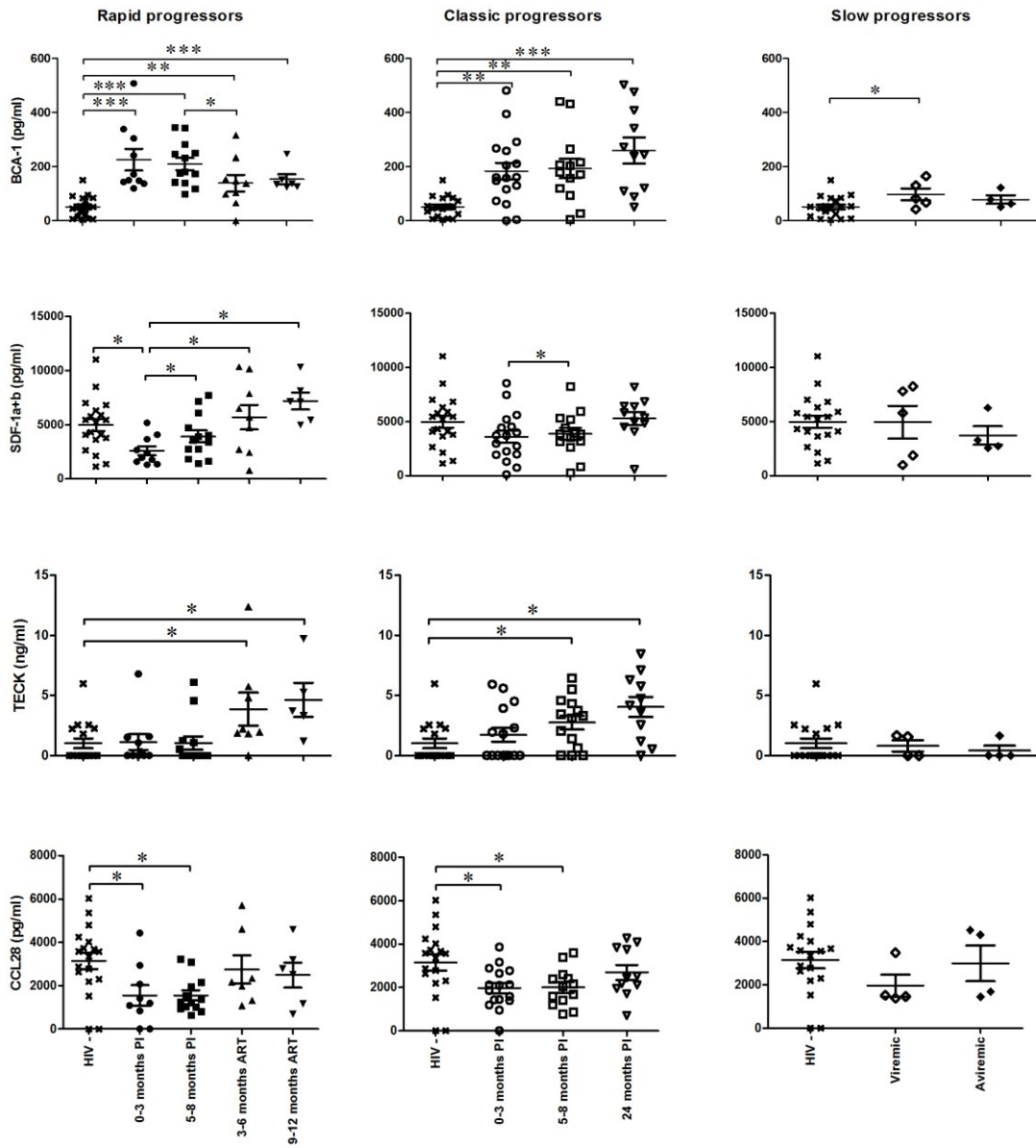
632. Toma, E., Devost, D., Chow Lan, N., and Bhat, P. V (2001). HIV-protease inhibitors alter retinoic acid synthesis. *AIDS* *15*, 1979–1984.

Annexes

Figure annexe 1

Comparaison de la concentration plasmatique de chimiokines. Les concentrations plasmatiques de A) BCA-1, B) SDF-1 α + β , C) TECK et D) CCL28 chez les progresseurs rapides (panneaux de gauche), les progresseurs classiques (panneaux centraux) et les progresseurs lents (panneaux de droite). Les mêmes valeurs pour les individus non infectés au VIH-1 sont utilisées comme groupe contrôle, et sont retrouvées dans tous les panneaux. Les concentrations plasmatiques ont été mesurées par l'utilisation de trousse ELISA disponible commercialement, et elles ont été analysées en utilisant le test statistique Wilcoxon signed-rank pour les comparaisons paires entre les différents stades de l'infection à l'intérieur d'un groupe de progression, et test Mann-Whitney U afin de comparer les différents groupes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$. PI, postinfection; ART, thérapie antirétrovirale.

Figure annexe 1. Comparaison de la concentration plasmatique de chimiokines.



Annexe 2

Influence of Dendritic Cells on B-cell Responses during HIV infection

Johanne Poudrier, Josiane Chagnon-Choquet, et Michel Roger

Statut : Publié dans Clinical and Developmental Immunology, Volume 2012, Article ID 592187, 10 pages, doi:10.1155/2012/592187

Contribution des co-auteurs :

Johanne Poudrier, Josiane Chagnon-Choquet et Michel Roger ont participé à la rédaction de l'article.

Influence of Dendritic Cells on B cell responses during HIV infection

Johanne Poudrier^{1,2*}, Josiane Chagnon-Choquet^{1,2} and Michel Roger^{1,2*}

¹ Laboratoire d'immunogénétique, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM),

and ² Département de Microbiologie et Immunologie de l'Université de Montréal, Canada.

*Johanne Poudrier and Michel Roger are co-senior authors

[Redacted text block]

Financial support: This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Réseau SIDA from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). M Roger is recipient of a Research Scholar award from the FRSQ.

Abstract

Dendritic cells (DC) modulate B cell differentiation, activation and survival mainly through production of growth factors such as B Lymphocyte Stimulator (BLyS/BAFF). DC populations have been reported to be affected in number, phenotype and function during HIV infection and such alterations may contribute to the dysregulation of the B cell compartment. Herein, we reflect on the potential impact of DC on the pathogenesis of HIV-related B cell disorders, and how DC status may modulate the outcome of mucosal B cell responses against HIV, which are pivotal to the control of disease. A concept that could be extrapolated to the overall outcome of HIV disease, whereby control *vs* progression may reside in the host's capacity to maintain DC homeostasis at mucosal sites, where DC populations present an inherent capacity of modulating the balance between tolerance and protection, and are amongst the earliest cell types to be exposed to the virus.

Abstract word count: 149

Running Title: Influence of Dendritic cells on HIV-related B cell disorders

Keywords: HIV, Dendritic cells, B Lymphocytes, BLyS/BAFF, Disease Control *vs* Progression

1. Introduction

Based on the study of natural correlates of protection against HIV infection, the overall outcome of disease may depend on the host's capacity to control the extent of inflammation and preserve systemic integrity by constraining immune activity to mucosal tissues, where viral exposure occurs. There, DCs are one of the earliest cell types to be exposed to the virus, and present an inherent capacity to orchestrate a homeostatic balance between tolerance and protection [1-4]. It is likely that the incapacity to keep a balance in these homeostatic processes will promote inflammation and lead to disease progression [5]. In contrast, the capacity to maintain immune homeostasis at mucosal sites will probably allow for better control of HIV-infection. The general effects of HIV-infection and disease on DC populations have been recently reviewed [1-4] and are beyond the scope of this work. This perspective review will focus on the potential impact of DCs on HIV-related B cell disorders and responses.

Although the vast majority of HIV-infected individuals can now achieve and maintain viral suppression with modern antiretroviral therapy (ART), their life expectancy remains much shorter than the general population and they continue to be at much higher risk for non-AIDS-associated diseases commonly associated with aging. B lymphocyte dysregulations are often observed during HIV infection [reviewed in 6], contributing to abnormal levels of immune activation and inflammation that may drive these clinical events. Given that the requirements of B cell populations differ according to their status and stage of differentiation, they are likely to be affected differentially by the HIV context, a process reflected by events such as polyclonal activation, breakage of tolerance, altered sub-population dynamics, exhaustion, as well as loss of the capacity to generate and maintain memory. All of which contribute to a global impairment of the humoral immune compartment, leading to deficiency in the generation of efficient anti-HIV responses.

Although the mechanisms involved in the triggering and progression of HIV-related B cell disorders remain largely unknown, it has been suggested that they result from high viremia and an impaired CD4⁺ T cell compartment [6]. However, ART does not appear to fully restore the B cell compartment since autoimmune manifestations and malignancies are still detected despite recovery of CD4⁺ T cell counts and suppression of viral replication by

ART. In fact, the B cell disease seems to progress and differ in subtype depending on the level of CD4⁺ T cell compartment alteration/reconstitution [6]. The fact that some B cell disorders can persist despite successful ART and in absence of apparent disease progression [6-10], suggests that factors other than and/or complementary to viral load and CD4⁺ T cells may contribute to HIV-related B cell dysregulations. It is unlikely that they result from direct infection of B cells. Indeed, despite the fact that HIV has been shown to replicate in CD40 stimulated B cells *in vitro* [11-13], the virus has not yet been shown to infect or replicate in B cells *in vivo* [6, 11-17]. Moreover, although Epstein-Barr virus (EBV) has been reported to be involved in the AIDS-related B cell dysregulations leading to lymphomas, only 30-40% of the complications are EBV related and more so the result of chronic stimulation [18].

DCs are involved in the outcome of B cell development, differentiation and survival, in T-dependent and T-independent manners, mainly through production of the tumour necrosis factor (TNF)-family members B lymphocyte stimulator (BLyS/BAFF) and a proliferation-inducing ligand (APRIL) [19-20]. BLyS is involved in transitional immature (TI) B cell survival and ontogenesis, and both BLyS and APRIL have been shown to promote B cell differentiation by inducing molecular events characteristic of class switch recombination (CSR) leading to secretion of isotype switched Ig when in conjunction with signals delivered via the B cell receptor (BCR) or Toll like receptors (TLRs) [21-24].

Interestingly, we have recently demonstrated that BLyS over-expressing myeloid DCs (mDCs) are present in the blood of HIV-infected rapid and classic progressors, as soon as in the acute phase of infection and persisting despite successful therapy. Accordingly, these individuals present B cell dysregulations favouring the overall inflammatory burden and preventing effective viral eradication. In contrast, HIV elite controllers had normal levels of BLyS expression on their blood mDCs, and presented an unaltered blood B cell compartment. These observations suggest that the extent to which HIV disease progression is controlled may be linked to the integrity of the DC compartment and to its capacity to orchestrate B cell population dynamics and responses.

2. Observations with the HIV transgenic (HIV-Tg) mouse system

Early data supporting the hypothesis that DCs are involved in the dysregulation of the B cell compartment in the context of HIV, were obtained with HIV-Tg mice expressing the coding regions for proteins Rev, Env and/or Nef of HIV-1, under the control of the human CD4 promoter and mouse CD4 enhancer, which drive expression in CD4⁺ T cells, macrophages and DCs [25-27]. HIV-Tg mice develop a disease which is dependent on *nef* and comparable to many aspects of human AIDS [25-26]. In these animals, total B cell numbers were increased in lymph nodes (LN) and spleen, the latter which presented a particularly enlarged marginal zone (MZ) [25-26, 28]. Polyclonal B cell activation was reflected by hyperglobulinemia and accumulation of anti-dsDNA auto-antibodies in serum, as well as by spontaneous hyper-reactivity *in vitro* [28]. The capacity to generate germinal center (GC) reactions and mount matured antibody responses following immunisation was also severely impaired in these animals [28]. Soluble Nef has been shown to penetrate B cells and/or to be propelled via macrophage extensions, suppressing Ig CSR by blocking CD40 signalling and thus impairing the capacity of generating high affinity T-dependent memory B cell responses [29-30]. However, B cells enriched from the spleen of HIV-Tg mice behaved similarly to those of littermate controls by CSR in response to anti-CD40 stimulation *in vitro*, suggesting that soluble Nef was not mainly responsible for the impaired capacity of these animals to generate isotype switched Ig following immunisation [28]. Whether propelling of soluble Nef operates in the context of DC collaboration with B cells remains to be established. The direct effects of Nef on B cells are likely to vary with the status and activation requirements of the different B cell sub-populations, and DCs may modulate these responses accordingly.

Therefore, as reported in humans, HIV-Tg mice present polyclonal B cell activation and breakage of tolerance as well as an impaired capacity to generate high affinity adaptive humoral responses. Interestingly, CD11c⁺CD11b^{hi} mDCs from HIV-Tg mice accumulated at entry points of secondary lymphoid organs (SLO) [31], in the LN sub-capsular sinus as well as in the MZ of the spleen [28, 32]. Also, mDCs agglomerated among IgM^{bright} plasma cell foci in the red pulp adjacent to the MZ. The fact that blood derived immature mDCs are the primary cells that efficiently capture and transport particulate Ag to the splenic MZ, where

they provide signals to Ag-specific MZ B cells [33-34], suggest that their accumulation at such sites likely contributes to the enlargement of the MZ B cell population, as well as to the polyclonal activation and breakage of tolerance observed in HIV-Tg animals [28]. This most possibly involves delivery of “altered and/or excessive” contact events and/or B cell growth factors, such as BLyS, as mDCs from HIV-Tg mice were shown to be altered in their numbers, phenotype and stimulatory functions [32].

BLyS over-expressing mice also present enlarged splenic MZ, B cell hyperactivity and autoimmunity [35], a phenotype also shared by autoimmune-regulatory-(AIRE)-deficient mice, in which BLyS levels are elevated in serum and over-expressed by peripheral blood CD11c⁺ DC and stimulated bone marrow-derived DCs [36-37]. Of note, AIRE is involved in regulation of STAT1 signalling, a pathway shown to be used by the HIV Nef protein to promote a pro-inflammatory phenotype by human monocyte-derived macrophages [38-39] and likely in modulation of the over-expression of TNF- α by human monocyte-derived DCs [40]. The HIV protein Nef is released early and can be measured in the serum of HIV-infected patients [41]. Furthermore, Nef was reported to penetrate DCs and to alter DC maturation and function, and to induce distinct cytokine/chemokine secretion patterns [1]. Thus early HIV-released products such as Nef, may play an important role in modulating DC phenotype, likely influencing the outcome of B cell disease progression.

Several other HIV products are also likely to influence DCs. Indeed, HIV ssRNA, gp120 and Tat are considered to be major modulators of cellular activation via microbial pattern recognition receptors (PRR), including TLRs, which DC populations express a wide range, and which prior engagement lead to subversion of the immune response [42]. Interestingly, HIV-ssRNA is recognised by TLR7, which signalling was shown to regulate human monocyte-derived DC-dependent B cell responses through up-regulation of BLyS [43]. As such, both mDCs and plasmacytoid (pDCs) enriched from the blood of primary HIV-infected individuals were found to be hyper-responsive to TLR7 agonists and produced high amounts of cytokines and chemokines upon stimulation [44]. HIV-gp120 has also been shown to mediate B cell polyclonal activation, driving CSR in a BLyS-dependent manner [45].

Altogether, these observations support a role for DCs and BLyS in triggering and driving B cell dysregulations in the context of HIV.

3. HIV disease progression: Role for BLyS over-expressing mDCs in driving B cell dysregulations

In recent longitudinal studies involving HIV-infected individuals with different rates of disease progression, we have shown that mDC frequencies were reduced in the blood of rapid and classic progressors, as soon as in the acute phase of infection and persisting throughout the course of disease despite successful therapy [46]. The low blood levels of mDCs correlated with increased serum levels of DC-tropic chemokines CCL2, CCL19 and CCL20, suggesting drainage to peripheral sites [47]. Most importantly, our studies have revealed increased levels of BLyS expression in the plasma and on the surface of these blood mDCs [7]. Therefore, mDCs may play a major role in perpetuating B cell dysregulations, as they over-express BLyS and are recruited to peripheral sites. Furthermore there might be a pressure towards monocyte-driven differentiation into BLyS over-expressing mDCs, since BLyS over-expressing CD11c⁺CD14⁺CD16⁻ monocytes, precursors of DCs [48-49], were increased in the blood of chronically infected rapid and classic progressors [7, 46]. Interestingly the murine analogue of the CD11c⁺CD14⁺CD16⁻ population (Gr-1^{hi} monocytes) are linked to the formation of “Tip-DCs” which are a source of inflammatory cytokines and TNF [49].

Consistently, in HIV progressors, B cell dysregulations were found throughout follow-up and were accompanied by the increased frequency of a population presenting features shared by both transitional immature (TI) and circulating MZ-like B cells, bearing a CD1c⁺CD21^{lo}IgM^{hi}CD10⁺CD27⁺ phenotype, which we have termed “precursor/activated MZ-like” B cells [7]. Of course the human MZ is a complex heterogeneous niche, and MZ-like B cells have been shown to recirculate in humans and are not restricted to the spleen [50]. Further characterization is thus required to identify the exact nature of these B cells. Nevertheless, we believe these cells represent a “first line” B cell population that increases in the context of inflammatory conditions such as in HIV infection. These findings are in line with the recently described defects of IgM⁺ “memory” B cells reported for some HIV-infected

individuals [6]. TI B cells have been found to be elevated [51] and to preferentially give rise to MZ type B cells in conditions of lymphopenia associated with pathology [52]. The fact that TI B cells are hyper-responsive to BLYS [21], and are increased in the blood of HIV-infected patients with advanced disease [53], suggests that mDC expressing high levels of BLYS may contribute to increased survival of TI B cells and favoured selection into a MZ-like “first line” B cell pool [54].

These observations suggest that the DC-mediated B cell dysregulation process we are proposing would likely, although not solely, affect immature and “first line” B cell populations. Given their location in lymphoid organs and mucosal-associated structures, “first line” B cell populations are highly influenced by DC and constitute early T cell-independent defence against invading pathogens [22]. Also, given their frequent auto-reactive and cross-reactive repertoires and their relative hyperactivity, these populations are often found in pathologic conditions associated with infections, autoimmunity and lymphomas [21-22]. This likely involves chronic stimulation and excessive delivery of survival signals [16, 21-22, 55], which altogether may overcome mechanisms of peripheral tolerance and homeostasis. The aberrant expression of BLYS and/or its receptors is often linked to B cell autoimmunity and malignancies [21, 56-58]. As such, anergic auto-reactive B cells were shown to evade negative selection when provided with excess BLYS [56-57]. Recently, excess BLYS was found to be involved in the breakdown of B cell tolerance in Sjögren’s syndrome, favouring expansion of TI and MZ-like B cells [21]. This is reminiscent of events observed during the course of HIV infection, and is in line with correlations between the elevated blood levels of auto-reactive antibodies (Abs) and high levels of BLYS expression in the plasma and on the cell surface of blood monocytes in HIV-infected individuals [59-60].

Altogether, the above observations are consistent with the model by which, in the context of HIV disease progression, the high turnover of peripheral DCs may promote the recruitment of BLYS over-expressing monocytic precursors and mDCs, likely contributing to an inflammatory milieu and modulating the outcome of B cell responses (Figure 1). However, as to whether this process is regulated by the host response and/or modulated by direct and indirect viral effects, remains to be established. Likely explanations involve factors such as

HIV-products, excessive apoptosis and release of auto-Ag, as well as products from microbial translocation resulting from breakage of mucosal integrity. Interestingly, levels of products from microbial translocation such as LPS, LBP and sCD14 were elevated in the blood of HIV progressors harbouring increased frequencies of B_{LyS} over-expressing mDCs and of “precursor/activated MZ-like” B cells [7, 46].

4. Control of HIV disease progression: preservation of B_{LyS} expression status by mDC favours efficient B cell responses

In contrast to that observed in rapid and classic HIV progressors, blood mDC levels and B_{LyS} expression status were unaltered in HIV elite controllers [7, 46]. However, monocytic DC precursors of a CD11c⁺CD14⁺CD16⁺ phenotype, which murine analogs are thought to settle peripheral organs in steady state conditions [48-49], were found to be significantly increased in their blood [46], suggesting high turnover in absence of excessive inflammation. Also, although the blood B cell compartment remained unaltered in HIV elite controllers, their blood level of mature MZ-like B cells was lower when compared to that in both rapid and classic progressors, as well as to healthy donors [7]. This suggests that recruitment of this “first line” population to peripheral sites may be beneficial to the host and “control” process. Although our observations in HIV elite controllers may reflect early stages of malfunction, we rather favour the view by which HIV-mediated disease control may be an active process involving DC populations, preventing B cell dysregulation and favouring the generation of first line as well as effective broadly neutralizing anti-HIV antibody responses. In line with this, the capacity of some HIV-infected individuals to produce potent broadly neutralizing antibodies constitutes a good correlate of prognosis against disease progression [61]. Indeed, the relatively poor antigenicity and silenced immunogenicity of HIV-Env neutralization epitopes preclude the induction of efficient neutralising Abs in most HIV-infected individuals [62]. Needless to say that understanding the generation of such antibodies has become pivotal to the pursue of HIV vaccine research [63].

Given that mucosal DC populations are gate-keepers of peripheral integrity and amongst the first to be involved in the battle against HIV, it is likely that they influence the outcome of mucosal B cell responses against the virus. IgA is the most abundant mucosal Ig and aids

several functions including immune-mediated exclusion of both pathogenic and commensal micro-organisms [22, 64]. High levels of mucosal HIV-specific IgA have been found in highly-exposed persistently seronegative (HEPS) individuals [65], whereas mucosal HIV-specific IgA responses are rather low in HIV progressors [6]. Although the issue of “protection” conferred by mucosal HIV-specific IgA remains controversial [65], in many studies these Igs have been found to neutralize HIV infection and inhibit viral transcytosis *in vitro*. A recent study on HIV-gp41 specific mucosal IgA, produced by cervical B cells from HEPS individuals, demonstrated evidence for hypermutation and affinity maturation [66]. These observations based on natural control/immunity vs HIV suggest that efforts to develop an effective vaccine against HIV should consider soliciting HIV-specific mucosal IgA production. In support of this are the recent findings by Bomsel *et al*; demonstrating that mucosal IgA and IgG, elicited through mucosal vaccination with HIV-1 gp41 subunit virosomes in nonhuman primates, prevented systemic invasion following vaginal simian-HIV challenge, by blocking transcytosis and by mediating antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) [67]. Importantly, these animals lacked serum neutralizing antibody activity, highlighting the role of effector antibodies at the mucosal portal of entry, and their importance in preventing dissemination of HIV infection [68]. In humans, the Thai RV144 vaccine trial has been raising some hope. Although the nature of the immune responses responsible for the modest protection conferred (31%) have yet to be unravelled, it appears that the RV144 vaccine regimen may have elicited transient protective B-cell responses, which nature in terms of generation and effector mechanisms has become critical to define, and appear to involve short-lived antibody responses viewed to block HIV transmission at mucosal surfaces [69]. However, in light of the protection correlates data released at the AIDS Vaccine 2011 meeting in Bangkok, (J. Kim, B.F. Haynes and colleagues), high levels of plasma Env IgA, most probably monomeric, correlated with a 54% increased risk of infection. This is in line with our findings showing that rapid and classic HIV progressors presented hyper-IgA in their serum when compared to slow progressors and elite controllers [7]. Moreover, the fact that BLYS levels were increased in the blood and on the surface of mDC in rapid and classic progressors may have favoured serum hyper-IgA production. Indeed, over-expression of BLYS in Tg mice has been shown to favour monomeric hyper-IgA CSR by spleen MZ B cells [70], a population

known to present enhanced IgA CSR potential [71] and, which we have shown to be activated and increased in the blood of rapid and classic HIV progressors [7]. Nevertheless, production of serum and mucosal IgA appear to follow different circuits, and requirements may differ depending on the sites of induction, the immuno-modulatory milieu and B cell populations responding [72]. It is therefore possible that high levels of monomeric IgA in the blood may increase risk of infection and systemic invasion, whereas the production of dimeric IgA at mucosal sites may confer protection. Unfortunately, there were no mucosal samples in the RV144 trial to assess mucosal dimeric Env IgA levels, which we would predict may constitute better correlates of protection.

Again, based on these observations, our model would suggest that systemic and mucosal BLyS expression status, likely contributes to the modulation of B cell responses against HIV. On one hand, BLyS expression patterns at mucosal ports of entry may promote mucosal IgA and also IgG, viewed to block systemic invasion by the virus. On the other hand, the incapacity to control these levels and constrain this immune activity to mucosal sites may allow breaching systemic integrity and perpetuating disease (Figure 1).

5. The importance of DCs at mucosal sites

DCs are involved in maintaining a balance between tolerance *vs* protective immunity at both the innate and adaptive levels, which process is pivotal at mucosal sites, where immune homeostasis processes warrant peripheral integrity, and where the main battle with HIV takes place [1-4]. Recent studies have demonstrated the importance of cross-talk between epithelial cells and mDC populations in maintenance of a homeostatic balance of regulatory *vs*. inflammatory responses at the mucosal level [73-75]. In the murine gut, two mDC populations have recently been given importance, the CD103⁺ and CD103⁻ mDC populations that derive from distinct precursors and are found in the mucosal associated lamina propria and draining lymphoid organs [76-77]. Murine gut lamina propria CD103⁺ mDC are known to support the generation and retention of IgA-producing B cells in the lamina propria through retinoic acid (RA) production [78]. Also, the tolerogenic capacity to modulate CD4⁺ T regulatory (Treg) lymphocytes is conferred by CD103⁺ mDC through transforming growth factor (TGF)- β and

RA-dependent mechanisms [73]. On the other hand, the CD103⁻ mDC population was shown to produce higher levels of pro-inflammatory cytokines and generate protective immunity [48], promoting the differentiation of CD4⁺ T mucosal effector lymphocytes [79]. Creating imbalance in these mDC populations by favouring CD103⁻ mDC reconstitution lead to experimental-induced colitis in a TNF- α -dependent manner [76-77]. Analogous mucosal mDC populations have been described in the human gut [73] and more recently in the human lung, where they have been shown to differentiate from monocyte populations [80]. Based on these observations, it is tempting to speculate that in the context of HIV infection, the incapacity to keep a balance in homeostatic mucosal mDC populations, may allow for increased “pro-inflammatory” mDC, possibly over-expressing BLyS, to accumulate at mucosal sites, where they contribute to the imbalance of T regulatory/effector ratios and modulate the outcome of mucosal B cell responses.

Although IgA⁺ plasma cells are generated mainly in the mucosal associated lymphoid tissue (MALT) through a T-dependent mechanism, IgA⁺ cell differentiation has also been shown to be modulated in the MALT in a T-independent fashion through factors such as RA and cytokines such as BLyS and APRIL produced by mDCs. Also, mDCs were found to support T-independent IgA class switch recombination in human lamina propria via production of APRIL [22, 64]. Interestingly in mice, both conventional B2 and first line IgM⁺ peritoneal B1 cells, have been shown to migrate directly to the gut lamina propria and differentiate into IgA producing cells [64], through help provided by lamina propria mDCs. Importantly, TLR-mediated epithelial cell:DC cross-talk at the level of human tonsillar crypts was shown to orchestrate B cell CSR through modulation of BLyS levels via epithelial cell secretion of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) [75]. Work by Fontenot et al [81] demonstrated that HIV induces human genital mucosal epithelial cells to produce TSLP, activating mDCs, which in turn promote HIV-1 replication in CD4⁺ T cells. Furthermore, in rhesus macaques, increased TSLP expression was found to be concurrent with viral replication in the vaginal tissues within the first 2 weeks after vaginal SIV exposure. Therefore, these studies suggest that levels of TSLP involved in the cross-talk between mucosal epithelial cells

and mDCs may contribute to modulating B_{LyS} levels, and this may be important in modulating the fate of HIV infection in mucosa, and the outcome of disease progression.

Based on these observations, it is reasonable to think that the incapacity to keep a balance in homeostatic epithelial cell:DC cross-talk processes, which is likely to occur in individuals who progress with HIV infection, will promote inflammation and lead to disease perpetuation. In contrast, the capacity to maintain immune homeostasis at mucosal sites may allow for better control of immune responsiveness and HIV infection. This view is consistent with a report showing that early prevention of macrophage inhibitory protein (MIP)-3 α (CCL20) production in the genital tract of SIV-susceptible female macaques prevented excessive recruitment of pDC and mDC populations, establishment of an inflammatory milieu and infection, despite repeated intra-vaginal exposure to high doses of SIV [82]. Furthermore, studies of SIV infection in non-pathogenic animal models have shown that their control of disease progression appears linked to better management of the aberrant immune activation by early onset of anti-inflammatory IL-10 production and T regulatory activity. Mucosal Th17 effectors are the main targets for HIV/SIV in the gut and massive depletion of these cells [83-86] contributes to the breakage of integrity of the mucosal barrier and microbial translocation from the gut, characteristic of pathogenic infections [87]. Fewer, Th17 effector target cells were generated in non-pathogenic than in pathogenic SIV infections [88], a process linked to a low type I interferon (IFN)-gene profile and low TLR7-signalling [89]. Interestingly, both type I IFN- and TLR7-signalling have been shown to be involved in regulation of B_{LyS} expression patterns by DC populations [43, 90].

6. Role of DC in modulating B cell effector/regulatory responses in the context of HIV

The influence of DC in the outcome of B cell responses against HIV may modulate the outcome of CD4⁺ T cell effectors/targets for the virus. Indeed, there is an increasing body of experimental evidence demonstrating the role of B cells in regulating the development, proliferation and maintenance of CD4⁺ effector, memory as well as regulatory T cell populations, through both contact and/or cytokine mediated effector/regulatory functions [91-92]. The increased lymphotoxin “effector” to IL-10 “regulatory” B cell ratio was recently

demonstrated in the pathophysiology of multiple sclerosis (MS), promoting pro-inflammatory T cell effector functions [93]. MS patients treated with a single course of Rituximab, a monoclonal antibody that selectively targets and depletes CD20⁺ B lymphocytes but not plasmablasts, presented lower inflammatory brain lesions and clinical relapses, characterised by the reduction in effector T lymphocyte infiltrates as well as decreased pro-inflammatory Th1 and Th17 responses [94].

Episodic depletion of B cells is an effective therapy for several T cell-mediated autoimmune diseases by promoting the emergence of regulatory B cell populations that will hopefully prevent the reactivation of remaining autoreactive T cells [91]. The fact that at low concentrations BLYS was shown to favour IL-10-production by murine splenic MZ “regulatory” B cells, whereas elevated BLYS concentrations rather promoted MZ B cell activation and differentiation, suggests that BLYS may play an important role in modulating the nature of B cell functions and subsequently the outcome of Treg/T effector balance [95]. As such, blocking of BLYS, which has been used as a therapeutic target in clinical trials for the treatment of autoimmune disorders such as systemic lupus erythematosus (SLE) [58], may also be efficient in modulating this balance. In this view, decreased effector CD4⁺ T cell functions and increased regulatory CD4⁺ T cell functions were observed following treatment of NOD mice (model for type I diabetes) with the B cell maturation antigen (BCMA)-Fc construct, which blocks BLYS-mediated survival signals for B cells. In a collagen-induced model of rheumatoid arthritis, BLYS over-expression was shown to promote the expansion of Th17 effector cells, and BLYS gene silencing inhibited DC driving of Th17-cell differentiation *in vitro* [96]. These observations suggest that DCs may influence T cell differentiation and effector target CD4⁺ T cell availability for HIV in a BLYS-mediated manner either directly and/or indirectly via modulation of B cell functions.

Concluding remarks

The extent to which HIV disease progression is controlled may be linked to the integrity of the DC compartment and BLYS expression status, and to its capacity of orchestrating B cell

population dynamics and responses. This may be best achieved at mucosal sites, where DC populations present an inherent capacity of modulating the balance between tolerance and protection, and are amongst the earliest cell types to be exposed to the virus. It is therefore likely that they influence mucosal B cell responses against HIV, which in turn modulate the outcome of CD4⁺ T cell effectors, prime targets for the virus. The early assessment of BLyS levels as well as DC and B cell population statuses have great prognostic value in predicting the clinical course of HIV infection. This should be bared in mind in the design of future preventive vaccines, which should aim at inducing first line as well as adaptive mucosal B cell responses to block systemic invasion by the virus at the initial site of exposure. Therapeutic approaches viewed to control BLyS levels may also be promising to reduce both HIV target cells and systemic immune activation that are the hallmarks of HIV disease progression and AIDS-associated diseases such as cancers, autoimmune and cardiovascular disorders.

Acknowledgements

We are thankful to M. Christian Charbonneau for excellent graphic arts expertise.

References

- [1] N. Derby, E. Martinelli, and M. Robbiani, “Myeloid dendritic cells in HIV-1 infection,” *Current Opinion in HIV and AIDS*, vol. 6, pp. 379–384, 2011.
- [2] M. van der Vlist, A.M.G. van der Aar, S. I. Gringhuis, and T.B.H. Geijtenbeek, “Innate signaling in HIV-1 infection of dendritic cells,” *Current Opinion in HIV and AIDS*, vol. 6, pp. 348–352, 2011.
- [3] A. Smed-Sørensen, and K. Loré, “Dendritic cells at the interface of innate and adaptive immunity to HIV-1,” *Current Opinion in HIV and AIDS*, vol. 6, pp. 405–410, 2011.
- [4] F. Blanchet, A. Moris, J. P. Mitchell, and V. Piguet, “A look at HIV journey: from dendritic cells to infection spread in CD4R T cells,” *Current Opinion in HIV and AIDS*, vol. 6, pp. 391–397, 2011.
- [5] J. M. Brenchley, D. A. Price, and D.C. Douek, “HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe?,” *Nature Immunology*, vol. 7, pp. 235-239, 2006.
- [6] S. Moir, and A.S. Fauci, “B cells in HIV infection and disease,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 9, pp. 235-245, 2009.
- [7] J. Fontaine, J. Chagon-Choquet, H.S. Valcke, J. Poudrier, and M. Roger, “High expression levels of B Lymphocyte Stimulator (BLyS) by dendritic cells correlate with HIV-related B cell disease progression in humans,” *Blood*, vol. 117, pp. 145-155, 2011.
- [8] M.A. Jacobson, H. Khayam-Bashi, J.N. Martin, D. Black, and V. Ng, “Effect of long-term highly antiretroviral therapy in restoring HIV-induced abnormal B-lymphocyte function,” *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*, vol. 31, pp. 472-477, 2002.

- [9] L.H. Calabrese, E. Kirchner, and R. Shrestha, "Rheumatic complications of human immunodeficiency virus infection in the era of highly active antiretroviral therapy: emergence of a new syndrome of immune reconstitution and changing patterns of disease," *Seminars in Arthritis Rheumatology*, vol. 35, pp. 166-174, 2005.
- [10] V. Bekker, H. Scherpbier, D. Pajkrt, S. Jurriaans, H. Zaaijer, and T.W. Kuijpers, "Persistent humoral immune defect in highly active antiretroviral therapy-treated children with HIV-1 infection: loss of specific antibodies against attenuated vaccine strains and natural viral infection," *Pediatrics*, vol. 118, pp. e315-322, 2006.
- [11] S. Moir, R. Lapointe, A. Malaspina et al., "CD40-Mediated Induction of CD4 and CXCR4 on B Lymphocytes Correlates with Restricted Susceptibility to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection: Potential Role of B Lymphocytes as a Viral Reservoir," *Journal of Virology*, vol. 73, pp. 7972-7980, 1999.
- [12] S. Moir, A. Malaspina, Y. Li et al., "B Cells of HIV-1-infected Patients Bind Virions through CD21-Complement Interactions and Transmit Infectious Virus to Activated T Cells," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 192, pp. 637-645, 2000.
- [13] G. Gras, C. Legendre, R. Krzysiek, D. Dormont, P. Galanaud, and Y. Richard, "CD40/CD40L Interactions and Cytokines Regulate HIV Replication in B Cells *in Vitro*," *Virology*, vol. 220, pp. 309-319, 1996.
- [14] G.M. Shearer, "HIV-Induced Immunopathogenesis," *Immunity*, Vol. 9, pp. 587-593, 1998.

- [15] G. Rappocciolo, P. Piazza, C. L. Fuller et al., "DC-SIGN on B Lymphocytes Is Required for Transmission of HIV-1 to T Lymphocytes," *PloS Pathogens*, vol. 2, no. 7, pp. 691-704 e70, 2006.
- [16] A. S. Edelman, and S. Zolla-Pazner, "AIDS: A syndrome of immune dysregulation, dysfunction, and deficiency," *FASEB Journal*, vol. 3, pp. 22-30, 1989.
- [17] G. Gras, Y. Richard, P. Roques, R. Olivier, and D. Dormont, "Complement and Virus-Specific Antibody-Dependent Infection of Normal B Lymphocytes by Human Immunodeficiency Virus Type 1," *Blood*, vol. 81, pp.1808-1818, 1993.
- [18] J.G. Monroe, and L.E. Silberstein, "HIV-mediated B-lymphocyte activation and lymphomagenesis," *Journal of Clinical Immunology*, vol. 15, pp. 61-68, 1995.
- [19] F.D. Batista, and N.E. Harwood, "The who, how and where of antigen presentation to B cells," *Nature Reviews Immunology*, vol. 9, pp. 15-27, 2009.
- [20] G. Macpherson, N. Kushnir, and M. Wykes, "Dendritic cells, B cells and the regulation of antibody synthesis," *Immunological Reviews*, vol. 172, pp. 325-34, 1999.
- [21] M.M. Varin, L. Le Pottier, P. Youinou et al., "B-cell tolerance breakdown in Sjögren's syndrome: focus on BAFF," *Autoimmunity Reviews*, vol. 9, no. 9, pp. 604-8, 2010.
- [22] A. Cerutti, I. Puga, and M. Cols, "Innate control of B cell responses," *Trends in Immunology*, Vol. 32, No. 5, pp. 202-211, 2011.

- [23] S.G. Tangye, V. L. Bryant, A. K. Cuss, and K. L. Good, "BAFF, APRIL and human B cell disorders," *Seminars in Immunology*, vol. 18, pp. 305-317, 2006.
- [24] M.B. Litinskiy, B. Nardelli, D.M. Hilbert et al., "DCs induce DC40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL," *Nature Immunology*, vol. 3, pp. 822-829, 2002.
- [25] Z. Hanna, D.G. Kay, N. Rebai, A. Guimond, S. Jothy, and P. Jolicoeur, "Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice," *Cell*, vol. 95, pp. 163-175, 1998.
- [26] Z. Hanna, D.G. Kay, M. Cool, S. Jothy, N. Rebai, and P. Jolicoeur, "Transgenic Mice Expressing Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Immune Cells Develop a Severe AIDS-Like Disease," *Journal of Virology*, vol. 72, pp. 121-132, 1998.
- [27] Z. Hanna, N. Rebai, J. Poudrier, and P. Jolicoeur, "Distinct regulatory elements are required for faithful expression of human CD4 in T cells, macrophages, and dendritic cells of transgenic mice," *Blood*, vol. 98, pp. 2275-2278, 2001.
- [28] J. Poudrier, X. Weng, D.G. Kay et al., "The AIDS disease of CD4C/HIV transgenic mice shows impaired germinal centers and autoantibodies and develops in the absence of IFN-gamma and IL-6," *Immunity*, vol. 15, pp. 173-185, 2001.
- [29] X. Qiao, B. He, A. Chiu, D.M. Knowles, A. Chadburn, and A. Cerutti, "Human immunodeficiency virus 1 Nef suppresses CD40-dependent immunoglobulin class switching in bystander B cells," *Nature Immunology*, vol. 7, pp. 302-310, 2006.

- [30] W. Xu, P.A. Santini, J.S. Sullivan et al., “ HIV-1 Evades virus-specific IgG2 and IgA responses by targeting systemic and intestinal B cells via long-range intercellular conduits, ” *Nature Immunology*, vol. 10, pp. 1008-1017, 2009.
- [31] D. Alvarez, E. H. Vollmann, and U. H. von Andrian, “Mechanisms and Consequences of Dendritic Cell Migration,” *Immunity*, vol. 29, pp. 325-342, 2008.
- [32] J. Poudrier, X. Weng, D.G. Kay, Z. Hanna, and P. Jolicœur, “The AIDS-like disease of CD4C/human immunodeficiency virus transgenic mice is associated with accumulation of immature CD11bHi dendritic cells,” *Journal of Virology*, vol. 77, pp. 11733-11744, 2003.
- [33] M. Balazs, F. Martin, T. Zhou, and J. F. Kearney, “Blood Dendritic Cells Interact with Splenic Marginal Zone B Cells to Initiate T-Independent Immune Responses,” *Immunity*, vol. 17, pp. 341-352, 2002.
- [34] A. Bergtold, D.D. Desai, A. Gavhane, and R. Clynes, “Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells,” *Immunity*, vol. 23, pp. 503-514, 2005.
- [35] F. Mackay, W.A. Figgett, D. Saulep, M. Lepage, and M.L. Hibbs, “B-cell stage and context-dependent requirements for survival signals from BAFF and the B-cell receptor,” *Immunological Reviews*, vol. 237, no. 1, pp. 205-225, 2010.
- [36] S. Hässler, C. Ramsey, M.C. Karlsson et al., “AIRE-deficient mice develop haematopoietic irregularities and marginal zone B-cell lymphoma,” *Blood*, vol. 108, pp.1941-1948, 2006.

- [37] E. Lindh, S.M. Lind, E. Lindmark et al., "AIRE regulates T-cell-independent B-cell responses through BAFF," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, pp. 18466-18471, 2008.
- [38] M. Federico, Z. Percario, E. Olivetta et al., "HIV-1 Nef activates STAT1 in human monocytes/macrophages through the release of soluble factors," *Blood*, vol. 98, pp. 2752-2761, 2001.
- [39] G. Mangino, Z.A. Percario, G. Fiorucci et al., "In vitro treatment of human monocytes/macrophages with myristoylated recombinant NEF of human immunodeficiency virus type 1 leads to the activation of mitogen-activated protein kinases, IkappaB kinases, and interferon regulatory factor 3 and to the release of beta interferon," *Journal of Virology*, vol. 81, pp. 2777-2791, 2007.
- [40] M.G. Quaranta, E. Tritarelli, L. Giordani, and M. Viora, "HIV-1 Nef induces dendritic cell differentiation: a possible mechanism of uninfected CD4 (+) T cell activation," *Experimental Cell Research*, vol. 275, pp. 243-254, 2002.
- [41] Y. Fujii, K. Otake, M. Tashiro, and A. Adachi, "Soluble NEF antigen of HIV-1 is cytotoxic for human CD4+ T cells," *FEBS Letters*, vol. 393, pp. 93-96, 1996.
- [42] L. J. Young, N. S. Wilson, P. Schnorrer et al., "Dendritic cell preactivation impairs MHC class II presentation of vaccines and endogenous viral antigens," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 104, pp.17753-17758, 2007.

[43] H. Yu, Y. Liu, J. Han et al., “TLR7 regulates dendritic cell-dependent B cell responses through BLyS in immune thrombocytopenic purpura,” *European Journal of Haematology*, vol. 86, pp. 67-74, 2011.

[44] R.L. Sabado, M. O'Brien, A. Subedi et al., “Evidence of dysregulation of dendritic cells in primary HIV infection,” *Blood*, vol.116, no. 19, pp. 3839-3852, 2010.

[45] B. He, X. Qiao, P.J. Klasse et al., “HIV-1 envelope triggers polyclonal Ig class switch recombination through a CD40-independent mechanism involving BAFF and C-type lectin receptors,” *Journal of Immunology*, vol. 176, pp. 3931-3941, 2006.

[46] J. Fontaine, F. Coutlée, C. Tremblay, J.P. Routy, J. Poudrier, and M. Roger, “HIV infection affects blood myeloid dendritic cells after successful therapy and despite nonprogressing clinical disease,” *Journal of Infectious Disease*, vol. 199, pp. 1007-1018, 2009.

[47] J. Fontaine, J. Poudrier, and M. Roger, “Persistence of high blood levels of the chemokines CCL2, CCL19 and CCL20 during the course of HIV infection,” *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol. 27, pp. 655-657, 2011.

[48] M.L. del Rio, G. Bernhardt, J.I. Rodriguez-Barbosa, and R. Förster, “Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells,” *Immunological Reviews*, vol. 234, pp. 268-281, 2010.

[49] F. Tacke, and G.J. Randolph, “Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets,” *Immunobiology*, vol. 211, pp. 609-618, 2006.

- [50] J.C. Weill, S. Weller, and C.A. Reynaud, "Human Marginal Zone B cells," *Annual Review of Immunology*, vol. 27, pp. 267-85, 2009.
- [51] A. Malaspina, S. Moir, D.G. Chaitt et al., "Idiopathic CD4+ T lymphocytopenia is associated with increases in immature/transitional B cells and serum levels of IL-7," *Blood*, vol. 109, pp. 2086-2088, 2007.
- [52] G. Pantaleo, C. Graziosi, J.F. Demarest et al., "HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease," *Nature*, vol. 362, pp. 355-358, 1993.
- [53] A. Malaspina, S. Moir, J. Ho et al., "Appearance of immature/transitional B cells in HIV-infected individuals with advanced disease: correlation with increased IL-7," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, pp. 2262-2267, 2006.
- [54] M.P. Cancro, D.P. D`Cruz, and M.A.Khamashta, "The role of B Lymphocyte Stimulator (BLyS) in systemic lupus erythematosus," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 119, pp. 1066-73, 2009.
- [55] F. Suarez, O. Lortholary, O. Hermine, and M.Lecuit, "Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven lymphoproliferation," *Blood*, vol. 107, pp. 3034-3044, 2006.
- [56] R. Lesley, Y. Xu, S.L. Kalled et al., "Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF," *Immunity*, vol. 20, pp. 441-453, 2004.

- [57] M. Thien, T.G. Phan, S. Gardam et al., “Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches,” *Immunity*, vol. 20, pp. 785-798, 2004.
- [58] Z. Liu, and A. Davidson, “BAFF and selection of autoreactive B cells,” *Trends in Immunology*, vol 32, pp.388-394, 2011.
- [59] W. Stohl, G.S. Cheema, W.S. Briggs et al., “B lymphocyte stimulator protein-associated increase in circulating autoantibody levels may require CD4+ T cells: lessons from HIV-infected patients,” *Clinical Immunology*, vol. 104, pp. 115-122, 2002.
- [60] B. Rodriguez, H. Valdez, W. Freimuth et al., “Plasma levels of B-lymphocyte stimulator increase with HIV disease progression,” *AIDS*, vol. 17, pp. 1983-2000, 2003.
- [61] J.R. Mascola, and D.C. Montefiori, “The Role of Antibodies in HIV Vaccines,” *Annual Review of Immunology*, vol. 28, pp. 413–44, 2010.
- [62] P. J. Klasse, R. W. Sanders, A. Cerutti, and J. P. Moore, “How Can HIV-Type-1-Env Immunogenicity Be Improved to Facilitate Antibody-Based Vaccine Development?” *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol.27, DOI: 10.1089/aid.2011.0053, 2011.
- [63] D. R. Burton, and R. A. Weiss, “A Boost for HIV Vaccine Design,” *Science*, vol. 329, pp. 770-773, 2010.
- [64] S. Fagarasan, S. Kawamoto, O. Kanagawa, and K. Suzuki, “Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis,” *Annual Review of Immunology*, vol. 28, pp. 243-273, 2010.

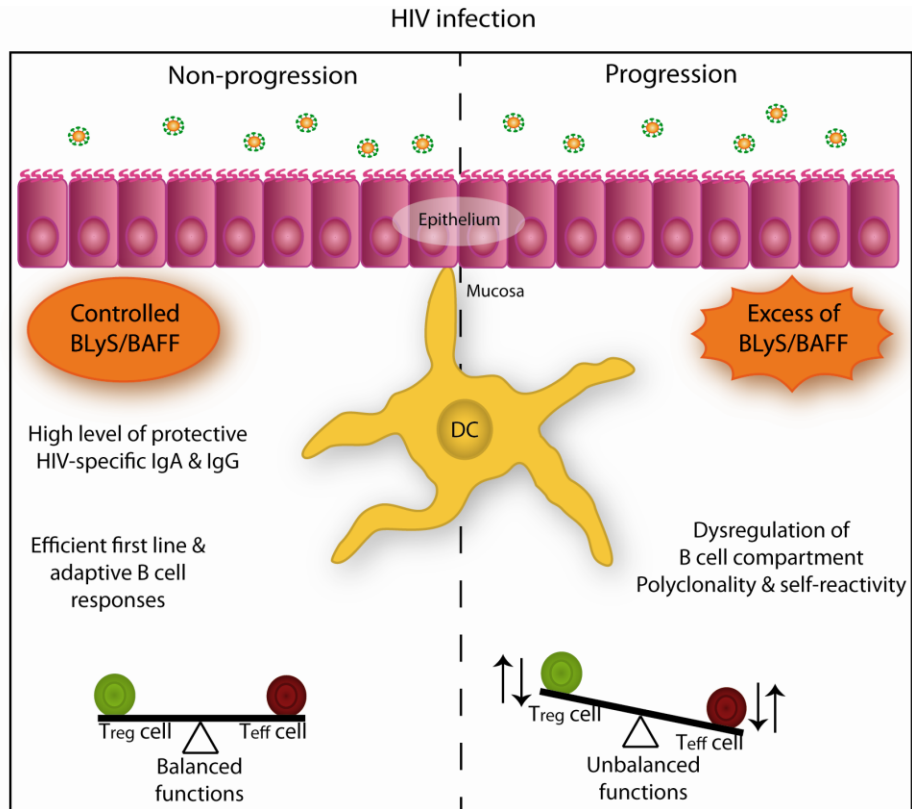
- [65] B.L. Shacklett, “Immune responses to HIV and SIV in mucosal tissues: ‘location, location, location,’” *Current Opinion in HIV AIDS*, vol. 5, pp. 128-134, 2010.
- [66] D. Tudor, M. Derrien, L. Diomedea et al., “HIV-1 gp41-specific monoclonal mucosal IgAs derived from highly exposed but IgG-seronegative individuals block HIV-1 epithelial transcytosis and neutralize CD4(+) cell infection: an IgA gene and functional analysis,” *Mucosal Immunology*, vol. 2, pp. 412-426, 2009.
- [67] M. Bomsel, D. Tudor, A.S. Drillet et al., “Immunization with HIV-1 gp41 subunit virosomes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges,” *Immunity*, vol. 34, pp. 269-280, 2011.
- [68] M.J. McElrath, “Standing Guard at the Mucosa,” *Immunity*, vol. 34, pp. 146-148, 2011.
- [69] G.D. Tomaras, and B.F. Haynes, “Strategies for eliciting HIV-1 inhibitory antibodies,” *Current Opinion in HIV and AIDS*, vol. 5, pp. 421–427, 2010.
- [70] M. Batten, and J. Groom, “BAFF mediates survival of peripheral immature B Lymphocytes,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 192, pp. 1453 – 1466, 2000.
- [71] D. A. Kaminski, and J. Stavnezer, “Enhanced IgA class switching in marginal zone and B1 B cells relative to follicular/B2 B cells,” *Journal of Immunology*, vol. 177 , pp. 6025 – 6029, 2006.
- [72] A.J. Macpherson, K.D. McCoy, F-E. Johansen, and P. Brandtzaeg, “The immune geography of IgA induction and Function,” *Mucosal Immunology*, vol. 1, pp.11-22, 2008.

- [73] M. Rescigno, and A. Disabatino, “Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 119, pp. 2441-2450, 2009.
- [74] S. Manicassamy, B. Reizis, R. Ravindran et al., “Activation of beta-catenin in dendritic cells regulates immunity versus tolerance in the intestine,” *Science*, vol. 329, no. 5993, pp. 849-853, 2010.
- [75] W. Xu, B. He, A. Chiu A et al., “Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI,” *Nature Immunology*, vol. 8, pp. 294-303, 2007.
- [76] M. Bogunovic, F. Ginhoux, J. Helft et al., “Origin of the lamina propria dendritic cell network,” *Immunity*, vol. 31, pp. 513-525, 2009.
- [77] C. Varol, A. Vallon-Eberhard, E.C. Elinav et al., “Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions,” *Immunity*, vol. 31, pp. 502-512, 2009.
- [78] S. Uematsu, K. Fujimoto, M.H. Jang et al., “Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5,” *Nature Immunology*, vol. 9, pp. 769-776, 2008.
- [79] K. Atarashi, J. Nishimura, T. Shima, et al., “ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation,” *Nature*, vol. 455, pp. 808-812, 2008.
- [80] C. Jakubzick, F. Tacke, F. Ginhoux, et al., “Blood Monocyte Subsets Differentially Give Rise to CD103⁺ and CD103⁻ Pulmonary Dendritic Cell Populations,” *Journal of Immunology*, vol.180, pp. 3019-3027, 2008.

- [81] D. Fontenot, H. Hea, S. Hanabuchia et al., "TSLP production by epithelial cells exposed to immunodeficiency virus triggers DC-mediated mucosal infection of CD4 T cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, pp. 16776-16781, 2009.
- [82] Q. Li, J.D. Estes, P.M. Schlievert et al., "Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV transmission," *Nature*, vol. 458, pp. 1034-1038, 2009.
- [83] M. Kader, X. Wang, M. Piatak et al., " $\alpha 4 + \alpha 7$ hi CD4 + memory T cells harbor most Th-17 cells and are preferentially infected during acute SIV infection," *Mucosal Immunology*, vol. 2, pp. 439-449, 2009.
- [84] J. M. Brenchley, M. Paiardini, K. S. Knox et al., "Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and non-pathogenic lentiviral infections," *Blood*, vol. 112, pp. 2826-2835, 2008.
- [85] D. Favre, S. Lederer, B. Kanwar et al., "Critical Loss of the Balance between Th17 and T Regulatory Cell Populations in Pathogenic SIV Infection," *PloS Pathogens*, vol. 5, no.2, e1000295, 2009.
- [86] J. Arthos, C. Cicala, E. Martinelli et al., "HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin $\alpha 4 \alpha 7$, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells," *Nature Immunology*, vol. 9, pp. 301-309, 2008.
- [87] J. M. Brenchley, D. A. Price, T. W. Schacker et al., "Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection," *Nature Medicine*, vol. 12, pp. 1365-1371, 2006.

- [88] D.L. Sodora, J.S. Allan, C. Apetrei et al., "Toward an AIDS vaccine: lessons from natural simian immunodeficiency virus infections of African nonhuman primate hosts," *Nature Medicine*, vol. 15, no. 8, pp. 861-865, 2009.
- [89] J.N. Mandl, A.P. Barry, T.H. Vanderford et al., "Divergent TLR7 and TLR9 signalling and type I interferon production distinguish pathogenic and nonpathogenic AIDS virus infection," *Nature Medicine*, vol. 14, pp. 1077-1087, 2008.
- [90] H. Tezuka, Y. Abe, J. Asano et al., "Prominent Role for Plasmacytoid Dendritic Cells in Mucosal T Cell-Independent IgA Induction," *Immunity*, vol. 34, pp. 247-257, 2011.
- [91] F.E. Lund, and T.D. Randall, "Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity," *Nature Reviews Immunology*, vol. 10, pp. 236-47, 2010.
- [92] D. Gray, and M. Gray, "What are Regulatory B cells?" *European Journal of Immunology*, vol. 40, pp. 2677-2679, 2010.
- [93] A. Bar-Or, L. Fawaz, B. Fan et al., "Abnormal B cell cytokine responses a trigger of T cell-mediated disease in MS?," *Annals of Neurology*, vol. 67, no. 4, pp. 452-61, 2010.
- [94] S.L. Hauser, E. Waubant, D.L. Arnold et al., "B cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis," *New England Journal of Medicine*, vol. 358, no. 7, pp. 676-88, 2008.
- [95] M. Yang, L. Sun, S. Wang et al., "Novel function of B cell-activating factor in the induction of IL-10-producing regulatory B cells," *Journal of Immunology*, vol. 184, no. 7, pp. 3321-5, 2010.

[96] Q. Lai Kwan Lam, O. King Hung Ko, B.J. Zheng, and L. Lu, "Local BAFF gene silencing suppresses Th17-cell generation and ameliorates autoimmune arthritis," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 39, pp. 14993-14998, 2008.



Legend to Figure 1: The implication of BlyS/BAFF expression status in the modulation of HIV-specific responses. Control of HIV infection is reflected by the capacity to regulate BlyS/BAFF expression status at mucosal sites, where the main battle against HIV takes place, promoting efficient HIV-specific B and T cell responses, viewed to block systemic invasion by the virus. In contrast, breaching of systemic integrity and progression of HIV infection is reflected by the incapacity to control BlyS/BAFF levels at mucosal sites, leading to dysregulated B and T cell responses, impairing the generation of highly protective HIV-specific immunity.

Annexe 3 - Liste des présentations réalisées par affiches et communications orales

J. Chagnon-Choquet, J Fontaine, J Roger, J. Poudrier* et M. Roger*. HIV-Nef contributes to B cell dysregulations by driving pro-inflammatory BLyS/BAFF over-expression by Dendritic cells. 10-15 février 2013. Keystone Symposium B Cell Development and Function/HIV Vaccines. Keystone, CO, USA. *Co-séniors sur le projet

J. Chagnon-Choquet, J Fontaine, J. Poudrier* et M. Roger*. Maintenance of Breg capacity and increased LT- α expression by first line MZ-like B cells is associated with control of HIV disease progression. 10-15 février 2013. Keystone Symposium B Cell Development and Function/HIV Vaccines. Keystone, CO, USA Communication orale *Co-séniors sur le projet

J. Chagnon-Choquet, J Fontaine, J. Poudrier* et M. Roger*. Détection de Nef dans le plasma et les cellules dendritiques de patients infectés au VIH. 18 décembre 2012. 15^e Congrès annuel des étudiants et stagiaires du CRCHUM. Montréal, Qc, Canada. *Co-séniors sur le projet

J. Chagnon-Choquet, J. Fontaine, J. Poudrier* et M. Roger*. Involvement of HIV Nef in driving BLyS/BAFF over-expression by dendritic cells. 30 novembre 2012. Symposium d'Immunologie Montréal sur Les cellules dendritiques – chef d'orchestre du système immunitaire, en commémoration du Dr Ralph Steinman. Montréal, Qc, Canada. *Co-séniors sur le projet

J. Chagnon-Choquet, J Fontaine, J. Poudrier* et M. Roger*. Détection de Nef dans le plasma et les cellules dendritiques de patients infectés au VIH. 2 novembre 2012. Journée des étudiants du Réseau FRSQ SIDA/MI. Montréal, Qc, Canada. Communication orale *Co-séniors sur le projet

J. Chagnon-Choquet, J. Fontaine, J. Poudrier* et M. Roger*. Involvement of HIV Nef in driving BLyS/BAFF over-expression by dendritic cells. 19-22 avril 2012. 21st Annual Canadian Conference on HIV/AIDS Research. Montréal, Qc, Canada. *Co-séniors sur le projet

J. Chagnon-Choquet, J Fontaine, J. Poudrier* et M. Roger*. L'implication de Nef dans les dérégulations des cellules B reliées à l'infection au VIH. 13 décembre 2011. 14^e Congrès annuel des étudiants et stagiaires du CRCHUM. Montréal, Qc, Canada. *Co-seniors sur le projet

J. Chagnon-Choquet, J Fontaine, J. Poudrier* et M. Roger*. L'implication de Nef dans les dérégulations des cellules B reliées à l'infection au VIH. 18 novembre 2011. Journée des étudiants du Réseau FRSQ SIDA/MI. Montréal, Qc, Canada. Communication orale *Co-seniors sur le projet

J. Chagnon-Choquet, J Fontaine, J. Poudrier* et M. Roger*. Importance of Nef in HIV-related B cell dysregulations. 28 octobre 2011. Journée de la recherche du Département de Microbiologie et Immunologie. Montréal, Qc, Canada. *Co-seniors sur le projet

J. Chagnon-Choquet, J. Fontaine, J. Poudrier* et M. Roger*. Importance of Nef in HIV-related B cell dysregulations. 12-17 avril 2011. Keystone Symposia on B cell Immunobiology and Dysregulated Functions. Whistler, BC, Canada. * Co-seniors sur le projet

Annexe 4 – Résumé de communication orale et affiche présentée à une session de «workshop» lors du congrès Symposium B Cell Development and Function/HIV Vaccines. Keystone, CO, USA (10-15 février 2013)

Maintenance of Breg capacity and increased LT- α expression by first line MZ-like B cells is associated with control of HIV disease progression

Josiane Chagnon-Choquet, Johanne Poudrier* and Michel Roger* Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), and Département de Microbiologie et Immunologie de l'Université de Montréal, Canada. (*senior authors)

We have previously shown that B cell dysregulations in the blood of HIV-infected rapid and classic progressors were accompanied by the increased frequency of a population presenting characteristics of both transitional immature (TI) and marginal zone (MZ) B cells, which we have termed MZ activated/precursors. However, this population was unaltered in ELITE controllers (EC), even though we found significantly lower frequencies of mature MZ-like B cells, suggesting that such first line populations may contribute to control of HIV disease progression. Interestingly, MZ-like B cell populations have recently been associated with Breg potential. As such, we found that as for HIV negative individuals, mature MZ-like B cells retained their capacity of IL-10 production in EC. In contrast, HIV-infected rapid and classic progressors presented increased frequencies of total B cells expressing IL-10, which was mostly contributed by TI B cells and less by MZ-like B cells. Interestingly, in EC, blood MZ activated/precursors provided substantial LT- α expression when compared to HIV negative individuals, and in contrast to that found in rapid and classic progressors where significant LT- α expression was provided by TI B cells. In fact, the degree of control of disease progression seems associated with greater LT- α to IL-10 ratio within the MZ activated/precursors population. Our results therefore suggest that maintenance of Breg integrity and increased LT- α expression by first line B cells, such as MZ-like populations, is involved in the control of HIV disease progression, possibly through contribution to immune modulation and homeostasis. Soliciting such populations may be bared in mind in the design of vaccine strategies aiming at generating both first line and adaptive protective responses.

Introduction

- Dendritic cells (DC) are main modulators of B cell differentiation mainly through production of B cell growth factors such as B lymphocyte stimulator (BLYS/BAFF)
- DC have been shown to be altered in number, phenotype and function in the context of HIV (reviewed by Smeit-Sorenson & Lere 2011, *Current Opinion in HIV and AIDS*)
- B cell dysregulations found in the context of HIV (reviewed by Alou & Faurio 2008, *Nature Rev Immunol*):
 - Polyclonal activation, breakage of tolerance
 - Loss of the capacity to generate and maintain memory
 - Perturbed population dynamics, exhaustion
 - Auto-immune manifestations and lymphomas
- Nef:
 - Penetrates monocytes and DC and modulates phenotype and function (Quaranta et al 2002, *Exp Cell Res*)
 - Prevents CD40 mediated class switch signalling in B cells (Cao et al 2006, *Nature Immunol*)

Background and Rationale

In previous work with HIV-transgenic (Tg) mice, which develop a Nef-dependent, AIDS-like disease (Hanna et al 1998, *Cell*), we have found (Poudrier et al 2001, *Immunol*; 2003, *J Virol*):

- Altered DC and B cell compartments
- DC accumulate in the enlarged splenic marginal zone (MZ)
- B cell phenotype similar to that reported for BLYS-Tg and NRE-/- mice, in which DC over-express BLYS (Mackay et al 2010, *Immunol Rev*; Hissler et al 2006, *Blood*)

Our recent longitudinal studies in HIV-infected individuals with different rates of disease progression have shown that B cell dysregulations were concomitant with (Fontaine J, Chagnon-Choquelet J et al 2011, *Blood*):

- Over-expression of BLYS by blood myeloid DC (mDC) and monocytic mDC precursors
- Increased BLYS blood levels
- As early as in the acute phase and despite successful therapy
- Absent in aviremic slow progressors (Elite controllers)

Hypothesis

HIV Nef may be involved in the over-expression of BLYS by DC, contributing to B cells dysregulations.

Objectives

- To longitudinally measure Nef in blood and in blood mDC and monocytic mDC precursors from same subjects as mentioned above, undergoing primary HIV infection with different rates of disease progression, and in viremic and aviremic slow progressors.
- To correlate the levels of Nef with those of BLYS.
- To measure the effect of recombinant Nef on BLYS expression by monocyte-derived DC (Mo-DC) *in vitro*.

Acknowledgements

Members and coordinators of FRSQ Réseau SIDA Primary infection and LTNF cohorts
 Flow Cytometry Facility, Dre Dominique Gauchat
 JCC holds a scholarship from Gabriel-Marquis Foundation

Primary-infection cohort: FRSQ Réseau SIDA

- 13 rapid progressors (RP): blood CD4+ T cell counts <250 cells/mm³ within 2 yrs infection
 - 17 classic progressors (CP): blood CD4+ T cell counts >500 cells/mm³ for 2 yrs
 - 7 viremic slow progressors
 - 5 aviremic slow progressors (Elite controllers)
- Blood samples were taken at different time points
- Early phase: 0-8 months following infection
 - 3-12 months following initiation of ART for RP
 - 2 yrs following initiation for ART-naïve CP

mDC populations: BLYS expression and intracellular Nef were assessed by flow cytometry (BD) compared to FMO values and isotype controls. $p < 0.05$, $^{**} p < 0.001$, $^{***} p < 0.0001$. Data were

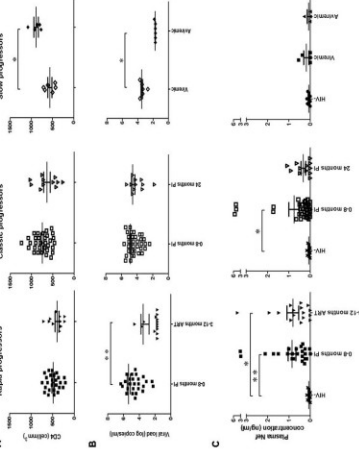


Figure 1: Longitudinal variations in CD4+ T cell counts and viral loads, and detection of HIV-1 Nef. (A) CD4+ T cell counts (log copies/ml) in plasma. (B) Viral loads (log copies/ml) in plasma. (C) Plasma Nef concentrations (ng/ml) were quantified by ELISA. Cell populations, viral loads and plasma Nef concentrations were compared using the Mann-Whitney U test for comparisons of different phases of infection within each group and between the study groups, respectively.

Methods and Results

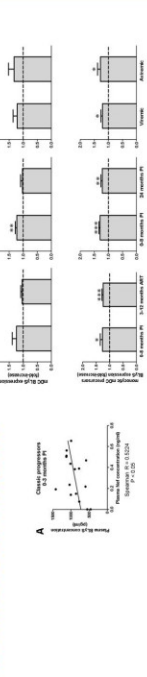


Figure 3: Elevated BLYS expression levels by ex vivo mDC and monocytic mDC precursors with intracellular HIV-Nef. (A) Spearman correlation between BLYS and Nef plasma concentrations within the 0-3 months postinfection of classic progressors. (B) BLYS expression levels by mDC (top panels) and by monocytic mDC precursors (bottom panels) bearing HIV-Nef over that of mDC (GMOFI) ± SEM. The dashed line indicates a fold-increase of one. The fold-increase in BLYS expression levels were compared using the Student's t test within each phase of infection and within each study group.

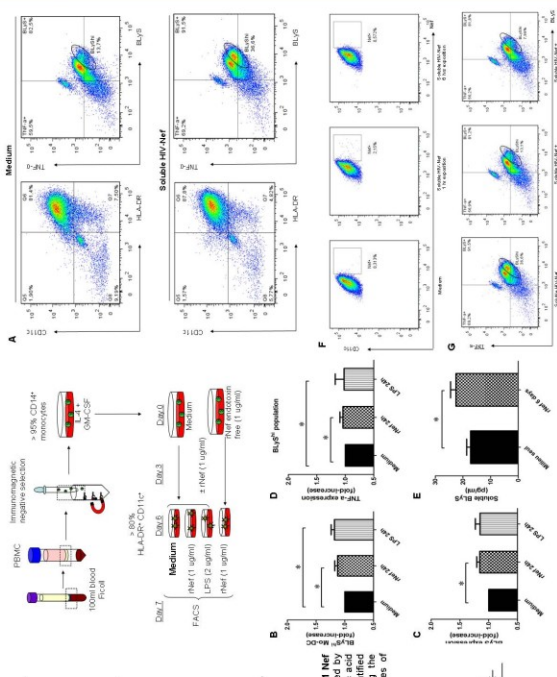
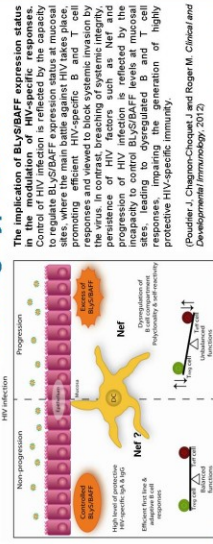


Figure 4: Recombinant soluble HIV-Nef (rNef) promotes expression of a high BLYS pro-inflammatory profile by human Mo-DC. CD14+ monocytes were negatively enriched from PBMCs of a healthy donor and cultured in presence of recombinant human GM-CSF and IL-4 for 6 days. Cells were stimulated for 18 hours with either rNef at 1 µg/ml or LPS at 2 µg/ml. (A) Dot plots show the gate on IL-4-GMOFI. These Mo-DC were cultured in presence of rNef or LPS at 1 µg/ml or 2 µg/ml, respectively. (B) Dot plots show the gate on BLYS. The fold-increase in frequency of high BLYS-expressing Mo-DC when cultured in presence of rNef or LPS over that of medium alone. (C) Expression levels of TNF-α by Mo-DC expressing high BLYS levels when cultured in presence of rNef or LPS over that of medium alone. Expression levels of TNF-α are determined by GeoMFI. (D) Soluble BLYS concentration (ng/ml) in Mo-DC supernatants, when cultured in presence or absence of rNef, were quantified by ELISA. Statistical analyses were made using the two-tailed Student's t test. (E) Bar graphs show the percentage of BLYS+ Mo-DC. (F) Dot plots represent BLYS and TNF-α expression patterns by live Mo-DC cultured for 6 hours (middle panels) and for 6 hours (right panels). (G) Dot plots represent BLYS and TNF-α expression patterns by live Mo-DC cultured for 18 hours in presence of rNef at 1 µg/ml (left panels) and anti-Nef antibody at 1 µg/ml (middle panels) or at 5 µg/ml (right panels).

Summary & Discussion

- Nef is detected early in plasma and in blood mDC and monocytic mDC precursors of HIV-infected rapid and classic progressors, and beyond successful therapy.
 - Nef could not be significantly measured neither in plasma nor in mDC populations of elite controllers.
 - Levels of Nef correlate with the increased expression of BLYS in blood
 - Elevated BLYS expression levels by ex vivo blood mDC and monocytic mDC precursors is significantly associated with intracellular HIV-Nef.
 - Recombinant soluble HIV-Nef drives Mo-DC towards a high BLYS pro-inflammatory profile
- These data suggest that:
- Detection of Nef is indicative of disease progression and viral reservoir status.
 - Nef promotes BLYS over-expression by mDC and monocytic mDC precursors, likely contributing to B-cell dysregulations and to the sustained chronic inflammation and impaired immune restoration, despite therapy.

Working Hypothesis



Taken together, our results support the notion that blocking of Nef and/or excess BLYS could be envisaged as adjunct to current therapeutic advances in view of reducing remaining reservoir activities and restoring immune homeostasis.

(Poudrier J, Chagnon-Choquelet J and Roger M. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012)

Annexe 6 – Affiche présentée lors du congrès Symposium B Cell Development and Function/HIV Vaccines. Keystone, CO, USA (10-15 février 2013).



Université de Montréal

Maintenance of Breg capacity and increased LTA expression by first line MZ-like B cells is associated with control of HIV disease progression

Josiane Chagnon-Choquelet, Julie Fontaine, Johanne Poudrier* and Michel Roger* (senior co-authors)

Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) et Département de Microbiologie et Immunologie de l'Université de Montréal, Canada.



CRCHUM
Centre de Recherche

Introduction

- Based on the study of natural control/immunity against HIV and on promising mucosal vaccine strategies, first line and adaptive B-cell responses at the viral portal of entry are likely to be major players in the battle against HIV. (reviewed by Poudrier et al., *Clin. Dev. Immunol.* 2012; *Bonville et al. Immunol.* 2011)
- Unfortunately, HIV-infected individuals present B-cell dysregulations that are not fully restored by therapy and can often lead to uncommonly increased B cell activation and malignancies. (reviewed by Moré & Chagnon-Choquelet, 2009)

Background and Rationale

- In HIV-transgenic (Tg) mice, which develop a Net-dependent AIDS-like disease (Peters et al., *Cell* 1998), we have found (Poudrier et al., *Immunol.* 2007; *J. Virol.* 2009):
 - B-cell dysregulations associated with:
 - enlarged myeloid dendritic cells (mDC)
 - enlarged splenic marginal zones (MZ)
 - increased BlyS/BAFF in serum
 - increased BlyS/BAFF in spleen
 - B cell phenotype similar to that reported for BlyS-Tg and AIRE-/- mice, in which DC over-express BlyS (Mackay et al., *Immunity* 2000; *Winkler et al. Blood* 2009)
- MZ-like B cells recirculate in humans, and likely constitute a heterogeneous niche. (Winkler *Ann. Rev. Immunol.* 2009)
- MZ-like B cells are associated with IL-10 production and B regulatory (Breg) function, both in murine and human systems. (reviewed by Moré, *Ann. Rev. Immunol.* 2012)
- At low concentrations, BlyS was shown to induce IL-10 production by murine splenic MZ "regulatory" B cells, whereas elevated BlyS concentrations rather promoted MZ B cell activation and differentiation. (Feng et al., 2010)

Preliminary studies

Our recent longitudinal studies in HIV-infected individuals with different rates of disease progression have shown that B cell dysregulations occurred in rapid and nonclassical progressors, as early as in the acute phase of infection and despite successful therapy. (Poudrier et al., Chagnon-Choquelet et al., *Blood*, 2011)

These were accompanied by:

- Increased frequencies of a blood population presenting features shared by both transitional immature (TI) and circulating MZ-like B cells (CD19⁺CD27⁺IGM⁺CD137⁺CD27⁺), termed "precur/activated MZ-like B cells"
- Increased BlyS/BAFF in serum
- Increased markers of inflammation and microbial translocation (sCD14, LBP, LPS)

In uninfected, albeit long term progressors (LTNP)/slow progressors, the DC and B cell compartments were enlarged, albeit blood "maturing/resting" MZ-like B cell frequencies were decreased.

Increased blood levels of IL-6 and IL-10 were found in all HIV-infected individuals.

Objectives & Methods

To longitudinally determine and compare expression of IL-10 and LTA in ex vivo blood B cell populations from the same subjects described in preliminary studies.

Subjects:

- Primary infection cohort: ERSS Réseau SIDA: 43 rapid progressors; blood CD4⁺ T cell counts <250 cells/mm³; within 2 yrs infection
- 17 classic progressors; blood CD4⁺ T cell counts >500 cells/mm³ for 2 yrs follow-up
- 17 classic progressors; blood CD4⁺ T cell counts >500 cells/mm³ for 2 yrs follow-up
- Early phase
- Acute phase: 0-3 months following infection
- Intermediate phase: 3-12 months following infection
- 2, 2, 2 months following infection for ART-naïve progressors
- LTNP cohort ERSS Réseau SIDA: Infected for >5 years; Blood CD4⁺ T cell counts >500 cells/mm³; ART-naïve individuals
- 7 viremic slow progressors; 5 aviremic slow progressors (Elite controllers)

8 HIV⁻, HBV⁻ and HCV⁻ negative donors matched for age and sex

B cell population frequencies and intracellular IL-10 and LTA expression were assessed ex vivo by flow cytometry (BD FACs Fortessa) and analysed using FlowJo and GraphPad Prism Softwares. Data were compared to FMO values and isotype controls. Statistics: Wilcoxon signed-rank test and the Mann-Whitney U test for pairwise comparisons of different phases of infection within each group and between the study groups, respectively. Data shown at mean ± SEM. *p < 0.05, **p < 0.001

Conclusion

- Increased frequencies of blood "precur/activated MZ-like" B cells in viremic HIV-progressors may reflect host response to the overall inflammation, which involves BlyS/BAFF over-expression; to microbial translocation and lymphopenia, and/or be modulated by direct and indirect viral effects.
- Further characterization is required to identify the exact nature of these B cells. Nevertheless, we believe they represent a "first line" population that increases in the context of controlled inflammatory conditions.
- Decreased frequencies of blood "maturing/resting" MZ-like B cells in viremic and aviremic slow progressors suggest their recruitment to periphery and involvement in disease control.
- The fact that several B cell populations, mostly TI, express IL-10 in the context of HIV disease progression when compared to disease control, possibly suggest an attempt from the host to control the inflammatory burden, but the overall effect may well be to sustain chronic B cell activation and lead to imbalanced Breg/factor ratios, shown to be associated with HIV disease progression.
- The fact that in HIV-controllers, IL-10 expression is mainly found in "maturing/resting" MZ-like B cells suggest they are able to preserve "Breg" integrity. Moreover, MZ-like B cell populations also express high levels of LTA in HIV-controllers, suggesting that they are involved in the control of disease progression, possibly through contribution to immune modulation and homeostasis and likely to generation of first line effector antibodies.
- Efficiently soliciting such populations may be bared in mind in the design of vaccine strategies aiming at generating both first line and adaptive protective responses.

Acknowledgements

Members and coordinators of ERSS Réseau SIDA Primary infection and LTNP cohorts
Flow Cytometry facility: Dominique Gauchat
JCC holds a scholarship from Gabriel-Mirquez Foundation

Results



Figure 1 - Modulation of frequencies of blood B cells in the context of HIV infection and despite therapy. Relative percentages of B cells presenting a mature phenotype (CD19⁺CD27⁺IGM⁺CD137⁺CD27⁺) are significantly increased in HIV-infected individuals, as soon as in the acute phase of infection. Similarly, B cells presenting a "precur/activated" MZ-like phenotype (CD19⁺CD27⁺IGM⁺CD137⁺CD27⁺) are significantly increased in these patients and in viremic LTNP. In contrast to aviremic LTNP, B cells with a "maturing/resting" MZ-like B cell phenotype (CD19⁺CD27⁺IGM⁺CD137⁺CD27⁻) are significantly increased in HIV-infected rapid and normal progressors, but significantly decreased in both viremic and aviremic LTNP. We find a trend for increased frequencies of TI B cells (CD19⁺CD27⁺IGM⁺CD137⁺CD27⁻CD101⁺) in chronically HIV-infected normal progressors (data not shown). (Poudrier et al., *Blood*, 2011)



Figure 2 - Increased frequencies of B cells expressing IL-10 in the context of HIV disease progression. When compared to HIV-uninfected controls, data show increased percentages of total B cells expressing IL-10 in all viremic HIV-infected individuals, as soon as in the early phase of infection. Importantly, this increase is also reflected in mature activated and "precur/activated" MZ-like B cells. D "Maturing/resting" MZ-like B cells are less involved in this increased expression. E TI B cells are the main contributors of IL-10 in viremic individuals. CF Note: aviremic slow progressors seem to control B cell IL-10 expression similar to that found in HIV-uninfected individuals. However, we observe a significant increase in these B cells in LTNP. The fact that the IL-10 expression might be influenced by fluctuations in B cell population frequencies, we have expressed data as percentages of IL-10 expression within each B cell population.



Figure 3 - Intracellular LTA expression by B cells. A) Compared to healthy donors, data show increased percentages of total B cells expressing LTA in classic progressors as well as in both viremic and aviremic slow progressors. This increase in B cells expressing LTA is not observed in HIV-uninfected individuals. Importantly, LTA expression was significantly contributed by "precur/activated" MZ-like B cells, "maturing/resting" MZ-like B cells and most significantly by TI B cells. F) In frequencies of B cell populations, we have expressed data as percentages of LTA expression within each B cell population. Interestingly, "precur/activated" MZ-like B cells were the main LTA expressors, and this is most striking in aviremic slow progressors.



Figure 4 - Summary of IL-10 versus LTA expression within B cell populations. IL-10 expression is always greater than for LTA in HIV-infected and uninfected individuals. IL-10 expression is greater in the context of HIV disease progression. B) A similar pattern is observed in classic progressors. C) In contrast to classic progressors, "precur/activated" MZ-like B cells, we observe that the degree of control of disease progression seems associated with greater LTA to IL-10 expression. In rapid progressors, expression by B cells, we find no significant increase in IL-10 expression by this population. D) In "maturing/resting" MZ-like B cells, we find no significant increase in IL-10 expression. However, we observe a significant increase in these B cells in LTNP. E) In contrast to classic progressors, we observe that in LTNP expression in TI B cells is associated with HIV disease progression and despite successful therapy.



Figure 5 - Increased frequencies of B cells expressing IL-10 in the context of HIV disease progression. When compared to HIV-uninfected controls, data show increased percentages of total B cells expressing IL-10 in all viremic HIV-infected individuals, as soon as in the early phase of infection. Importantly, this increase is also reflected in mature activated and "precur/activated" MZ-like B cells. D "Maturing/resting" MZ-like B cells are less involved in this increased expression. E TI B cells are the main contributors of IL-10 in viremic individuals. CF Note: aviremic slow progressors seem to control B cell IL-10 expression similar to that found in HIV-uninfected individuals. However, we observe a significant increase in these B cells in LTNP. The fact that the IL-10 expression might be influenced by fluctuations in B cell population frequencies, we have expressed data as percentages of IL-10 expression within each B cell population.



Figure 6 - Intracellular LTA expression by B cells. A) Compared to healthy donors, data show increased percentages of total B cells expressing LTA in classic progressors as well as in both viremic and aviremic slow progressors. This increase in B cells expressing LTA is not observed in HIV-uninfected individuals. Importantly, LTA expression was significantly contributed by "precur/activated" MZ-like B cells, "maturing/resting" MZ-like B cells and most significantly by TI B cells. F) In frequencies of B cell populations, we have expressed data as percentages of LTA expression within each B cell population. Interestingly, "precur/activated" MZ-like B cells were the main LTA expressors, and this is most striking in aviremic slow progressors.