

Université de Montréal

Étude du niveau de *B Lymphocyte Stimulator* (BLyS) et de son impact sur les lymphocytes B en relation avec l'infection et la résistance au virus d'immunodéficience humaine (VIH) chez des travailleuses du sexe au Bénin

par
Catherine Sabourin-Poirier

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 et immunologie
Avril 2016

© Catherine Sabourin-Poirier, 2016

Résumé

L'infection au VIH s'accompagne souvent de dérégulations du compartiment des lymphocytes B qui nuisent à la génération de réponses efficaces. En effet, détectées tôt après l'infection, ces dérégulations perdurent, ne sont pas totalement restaurées par la thérapie, et mènent souvent à des manifestations auto-immunes et lymphomes. Une étude longitudinale de notre groupe, effectuée avec des cellules mononucléées du sang circulant provenant de patients VIH⁺ avec différents types de progression clinique, a démontré qu'un niveau élevé de BLYS chez des individus VIH⁺ progresseurs était associé à une dérégulation des fréquences de populations de cellules B avec augmentation de cellules innées de la zone marginale (MZ) présentant des caractéristiques d'immaturation et d'activation. Au contraire, chez des individus VIH⁺ non-progresseurs avirémiques ou contrôleurs d'élite, les niveaux de BLYS étaient dans la normale et ce sont les fréquences de cellules B MZ plus matures qui étaient diminuées. La résistance au VIH pourrait aussi impliquer le contrôle de BLYS et son impact sur les cellules B.

De ce fait, nous avons préalablement recruté une cohorte de travailleuses du sexe (TS) à Cotonou (Bénin) dans laquelle nous avons identifié des femmes qui demeurent séronégatives malgré une exposition soutenue au virus. Nous avons mesuré les niveaux de BLYS dans le sang et dans les lavages cervico-vaginaux (CVL) de TS VIH⁻ et les avons comparés à ceux mesurés chez des TS VIH⁺ et un groupe contrôle de non-TS VIH⁻. Nous avons trouvé que les niveaux de BLYS dans le sang et le CVL des TS VIH⁻ étaient inférieurs à ceux des TS VIH⁺ et des non-TS VIH⁻. Le niveau d'expression de BLYS à la surface des lymphocytes T, monocytes et cellules dendritiques de TS VIH⁻ était augmenté, mais à un niveau moindre que les TS VIH⁺. Chez les TS VIH⁺, les hauts niveaux de BLYS étaient concomitants avec une dérégulation du compartiment B caractérisée par une hyperglobulinémie, une augmentation de la fréquence de populations avec un profil immature/inné et une plus grande proportion de plasmablastes IgG vs IgA. Au contraire, les niveaux inférieurs de BLYS dans le sang des TS VIH⁻ coïncident avec un compartiment B préservé, révélant que les lymphocytes B MZ peuvent être impliqués dans l'immunité naturelle au VIH. Ces résultats démontrent l'importance du contrôle des niveaux de BLYS et du maintien de l'intégrité du compartiment B dans la résistance au VIH.

Mots clés: Virus d'immunodéficience humaine (VIH), lymphocytes B, populations de lymphocytes B, zone marginale, BLYS, BAFF, immunité naturelle, travailleuse du sexe, Bénin

Abstract

HIV infection leads to B cell dysregulations that disrupt efficient immune responses. Detected early after infection, these dysregulations are lasting, are not totally resolved by therapy and often lead to auto-immune defects. We have shown that excess BLyS in plasma and on the surface of blood dendritic cells (DC) of HIV-infected progressors coincides with B cell dysregulation and increased frequency of “precursor” innate marginal zone (MZ)-like B cells. In contrast, BLyS levels were normal in elite-controllers and frequency of precursor MZ-like B cells was unaltered. Instead, percentages of MZ-like B-cells presenting a more “mature” profile were decreased in the blood of these individuals, suggesting peripheral recruitment of these cells could be beneficial to the control of disease progression. Based on this, we hypothesize that control of BLyS status and innate B cells could be relevant to the understanding of natural immunity to HIV.

We previously established an ongoing cohort of heavily HIV-exposed female commercial sex workers (CSWs) in Cotonou (Benin) and identified individuals who remain HIV-uninfected after several years of active prostitution. Herein, we have measured BLyS levels in the blood and cervico-vaginal lavages (CVLs) of HIV-uninfected CSWs and have compared them to those of HIV-infected CSWs and control uninfected non-CSWs. We found that BLyS levels in the blood and CVLs of HIV-uninfected CSWs were lower when compared to HIV-infected CSWs and even to controls. BLyS surface expression on T-cells, monocytes, and DC of HIV-uninfected CSWs was increased, but to a significantly lower extent than those measured in HIV-infected CSWs, albeit higher than controls. In HIV-infected CSWs, high BLyS levels were concomitant with a dysregulated blood B-cell compartment, characterized by hyperglobulinemia, increased frequency of populations presenting immature and/or innate profiles and a higher proportion of IgG⁺ than IgA⁺ plasmablasts. In contrast, contained BLyS levels in the blood of HIV-uninfected CSWs coincided with a rather preserved B-cell compartment, which reveals that “mature” MZ-like B-cells could be involved in natural immunity against HIV. These results highlight the importance of a better understanding of B cell populations and BLyS in the context of HIV resistance.

Key words: Human immunodeficiency virus (HIV), B cell, B cell populations, Marginal-zone, BLyS, BAFF natural immunity, commercial sex worker, Benin

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xi
Revue de la littérature	1
1 Virus d'immunodéficience humaine	1
1.1 Historique et découverte.....	1
1.2 Origine et diversité.....	2
1.3 Épidémiologie	3
1.4 Structure et génome viral	4
1.5 Cycle réplicatif (Figure 1).....	4
1.5.1 Entrée du virus	4
1.5.2 Décapsidation, transcription inverse et intégration.....	6
1.5.3 Transcription, assemblage, et sortie.....	7
1.6 Pathogenèse.....	8
1.6.1 Transmission.....	8
1.6.2 Progression clinique.....	9
1.6.3 Traitements	12
1.7 Impact sur le système immunitaire.....	13
1.7.1 Réponse innée	13
1.7.2 Cellules NK.....	14
1.7.3 Cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC).....	15

1.7.4	Cellules dendritiques myéloïdes (mDC).....	15
1.7.5	Lymphocytes T cytotoxiques CD8 ⁺	16
1.7.6	Lymphocytes T CD4 ⁺	16
1.7.7	Lymphocytes B.....	18
1.7.8	Activation immune chronique.....	18
1.8	L'immunité naturelle au VIH.....	19
1.8.1	Facteur génétique : mutation CCR5.....	20
1.8.2	Individus hautement exposés et séronégatifs.....	20
2	Lymphocytes B.....	22
2.1	Développement des lymphocytes B (Figure 3).....	22
2.1.1	Développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse.....	23
2.1.2	Maturation des lymphocytes B.....	24
2.1.3	Activation T-dépendante.....	28
2.1.4	Activation T-indépendante.....	29
2.1.5	Plasmablastes et immunoglobulines.....	30
2.2	Lymphocytes B de la zone marginale.....	31
2.3	Lymphocytes B dans le contexte du VIH.....	32
2.3.1	Effet de la trithérapie sur les lymphocytes B.....	35
3	BLyS.....	36
3.1	Fonction.....	36
3.2	Implications dans l'auto-immunité.....	39
3.3	Implications dans le VIH.....	40
	Hypothèse.....	43
	Objectif.....	44
	Article.....	45

Discussion.....	71
Niveaux et expression de BLyS	72
Fréquences des populations de lymphocytes B.....	75
Immunoglobulines et isotypes.....	77
Limites de l'étude.....	78
Conclusion	79
Perspectives.....	81
Mesure des niveaux d'expression des récepteurs de BLyS.....	81
Blocage de BLyS et TACI	81
Étude de l'immunité vaginale	82
Bibliographie.....	83

Liste des tableaux

Article

Tableau I. Distribution of demographic and sexual behavior in HIV ⁻ non-CSWs, HIV ⁻ CSWs, and HIV ⁺ CSWs.....	69
---	----

Liste des figures

Figure 1. Cycle répliatif du VIH	5
Figure 2. Progression clinique de l'infection au VIH	9
Figure 3. Développement des lymphocytes B	24
Figure 4. Impact de BLyS sur la survie des lymphocytes B	27
Figure 5. Liaison de BLyS membranaire et soluble à BAFF-R et TACI.....	38
Figure 6. Concentration de BLyS dans le CVL de non-TS VIH ⁻ , TS VIH ⁻ , TS VIH ⁺	73

Article

Figure 1. Concentration of BLyS in the serum of HIV-1 uninfected non-commercial sex workers (CSWs), HIV-1 uninfected CSWs and HIV-1 infected CSWs.....	63
Figure 2. Frequencies of T-cells, monocytes, myeloid DC (mDC) precursors and mDC in the blood of HIV-1 uninfected non-commercial sex workers (CSWs), HIV-1 uninfected CSWs and HIV-1 infected CSWs	64
Figure 3. BLyS expression by T-cells, monocytes, myeloid DC (mDC) precursors and mDC in the blood of HIV-1 uninfected non-commercial sex workers (CSWs), HIV-1 uninfected CSWs and HIV-1 infected CSWs.....	65
Figure 4. B-cell populations in the blood of HIV-1 uninfected non-commercial sex workers (CSWs), HIV-1 uninfected CSWs and HIV-1 infected CSWs.....	66
Figure 5. Plasmablast isotype frequencies in the blood of HIV-1 uninfected non-commercial sex workers (CSWs), HIV-1 uninfected CSWs and HIV-1 infected CSWs	67
Figure 6. Immunoglobulin isotype frequencies in the blood of HIV-1 uninfected non-commercial sex workers (CSWs), HIV-1 uninfected CSWs and HIV-1 infected CSWs	68
Figure supplémentaire 1. Total B-cell frequency in the blood of HIV-1 uninfected non-commercial sex workers (CSWs), HIV-1 uninfected CSWs and HIV-1 infected CSWs	70
Figure supplémentaire 2. Concentration of lipopolysaccharide (LPS), lipopolysaccharide binding protein (LBP) and soluble CD14 (CD14s) in the blood of HIV-1 uninfected non-commercial sex workers (CSWs), HIV-1 uninfected CSWs and HIV-1 infected CSWs	70

Liste des abréviations

ADCC : *Antibody-dependant cellular cytotoxicity*
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AID : *Activation-induced cytidine deaminase*
APOBEC3G : *Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G*
ARN : Acide ribonucléique
BAFF : *B cell activating factor*
Bcl-2 : *B cell lymphoma 2*
Bcl-x_L : *B cell lymphoma-extra large*
BCMA : *B cell maturation antigen*
BCR : Récepteur B (*B cell receptor*)
BLYS : *B lymphocyte stimulator*
Bti : Lymphocyte B transitionnel immature
BTK : *Bruton's tyrosine kinase*
CA : Capside
CCR : *Chemokine receptor*
cGAS : *Cyclic GMP-AMP synthetase*
CPA : *Cellule présentatrice d'antigène*
CRF : Souche recombinée circulante (*Circulating recombinant form*)
CXCR : *CXC chemokine receptor*
DC : Cellule dendritique (*dendritic cell*)
DC-SIGN : *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecular*
DL1 : *Delta-like 1*
ESCRT : *Endosomal sorting complexes required for transport*
FCRL4 : *FC receptor-like protein 4*
FDC : Cellule dendritique folliculaire
FGT : Tractus genital féminin (*Female genital tract*)
GALT : *Gut-associated lymphoid tissue*
Gp41 : glycoprotéine 41
Gp120 : glycoprotéine 120
Gp160 : glycoprotéine 160
HAART : *Highly active antiretroviral therapy*
HESN : Individus hautement exposés et séronégatif (*Highly exposed seronegative*)
HTLV : *Human Leukemia T cell virus*
IFI16 : *Interferon inducible protein 16*
Ig : Immunoglobuline
IN : Intégrase
INF : Interféron
IRAK-4 : interleukin-1 receptor-associated kinase 4
IRF3 : *Interferon Regulatory Factor 3*
KIR : *Killer immunoglobuline-like receptor*
LAV : *Lymphadenopathy Associated Virus*

LDC: Cellules de Langerhans
LPS: Lipopolysaccharide
LTR: *Long terminal repeat*
MA: Matrice
MAP: *Mitogen activated protein*
mDC: Cellule dendritique myeloïde
MHC-I : Molécule d'histocompatibilité de classe I
MIP: *Macrophage inflammatory protein*
MYD88: *Myeloid differentiation primary response gene 88*
MZ: Zone marginale (*Marginal zone*)
NC: Nucléocapside
NK : *Natural Killer*
NOTCH2 : *Neurogenic locus notch homolog protein 2*
OLS : Organes lymphoïdes secondaires
PAMPS: Motifs moléculaires associés aux pathogènes (*pathogen-associated molecular patterns*)
PBS: Site de liaison de l'amorce (*primer binding site*)
PD-1: *Programmed cell death 1*
pDC: Cellules dendritiques plasmacytoïdes
PIC: Complexe de préintégration (*preintegration complex*)
PRR : Récepteur de reconnaissance de motifs (*Pattern recognition receptor*)
RANTES : *Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted*
RRE : Élément de réponse REV
RT: Transcriptase inverse (*reverse transcriptase*)
S1P1 : *Sphingosine 1-phosphate receptor 1*
SAMHD1 : *SAM domain and HD domain-containing protein 1*
SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise
SIV : Virus d'immunodéficience simien (*Simian immunodeficiency virus*)
TACI : *Transmembrane activator and cyclophilin ligand interactor*
TI : T indépendant
TIRAP : *Toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein*
TLR : *Toll-like receptor*
TRAF : *TNF receptor-associated factor*
Treg : Cellules T régulatrices
TRIM5- α : *Tripartite motif-containing protein 5*
TS : Travailleuse du sexe
VIH : Virus d'immunodéficience humaine
Vpr : protéine virale R

Remerciements

D'abord, merci à mon directeur de recherche, Michel Roger de m'avoir accueillie dans son équipe et de m'avoir permis de faire ma maîtrise dans son laboratoire.

Merci Johanne pour ton soutien et tes mots d'encouragement. Tu as une passion et une curiosité incroyable de la science et tes connaissances en immunologie ne finiront jamais de m'impressionner!

Merci Josiane. Tu es un pilier inestimable de notre équipe. Je ne sais pas ce que j'aurais fait sans ton aide technique, mais aussi morale!

Merci à tous les autres membres du laboratoire, présent et passé. Julie, Karine, Valérie, Marie-Claude, Lyvia.

Merci à mes amis, particulièrement Kevin et Véronique. Vous êtes toujours disponibles, même de loin, pour m'écouter et m'encourager.

Enfin, merci à famille, Florence, Maman, Papa. Merci de m'avoir toujours soutenue malgré mes doutes. Je ne pourrais m'imaginer avoir une meilleure famille que vous!

Revue de la littérature

1 Virus d'immunodéficience humaine

1.1 Historique et découverte

Au début des années 1980, une nouvelle maladie fit son apparition aux États-Unis. Cette maladie touchait particulièrement les hommes homosexuels et était caractérisée par une immunodéficience causant le développement de cancers, de sarcome de Kaposi, ainsi qu'une multitude de maladies opportunistes [6-8], ce qui lui valut le nom de « cancer gai » (*gay cancer*). Cependant, il fut rapidement évident que la maladie n'était pas limitée aux hommes homosexuels, mais affectait aussi les utilisateurs de drogues injectables, les hémophiles, les Haïtiens et les personnes ayant reçu des transfusions sanguines, laissant planer le doute d'une maladie infectieuse [6, 9]. En septembre 1982, le *Center for Disease Control* à Atlanta aux États-Unis, décida de nommer cette nouvelle maladie le Syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) [10].

Robert C. Gallo du *National Institute of Health* aux États-Unis fut le premier à suggérer que l'agent étiologique du SIDA pourrait être un rétrovirus et plus particulièrement, selon lui, un virus de la famille des *Human Leukemia T cell virus* (HTLV) [11]. D'ailleurs, l'équipe du Dr Gallo identifia des séquences ADN apparentées aux HTLV [11-13] et isola un virus ayant un tropisme pour les lymphocytes T qu'il nomma HTLV-III dans des échantillons de patients ayant le SIDA [14, 15]. Parallèlement, Luc Montagnier et Françoise Barré-Sinoussi de l'Institut Pasteur en France isolaient un nouveau rétrovirus d'un patient ayant le SIDA qu'ils nommèrent *Lymphadenopathy Associated Virus* (LAV) [16, 17]. Il s'avéra plus tard que le HTLV-III et le LAV n'étaient en fait qu'un seul et même virus [11] et on opta internationalement pour la nomenclature de Virus d'immunodéficience humain (VIH) en 1986 [18, 19]. Il fut découvert plus tard qu'il existait en fait deux formes de VIH, soit le VIH-1 et le VIH-2, ce dernier étant majoritairement restreint à l'Afrique de l'Ouest. Nous continuerons de référer au VIH-1 comme étant le VIH pour la suite du mémoire.

1.2 Origine et diversité

Le VIH tient son origine du virus d'immunodéficience simien (SIV). Différentes souches espèces-spécifiques de SIV représentent un groupe de lentivirus infectant des primates non humains. Environ 40 espèces différentes de primates seraient porteuses d'une souche de SIV, cependant, des études phylogéniques ont permis de déterminer que les chimpanzés, réservoir naturel du SIVcpz, sont la source du VIH [20, 21]. La transmission primate-homme serait probablement survenue suite à l'exposition à du sang ou des sécrétions muqueuses lors de la chasse et la consommation de chimpanzés ou même la capture de primates comme animaux de compagnie [22-24].

Le VIH se divise en quatre groupes qui représenteraient chacun un épisode indépendant de transmission du SIV à l'humain. Les groupes O (*outlier*) et N (*non-O, non-M*) sont plutôt rares et principalement limités à l'Afrique de l'Ouest, particulièrement au Cameroun. Le groupe M (*major*) représente 98 % de tous les cas d'infection au VIH. Il existe une diversité au sein du groupe M que l'on regroupe en 9 sous-types ou clades (A- D, F-H, J et K) en plus de la possibilité de recombinaison entre les différentes souches circulantes (*circulating recombinant form –CRF*) [22]. Le groupe P n'a été découvert que récemment en 2009 et n'a été isolé que chez deux personnes du Cameroun [25]. Contrairement aux trois autres groupes, le VIH-1 de groupe P proviendrait de gorilles porteurs du SIVgor. Ce virus aurait cependant lui-même un ancêtre commun avec une lignée de SIVcpz [26].

Les premières preuves directes de la présence du VIH chez l'humain ont été obtenues à partir d'échantillons de sang et de ganglions qui avaient été conservés depuis 1959 et 1960. À partir de ces échantillons, il a été possible d'extrapoler le taux d'évolution du virus et ainsi estimer le moment de transmission de chaque groupe. Ainsi, le dernier ancêtre commun entre le SIVcpz et le VIH de groupe M remonterait à 1799-1904, le groupe O à 1890-1940 et le groupe N à 1948-1977. Les premières transmissions interspèces auraient donc eu lieu vers le début du 20^e siècle en Afrique de l'Ouest équatoriale [22, 27] et les changements sociaux, économiques et comportementaux qui sont survenus au fil des années ont permis au virus de

se disséminer facilement dans la population jusqu'à la pandémie que l'on connaît aujourd'hui [24, 27].

1.3 Épidémiologie

Depuis sa découverte en 1983, environ 75 millions de personnes auraient été infectées par le VIH. De ce nombre, près de la moitié, soit 36 millions, en est décédée. En 2012, on estimait que 35,3 millions de personnes étaient infectées dans le monde dont 2,3 millions de nouvelles infections, une diminution de 33 % depuis 2001. Berceau de l'épidémie, c'est en Afrique subsaharienne que l'on retrouve encore le plus grand nombre de cas avec 25 millions de personnes vivant avec le VIH [28].

Bien qu'en Amérique du Nord, ainsi que dans la majorité des pays occidentaux, on associe la plupart du temps le VIH aux hommes homosexuels et aux utilisateurs de drogues injectables, les femmes sont aussi affectées par ce virus, particulièrement dans les pays en développement. En effet, les femmes représentent 52 % des personnes vivant avec le VIH dans les pays à faible revenu. En Afrique subsaharienne, cette proportion monte à 57 % [29]. Dans ces régions du monde, les femmes sont particulièrement plus à risque de contracter le VIH en raison d'un contexte économique, social et culturel particulier [30-32]. Ainsi, les femmes sont plus susceptibles d'être violées ou d'avoir des relations sexuelles avec des hommes plus âgés ou sont dans l'incapacité de pouvoir négocier l'utilisation de préservatifs lors des relations sexuelles. Un accès plus difficile à l'éducation accentue aussi l'incompréhension face aux risques associés au VIH [29, 33]. En plus d'un risque social plus élevé, les femmes sont aussi plus à risque de contracter le VIH en raison de facteurs biologiques, notamment la particularité anatomique du tractus génital féminin (FGT-*female genital tract*). En effet, la composition cellulaire de la muqueuse vaginale au niveau de la zone entre l'endocol et l'ectocol est particulièrement sensible aux perforations ce qui facilite la transmission du virus [34].

1.4 Structure et génome viral

D'un diamètre d'environ 100 nm [35] le VIH est un virus enveloppé d'une bicouche lipidique qui provient de la membrane cellulaire. À la surface de l'enveloppe, on retrouve la glycoprotéine 120 (gp120) assemblée en trimer, laquelle est ancrée au virus via une interaction avec la glycoprotéine transmembranaire et hétérodimère gp41. Gp120 contient cinq domaines conservés (C1-C5) et cinq boucles variables (V1-V5). Ces dernières prédominent à la surface de la protéine et sont responsables de l'interaction du virus avec le récepteur cellulaire CD4 [36]. Sous l'enveloppe, on retrouve la matrice (MA), composée de la protéine p17. Enfin, la capsid (CA), formée de la protéine p24, est au centre du virus et englobe deux copies du génome viral liées à une nucléoprotéine ainsi que les enzymes virales protéase, transcriptase inverse (RT- *reverse transcriptase*) et intégrase (IN) [35, 37, 38].

Le génome du VIH est formé par deux copies identiques d'acide ribonucléique (ARN) simple brin à polarité positive. On y retrouve la présence de trois gènes de structure : *gag*, *env*, *pol*. Le gène *gag* code pour les protéines de la capsid (p24, p7, p6) et de la matrice (p17). Le gène *env*, code pour les protéines de l'enveloppe gp120 et gp41. Enfin, le gène *pol* code pour les enzymes utilisées lors du cycle réplcatif, soit les enzymes virales protéase, transcriptase inverse et l'intégrase. Le génome viral contient aussi des gènes accessoires et régulateurs (*tat*, *rev*, *vif*, *nef*) [35, 39].

1.5 Cycle réplcatif (Figure 1)

1.5.1 Entrée du virus

La toute première étape du cycle réplcatif est l'entrée du virus dans une cellule permissive. Pour ce faire, le virion doit d'abord s'attacher à une cellule cible. Les protéines de l'enveloppe interagissent de façon spécifique ou non avec des molécules en surface des cellules, par exemple une interaction avec des récepteurs de reconnaissance de motifs (*pattern recognition receptor*- PRR) ou comme DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecular). Cet attachement du virus à la cellule n'est pas essentiel à l'entrée, cependant, il permet de rapprocher le virus du récepteur cellulaire CD4 et ainsi améliorer l'efficacité de l'infection [36].

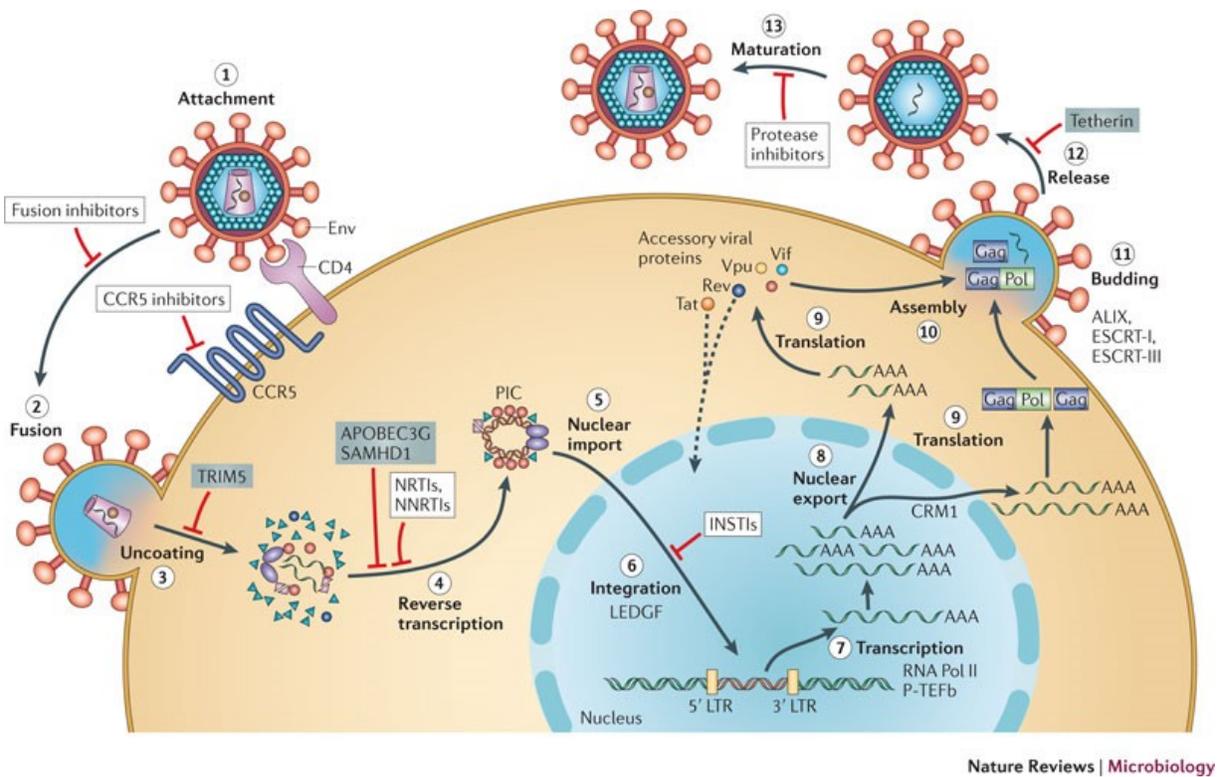


Figure 1 : Cycle de réplication du VIH [1]

L'attachement du virus aux récepteurs et corécepteurs est toutefois essentiel pour l'entrée du virus. Ceci débute par la liaison de gp120 au récepteur cellulaire CD4. La molécule CD4 est principalement retrouvée à la surface des lymphocytes T CD4⁺ (lymphocyte T auxiliaire), cible principale du virus, mais aussi sur les cellules dendritiques (DC) et les macrophages. La liaison de CD4 à gp120 entraîne un réarrangement des boucles V1-V2 suivi de V3, ce qui provoque un changement de conformation de gp120 exposant une portion de la protéine pouvant se lier aux corécepteurs CCR5 ou CXCR4 [36]. CCR5 est un chémorécepteur principalement présent à la surface des lymphocytes T, des monocytes et des macrophages. CXCR4 est un autre chémorécepteur qui est plutôt à la surface des lymphocytes T. L'utilisation de l'un ou l'autre des corécepteurs détermine le tropisme d'une souche de VIH. Ainsi, une souche M-tropique ou R5 se lie à CCR5 et infecte préférentiellement les macrophages, tandis qu'une souche T-tropique ou X4 se lie à CXCR4 et infecte préférentiellement les lymphocytes T. Il est important de mentionner que malgré ce tropisme, une souche M-tropique peut tout de même infecter les lymphocytes T et vice versa. Il existe aussi

des souches à double tropisme, pouvant se lier autant à CCR5 que CXCR4. Lors d'une infection, on observe un changement de tropisme du VIH. Pour une raison encore mal comprise, la transmission se fait le plus souvent via une souche R5. Au fil des années, la majorité des virions arbore un double tropisme puis un tropisme T favorisant l'infection des lymphocytes T CD4⁺ [40-42].

La liaison entre gp120 et le corécepteur induit un autre changement de conformation qui provoque l'exposition de la partie hydrophobique du peptide de fusion de gp41. Ce dernier s'insère dans la membrane de la cellule et deux régions hélicoïdales s'agencent en une structure à 6 hélices. Cette structure, agissant comme un harpon, force le rapprochement entre la membrane virale et cellulaire entraînant ainsi la formation d'un pore de fusion et de l'entrée du virus encore encapsidé dans la cellule [36].

1.5.2 Décapsidation, transcription inverse et intégration

Une fois dans la cellule, la capsid du virus est dégradée par un mécanisme peu connu, mais qui implique probablement la phosphorylation de la matrice par une MAP (*mitogen activated protein*) kinase. La protéine virale NEF pourrait aussi agir en s'associant à une pompe à proton (V-ATPase) et induire une décapsidation en provoquant un changement de pH local. Suivant la décapsidation, il y a formation du complexe de transcription inverse comprenant le génome viral, une amorce ARN^{t^{Lys}}, la transcriptase inverse, l'intégrase, la matrice, la nucléocapside (NC) et la protéine virale R (Vpr). La protéine Vif permet de stabiliser ce complexe qui se joint ensuite à des filaments d'actine, une interaction médiée par la matrice phosphorylée et qui est nécessaire pour la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADN) virale [43].

La transcription inverse est initiée par l'amorce ARN^{t^{Lys}}, laquelle est attachée au site de liaison de l'amorce (*pbs-primer binding site*) sur le génome. La synthèse de l'ADN commence à l'extrémité 5' générant ainsi un hybride ADN/ARN. La portion ARN est ensuite dégradée par l'activité ARNaseH de la RT. En utilisant des régions d'homologie, la petite partie restante d'ADN « saute » de l'extrémité 5' à 3' du génome et est utilisée comme nouvelle amorce. Un brin positif d'ADN est synthétisé alors que la dégradation de l'ARN se

poursuit permettant par la suite la synthèse d'un deuxième brin d'ADN. Lorsque la transcription inverse est complétée, le complexe de préintégration (PIC) se forme. Celui-ci comprend l'ADN complémentaire (ADNc) double brin, IN, MA, Vpr et la RT. Pour pénétrer dans le noyau, le PIC utilise un mécanisme utilisant probablement les microtubules lui permettant d'entrer dans le noyau via des pores nucléaires [43, 44].

Une fois le PIC à l'intérieur de noyau, l'IN se lie aux extrémités 3' des deux brins de l'ADN viral et en excise quelques nucléotides. En parallèle, l'IN clive aussi l'ADN cellulaire puis catalyse la liaison de l'ADN viral à l'ADN génomique de la cellule cible. Enfin, des enzymes cellulaires réparent l'ADN en complétant les nucléotides manquant entre l'ADN viral et cellulaire [44].

1.5.3 Transcription, assemblage, et sortie

Une fois intégré à l'ADN cellulaire, le provirus entre soit dans une phase de latence ou bien est transcrit pour compléter le cycle viral et produire de nouveaux virions. La transcription de l'ARN est initiée à l'extrémité 3' de la séquence LTR (long terminal repeat) du provirus. Le niveau basal de cette transcription est très faible, mais est dupliqué par la protéine virale TAT [45, 46]. Cet activateur de transcription agit en se liant à la protéine cycline T1, une protéine formant un complexe avec le facteur d'élongation P-Tef-B. Le recrutement de ce facteur permet la phosphorylation de l'ARN polymérase et augmente significativement son activité [47]. L'ARN ainsi transcrit est transporté hors du noyau en utilisant la machinerie de transport nucléaire de la cellule. Pour ce faire, la protéine virale Rev se lie à l'élément de réponse REV (RRE- Rev responsive element) situé sur le gène rev. Ensemble, ils forment un complexe capable d'interagir avec la machinerie d'exportation permettant le transport de l'ARN dans le cytoplasme [44, 48].

Lorsque l'ensemble des protéines virales a été produit, l'assemblage du virion prend place au niveau de la membrane plasmique. Un précurseur de Gag, Pr55^{Gag}, dont l'extrémité est occupée par la MA, cible et se lie à la membrane plasmique. L'ARN génomique contient un signal d'encapsidation qui est formé de quatre structures en forme de boucle. Ces structures interagissent avec la nucléocapside de Gag, permettant l'encapsidation du génome. Des

interactions Gag-Gag, Gag-lipide et Gag-ARN permettent ensuite de poursuivre la formation du virion au niveau de la membrane plasmique [44, 49]. Parallèlement, la protéine gp160, un précurseur de gp120 et gp41, est synthétisée dans le réticulum endoplasmique rugueux et est transportée vers la surface de la cellule. Lors de ce transport, gp160 transite par l'appareil de Golgi, où il sera clivé en gp120 et gp41 par une protéase cellulaire. Une fois à la surface de la cellule, le complexe gp120-gp41 est incorporé au virion par un processus impliquant probablement une interaction entre gp41 et la MA [44, 49-51]. Enfin, la sortie du virion de la cellule est médiée par l'activité des domaines L (Late-budding). Ces domaines sont, entre autres, exprimés par la protéine p6 de GAG. Les domaines L agiraient notamment en recrutant la machinerie cellulaire ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*). Cette dernière est normalement responsable de la scission de la membrane entre une cellule mère et une cellule fille. Ce phénomène de scission permet ainsi le bourgeonnement du virion hors de la cellule hôte [52-54].

1.6 Pathogenèse

1.6.1 Transmission

Le VIH est transmis principalement lors de rapports sexuels. En effet, environ 80 % des adultes infectés l'auraient été suite à une exposition des muqueuses au sperme ou au fluide vaginal d'un partenaire infecté [55, 56]. La transmission par inoculation intraveineuse ou sous-cutanée est aussi possible lors de l'utilisation de drogue injectable, l'exposition à du sang contaminé lors d'une transfusion ou l'exposition à des outils médicaux contaminés [55, 56]. Les cas de transmission mère-enfant sont possibles lors de la grossesse, de l'accouchement ou de l'allaitement [57]. La transmission via les muqueuses étant la plus répandue, nous nous concentrerons sur ce type d'infection et plus particulièrement la transmission par voie vaginale.

L'infection au VIH aurait lieu à partir d'une particule virale unique ou via des cellules infectées qui peuvent transmettre le virus à des cellules immunitaires et des cellules mucoales vaginales ou anales [55, 58]. Tout d'abord, le virus doit traverser la barrière épithéliale mucoale pour atteindre ses cellules cibles. Ainsi, les virions libres ou libérés des cellules

infectées peuvent se lier et entrer dans les cellules épithéliales. Les virions migrent ensuite par tranzytose vers les cellules cibles comme les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs, les cellules de Langerhans (LDC), les DC et les macrophages [59, 60]. D'autres modes d'infection ont été suggérés. Notamment, les virions pourraient pénétrer directement l'épithélium à l'aide d'espaces étroits entre les jonctions, leur donnant un accès direct à leurs cellules cibles [61]. L'infection des cellules épithéliales en tant que telle a aussi été suggérée [62]. Enfin, des microabrasions de l'épithélium causées lors de rapports sexuels pourraient aussi contribuer à la transmission du virus [63]. (Revue dans [64])

1.6.2 Progression clinique

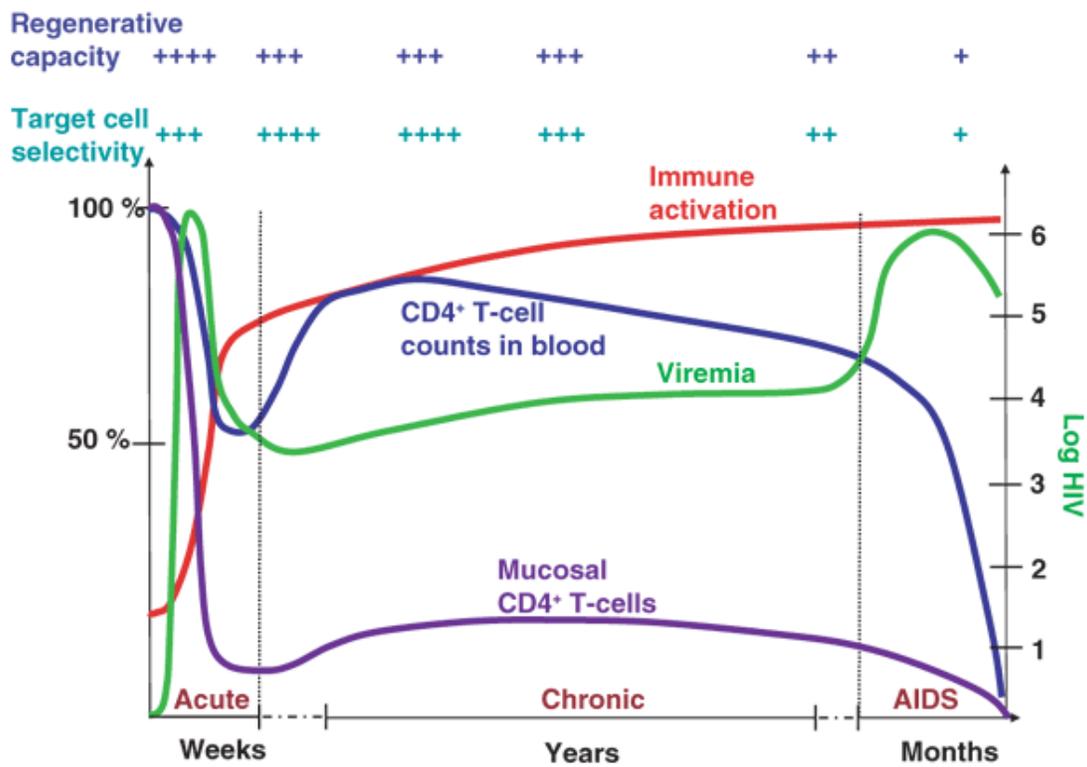


Figure 2. Progression clinique de l'infection au VIH [3]

1.6.2.1 Phase aigüe

L'arrivée du virus aux muqueuses, sa liaison aux LDC et aux DC [3, 64] et l'infection initiale de lymphocytes T CD4⁺ provoquent la production de cytokines visant à contrer cette invasion virale. Paradoxalement, cette réponse immune a comme conséquence de faciliter la dissémination du virus en attirant de nouvelles cellules cibles au lieu d'infection. Ainsi, l'exposition au virus stimule la production de MIP-3 α (*macrophage inflammatory protein*), cette dernière attirant les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) au niveau basal de l'épithélium. Ces pDC recrutent à leur tour des cellules dendritiques myéloïdes (mDC) et lymphocytes T CD4⁺ via MIP-3 β [65]. Cet influx de cellules CD4⁺ activées vient contrebalancer la faible quantité initiale de cellules cibles au niveau de la muqueuse vaginale. Quatre jours après l'infection, l'environnement mucosal est ainsi transformé en un milieu riche en cellules cibles CD4⁺. Cette expansion locale semble être essentielle pour la propagation du virus dans les lymphocytes T CD4⁺ activés plus susceptibles au virus, mais moins présent au lieu d'infection. Ensuite, le virus libre, ou lié aux LDC et DC, est disséminé en périphérie via les ganglions drainants. Le virus migre alors rapidement vers la muqueuse intestinale et plus particulièrement au niveau du GALT (*gut-associated lymphoid tissue*) où il induira une réduction marquée des lymphocytes T CD4⁺ mémoires. Cet événement caractéristique de la phase aigüe de l'infection est aussi accompagné d'une forte diminution des lymphocytes T CD4⁺ sanguins, probablement en réponse à la déplétion des cellules mucosales [55, 66, 67].

Lors de la dissémination locale du VIH, il y a une période où le virus n'est pas détectable dans le sang, la phase éclipse. Après une dizaine de jours, le virus atteint les ganglions et, en absence d'une réponse immunitaire efficace, se multiplie exponentiellement pour atteindre un sommet environ 3 à 4 semaines après l'infection. En raison de cette forte virémie, la phase aigüe s'accompagne de symptômes similaires à ceux de la grippe comme de la fièvre, des douleurs musculaires, des maux de tête, une perte de poids et une lymphadénopathie. En parallèle, la réponse lymphocyte T CD8⁺ apparaît lorsque la virémie est à son sommet et culmine une à deux semaines plus tard, en même temps que le déclin de la virémie [55, 67, 68]. C'est aussi lors de la phase aigüe que les premiers anticorps IgG VIH spécifiques apparaissent. Deux semaines après l'infection, des anticorps non neutralisants,

ayant un fort potentiel à ADCC (*Antibody-dependant cellular cytotoxicity*), sont produits. Ce n'est que 8 semaines après l'infection que les anticorps neutralisants apparaissent, malheureusement trop tard [56].

1.6.2.2 Phase chronique

Après la phase aigüe s'ensuit une phase chronique asymptomatique. En moyenne, la phase chronique perdure pendant 10 ans, mais peut varier de 6 mois à près de 30 ans chez certains individus. Quatre à six mois après le sommet de la charge virale, la virémie se stabilise et demeure relativement constante tout au long de la phase chronique, même s'il est possible d'observer une légère augmentation de la virémie au cours des années. Bien que la phase chronique soit caractérisée par l'absence de symptômes, cette période est tout de même le théâtre d'une forte activation immune (section 1.7.6) et d'une diminution graduelle du taux de lymphocytes T CD4⁺ résultant en une détérioration du système immunitaire et une perturbation lors des réponses immunes. Comme conséquence, l'équilibre précaire entre le système immunitaire et le virus est rompu, ce dernier n'étant plus soumis aux pressions immunologiques [68].

La durée de la phase chronique permet de définir différents types de progression de la maladie. Ainsi, près 70 à 80 % des personnes infectées par le VIH vivront une phase chronique d'environ 6 à 8 ans durant laquelle ils auront très peu de symptômes dus au virus. Ces personnes sont caractérisées comme « progresseurs classiques ». Un autre 10 à 15 % des individus, des « progresseurs rapides » ont malheureusement une phase chronique très courte d'environ 2 à 3 ans avant de développer le SIDA. Enfin, moins de 5 % des individus sont ce qu'on appelle des « progresseurs lents ». Ceux-ci ne développent pas de maladie pour une très longue période de temps et conservent un niveau de lymphocytes T CD4⁺ égal ou supérieur à 500 cellules/ μ l [69]. Une sous-catégorie de progresseurs lents n'a pas de virus détectable dans leur sang. On les appelle des « progresseurs lents avirémiques » ou encore des « contrôleurs d'élite » [70].

1.6.2.3 Phase SIDA

Phase finale de la maladie, le SIDA est cliniquement diagnostiqué lorsque le taux sanguin de lymphocytes T CD4⁺ est inférieur à 200 cellules/ μ l. En parallèle, on observe aussi une hausse de la virémie. En absence de traitement, la mort survient généralement de 10 à 12 mois suivant le diagnostic. Lors de ce stade, le patient atteint du SIDA est particulièrement susceptible aux infections opportunistes bactériennes (tuberculose, listériose, pneumonie), fongiques (candida), parasitaires (toxoplasme) ou virales (*Herpes simplex*, cytomégalovirus). Certains patients développeront des formes de cancer comme le sarcome de Kaposi. Enfin, des problèmes neurologiques (démence), cardiaques (endocardite, athérosclérose) et pulmonaires (emphysème) peuvent aussi survenir [68, 71-73].

1.6.3 Traitements

Le premier traitement médicamenteux contre le VIH, un inhibiteur de la transcriptase inverse nommé zidovudine, a été découvert en 1986 [74]. Aujourd'hui, il existe 6 types différents d'antiviraux classés selon leur mode d'action au niveau du cycle réplcatif du virus. On retrouve ainsi les inhibiteurs d'entrée, qui empêchent la liaison du virus à ces récepteurs. Les inhibiteurs de fusion qui interfèrent avec la capacité du virus de fusionner avec la membrane plasmique cellulaire. Les inhibiteurs de la transcription inverse se divisent en deux catégories : les inhibiteurs de nucléotide et les inhibiteurs liant la transcriptase inverse. Les inhibiteurs d'intégrase empêchent l'intégration de l'ADN virale dans la cellule. Enfin, les inhibiteurs de protéase ciblent le clivage des protéines virales [75].

À la fin des années 1990, l'introduction de la trithérapie, soit la combinaison de trois à quatre différentes classes d'inhibiteurs, aussi connue sous le nom de *highly active antiretroviral therapy* (HAART), permet de transformer l'infection au VIH d'une maladie mortelle à une maladie chronique contrôlable [57, 76]. Ces traitements entraînent une réduction de la virémie sous les niveaux détectables en trois mois et, dans la majorité des cas, rétablissement des niveaux de lymphocytes T CD4⁺ sanguins [76]. Malgré cette diminution de la virémie, il perdure un niveau élevé d'inflammation et d'activation immune chronique (section 1.7.8) et les fonctions immunitaires, notamment celle des lymphocytes B, ne sont pas totalement restaurées (section 2.3). De plus, les traitements ne sont pas curatifs. Bien qu'ils

rallongent l'espérance de vie des personnes infectées, la présence de réservoirs viraux, et l'inaccessibilité de certains sites obligent les patients à poursuivre leur traitement tout au long de leur vie. Malheureusement, le haut taux d'erreurs de la transcriptase inverse du VIH favorise l'émergence de souches résistantes aux inhibiteurs utilisés et le manque de conformité aux traitements accentue ce problème. D'ailleurs, on estimait en 2012 un taux de résistance aux antiviraux d'environ 10 à 19 % chez les personnes n'ayant jamais eu de traitement [76]. Enfin, les antiviraux utilisés provoquent de nombreux effets secondaires comme la stéatose hépatique, la lipodystrophie ou la néphrotoxicité et contribuent à une mauvaise adhérence aux traitements [77].

1.7 Impact sur le système immunitaire

1.7.1 Réponse innée

La réponse immunitaire innée repose largement sur la détection de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs- pathogen-associated molecular patterns) par des PRR. Ainsi, lors d'une évasion virale, la détection du virus via les PRR induit notamment la production d'interféron (INF) de type I (α et β) [78], une famille de cytokines qui à leur tour lie un récepteur spécifique et déclenche l'activation de centaines de gènes impliqués dans la réponse antivirale, la production de cytokines pro-inflammatoires et l'orchestration de la réponse immunitaire adaptative [79].

La reconnaissance du VIH par les cellules de l'hôte, principalement les lymphocytes T CD4⁺, peut se faire à de nombreuses étapes du cycle répliatif, soit via les produits de la transcription inverse, mais aussi lors de l'interaction du virion, de sa capsid ou de l'ARN virale avec les différents PRRs. Entre autres, deux types de PRR intracellulaires permettent la détection de l'ADN rétroviral dans le cytoplasme: IFI16 (*interferon inducible protein 16*) [80] et cGAS (*cyclic GMP-AMP synthetase*) [81]. Les TLR (*toll-like receptor*), des récepteurs présents à la surface des cellules et dans les endosomes sont aussi impliqués dans la reconnaissance du VIH. De ce fait, la gp120 est reconnue par les TLR2 et 4 à la surface des cellules épithéliales mucoales [82] et l'ARN génomique virale est reconnu par les TLR endosomaux 7 et 8 [83]. La reconnaissance du VIH par les PRR cellulaires active le facteur de

régulation IRF3 (*Interferon Regulatory Factor 3*), ce dernier jouant un rôle central dans la cascade de signaux permettant la transcription de l'INF. L'INF à son tour stimule l'expression de gènes anti-VIH, notamment les facteurs de restrictions conférant aux cellules une protection envers le virus. Ainsi, SAMHD1 (*SAM domain and HD domain-containing protein 1*) inhibe la réplication virale, TRIM5- α (*Tripartite motif-containing protein 5*) empêche l'assemblage de la capside, *thetherin* empêche le relargage de virions hors de la cellule et APOBEC3G (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G*) provoque la mutation de l'ADN retro-transcrit. Bien qu'il ait été démontré que le VIH soit sensible à l'INF *in vitro*, les protéines accessoires du virus (Vpu, Vif) lui confèrent une résistance aux facteurs de restriction et lui permettent de déjouer en grande partie la réponse immunitaire innée [84]. Ainsi, dans les lymphocytes T CD4⁺, l'IRF3 est dégradé bloquant ainsi l'activation des gènes induits par l'INF [85]. Malgré ce mécanisme lui permettant de déjouer la réponse innée, les niveaux d'INF demeurent élevés chez les patients infectés au VIH, particulièrement lors de la phase aiguë, mais aussi tout au long de la phase chronique [86]. Ces niveaux élevés sont probablement attribuables aux pDC (voir section 1.7.3) (revu dans [87, 88]).

1.7.2 Cellules NK

Les cellules NK ne sont pas une cible directe du VIH, bien que des études *in vitro* aient démontré qu'elles sont théoriquement sensibles au virus lorsqu'elles possèdent la molécule CD4 à leur surface [89]. Il est cependant connu que le VIH tente d'échapper à l'action des cellules NK en utilisant la protéine Nef. Celle-ci diminue de façon sélective l'expression de certains types de MHC-I (A-B), mais épargne la molécule d'histocompatibilité de classe I (MHC-I) ce qui permet au virus d'échapper à l'action des lymphocytes T CD8⁺ tout en évitant l'activité cytolytique des cellules NK [90]. Lors d'une infection au VIH, on remarque aussi un changement dans la fréquence des cellules NK [91]. De ce fait, il y a une forte déplétion des cellules CD56⁺ au profit d'une population rare CD56⁻/CD16⁺ au profil anergique et qui ne possède pas la majorité des fonctions des cellules NK normales [92].

1.7.3 Cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC)

Les pDC peuvent sécréter des cytokines antivirales comme l'INF α et β tandis que les mDC, particulièrement présentes au niveau de la peau et des muqueuses, sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) pouvant activer les lymphocytes T et B. Lors d'une infection au VIH, la fréquence de ces deux types de DC est diminuée, possiblement en raison d'une augmentation de la mort, d'un drainage vers les ganglions lymphatiques, ou d'une diminution de la différenciation des cellules précurseurs. Les pDC sont particulièrement stimulées à produire de l'INF α en contact avec le VIH. D'ailleurs, le rôle de l'INF α dans la virémie a été mis en évidence chez des patients contrôlant le virus. En effet, ceux-ci avaient des niveaux supérieurs de pDC comparé à des personnes VIH⁻ et étaient probablement plus aptes à contrôler le virus en raison d'une production accrue d'INF α . Malgré une propension à produire de l'INF α , les pDC exposés au VIH ne sont que partiellement matures et sont moins efficaces comme CPA. Ainsi, l'activation des lymphocytes T via CD80 et CD86 est notamment perturbée en raison de la diminution de l'expression de ces molécules à la surface des DC dans les ganglions. De plus, les pDC exposées au VIH produisent l'indoléamine 2,3-dioxygénase ce qui induirait les lymphocytes T CD4⁺ à se différencier en cellules T régulatrices (Treg). Les Treg seraient cependant une arme à double tranchant. En effet, d'un côté elles supprimeraient la réponse T VIH-spécifique, mais de l'autre, elle limiterait une activation immune chronique de certaines cellules pouvant être délétères (revu dans [58, 67, 93]).

1.7.4 Cellules dendritiques myéloïdes (mDC)

Au niveau des mDC, on remarque une diminution marquée de leur fréquence dans le sang des personnes séropositives. Cette diminution qui est détectable dès la phase aiguë et qui persiste lors de la phase chronique pourrait s'expliquer en partie par une accumulation des mDC au niveau des ganglions. D'ailleurs, une étude de notre laboratoire a démontré que l'infection au VIH était accompagnée de niveaux élevés de chémokines impliquées dans le recrutement des DC aux tissus [94]. Il pourrait aussi s'agir d'un effet direct du virus, puisque ce dernier a la capacité d'infecter, quoiqu'inefficacement, les mDC. Malgré une diminution du nombre des mDC, celles-ci arborent un profil hyperactivé contribuant probablement à l'activation immune chronique (section 1.7.6). Malgré cela, d'autres études révèlent que les

mDC ont un profil immature et une incapacité à activer efficacement les lymphocytes T [95, 96]. D'ailleurs, on observe une augmentation de l'expression de la molécule PD-1 à la surface des mDC et qui contribue aussi à l'augmentation de son expression à la surface des lymphocytes T. Il semble aussi avoir une perte de la capacité des mDC à activer les cellules NK et donc une diminution de l'activité lytique de ces dernières (revu dans[97]). Enfin, des études faites par notre laboratoire ont démontré que l'augmentation de la production de BLYS par les mDC, corrélait avec la progression de la maladie (section 3.3).

1.7.5 Lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺

Lors de la phase aiguë d'une infection au VIH, la réponse T CD8⁺ est restreinte à très peu d'épitopes, majoritairement présents au niveau de l'Env et de Nef. On remarque tout de même que cette réponse étroite engendre une réponse efficace, puisqu'elle provoque une diminution marquée de la virémie [98]. Lors de la phase chronique, il est encore possible de détecter une réponse T CD8⁺ qui est d'ailleurs élargie à une plus grande variété d'épitopes [99]. Cependant, cette réponse entraîne une pression immunologique sélective sur le virus. Le VIH ayant la capacité de muter facilement en raison de son ADN polymérase, échappe éventuellement à la réponse CD8 [99]. Les lymphocytes T CD4⁺ activent indirectement les lymphocytes T CD8⁺ en stimulant les DC à produire de l'IL-12, une cytokine essentielle pour initier la réponse CD8. Or, on sait que les lymphocytes T CD4⁺ sont affectés par le VIH ce qui pourrait empêcher l'élaboration d'une nouvelle réponse CD8 envers les virions mutés ayant échappé à la réponse cytotoxique [100] (revu dans [101-103]).

1.7.6 Lymphocytes T CD4⁺

Les lymphocytes T CD4⁺, ou lymphocytes T auxiliaires, sont un élément central de la réponse immune en permettant le recrutement et l'activation d'autres cellules du système immunitaire. Les lymphocytes T CD4⁺ se divisent en différentes populations basées sur leur fonction, leur localisation et le type de cytokines qu'elles sécrètent. L'activation et la différenciation d'un lymphocyte T CD4⁺ naïf en l'une ou l'autre de ces populations dépendra de l'environnement en cytokines et de molécules de costimulation produites par les DC. Les deux premiers types de lymphocytes T CD4⁺ découverts sont les Th1 et Th2 [104]. Les lymphocytes T CD4⁺ Th1 produisent de l'INF- γ et sont impliqués dans les réponses cellulaires

cytotoxiques et les fonctions effectrices des NK, lymphocytes T CD8⁺ et des macrophages. Ils favorisent donc une réponse aux pathogènes intracellulaires. Les lymphocytes T CD4⁺ Th2 sécrètent de l'IL-4 et IL-13 et sont donc impliqués dans les réponses humorales et plus particulièrement dans la réponse antiparasitaire. De ce fait, les Th2 favorisent la production d'IgG4 et d'IgE par les lymphocytes B (voir section 2.1.5). Il est maintenant connu qu'il existe deux autres types majeurs de lymphocytes T CD4⁺. Le type Th17 exprime le récepteur IL-23 (IL-23R) et CCR6. Ces lymphocytes T CD4⁺ produisent les cytokines IL-17, IL-1, IL-6, IL21, IL-22 et TNF- α et sont essentiels dans le maintien de l'homéostasie intestinale. De ce fait, ils sont impliqués dans le contrôle de l'intégrité de l'épithélium intestinal et la production de cytokines pro-inflammatoires qui permettent de contrer l'invasion de bactéries et mycètes extracellulaires [105]. Enfin, les Treg ont des propriétés anti-inflammatoires et participent au contrôle de la tolérance immunitaire [106]. Ces cellules sécrètent notamment IL-10 et TGF- β [107] (revu dans [108]).

Bien que tous les types de lymphocytes T CD4⁺ puissent être infectés par le VIH, ce dernier infecte préférentiellement les lymphocytes T CD4⁺ activés ou les lymphocytes T CD4⁺ mémoires exprimant le récepteur CCR5 [3]. Comme il a été mentionné précédemment, l'infection au VIH s'accompagne d'une déplétion importante des lymphocytes T CD4⁺ mucosaux et particulièrement des lymphocytes Th17, lesquels expriment de hauts niveaux de CCR5 [109]. L'infection des Th17 ne peut expliquer totalement cette déplétion. Cependant, l'environnement pro-inflammatoire et la présence de protéines virales contribuent probablement à leur apoptose [110]. De plus, en raison de leur rôle important dans le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale muqueuse, la perte des lymphocytes Th17 entraîne une augmentation de la translocation microbienne (voir section 1.7.8) [111]. On observe aussi un déséquilibre dans le ratio des populations T et plus particulièrement une augmentation de la fréquence des Treg. Intuitivement, on pourrait penser que ces cellules sont utiles pour contrôler l'activation immunitaire chronique causée par l'infection. Or, les lymphocytes Treg suppriment aussi la réponse CD4 et CD8 VIH-spécifique qui pourrait être utile dans la lutte contre le virus. D'ailleurs, un ratio élevé de lymphocyte Treg a été corrélé avec une plus grande charge virale [112, 113].

1.7.7 Lymphocytes B

La réponse immunitaire des lymphocytes B dans le contexte du VIH est abordée à la section 2.3.

1.7.8 Activation immune chronique

Comme il a été mentionné plus tôt, la pathogenèse du VIH est marquée par une dysfonction immune entraînant une susceptibilité aux infections opportunistes. Il a longtemps été pensé que cette dysfonction était causée par la perte des lymphocytes T CD4⁺ infectés et l'incapacité du système immunitaire de compenser pour cette perte. Pourtant, dans un modèle animal de SIV, les macaques rhésus ne progressent pas vers le stade SIDA malgré une virémie élevée et une déplétion des lymphocytes T CD4⁺. La capacité des macaques rhésus de ne pas progresser tiendrait plutôt au fait qu'ils ne présentent pas de signe d'inflammation [114, 115]. Ainsi, il est de plus en plus reconnu que l'immunodéficience causée par le VIH serait, paradoxalement, causée par une activation immune chronique qui perdure tout au long de la vie de la personne infectée et n'est pas totalement restauré par la thérapie. On remarque alors une activation généralisée des cellules du système immunitaire se caractérisant par la présence de marqueurs d'activation et de prolifération sur les cellules (HLA-DR, CD38, Ki-67), une production accrue de cytokines pro-inflammatoires (INF, TNF) et un renouvellement constant de cellules comme les lymphocytes T, B et les cellules NK. Cette activation chronique épuise le système immunitaire qui, éventuellement, ne peut plus protéger adéquatement contre les invasions [55, 116-118].

Les causes exactes de cette activation chronique demeurent inconnues, mais sont probablement multifactorielles. Initialement, l'activation immune est utilisée par le virus afin d'augmenter le nombre de cellules cibles et lui permettre de se disséminer plus rapidement. Cependant, la raison de la persistance de ce phénomène au-delà de la phase aiguë ne fait pas consensus. Il pourrait s'agir d'une réaction immune innée et adaptative normale en réponse au VIH et ces antigènes ou bien l'action directe du virus lors de sa liaison sur des cellules cibles. Cependant, cette hypothèse n'explique pas l'activation qui perdure au-delà de la thérapie lorsque la réplication du virus est contrôlée. Une hypothèse de plus en plus mise en valeur est celle de la translocation microbienne. On sait que lors de l'établissement de l'infection, il y a

une déplétion massive des lymphocytes T CD4⁺ Th17 au niveau de la muqueuse intestinale provoquant une brèche dans la barrière mucosale. Cette brèche permet la translocation de produits microbiens, comme le lipopolysaccharide (LPS), provenant de la flore intestinale vers la circulation systémique. Ceci provoque une activation immune et un appel de cellules pro-inflammatoires (pDC, neutrophiles, monocytes) au détriment de cellules régulatrices essentielles au maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale, accentuant la translocation de produits microbiens et l'activation du système immunitaire notamment en liant des récepteurs comme les TLR [55, 116-118].

1.8 L'immunité naturelle au VIH

L'étude d'individus ayant la capacité de contrôler la maladie causée par le VIH ou ne devenant pas séropositifs malgré une exposition soutenue au virus pourrait mettre en lumière des facteurs génétiques ou immunologiques chez ces personnes qui ultimement permettraient de développer des stratégies thérapeutiques ou prophylactiques envers le VIH. Bien sûr, on ne peut mettre de côté des facteurs comme la charge virale ou le polymorphisme viral qui peuvent influencer la progression de la maladie. De plus, certains facteurs sociaux et culturels peuvent aussi influencer les risques de contracter le VIH. Cependant, en raison de l'emphase du présent mémoire sur les facteurs de l'hôte, nous n'aborderons pas plus en détail les caractéristiques du virus pouvant expliquer certains cas de résistance naturelle au VIH.

La recherche de facteurs immunologiques associés à la résistance au VIH est fort complexe. Certains facteurs trouvés dans une cohorte peuvent ne pas être présents dans une autre, ou même être associés à une plus grande susceptibilité au VIH. Cette disparité de résultats peut être causée par une définition de la résistance qui diffère d'une étude à l'autre. Elle indique aussi que la résistance est probablement multifactorielle et repose sur un équilibre précaire entre le virus, la génétique de l'hôte et une réponse immunitaire efficace, mais pas délétère. On parlera ainsi plutôt d'immunité naturelle au VIH, c'est-à-dire un processus actif permettant à ces individus de « résister » au VIH.

1.8.1 Facteur génétique : mutation CCR5

La véritable résistance au VIH est évidemment difficile à démontrer chez l'humain en raison de l'impossibilité éthique d'infecter volontairement un individu. La définition de résistance au virus repose donc majoritairement sur des observations épidémiologiques de cohortes ou l'étude de cas anecdotiques. Or, il existe tout de même une mutation génétique au niveau du corécepteur CCR5 qui confère une réelle résistance au VIH. Présente chez près de 10 à 20 % des caucasiens, mais quasi inexistante chez les personnes d'origine africaine ou asiatique, cette mutation est causée par une délétion de 32 paires de bases ($\Delta 32$) dans le gène codant pour le corécepteur CCR5. Les personnes homozygotes pour cette mutation n'ont donc pas de CCR5 exprimé à la surface de leurs cellules. Cependant, cette mutation confère seulement une résistance aux souches du virus M-tropique R5 et non aux T-tropique R4 [119].

1.8.2 Individus hautement exposés et séronégatifs

Les individus hautement exposés et séronégatifs (HESN) regroupent des gens qui par leurs fréquences et niveaux d'exposition probable au VIH devraient selon toute vraisemblance être infectés, mais demeurent séronégatifs IgG. Ce groupe de personnes inclut entre autres des utilisateurs de drogues intraveineuses, des hommes homosexuels ayant de nombreuses relations à risques, des couples sérodiscordants (séronégatif/séropositif) et des travailleurs du sexe (TS).

1.8.2.1 Lymphocytes T

On sait que la réponse cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ est essentielle dans la réponse contre le VIH puisqu'elle permet d'éliminer les cellules infectées. L'étude de cohortes de HESN a démontré l'existence chez certaines de ces personnes de lymphocytes T CD8⁺ VIH-spécifiques et fonctionnels [120, 121]. Intéressamment, ces lymphocytes T CD8⁺ ne reconnaissent pas les mêmes épitopes que ceux retrouvés chez les personnes séropositives [122], ce qui laisse penser qu'une réponse CD8 efficace ne dépend pas seulement de la présence de ces cellules, mais de leur capacité à reconnaître des portions d'antigènes précises. La capacité de maintenir une réponse CD8 efficace chez les individus HESN semblerait dépendre d'une exposition soutenue et fréquente au VIH, et ne pourrait perdurer lorsque la personne suspend ses comportements à risque [122] (revu dans [123]).

Une étude fait au sein d'une cohorte de TS du Kenya, a aussi démontré la présence de lymphocytes T CD8⁺ VIH-spécifiques chez des femmes séronégatives. Bien que ces lymphocytes furent trouvés dans le sang et au niveau de la muqueuse vaginale, c'est à ce dernier site qu'on en retrouvait le plus [124]. Du côté des lymphocytes T CD4⁺, des études au sein de la même cohorte kenyane ont révélé la présence de lymphocytes T CD4⁺ VIH-spécifiques. De plus, ceux-ci avaient un profil d'activation inférieur et une capacité de prolifération plus grande que les lymphocytes T CD4⁺ retrouvés chez les TS séropositives [125]. D'ailleurs, des fréquences élevées de lymphocytes T régulateurs « Treg » ont été retrouvées dans le sang des TS séronégatives, ce qui pourrait contribuer à un faible niveau d'activation immunitaire [126].

1.8.2.2 Anticorps

La recherche d'anticorps spécifiques chez les individus résistants au VIH est fortement explorée, puisque cela impliquerait une réponse adaptative efficace envers le virus. Évidemment, la présence d'anticorps IgG dans le sang supposerait une séroconversion et implicitement, l'infection de l'individu. Cependant, la présence d'anticorps aux portes d'entrée du VIH comme les muqueuses intestinale et vaginale pourrait permettre d'éviter une évasion du virus au niveau systémique. En ce sens, quelques études ont permis de démontrer l'existence d'anticorps de type IgA, et parfois IgG, au niveau du tractus génital de travailleuses du sexe (revu dans [123, 127]). Ces anticorps auraient probablement une activité neutralisante ou empêcheraient la translocalisation du virus au travers de l'épithélium mucosal [128, 129]. Un ratio plus important d'IgA VIH-spécifique par rapport aux IgG pourrait aussi permettre de contrôler le niveau d'inflammation de la muqueuse puisque les IgA n'ont pas la capacité d'induire le complément [123, 127]. Enfin, la présence d'IgA ayant la capacité de neutraliser le VIH a été démontrée chez des HESN au Kenya et en Italie tant au niveau systémique qu'au niveau des muqueuses. Bien que la capacité de neutralisation diffèrerait d'un site à l'autre, il se pourrait que la présence d'IgA dans le sang provienne d'une réponse mucosale [130].

1.8.2.3 Cytokines

La résistance au VIH pourrait aussi être reliée à un équilibre entre une réponse immunitaire efficace et un contrôle de l'inflammation aux portes d'entrée du virus qui limite le nombre de cellules cibles et la dissémination du virus au niveau systémique [131]. De ce fait, il a été démontré que la sécrétion, au niveau des muqueuses, de certains facteurs était associée à la résistance. Ainsi, la sécrétion de chémokines comme MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES a été associée à la prévention de l'infection en entrant en compétition avec le virus pour la liaison au corécepteur CCR5 [132]. De plus, des travaux antérieurs réalisés par notre équipe ont démontré, dans une cohorte de TS béninoises, que la résistance au VIH impliquait une production distincte de cytokines au niveau du tractus génital par rapport au compartiment systémique. Contrairement aux TS séronégatives, les TS séropositives avaient une production accrue de cytokines inflammatoires (TNF- α , INF- γ) [133].

2 Lymphocytes B

2.1 Développement des lymphocytes B (Figure 3)

Caractérisés par leur capacité de produire des immunoglobulines (Ig), ou anticorps, les lymphocytes B possèdent un récepteur B (BCR) composé d'une Ig formée de deux chaînes lourdes (H-*Heavy*) et de deux chaînes légères (L-*Light*). Celles-ci sont associées de façon non covalente aux protéines transmembranaires Ig α et Ig β , responsables d'envoyer le signal du BCR à la cellule lors de la reconnaissance d'un antigène [134].

Les gènes codant pour l'Ig sont retrouvés sur trois loci : μ pour la chaîne H et λ et κ pour la chaîne L. Cependant, un seul locus servira à l'expression de la chaîne L. Chacune des chaînes est formée d'une région constante (c) et d'une région variable (v). Les gènes codant pour la région v étant fragmentés, ils ne peuvent être exprimés directement. En fait, la région v est codée par différents segments contenant des versions alternatives. Ainsi, lors du développement des lymphocytes B, les gènes codant pour l'Ig subissent une série de réarrangements des différents segments visant d'abord à produire un gène pouvant être exprimé et ensuite à constituer un bassin de lymphocytes B ayant une grande diversité de BCR. La survie des lymphocytes B lors de ce processus dépend d'une sélection positive ou

négative à différents points de contrôle visant à éliminer les lymphocytes B non fonctionnels ou autoréactifs [2, 135].

2.1.1 Développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse

Tout au long de notre vie, les lymphocytes B sont formés dans la moelle osseuse à partir de cellules précurseurs hématopoïétiques, lesquelles ont été produites dans le foie lors de la phase embryonnaire. Le réarrangement des segments V (*variable*), D (*diversity*) et J (*joining*) de la chaîne H et des segments V et J de la chaîne L de l'Ig permet de définir 3 stades de développement [2, 136, 137].

Le premier stade, pro-B, est caractérisé par l'expression d'un pro-BCR ne contenant que les protéines Ig α et Ig β [134, 138]. Lors de ce stade, il y a un réarrangement des segments J_H et D_H suivi d'un second réarrangement permettant de joindre le segment V_H. La formation d'une chaîne H (μ -IgH) engage la cellule pro-B vers le second stade de développement, pré-B [2]. Lors de ce stade, les protéines $\lambda 5$ et VpreB s'assemblent en une chaîne L substitut. Cette dernière se lie à μ -IgH et aux protéines Ig α et Ig β pour former le pré-BCR [139-144]. C'est à ce stade que la cellule rencontre son premier point de contrôle. En effet, seules les cellules ayant un μ -IgH fonctionnel capable de se lier à la chaîne substitut pourront former un pré-BCR et enclencher une expansion clonale de ces cellules [135, 142, 145-147]. La formation d'un pré-BCR fonctionnel provoque l'arrêt du réarrangement de la chaîne H et de la production de la chaîne L substitut. Cet arrêt, aussi appelé exclusion allélique, prévient la formation de différentes chaînes H ayant une spécificité différente sur la même cellule [2, 146, 148]. Au fur et à mesure que les réserves de $\lambda 5$ et VpreB s'épuisent lors de la division des cellules, l'expression du pré-BCR n'est plus possible. À ce moment, la machinerie de réarrangement se réactive ce qui permet le réarrangement des segments V-J de la chaîne L [146]. Le réarrangement des segments V_L-J_L se fait en même temps sur les loci λ et κ bien que les réarrangements sur le locus κ soient initiés cinq fois plus souvent que sur le locus λ . Les réarrangements se poursuivent en parallèle sur chacun des loci, jusqu'à ce qu'une chaîne L fonctionnelle soit produite [146, 149]. À ce moment, une Ig de type IgM est exprimée à la surface d'un lymphocyte B immature [2, 146]. Pouvant être fortement autoréactifs, les lymphocytes B immatures subissent un nouveau point de contrôle. Les cellules sont exposées

Les lymphocytes Bti forment un ensemble hétérogène de cellules B présentes à différents stades de maturation. Chez la souris, il a été possible, selon les études, d'identifier 2 à 3 stades (T1, T2, T3) selon des marqueurs de surface et des caractéristiques fonctionnelles communes [159, 160]. Chez l'humain, les différents stades des lymphocytes Bti ne sont pas aussi bien définis et l'utilisation de marqueurs permettant leur identification est compliquée par le fait que certains d'entre eux sont présents sur les lymphocytes Bti, mais sont aussi régulés à la hausse sur les lymphocytes B activés/différenciés [161]. Quoi qu'il en soit, il existe tout de même des marqueurs permettant l'identification des lymphocytes Bti et leur division en stades similaires à ceux retrouvés chez la souris. Ainsi, les lymphocytes B immatures présents dans la moelle osseuse se distinguent par l'expression des marqueurs CD19⁺, CD21⁻, CD23⁻, CD38⁺, CD24⁺ et CD10⁺ [161-163]. Intéressamment, les lymphocytes B CD10⁺ sont parmi les premiers à émerger en périphérie à la suite d'une transplantation de moelle, laissant penser qu'il s'agit possiblement de lymphocytes Bti. D'ailleurs, une population de ces lymphocytes B immatures arbore un phénotype (CD21^{low}, CD23^{low}, IgM⁺, CD62L^{low}) analogue aux lymphocytes Bti de stade T1 chez la souris [161]. Il n'a pas été possible de trouver un phénotype B humain semblable au stade T2, cependant, les niveaux d'expression de CD21 permettraient de définir un certain degré de maturité. Ainsi, les lymphocytes Bti CD21^{low} ont une capacité proliférative moindre que les Bti CD21^{high} lors d'une stimulation avec CD40. En fait, la prolifération des Bti CD21^{high} est similaire aux lymphocytes B matures naïfs et serait donc à un stade supérieur de maturation que les Bti CD21^{low} [164]. Enfin, un troisième type de Bti se distingue par une perte de l'expression de CD10 ce qui impliquerait que ce stade se retrouve dans un continuum de maturation situé entre le stade T2 et les lymphocytes B matures [165]. Il est tout de même important de comprendre qu'il existe probablement une multitude de stades de maturation des Bti en plus des principaux déjà définis et pour lesquels on ne peut nécessairement établir un ordre séquentiel de maturation en raison des différents marqueurs utilisés dans les différentes études. Ces différents lymphocytes Bti sont possiblement présents à la fois dans la circulation sanguine et dans les OLS.

Au stade Bti, environ 40 % des lymphocytes B possèdent encore un fort potentiel autoréactif, particulièrement envers les antigènes du soi présents seulement en périphérie et

qui étaient absents lors du premier point de contrôle dans la moelle osseuse [166, 167]. La survie des Bti, et plus particulièrement la transition T1-T2, dépend donc du signal reçu via le BCR en plus de la stimulation par *B Lymphocyte Stimulator* (BLyS), un facteur de survie des lymphocytes B dont il est discuté plus amplement dans la section 3. En fait, le BCR de ces cellules envoie constamment un signal tonique basal qui induit un signal de mort à la cellule. Cet effet est cependant contrôlé par l'action de BLyS qui stimule la survie de la cellule via le récepteur BAFF-R. Dans le cas où le lymphocyte Bti aurait la capacité de lier un antigène du soi, les signaux de mort induits par le BCR seraient trop forts pour être contrebalancés par BLyS et la cellule entrerait donc en anergie ou apoptose (Figure 4). L'effet de BLyS semble particulièrement crucial pour la transition T1-T2 puisqu'en absence de BLyS, chez des souris transgéniques, le développement des lymphocytes B s'arrête au stade T1 [168].

Les lymphocytes Bti terminent leur maturation dans les OSL, où ils deviennent des cellules B matures naïves, c'est-à-dire des lymphocytes B n'ayant pas encore été activés par un antigène. À ce stade, les lymphocytes B co-expriment à leur surface les immunoglobulines IgM et IgD puisqu'il n'y a pas encore eu de commutation de classe (voir section 2.1.5). À la fin de cette maturation, les lymphocytes Bti se différencient principalement en deux types de cellules : les lymphocytes B folliculaires ou en cellules B MZ. Les lymphocytes B folliculaires, comme leur nom l'indique, sont localisés au niveau des follicules des OLS. Ils peuvent ainsi participer, avec les lymphocytes T, aux réponses immunitaires adaptatives (section 2.1.3). Les cellules B MZ seront abordées plus en profondeur à la section 2.2. Par un processus qui n'est pas encore totalement compris, l'engagement des lymphocytes B vers un type folliculaire ou de la zone marginale serait déterminé par la force du signal induit par la liaison d'auto-antigènes au BCR. Ainsi, chez la souris, un sous-groupe de lymphocytes Bti T1 ou T2 aurait la capacité de reconnaître des antigènes du soi avec une forte avidité (sous un certain seuil pour éviter l'anergie). Cette reconnaissance activerait en aval du BCR la Bruton's tyrosine kinase (BTK) et permettrait à ces cellules de se différencier en lymphocytes B folliculaires. Au contraire, les lymphocytes Bti ne reconnaissant qu'avec une faible avidité les auto-antigènes ne peuvent activer la BTK ce qui permet, entre autres, l'envoi d'un signal via l'interaction entre NOTCH2 (*Neurogenic locus notch homolog protein 2*) et delta-like 1 (DL1) exprimé à la surface des cellules endothéliales de la pulpe rouge de la rate. Ces lymphocytes B

se différencieraient alors en lymphocyte B MZ. La différenciation folliculaire/MZ dépend aussi du type de signal induit par BLyS. En fait, pour une raison encore inconnue, BLyS induit préférentiellement la voie canonique de NF- κ B chez les lymphocytes B destinée à devenir des lymphocytes B MZ contrairement aux lymphocytes B folliculaire pour lesquelles la voie non canonique est suffisante (revu dans [169]).

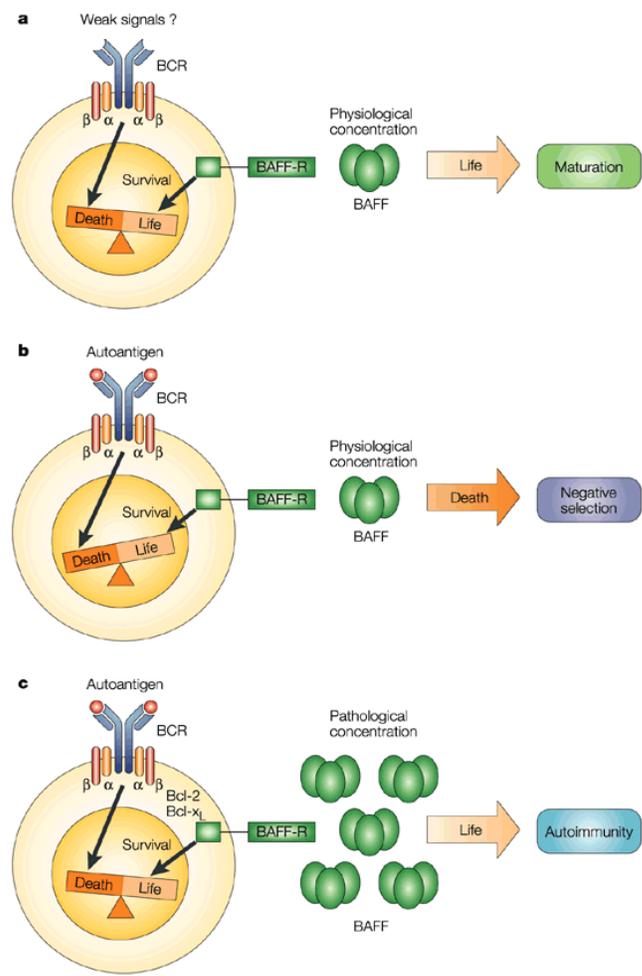


Figure 5. Impact de BLyS sur la survie des lymphocytes B [5]

2.1.3 Activation T-dépendante

L'activation T-dépendante des lymphocytes B matures naïfs est un processus impliquant à la fois les lymphocytes B, les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺, les DC et les FDC et ayant lieu au niveau de la rate et des OLS. Les lymphocytes B naïfs résident au niveau d'une structure folliculaire où s'entremêlent les FDC et laquelle est bordée par une zone comprenant les lymphocytes T. Les lymphocytes B ne sont pas sessiles. Au contraire s'ils ne rencontrent pas d'antigène spécifique, ils sortent du follicule et recirculent dans le système lymphatique. Lorsqu'un lymphocyte B, via son BCR, lie un antigène natif soluble ou exposé par les DC de façon extracellulaire [170], il y a diminution de l'expression de S1P1 (*sphingosine 1-phosphate receptor 1*) et l'expression de CXCR5 par les lymphocytes B permet leur rétention dans le follicule et enclenche sa migration CCR7-dépendante vers la jonction avec la zone T. Parallèlement, un lymphocyte T CD4⁺ antigène-spécifique est activé par la reconnaissance via son TCR de l'antigène présenté par le MHC-II d'une DC. La liaison de CD40L sur le lymphocyte T activé au CD40 sur le lymphocyte B en plus de signaux de costimulation comme IL-4 et IL-21 par la cellule T CD4⁺ activent le lymphocyte B. Le duo lymphocytes T/B migre ensuite vers le centre du follicule où un centre germinatif sera formé (revu dans [171-175]).

Anatomiquement, le centre germinatif comprend deux zones. La zone sombre est à proximité de la zone T et comprend des lymphocytes B ayant une forte capacité de prolifération nommés centroblastes. Dans cette zone, l'enzyme AID (*activation-induced cytidine deaminase*) catalyse l'hypermutation somatique et la commutation isotypique de classe (section 2.1.5) des lymphocytes B activés. La zone claire est un réseau où s'entremêlent les centrocytes (voir plus bas), des lymphocytes B, des lymphocytes T auxiliaires folliculaires et des FDC. En fait, après plusieurs rondes de prolifération, les centroblastes migrent vers la zone claire où ils deviendront des centrocytes et interagissent avec les antigènes présentés par les FDC. Les centrocytes possédant le BCR ayant la plus forte affinité pour l'antigène aura ainsi une plus grande capacité d'internaliser le BCR et de présenter l'antigène aux lymphocytes T auxiliaires via le MHC-II. En retour, les lymphocytes T envoient des signaux de stimulation et de survie. Il y a ainsi une compétition entre les lymphocytes B, et seuls ceux ayant la plus grande affinité pour l'antigène pourront survivre. De ce fait, le centre germinatif

n'est pas statique puisque les lymphocytes B migrent constamment d'une zone à l'autre, un processus de maturation permettant d'obtenir les lymphocytes B les plus spécifiques possible (revu dans [171-175]).

Ainsi, après chaque ronde de sélection positive, les centrocytes retournent soit à la zone sombre, ou quittent le centre germinatif en tant que lymphocyte B mémoire ou en tant que cellule plasmaticque productrice d'anticorps à long terme (section 2.1.5). C'est le temps passé dans le centre germinatif et le nombre de rondes de prolifération qui dictera si la cellule B deviendra une cellule plasmaticque ou mémoire. Tout comme lors du développement des lymphocytes B, c'est encore largement l'affinité et la force du signal BCR qui dictera la décision entre cellules mémoires ou plasmaticque. Ainsi les cellules B qui avaient initialement la plus grande affinité quitteront rapidement le centre germinatif en tant que cellule mémoire (revu dans [171-175]).

2.1.4 Activation T-indépendante

Il existe deux types d'activation T-indépendante (TI) des lymphocytes B. Les antigènes de type 1 ont des propriétés mitogènes permettant l'activation, la prolifération et la production d'anticorps par les lymphocytes B indépendamment de la reconnaissance d'un antigène spécifique par le BCR. L'activation se fait par la liaison de l'antigène à des PRR, notamment les TLR. L'antigène TI-1 classique est le lipopolysaccharide (LPS) bactérien, se liant aux TLR4 chez la souris ou l'ADN microbien se liant aux TLR9 chez l'humain [176]. L'activation TI de type 2 repose sur la reconnaissance d'antigènes répétitifs ou multivalents exprimés à la surface des microorganismes et liant plusieurs BCR spécifiques à la surface des lymphocytes B. La reconnaissance de l'antigène via le BCR n'est cependant pas suffisante pour enclencher le processus d'activation et des signaux secondaires reçus via les TLR sont nécessaires. De plus, les antigènes TI-2 ont la capacité de stimuler d'autres cellules à produire des cytokines pouvant induire la différenciation et l'activation des lymphocytes B. Un exemple important est la cytokine BLyS produite notamment par les DC. BLyS lie le récepteur TACI sur les lymphocytes B, et l'interaction MYD88-TACI résulte en une activation de la cascade de NF- κ B et éventuellement la production d'IgG et IgA par les lymphocytes B (voir section 3.1) (revu dans [177-179]).

Bien que tous les lymphocytes B puissent participer à l'activation TI-1, les lymphocytes B MZ (section 2.2) et les cellules B-1 (chez la souris) ont une plus grande responsivité aux signaux reçus lors de la reconnaissance d'un antigène TI-1 par les TLR. De plus, ces cellules B sont les seules pouvant être activées par les antigènes de type 2 [177, 178].

2.1.5 Plasmablastes et immunoglobulines

Les plasmablastes sont le dernier stade des lymphocytes B avant de devenir des cellules plasmatiques sécrétrices d'anticorps. À ce stade, le BCR est encore exprimé à la surface de la cellule et on peut identifier les plasmablastes comme étant $CD19^+$, $CD20^-$, $CD27^+$, $CD38^+$, $CD138^+$ [180]. À un état basal, près de 80 % des plasmablastes sont de type IgA. Le fait que ces cellules expriment la molécule CCR10 et la molécule d'adhésion intégrine β_7 [181] suggère une réaction immunitaire d'origine mucoale, probablement en réponse aux microorganismes présents à ces sites [182], et implique que ces plasmablastes ont la capacité de migrer vers les muqueuses. Lors d'une infection, l'activation T-dépendante ou T-indépendante des lymphocytes B folliculaires ou MZ entraîne leur différenciation en plasmablastes et la commutation isotypique de classe permet la production d'anticorps ou Ig variés. Il existe cinq types d'Ig sécrétés : IgM, IgG (1 à 4), IgA (1,2), et IgE.

Les IgM sont les premiers anticorps produits lors d'une exposition à un nouvel antigène. Le répertoire des IgM est restreint en raison du peu de mutations hypersomatiques requises pour leur production. La faible affinité de ces Ig pour leur antigène est compensée par leur capacité à former un pentamère, augmentant ainsi l'avidité totale. Ce sont aussi des anticorps participant aux réponses de première ligne, notamment en facilitant l'activation du complément [183]. Les IgG1 sont donc normalement produits en réponse à des antigènes protéiques solubles ou membranaires; c'est donc un anticorps que l'on retrouvera lors d'infection bactérienne ou virale. La réponse humorale envers les capsules bactériennes de polysaccharides est essentiellement attribuable aux IgG2, bien qu'une déficience puisse être légèrement compensée par les IgG1 et IgG3. D'ailleurs, les IgG3, comme les IgG1, participent aussi à la réponse virale et bactérienne. De plus, ces deux types d'anticorps ont la capacité de déclencher la toxicité cellulaire médiée par les anticorps (*Antibody-dependant cellular*

cytotoxicity-ADCC) [184]. En raison de leur effet pro-inflammatoire, les IgG3 ont une courte durée de vie, ce qui pourrait expliquer que l'on retrouve rarement des réponses humorales dominées par ceux-ci. Enfin, les IgG4 sont souvent retrouvés en réponse aux allergènes. Bien que les IgG1 soient aussi impliqués dans cette réponse, les IgG4 sont plus souvent formées à la suite d'une exposition soutenue et prolongée à l'allergène. On retrouve d'ailleurs un niveau élevé d'IG4, modulé par une sécrétion d'Il-10, lors de thérapies visant une désensibilisation. De plus, les helminthes et certains parasites auraient aussi la capacité d'induire une réponse IgG4 et seraient donc impliqués dans la réponse Th2 (section 1.7.6) [185]. Les IgA, sont les immunoglobulines les plus nombreuses dans le corps humain, particulièrement en raison de leurs sécrétions en réponse aux microorganismes commensaux au niveau des muqueuses. Les IgA1 prédominent dans le sérum sous forme monomérique, tandis que les IgA2 sous forme dimérique sont présents aux muqueuses [186, 187]. Enfin, les IgE sont impliquées dans les réponses allergiques et contre les parasites. Ils participent à la reconnaissance rapide de produits étrangers et permettent l'activation des mastocytes [188].

2.2 Lymphocytes B de la zone marginale

Les lymphocytes B MZ ont tout d'abord été découverts au niveau de la zone marginale de la rate des rongeurs, d'où l'origine de leur nom. Chez les rongeurs, la zone marginale se retrouve entre la pulpe rouge, riche en érythrocytes, et la pulpe blanche, un tissu lymphoïde secondaire [189]. Ainsi, les lymphocytes B MZ sont positionnés stratégiquement à la frontière entre le système sanguin et le système immunitaire. Ils sont donc hautement exposés aux antigènes « libres » et à ceux présentés par les macrophages, les neutrophiles et les DC. Bien que les lymphocytes B MZ soient restreints à la rate chez les rongeurs, chez l'humain, ils ont la capacité de recirculer et on les retrouve dans le sang, mais aussi dans les ganglions, les amygdales et dans certains tissus lymphoïdes muqueux [190-192].

Contrairement aux lymphocytes B folliculaires, les lymphocytes B MZ possèdent un BCR polyréactif qui leur permet de reconnaître un grand nombre d'antigènes. Il a été démontré qu'ils expriment des gènes Ig V_H somatiquement mutés indépendamment de la stimulation du BCR par un antigène. La fréquence de ces mutations atteint son maximum vers

2 à 4 ans ce qui laisse croire que les lymphocytes B MZ contiendraient un répertoire prédiversifié leur permettant de réagir envers un grand nombre d'antigènes [193, 194]. Ils expriment aussi un grand niveau de TLR à leur surface et la double reconnaissance d'un antigène par les TLR et le BCR permet aux lymphocytes B MZ d'être activés de façon TI. La production de BlyS (voir section 3.1) par les DC et neutrophiles stimule la survie des lymphocytes B MZ, leur différenciation en plasmablastes et éventuellement la production d'anticorps IgM, IgG et IgA. En effet, bien que l'on ait longtemps cru que les lymphocytes B MZ ne produisaient que des IgM de faible affinité, il est reconnu maintenant que la stimulation du récepteur TACI par BlyS (section 3.1) entraîne la commutation de classe et la production d'IgG et d'IgA. Contrairement à la réponse T-dépendante qui peut prendre 5 à 7 jours avant d'être effective, l'activation des lymphocytes B MZ ne prend que 1 à 3 jours, permettant de combler le décalage entre la réponse innée et adaptative [190-192]. Les lymphocytes B MZ ont aussi la capacité d'être activés de façon T-dépendante. En fait, ils expriment un haut niveau de molécules MHC-II ce qui leur confère une forte habileté comme CPA et la possibilité d'être activés via les lymphocytes T CD4⁺ folliculaires. Les lymphocytes B MZ participent davantage à la réponse T-dépendante en agissant comme « navette » d'antigènes. La liaison d'antigènes sur les molécules CD21 et CD35 des lymphocytes B MZ provoque leur migration vers les follicules, où ils peuvent déposer des complexes compléments-antigènes sur les DC folliculaires [191]. Enfin, les lymphocytes B MZ auraient aussi des caractéristiques B régulatrices (Breg) qui moduleraient la réponse des lymphocytes T en sécrétant de l'IL-10 (voir discussion).

Les lymphocytes B MZ constituent une niche hétérogène de cellules. L'expression de différents TLR, les niveaux d'expression de CD21 ou leur production de cytokines régulatrices comme IL-10 démontrent qu'il existe probablement plusieurs sous-groupes de lymphocytes B MZ avec des fonctions et une capacité d'activation différente [193].

2.3 Lymphocytes B dans le contexte du VIH

Bien qu'il n'ait jamais été prouvé que le VIH ait la capacité de se répliquer *in vivo* dans les lymphocytes B, une étude de Moir *et al.* a démontré *in vitro* qu'un environnement

immunitaire activé avait la capacité d'induire l'expression du récepteur CXCR4 à la surface des lymphocytes B et de permettre leur infection, ce qui suggère que les lymphocytes B pourraient agir comme réservoir viral [195]. De plus, il est connu que l'infection au VIH provoque de nombreuses dérégulations au niveau du compartiment B qui se manifestent, en outre, par une surreprésentation de sous-populations B immatures et « épuisées » (*exhausted*), une hyperglobulinémie et des réactions auto-immunes et lymphomes qui nuisent à une réponse efficace contre le virus. D'ailleurs, plusieurs études de notre laboratoire ont démontré un dérèglement du compartiment B lors d'une infection au VIH (voir section 3.3).

Bien qu'il existe une certaine controverse quant à la capacité du VIH de se répliquer dans les lymphocytes B, le virus est tout de même capable d'interagir avec ces cellules, notamment avec le récepteur du complément CD21, exprimé sur la majorité des cellules B matures. De plus, la liaison du virus via DC-SIGN ou certaines Ig à la surface des lymphocytes B a aussi été démontré *in vitro*. On ne connaît pas exactement l'utilité de ces interactions VIH-lymphocytes B, cependant elles pourraient faciliter la transmission du virus vers des cellules cibles. On ne retrouve pas un grand nombre de lymphocytes B arborant un virion à leur surface, suggérant que la majorité des perturbations au niveau du compartiment B ne proviennent pas de cette interaction directe entre le virus et les cellules B [196-198]. Malgré cela, il a été suggéré que gp120 [199] et Nef [200] pourraient être impliqués dans les dérégulations observées au niveau du compartiment B.

Il a été mentionné plus tôt, qu'une des marques importantes de l'infection au VIH est l'activation immune chronique affectant toutes les cellules du système immunitaire. Les lymphocytes B ne font pas exception à cette règle. L'hyperactivation des lymphocytes B se traduit notamment en une hyperglobulinémie c'est-à-dire une production accrue d'anticorps. Lors de la phase aiguë de l'infection au VIH, on observe rapidement une augmentation de la quantité d'IgG1 et IgG3, puis lors de la phase chronique une plus grande quantité d'IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 et IgA comparativement aux personnes séronégatives [201]. Cette hyperglobulinémie est concomitante avec une activation polyclonale des lymphocytes B et une augmentation de leur différenciation en plasmablastes. Alors que la majorité des plasmablastes en circulation sont de type IgA, en raison de leur migration vers les muqueuses [181], on

remarque que chez les personnes infectées, la majorité des plasmablastes sont plutôt de types IgG. Lors d'une vaccination ou d'une infection, par exemple à l'Influenza, il est normal d'observer une poussée transitoire de la proportion de plasmablastes IgG. Cependant, cette proportion plus élevée lors de l'infection au VIH perdure lors de la phase chronique. De plus, la majorité de ces plasmablastes ne sont pas VIH-spécifique. Normalement, lors d'une infection virale, la proportion de plasmablastes spécifique est d'environ 30 %, mais un maximum de 1,5 % de plasmablastes VIH-spécifique est normalement retrouvé [202]. L'hyperactivation des lymphocytes B se traduit souvent en une production d'auto-anticorps, témoignant d'une dérégulation dans le contrôle de la sélection des lymphocytes B autoréactifs ce qui pourrait être une conséquence indirecte de l'activation immune chronique en raison d'un apport accru en cytokine pro-inflammatoire comme $INF\alpha$, TNF, IL-6, et BLYS (voir section 3). Le virus en tant que tel pourrait aussi participer directement à l'activation des lymphocytes B. En effet, il a été démontré que gp120 avait la capacité d'induire la commutation de classe en liant des lectines exprimées à la surface des cellules [198].

L'hyperactivation des lymphocytes B s'accompagne d'une augmentation de la fréquence de certaines populations B $CD21^{low}$ [198, 203]. L'augmentation de cette fréquence peut d'abord s'expliquer par l'augmentation de plasmablastes ($CD27^+$) et de l'augmentation de la fréquence des lymphocytes B Ti ($CD10^+$) en réponse à la lymphopénie. Cependant, une population hétérogène de lymphocytes B $CD21^{low}$ avec un profil « épuisé » exprimant de hauts niveaux de récepteurs d'inhibition comme PD-1 (*Programmed cell death 1*) est présente chez les individus séropositifs [204]. L'origine de ces cellules B épuisées ne fait pas consensus et est compliquée par l'utilisation de marqueurs différents selon les études. Il est connu qu'une population B mémoire ($CD27^+$) au niveau des amygdales arbore le récepteur FCRL4 (*FC receptor -like protein 4*) et est parfois $CD21^{low}$. Intéressamment, des lymphocytes B FCRL4 et $CD21^{low}$ ont été retrouvés dans le sang de patients VIH^+ , mais pas chez les personnes VIH^- [205]. Ces cellules étaient aussi $CD21^{low}/CD27^-$ ce qui leur valut le nom de « tissue-like memory B cells ». La présence de nombreux récepteurs d'inhibition comme CD22, CD72, CD85j et CD85K en plus de FCRL4, une caractéristique commune avec les lymphocytes T épuisés est aussi retrouvée chez ces cellules B mémoires. De plus, on observe un profil particulier de récepteur à chémokines. Notamment une augmentation des récepteurs CXCR3 et

CD11c, requis pour la migration vers les sites d'inflammation, mais une diminution des récepteurs CCR7 et CD621 requis pour la migration vers les ganglions et CXCR4 et CXCR5 requis pour la migration des lymphocytes B vers les centres germinatifs. Ces lymphocytes B ont une capacité proliférative et des fonctions effectrices moindres, se résultant en une plus petite diversité d'immunoglobulines. De plus, l'augmentation de la fréquence des ces lymphocytes B mémoires « tissue-like » est accompagnée par une diminution de la fréquence de lymphocytes B mémoires « classiques » [198, 203].

2.3.1 Effet de la trithérapie sur les lymphocytes B

Certaines perturbations observées au sein du compartiment B sont renversées par la thérapie et la diminution de la virémie. Ainsi, l'hyperglobulinémie et la production spontanée d'anticorps sont réduites ce qui pourrait être expliqué par une diminution de la prolifération et de l'activation des lymphocytes B induites par la virémie élevée. D'ailleurs, on observe aussi une diminution de l'expression des marqueurs d'activation à la surface des lymphocytes B. De plus, on remarque une diminution du taux de renouvellement des cellules qui était une conséquence de l'hyperactivation [198]. Malgré cela, une étude de notre équipe a démontré que la thérapie ne permettait pas de rétablir les niveaux d'activation à ceux présents chez les personnes non infectées [70].

Bien que la trithérapie ait permis de diminuer les impacts du VIH sur le compartiment B, le débalancement dans les populations B mémoires persiste au-delà du traitement. Ainsi, la fréquence de cellules B mémoires « classique » ($CD27^+$) ne revient pas à la normale suite à la thérapie, bien qu'elle augmente légèrement. La diminution de la réponse T-dépendante pourrait s'expliquer par la perte permanente de certaines fonctions des lymphocytes T $CD4^+$, aux dommages causés aux structures lymphoïdes ou à la non-restauration du compartiment des DC. Cependant, la diminution de la réponse B T-indépendante perdure au-delà de la thérapie et est associée à une diminution de la fréquence de lymphocytes B mémoires IgM^+ « tissue-like ». Le rôle TI de ces lymphocytes B mémoires indique que ces cellules pourraient être similaires aux lymphocytes B MZ [198, 206]. Il est tout de même pertinent de mentionner que l'initiation d'un traitement tôt après l'infection, lors de la phase aiguë, semble favoriser un meilleur rétablissement vers la normale de la fréquence des lymphocytes B mémoires [207].

3 BLyS

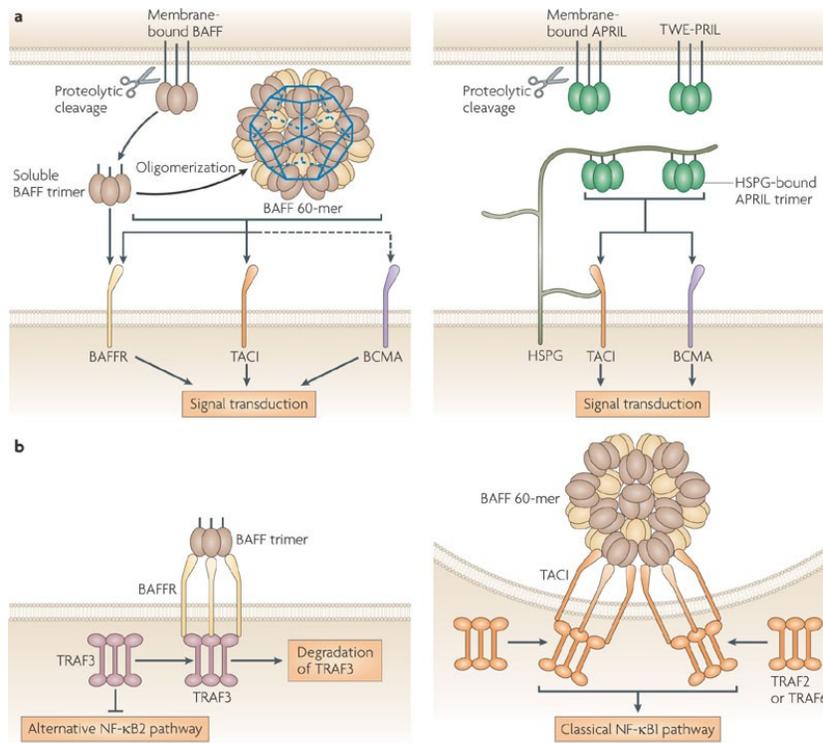
3.1 Fonction

B Lymphocyte Stimulator (BLyS), aussi connu sous le nom de BAFF (*B cell activating factor*), est une protéine transmembranaire de la famille des ligands de type TNF qui est un facteur de survie, de maturation et d'activation des lymphocytes B [208]. BLyS est majoritairement exprimé par des cellules myéloïdes comme les DC, les monocytes et les macrophages [209], les neutrophiles [210] et certaines populations de lymphocytes T [211]. De plus, certaines cellules non myéloïdes auraient aussi la capacité de produire BLyS comme les cellules épithéliales, les astrocytes et les fibroblastes [4]. Le mécanisme exact permettant l'expression et la sécrétion de BLyS n'est pas totalement connu. Cependant, on sait que son expression est induite par la présence de cytokines comme l'INF α , l'INF γ et IL-10 [209, 212] et d'hormones sexuelles comme l'estrogène [213]. La présence de produits microbiens comme le LPS et certains peptidoglycans et l'activation de TLR peuvent aussi stimuler la production de BLyS [4, 214]. BLyS existe sous deux formes, soit membranaire ou soluble. Suite à un clivage par une protéase de type furine, BLyS est retrouvée sous forme soluble trimérique ou oligomérique (60-mer) dans le sang [215].

Il existe trois récepteurs différents de BLyS soit TACI (*transmembranaire activator and cyclophilin ligand interactor*), BCMA (*B cell maturation antigen*) et BAFF-R. L'expression de ces différents récepteurs sur les lymphocytes B dépend fortement du stade de maturation de la cellule et de la fonction de cette cellule. Ainsi, BAFF-R est acquis par les lymphocytes B immatures lors de la formation d'un BCR fonctionnel et est éventuellement exprimé sur tous les lymphocytes B matures. BAFF-R est essentiel pour la survie et la maturation de ces cellules. TACI est présent sur toutes les cellules B en périphérie, mais particulièrement sur les lymphocytes B de première ligne comme les lymphocytes B MZ. TACI est nécessaire à l'activation TI. De plus, les lymphocytes B MZ possèdent un isoforme « court » de TACI qui permet une différenciation rapide en plasmablastes [216]. C'est aussi un récepteur exprimé à la surface des lymphocytes B mémoires. En plus de l'activation, il permet la commutation isotypique de classe. Il joue aussi un rôle dans la régulation du compartiment B puisqu'en son absence, on remarque un nombre excessif de lymphocytes B et des signes d'auto-immunité

[217-219]. Enfin BCMA est seulement retrouvé sur les plasmablastes et les cellules plasmatiques, facilitant leur survie à long terme. Il est important de noter que ces récepteurs peuvent être exprimés par d'autres cellules que les lymphocytes B. On retrouve par exemple, BAFF-R sur certaines populations de lymphocytes T et TACI à la surface des neutrophiles et des DC [4, 5, 220-222].

Chaque récepteur peut lier la forme soluble trimérique ou oligomérique de BLyS, mais avec une capacité différente de transduction du signal. Ainsi, BAFF-R et BCMA sont activés par les deux formes solubles tandis que TACI peut seulement être activé par la forme oligomérique [215]. Cette différence s'explique par le recrutement de molécules, les TRAF (*TNF receptor-associated factor*), qui lient des séquences précises de récepteurs comme BAFF-R, TACI et BCMA. Les TRAF n'ont pas une grande affinité pour ces séquences, ainsi la liaison est stabilisée lorsque plusieurs récepteurs sont à proximité, comme lorsque TACI lie une forme oligomérique de BLyS (Figure 5). À ce moment, la liaison de TRAF2 et TRAF6 à TACI permet d'induire la transcription de NF- κ B1. La liaison de BLyS trimérique à BAFF-R facilite plutôt la dégradation de TRAF3, qui normalement inhibe l'activation de NF- κ B2 [4]. La transcription de NF- κ B1 et NF- κ B2 sont tous les deux requis pour la survie des lymphocytes B, bien que la stimulation via BAFF-R soit suffisante. La voie NF- κ B induit la production d'une foule de protéines impliquées dans l'inhibition de l'apoptose, la synthèse de protéines, la survie et la croissance cellulaire [4].



Nature Reviews | Immunology

Figure 6. Liaison de BlyS soluble et membranaire à BAFF-R et TACI [4]

Il a longtemps été pensé que la forme membranaire de BlyS était inactive. En effet, il avait été démontré dans un modèle murin que lorsque le clivage de la protéine est inhibé, le développement et les fonctions des lymphocytes B sont altérés et les souris ont un phénotype semblable à celles ne produisant pas BlyS [223]. Cependant, cette étude a aussi démontré que BlyS membranaire avait la capacité de faciliter la survie des lymphocytes B, et de permettre la différenciation des lymphocytes B MZ et une production basale d'IgA [223]. De plus, la quantité de BlyS membranaire produite par ces souris était moindre que celle exprimée par les souris de type sauvage, suggérant que les dysfonctions observées pourraient plutôt être expliquées par une diminution de l'expression de BlyS membranaire et non l'absence de BlyS soluble [224, 225]. Aussi, il est suggéré que BlyS membranaire pourrait avoir la même fonction que BlyS soluble oligomérique et activer préférentiellement le récepteur TACI.

La nécessité de BlyS pour le maintien de l'homéostasie du compartiment des lymphocytes B a été démontrée grâce à l'étude de souris « knock-out » ne produisant pas ce

facteur. Ainsi, l'absence de BLyS provoque un arrêt du développement des lymphocytes B au-delà du stade B T1. Le fait que des souris déficientes pour les récepteurs TACI et BCMA aient un développement normal des lymphocytes B implique que l'action de BLyS à ce stade du développement serait dépendante de BAFF-R. Comme il a été mentionné précédemment (section 2.1.2), la transition T1-T2 repose sur le signal basal de mort produit par le BCR et sa capacité de lier ou non un antigène du soi. BLyS permet de contrecarrer ce signal de mort en stimulant la production de molécules pro-survie comme Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) et Bcl-x_L (B-cell lymphoma-extra large) et en diminuant l'expression de molécules pro-apoptiques comme Bak [4]. L'absence de BLyS montre aussi sa nécessité dans la survie des lymphocytes B matures passé le stade T2. En effet, suite à la neutralisation de BLyS, le compartiment B mature s'épuise à un rythme qui ne pourrait être expliqué par le simple non-renouvellement des cellules. Intéressamment, un apport en Bcl-2 substitue le manque de BLyS et permet la survie des lymphocytes B, mais ne rétablit pas un niveau normal de lymphocytes B MZ matures suggérant un rôle de BLyS dans la différenciation de ces cellules [226]. Enfin, l'absence de BLyS démontre aussi son implication au niveau des centres germinatifs. Les premières études démontraient son importance dans leur formation, or BLyS serait plutôt nécessaire pour le maintien des centres germinatifs en permettant la survie des lymphocytes B à plus long terme [214].

3.2 Implications dans l'auto-immunité

Des études ont démontré que certaines maladies auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde, le lupus et la sclérose en plaques étaient associées à des niveaux élevés de BLyS [214, 227]. D'ailleurs, on remarque chez la souris BLyS-transgénique un élargissement de la rate, des plaques de Peyer et des ganglions. Elle produit aussi un nombre accru de lymphocytes B, d'immunoglobulines totales et d'auto-anticorps et développent souvent des symptômes semblables au lupus [228-230]. L'impact d'une surproduction de BLyS sur les lymphocytes B se fait probablement le plus ressentir au niveau de la maturation des cellules. De ce fait, la souris BLyS-transgénique possède des niveaux normaux de lymphocytes B immatures dans la moelle osseuse, ce qui laisse penser que le bris de tolérance se fait probablement en périphérie. Comme il a été mentionné plus tôt, il existe de nombreux

mécanismes permettant d'éliminer les lymphocytes B autoréactifs. D'ailleurs, lors de la transition T1-T2, BLyS joue un rôle important pour la survie des lymphocytes B en contrebalançant les signaux de mort toniques envoyés via le BCR. Dans un état physiologique normal, les signaux produits lors de la reconnaissance d'un antigène du soi sont si fort, qu'ils ne peuvent être contrebalancés par BLyS ce qui déclenche l'apoptose de la cellule. Or, lorsqu'il y a excès de BLyS, les signaux de survie surpassent ceux de mort et les lymphocytes B auto-immuns peuvent survivre et compléter leur maturation [5]. Bien que toutes les populations B soient augmentées chez la souris BLyS-transgénique, ce sont particulièrement les lymphocytes B Ti-2 et les lymphocytes B MZ dont la fréquence augmente le plus, démontrant qu'un excès de BLyS perturbe le processus normal de maturation des cellules B [231]. On ne sait pas si un excès de BLyS favorise réellement la différenciation des lymphocytes B MZ au détriment des lymphocytes B folliculaires. Cependant, on sait que certaines cellules B autoréactives sont sélectionnées pour devenir des lymphocytes B MZ [232, 233] et l'augmentation d'une population de lymphocytes B Ti-2 autoréactifs pourrait pousser leur différenciation en lymphocytes B MZ [231]. Comme il a déjà été mentionné, les lymphocytes B MZ sont impliqués dans les réponses T-indépendantes. De plus, on sait que ces réponses polyréactives contre les microorganismes peuvent produire des réactions croisées avec des antigènes du soi. Ainsi, les manifestations observées chez la souris BLyS-transgénique et dans les maladies auto-immunes pourraient être expliquées par l'augmentation d'une population B MZ autoréactive. D'ailleurs de récentes études ont démontré que la stimulation des lymphocytes B MZ via TACI expliquerait probablement la production accrue d'immunoglobulines autoréactives. Ainsi, la délétion de TACI protège contre les manifestations auto-immunes, tout en préservant l'intégrité du compartiment B, ce qui implique qu'un traitement ciblant spécifiquement la liaison de BLyS à TACI pourrait être efficace contre certaines maladies auto-immunes [234].

3.3 Implications dans le VIH

Des travaux antérieurs de notre équipe de recherche ont démontré une similarité phénotypique entre la souris BLyS transgénique et une souris VIH transgénique développant

une maladie similaire au SIDA de façon Nef-dépendante [235, 236]. Ces travaux suggèrent dans un premier temps un lien entre des niveaux élevés de BLyS (Poudrier, Hanna, Jolicoeur, non publié) et les dérèglements du compartiment B lors de l'infection au VIH [237]. Ainsi, on observe une activation polyclonale des lymphocytes B et un bris de la tolérance, impliquant une hyperglobulinémie et la présence d'anticorps anti-ADN. En même temps, la capacité d'établir des centres germinatifs et de générer une réponse humorale lors d'une immunisation avec de l'alum-ovalbumine était diminuée chez ces souris. Un phénotype semblable est aussi observable chez la souris déficiente pour AIRE (régulateur d'immunité), laquelle a des niveaux élevés de BLyS dans le sang et en surface des mDC périphériques [238]. Il est aussi intéressant de mentionner que la souris VIH-transgénique arbore un dérèglement du compartiment DC se traduisant en une diminution du nombre total de DC, une accumulation de mDC immatures au point d'entrée des OLS et au niveau de la zone marginale de la rate et une diminution de leur capacité stimulatrice [239]. L'accumulation de mDC immatures au niveau de la zone marginale et le fait que les mDC ont un rôle important dans le trafic et la présentation d'antigènes suggèrent qu'ils pourraient contribuer à l'augmentation de la population B MZ, possiblement en réponse à un apport excessif de facteurs de croissance comme BLyS [240]. D'ailleurs, nous avons démontré récemment que la protéine virale Nef promouvait la production de BLyS par les DC humains [241].

Nous avons aussi démontré que des niveaux élevés de BLyS observés chez des personnes séropositives ont été associés à une augmentation d'auto-anticorps [242] et à une progression accrue de la maladie causée par le VIH [243, 244]. D'ailleurs, une étude longitudinale dans le sang et sur les PBMC de patients séropositifs présentant différents types de progression de la maladie a permis de démontrer que les progresseurs rapides et classiques avaient des niveaux élevés de BLyS contrairement aux non-progresseurs avirémiques qui avaient des niveaux de BLyS similaires aux personnes séronégatives. Ces niveaux élevés de BLyS dans le sang étaient accompagnés par une augmentation de l'expression de BLyS à la surface des mDC. De plus, une augmentation de la fréquence relative d'une population B présentant à la fois des caractéristiques communes aux lymphocytes B T_H1 et MZ, nommés lymphocytes B « précurseur MZ », était aussi observée en concomitance avec les niveaux élevés de BLyS. Au contraire, les signes de perturbation du compartiment B n'ont pas été

observés chez les non-progresseurs avirémiques suggérant que des niveaux élevés de BLYS et sa production par les mDC pourraient moduler la progression de la maladie causée par le VIH [70]. Récemment, nous avons démontré qu'une augmentation de l'expression de BLYS à la surface de DC et des granulocytes était aussi associée au dérèglement du compartiment B chez des macaques infectés au SIV. En effet, tout comme chez les humains ces macaques avaient une fréquence diminuée des lymphocytes B totaux accompagné d'une augmentation de la fréquence relative de lymphocytes B activés et d'une population CD27⁻/CD21^{-low} avec un profil épuisé. Ces perturbations du compartiment B étaient accompagnées d'une activation polyclonale reflétée par une hyperglobulinémie (IgG et IgM) [245]. D'ailleurs, une autre étude a démontré que l'infection au SIV s'accompagnait de niveaux élevés de BLYS et d'une incapacité à induire une réponse IgA T-dépendante au niveau des muqueuses au profit d'une réponse IgG et IgM [246]. Enfin, une autre étude a démontré une augmentation de l'expression de BLYS a la surface des pDC et des cellules myéloïdes chez des patients VIH⁺ [247].

Malgré les perturbations du compartiment B, on remarque tout de même un certain intérêt dans l'utilisation de BLYS dans une perspective de prévention du VIH. En effet, l'apparition rapide d'anticorps IgA anti-gp41 mucosaux a été corrélée à une élévation de BLYS et implique que ces anticorps proviennent probablement de populations B de première ligne comme les lymphocytes B MZ [248]. De plus des études proposent l'utilisation de BLYS comme adjuvant et démontrent que son utilisation entraîne une augmentation de la réponse humorale envers des antigènes du VIH [249], mais aussi une augmentation de la réponse des lymphocytes T CD8⁺ [250] suite à une vaccination. Il a aussi été démontré qu'une administration de BLYS avant une immunisation avec les glycoprotéines de l'enveloppe virale accentue la réponse au vaccin et augmente la fréquence et le potentiel des anticorps produits. L'apparition de ces anticorps était concomitante avec une augmentation du taux de survie des lymphocytes B et particulièrement les lymphocytes Bti et MZ [251]. D'ailleurs, il a été récemment démontré que certains anticorps anti-VIH largement neutralisants trouvés chez l'humain arboraient des similitudes avec les lymphocytes B MZ trouvés chez la souris [252].

Hypothèse

Des études effectuées avec des individus hautement exposés et non infectés par le VIH, définis comme présentant une certaine « résistance » et immunité naturelle face au virus, ont démontré que la réponse des lymphocytes B s'avère essentielle dans la lutte contre le VIH. Or, dans la plupart des cas, l'infection au VIH s'accompagne de dérégulations du compartiment des lymphocytes B qui nuisent à la génération de réponses efficaces. En effet, détectées tôt après l'infection, ces dérégulations perdurent, ne sont pas totalement restaurées par la thérapie, et mènent souvent à des manifestations auto-immunes et lymphomes [198]. Une étude longitudinale de notre groupe, effectuée avec des cellules mononucléées du sang circulant provenant de patients VIH⁺ avec différents types de progression clinique a démontré un niveau élevé de BLyS chez des individus VIH⁺ progressseurs était associé à une dérégulation des fréquences de populations de cellules B avec augmentation de cellules innées de la zone marginale (MZ) présentant des caractéristiques d'immaturité et d'activation. Au contraire, chez des individus VIH⁺ non-progressseurs avirémiques ou contrôleurs d'élite, les niveaux de BLyS étaient contenus et ce sont les fréquences de cellules B MZ présentant un phénotype plus mature qui étaient diminuées [70]. Cette population présente un plus grand index migratoire en réponse à la chémokine CCL25 ce qui pourrait refléter un recrutement de ces cellules en périphérie et une participation dans la bataille contre le VIH comme le démontrent nos études. (Gauvin *et al.*, en révision)

Tout nous porte à croire que la résistance au VIH pourrait aussi impliquer le contrôle de BLyS et son impact sur les cellules B. De ce fait, nous avons préalablement recruté une cohorte de travailleuses du sexe (TS) à Cotonou (Bénin) dans laquelle nous avons identifié des femmes qui demeurent séronégatives malgré une exposition soutenue au virus. Nous avons démontré chez ces femmes l'existence d'une réponse inflammatoire distincte, dans le sang et au niveau du TGF, associée à la résistance ou à la susceptibilité au VIH et qui suggère qu'un profil inflammatoire bas est associé avec une immunité naturelle (« résistance ») au VIH [133].

Ces observations nous amènent à émettre l'hypothèse que dans le contexte de la résistance au VIH, les niveaux de BLyS, dans le sang et à la surface des DC, sont régulés de façon à préserver l'intégrité du compartiment des lymphocytes B ce qui permettrait de maintenir une réponse efficace envers le virus.

Objectif

L'objectif principal du projet est de déterminer l'impact des niveaux de BLyS sur les populations de lymphocytes B dans un contexte de résistance au VIH. Les niveaux de BLyS dans le sang et à la surface des DC, des monocytes et des lymphocytes T seront mesurés chez des femmes béninoises TS VIH⁺, TS VIH⁻ et non-TS VIH⁻ provenant d'une étude prospective de cohorte. Les différentes populations de lymphocytes B et leur fréquence dans le sang seront caractérisées selon des marqueurs de surface et un intérêt particulier sera porté aux populations connues pour être particulièrement sensibles à BLyS (Ti, MZ). Étant donné le fait que BLyS est un facteur de survie et d'activation des lymphocytes B, les Ig totales et les isotypes seront mesurés afin d'évaluer l'activation polyclonale. Enfin, la présence de LPS pouvant influencer la production de BLyS, les niveaux de LPS, LBP et sCD14, signe de translocation microbienne, et d'inflammation seront mesurés.

Article

Levels of B Lymphocyte Stimulator (BLyS)/BAFF in the Blood of Beninese HIV Highly Exposed Uninfected Commercial Sex Workers Coincide With a B-Cell Profile Which May Reflect Natural Immunity Against HIV

Catherine Sabourin-Poirier, Johanne Poudrier*, Michel Roger *

*JP et MR sont co-auteurs séniors

Statut: Soumis à Scientific Report

Contribution des co-auteurs:

Catherine Sabourin-Poirier a effectué les expériences, analysé les résultats et participé à la rédaction de l'article. 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.

Levels of B Lymphocyte Stimulator (BLyS)/BAFF in the Blood of Beninese HIV Highly Exposed Uninfected Commercial Sex Workers Coincide With a B-Cell Profile which May Reflect Natural Immunity Against HIV.

Catherine Sabourin-Poirier^{1,2}, Johanne Poudrier^{1,2*}, and Michel Roger^{1,2*}

¹ Laboratoire d'immunogénétique, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Canada, ²Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie de l'Université de Montréal, Montréal, Canada,

*co-seniorship

Word count in text:

Word count in abstract: 211

Short Title: BLyS in natural immunity to HIV

Key Words: HIV, B-cells, BLyS/BAFF, highly exposed, natural immunity

Number of figures 6; table 1; supplementary figure 1

Reference count: 42

Address correspondence to: Johanne Poudrier and Michel Roger

ABSTRACT

We have previously shown that excess B lymphocyte Stimulator (BLyS)/BAFF in plasma and on the surface of blood dendritic cells (DC) of HIV-infected progressors coincides with B-cell dysregulations and particularly with increased frequencies of “precursor” innate marginal zone (MZ)-like B-cells. In contrast, both blood BLyS levels and frequencies of this population remained unaltered in HIV elite-controllers (EC). Based on these observations, we hypothesized that control of BLyS and innate B-cell status could play a role in natural immunity against HIV infection. Therefore, we assessed whether blood BLyS levels and B-cell status were associated with protection from HIV infection in HIV highly-exposed seronegative (HESN) commercial sex workers (CSWs) from Benin. We found BLyS levels in the blood of HIV-uninfected CSWs were lower than those observed in both HIV-infected CSWs and HIV-uninfected non-CSW controls. Levels of BLyS expression on blood T-cells, monocytes and DC were higher in HIV-infected CSWs than in both HIV-uninfected groups. Concomitantly, HIV-infected CSWs presented a dysregulated blood B-cell compartment, characterized by hyperglobulinemia, increased frequencies of populations presenting immature and/or innate profiles and a higher proportion of IgG⁺ than IgA⁺ plasmablasts. In contrast, relatively low levels of BLyS in the blood of HIV-uninfected CSWs coincided with a rather preserved B-cell compartment which reveals that “mature” MZ-like B-cells could be involved in natural immunity against HIV. These results highlight the importance of a better understanding of B cell populations and BLyS in the context of HIV resistance.

INTRODUCTION

Worldwide, most HIV infections are acquired through heterosexual intercourse, and in sub-Saharan Africa, 60% of new HIV infections affect women [1]. Vaccines hold promise for preventing the acquisition of HIV, and the success of designing such agents will benefit from the study of HIV highly-exposed seronegative (HESN) individuals, who provide a model of natural immunity to HIV. High levels of anti-inflammatory and neutralizing proteins, such as anti-proteases and HIV-specific immunoglobulins (Igs) are found in the genital mucosa of HESN [2,3]. In a cohort of HESN women from the Ivory Coast, HIV-specific mucosal IgA were shown to block viral transcytosis through tight epithelial barriers [3–5]. In a Kenyan

female commercial sex worker (CSW) cohort, HIV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses as well as cross-clade neutralizing IgA have been found in both the blood and genital tract of HIV-uninfected CSWs [2,3,6–10]. Moreover, in these individuals a low activation T-cell profile corresponds with a greater ability to proliferate in response to HIV p24 peptides when compared to HIV-infected CSWs [11]. Furthermore, elevated frequencies of T-regulatory lymphocytes have been found in the blood of HIV-uninfected CSWs [12]. In addition, we have previously shown that Beninese female CSWs had significantly lower genital levels of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IFN- γ than HIV-infected CSWs [13]. Altogether, these findings suggest that the capacity to maintain a low-key activation/inflammatory profile is associated with protection against HIV infection.

Until now, few studies have assessed B-cell expression profiles in the context of natural immunity against HIV. The detailed characterization of the Ig repertoire of cervical and systemic B-cells from a Kenyan HESN individual revealed that site-specific responses occur with unique regulation of tolerance and recruitment into local memory or blast B-cell compartments, and the infusion of systemic post-germinal center (GC) B-cells to the cervix seems to be a common event [14]. Understanding the nature and how these B-cell populations are solicited appears important to the design of preventive approaches.

Although the specific factors responsible for the natural immunity against HIV have yet to be fully unraveled, we believe that observations from HIV elite-controllers (EC) can shed some light. As such, our previous studies suggest that control of HIV disease progression may be linked to B lymphocyte Stimulator (BLyS)/BAFF expression status, and to its capacity of orchestrating B-cell population dynamics and responses [15]. Indeed, we have shown that BLyS over-expression in the blood of HIV-1-infected progressors coincided with major B-cell dysregulations and hyperglobulinemia, with increased frequencies of an activated population presenting characteristics of both transitional immature and innate marginal zone (MZ)-like B-cells, designated as “precursor MZ-like” [16,17]. In contrast, in EC, BLyS levels and precursor MZ-like B-cell frequencies remained similar to those observed in HIV-negative donors. Rather, percentages of MZ-like B-cells presenting a more “mature” profile were decreased when compared to both HIV progressors and HIV-negative individuals [16,17].

These findings suggest that the presence of these cells in a preserved BLYS non-inflammatory environment, such as encountered in EC, could be beneficial to the battle and even control of HIV (Gauvin et al; submitted). Moreover, BLYS levels and control have been implied in the immune response against several viral infections such as hepatitis C, Influenza, Epstein-Barr virus (EBV), and Respiratory Syncytial virus (RSV) [18]. In an effort to further understand elements involved in natural immunity to HIV, we have therefore assessed whether blood BLYS levels and B-cell status is associated with protection from HIV infection in HESN CSWs from Benin.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Female CSWs were recruited through a dedicated sex worker clinic in Cotonou, Benin. Non-CSW control subjects at low risk for exposure were enrolled from a general health clinic in Cotonou. Women were invited to participate in the study as they attended clinics. Women under 18 years old, pregnant or menstruating were excluded from the study. Recruited women were asked to answer a questionnaire about their age, duration of prostitution (if applicable), number of clients per week (if applicable), sexual behavior, vaginal douching practices, and use of condom or hormonal contraceptive. Subjects underwent vaginal examination by a physician and vaginal specimens were used for diagnosis of candidiasis, trichomoniasis and bacterial vaginosis by microscopic examination and Herpes simplex virus (HSV) infection by polymerase chain reaction (PCR). Endocervical swabs were obtained for the detection of Neisseria gonorrhoea and Chlamydia trachomatis (BD ProbeTec Et system). Blood samples were collected and tested for HIV status, diagnosis of syphilis and progesterone levels. Subjects with fever, visible vaginal inflammation and infection other than HIV were excluded from the study. HIV-1 positivity was defined by the presence of HIV-1 specific IgG tested with Vironostika HIV Uni-Form II Ag/Ab (Organon Teknika, Boxtel, The Netherlands). Non-reactive samples were considered HIV seronegative, whereas reactive samples were tested with Genie II HIV-1/HIV-2 (Bio-Rad, Hercules, CA). Genie II dually reactive samples (to HIV-1 and HIV-2) and discordant samples (Vironostika reactive/Genie II (non-reactive)) were further tested by INNO-LIA HIV I/II Score (Innogenetics NV, Technologiepark 6, Gent, Belgium). For the present study we selected samples from 10 HIV-1-uninfected and 10

treatment-naïve HIV-1-infected CSWs, and 21 HIV-1-uninfected non-CSW control subjects from the general population. The three study groups were all in the follicular phase of their menstrual cycle, not taking oral contraception, had no co-infections, bacterial vaginosis, trichomoniasis or candidiasis.

Sample collection and preparation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from whole blood by centrifugation on Ficoll gradients, washed and suspended in freezing medium (90% heat inactivated fetal bovine serum (hi-FBS), 10% DMSO) and kept in liquid nitrogen until use. Plasma and serum were kept frozen at -80°C until use.

Determination of blood LPS, LBP, sCD14 and soluble BLyS concentration

Serum levels of lipopolysaccharide (LPS), lipopolysaccharide binding protein (LBP) and soluble CD14 (sCD14) were measured respectively with commercial Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits by CUSABIO (Wuhan, China), Hycult Biotech (Plymouth Meeting, USA), and R&D systems (Minneapolis, USA) according to manufacturers' protocol. Serum levels of BLyS were determined by a commercial ELISA kit by R&D systems (Minneapolis, USA).

Determination of blood immunoglobulin and isotypes concentration

Levels of total immunoglobulin and isotypes IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM and IgA were measured in serum using the multiplex bead assay Milliplex Map Kit with human immunoglobulin isotyping Magnetic Bead panel by EMD Millipore (Billerica, USA) according to manufacturer's protocol. Analysis was performed on a Luminex 200 System (Luminex Corporation, Austin, TX, USA).

Evaluation of BLyS cell surface expression by flow cytometry

PBMCs were thawed and washed with RPMI 1640 followed by 1X PBS. A maximum of 10^6 PBMCs per sample were used for staining. Live/Dead cell exclusion was performed using AQUA Live/Dead Fixable stain (Invitrogen Life technologies, Eugene, USA). Non-specific binding sites were blocked using a Fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer (1X

PBS, 2% hi-FBS and 0,1 % sodium azide) supplemented with 20% hi-FBS and 10ug mouse IgG (Sigma-Aldrich, St-Louis, USA) per 10^6 cells. PBMCs were stained using the following fluorochrome conjugated mouse anti-human monoclonal antibodies: Alexa Fluor700 anti-CD16 (BioLegend, San Diego, CA, USA), APC anti-CD11c, FITC anti-CD3, PE-Cy7 anti-HLA-DR, and PerCP-Cy5.5 anti-CD14 (BD-Biosciences, San Jose, CA, USA), PE anti-BLyS (ebiosciences, San Jose, CA, USA). PBMCs were fixed with 1.25% paraformaldehyde and kept at 4°C for a minimum of 12 hours before flow cytometry analysis. A minimum of 10^5 events per sample were acquired with a LSRFortessa (BD-Biosciences, San Jose, CA, USA) and analyzed with FlowJo7.6.3 software (TreeStar, Ashland, OR, USA).

Evaluation of blood B-cell populations by flow cytometry

PBMCs processing, staining and analysis were performed as mentioned above. PBMCs were stained using the following fluorochrome conjugated mouse anti-human monoclonal antibodies: APC-Cy7 anti-CD10, Pacific Blue anti-CD19 (BioLegend, San Diego, CA, USA), Alexa Fluor700 anti-CD27, FITC anti-IgM, PE anti-CD21, BV650-anti-CD19, APC-H7-anti-IgG BV605-anti-IgM (BD-Biosciences, San Jose, CA, USA), APC-anti-CD3, APC-anti-CD56 PE-Cy7-anti-CD20, PE-anti-CD38, PerCP efluor710 anti-CD1c (ebiosciences, San Jose, CA, USA), and FITC-anti-IgA (EMD Millipore, Temecula, CA, USA).

Statistical analyses

The statistical significance of difference between groups was determined by Fisher's exact test for categorical variables and unpaired Student's T-test or one-way ANOVA analysis for variance when continuous variables were normally distributed or by Mann-Whitney U test otherwise. Analyses were performed using GraphPad Prism 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

RESULTS

Socio-demographic characteristics of the study population

The socio-demographic characteristics of selected CSWs and non-CSWs are shown in Table 1. The three study groups were similar with respect to age and vaginal douching practice.

Duration of sex work, average number of clients and condom use were similar between the HIV-infected and HIV-uninfected CSW groups.

Levels of expression of BLyS in serum and on blood T-cells, monocytes, monocytic CD14⁺CD11c⁺ myeloid dendritic cell (mDC) precursors and mDC

BLyS levels measured in serum of HIV-uninfected CSWs were significantly lower than those observed in HIV-infected CSWs and HIV-uninfected non-CSWs (Fig 1). Because determining frequencies of cells expressing BLyS might be influenced by the fluctuations in cell populations, we have assessed the relative percentages of T-cells, monocytes, monocytic CD14⁺CD11c⁺ mDC precursors [19] and mDC in the blood of the three study groups. The percentages of HLA-DR⁻ T-cells were increased in the blood of both HIV-infected and HIV-uninfected CSWs (Fig 2B) whereas the frequencies of activated HLA-DR⁺ T-cells were elevated only in the HIV-infected CSWs (Fig 2C) when compared to HIV-uninfected non-CSWs. Although no significant differences were observed in frequencies of blood monocytes between the three study groups (Fig 2D), we found frequencies of monocytic mDC precursors were greatly diminished in the blood of both CSW groups when compared to HIV-uninfected non-CSWs (Fig 2E). A similar pattern was observed for mDC, reaching significance only for the HIV-uninfected CSWs (Fig 2F).

Taking into account these observations, we found higher relative frequencies of T-cells, monocytes, monocytic mDC precursors and mDC expressing BLyS in the blood of HIV-uninfected CSWs when compared to those observed in both HIV-infected CSWs and control HIV-uninfected non-CSWs (Fig 3 B-F, left panels). BLyS expression levels for these cell populations were greater for both CSW groups when compared to that of control HIV-uninfected non-CSWs (Fig 3 B-F, right panels). However, it is on the surface of cells from the blood of HIV-infected CSWs that we found the highest BLyS expression levels when compared to both HIV-uninfected CSWs and control non-CSWs (Fig 3 B-F, right panels).

Analysis of B-cell populations in the blood

Relative percentages of total B-cells were lower in the blood of HIV-uninfected and HIV-infected CSWs when compared to that of control non-CSWs (Supp Fig 1). Naïve resting B-

cell frequencies were higher in HIV-uninfected CSWs when compared to those in HIV-infected CSWs, but lower than those found in control HIV-uninfected non-CSWs (Fig 4B). Conversely, the frequency of mature activated B-cells was lower in HIV-uninfected CSWs than in HIV-infected CSWs, but higher than in control non-CSWs (Fig 4C). Frequencies of resting switched memory B-cells were significantly decreased in the HIV-infected CSWs group only (Fig 4D). As for mature MZ-like B-cells, frequencies were decreased in the blood of both HIV-uninfected and HIV-infected CSW groups when compared to control HIV-uninfected non-CSWs, more so in HIV-infected than in HIV-uninfected CSWs (Fig 4F). As stated earlier, we had previously described increased frequencies of precursor MZ-like B-cells presenting an activated phenotype in the blood of HIV-infected progressors [16,17]. As such, we found a significant increased frequency of B-cells presenting this phenotype in the blood of HIV-infected CSWs when compared to the two HIV-uninfected groups (Fig 4G). We also found higher frequencies of B-cell populations presenting similar $IgM^+CD10^+CD21^{-/lo}$ characteristics in the blood of HIV-infected CSWs (Fig 4H-I), and GC-like $CD27^+IgM^-CD10^+CD21^{-/lo}$ cells (Fig 4J).

Frequencies of plasmablasts, total immunoglobulins and isotype concentration in the blood

HIV-uninfected CSWs had lower frequencies of blood IgM^+ and IgG^+ plasmablasts but higher percentages of IgA^+ plasmablasts when compared to HIV-infected CSWs (Fig 5 A-C). The relative frequencies of IgA^+ and IgG^+ plasmablasts were similar between the HIV-uninfected CSW and non-CSW groups. However, HIV-uninfected CSWs had lower frequencies of IgM^+ plasmablasts than the control HIV-uninfected non-CSWs. The evaluation of total serum immunoglobulin and isotypes profile demonstrated that HIV-infected CSWs had hyperglobulinemia with a higher concentration of IgG1, but lower concentration of IgG2 and IgG4 compared to HIV-uninfected CSWs and control HIV-uninfected non-CSWs (Figure 6).

DISCUSSION

Although HIV-uninfected CSWs had the lowest levels of BLyS in their serum, they presented greater frequencies of BLyS expressing cells in their blood when compared to both HIV-infected CSWs and control non-CSWs. However, HIV-infected CSWs presented the highest

levels of BLyS cell surface expression. Altogether these findings suggest that natural immunity to HIV, as encountered in HIV-uninfected CSWs, may involve relatively high frequencies of BLyS expressing cells while preserving homeostatic regulation of its cell surface expression level and soluble release. Recent studies have shown that in contrast to mDCs, pDCs exposed to HIV *in vitro* upregulate BLyS cell surface expression without release, and that this may depend on cellular intrinsic factors [20]. Such a regulation might not be cell population restricted but may also be influenced by the overall inflammatory status of the host. Therefore, the low-inflammatory response we have previously described in these HIV-uninfected CSWs [13] may be linked to the modulation of the intracellular machinery leading to BLyS expression and/or release. As to whether these are related to advantageous genetic mutations remains to be established.

The relatively higher levels of BLyS observed in the serum of HIV-infected CSWs is consistent with previous reports by us and others showing that BLyS expression is increased in the context of HIV disease [15]. This is likely due to direct and indirect factors associated with HIV infection [15]. Indeed, soluble HIV-Nef can directly modulate BLyS membrane expression and soluble release by monocyte derived DCs (mo-DCs) [21], and HIV-Env has been shown to upregulate BLyS expression by macrophages [22]. Moreover, the elevated inflammatory status we have previously described in HIV-infected CSWs [3,13] as well as elements of microbial translocation, such as LPS (Supp Fig 2), are known to up-regulate BLyS expression and release [21]. However, blood sCD14 levels were similar between the HIV-infected and HIV-uninfected groups (Supp Fig 2), suggesting that these African women might be exposed to microbial factors [23] other than HIV that can also lead to inflammation and microbial translocation, through diarrhea for example. This may help explain why soluble levels of BLyS measured in the serum of control HIV-uninfected non-CSWs are comparable to those observed in HIV-infected CSWs, and may suggest that these individuals have inflammatory/infectious conditions other than HIV favoring soluble release of BLyS, as we did not find increased expression on the surface of blood cells we analyzed from these individuals. Albeit, our sample processing did not allow us to assess expression by neutrophils, which are a substantial source of BLyS [24].

Consistent with previous findings by us and others [15,25,26], the high BLyS levels found in the blood of HIV-infected CSWs were concomitant with hyperglobulinemia and major B-cell dysregulations, namely increased activation and possibly pre-exhausted profiles and a decrease in switched memory. Furthermore, in agreement with the high prevalence of IgG⁺ plasmablasts in the blood of HIV-infected individuals [27], we found that the majority of plasmablasts in HIV-infected CSWs were IgG⁺, whereas IgA⁺ plasmablasts were found predominantly in HIV-uninfected CSWs and controls, likely reflecting homeostatic requirements at mucosal interfaces such as the GALT [27]. The high frequencies of IgG⁺ plasmablasts and IgG1 hyperglobulinemia in the blood of HIV-infected CSWs is consistent with polyclonal B-cell activation found in chronic viral infections. However, we noticed a relative reduction in serum IgG2 in these individuals when compared to HIV-uninfected CSWs and controls, which could reflect an increased need for IgG1 or perhaps IgG2 class switch interference by HIV factors such as Nef [28,29].

The fact that relative frequencies of “mature” MZ-like B-cells were reduced in the blood of both HIV-uninfected and HIV-infected CSW groups may reflect recruitment of this cell population to peripheral sites and involvement in the battle against HIV, as it has been suggested by our recent observations whereby this population presented a greater migration index in response to CCL25 (Gauvin et al; submitted). However, HIV-infected CSWs presented increased frequencies of MZ-like B-cells with an activated and precursor profile, not observed in HIV-uninfected CSWs. This is likely related to the over-expression of BLyS found in HIV-infected CSWs, which favors expansion and activation of innate B-cell populations, which are likely to support over-representation of polyreactive at the expense of high affinity HIV-specific eradicated antibody (Ab) responses. Altogether, these findings observed in HESN female CSWs suggest that natural immunity to HIV does not lead to the high turnover and increase in B-cell populations presenting an immature and/or innate “activated” possibly “pre-exhausted” phenotype, but may involve other populations such as mature MZ-like and their recruitment to peripheral sites.

The innate B-cell phenotype we describe in the blood of HIV-uninfected CSWs likely reflects active but regulated battle against HIV, and is reminiscent of that we reported for EC

[16,17]. Whereby, upregulation of BLyS seems required, but regulated so as to prevent deleterious effects. The fact that we find decreased frequencies of precursor and mature mDCs bearing BLyS in the blood of both HIV-uninfected and HIV-infected CSW groups would be consistent with recruitment of these populations to peripheral sites in battling against HIV [30,31]. In a murine HIV-transgenic model, mDCs accumulated in enlarged MZ areas [32,33], likely promoting expansion of the MZ B-cell pool through cellular interactions [34,35]. DC surface expression may be more efficient in targeting BLyS signals to MZ-like B-cells, which express BLyS receptor TACI especially permissive to the action of BLyS in its 60-mer soluble or membrane-bound form [36]. In fact, MZ B-cells have been shown to express the short isoform of TACI, where activation leads to rapid differentiation into plasma cells [37].

We believe a regulated scheme of DC/BLyS/innate B-cell interactions could be involved in natural immunity against HIV. As such, 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 was elevated immediately preceding the appearance of these Abs. Interestingly, repeated treatment of mice with BLyS increased the MZ compartment, and generated an increased response to Env immunization and bNAbs from these animals [39]. Understanding the dynamics of BLyS and its role in homeostasis of immune responsiveness appears pivotal to the design of vaccine strategies soliciting protective B-cell responses. Despite a small cohort, based on our observations, the capacity to contain BLyS expression levels seems associated with natural immunity against HIV, whereas excessive BLyS 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 [42].

Ethics statement

Written informed consent was obtained from all subjects who participated in the study and the investigation reported in this paper was approved by the Comité National Provisoire d'Éthique de la Recherche en Santé in Cotonou and the CHUM Research Ethics Committee.

Funding

This work was supported by Grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-119406) and the Réseau SIDA et Maladies Infectieuses, Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS).

Acknowledgments

We are indebted to N. Geraldo, A. Gabin, C. Assogba and C. Agossa-Gbenafa for their clinical expertise, to M. Massinga-Loembe, G. Ahotin, L.Djossou, and E. Goma for their technical assistance and to G. Batona and other field workers who helped with recruitment of commercial sex workers. We thank Dr M. Bourbonnière from eBioscience and Dr D. Gauchat from the flow cytometry core facility of the CRCHUM for their assistance and expertise. We are thankful to K. Beauchemin, J. Chagnon-Choquet and V. Thibodeau for their help in managing the Benin-Montreal specimen importation.

References

1. http://www.unaids.org/globalreport/Global_report.htm.
2. Schellenberg JJ, Plummer FA. The Microbiological Context of HIV Resistance: Vaginal Microbiota and Mucosal Inflammation at the Viral Point of Entry. *Int J Inflam*. **2012**; 2012:131243.
3. Poudrier J, Thibodeau V, Roger M. Natural Immunity to HIV: a delicate balance between strength and control. *Clin Dev Immunol*. **2012**; 2012:875821.
4. Bélec L, Ghys PD, Hocini H, et al. Cervicovaginal secretory antibodies to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) that block viral transcytosis through tight epithelial barriers in highly exposed HIV-1-seronegative African women. *J Infect Dis*. **2001**; 184(11):1412–22.
5. Hocini H, Bomsel M. Infectious human immunodeficiency virus can rapidly penetrate a tight human epithelial barrier by transcytosis in a process impaired by mucosal immunoglobulins. *J Infect Dis*. **1999**; 179 Suppl :S448–53.
6. McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Cellular immune responses to HIV. *Nature*. **2001**; 410(6831):980–7.
7. McKinnon LR, Nyanga B, Chege D, et al. Characterization of a human cervical CD4+ T cell subset coexpressing multiple markers of HIV susceptibility. *J Immunol*. **2011**; 187(11):6032–42.

8. Kaul R, Trabattoni D, Bwayo JJ, et al. HIV-1-specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant Kenyan sex workers. *AIDS*. **1999**; 13(1):23–9.
9. Fowke KR, Kaul R, Rosenthal KL, et al. HIV-1-specific cellular immune responses among HIV-1-resistant sex workers. *Immunol Cell Biol*. **2000**; 78(6):586–95.
10. Kaul R, Plummer FA, Kimani J, et al. HIV-1-specific mucosal CD8⁺ lymphocyte responses in the cervix of HIV-1-resistant prostitutes in Nairobi. *J Immunol*. **2000**; 164(3):1602–11.
11. Alimonti JB, Koesters SA, Kimani J, et al. CD4⁺ T cell responses in HIV-exposed seronegative women are qualitatively distinct from those in HIV-infected women. *J Infect Dis*. **2005**; 191(1):20–4.
12. Card CM, McLaren PJ, Wachihi C, et al. 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*. **2009**; 199(9):1318–22.
13. Lajoie J, Poudrier J, Massinga-Loembe M, et al. Differences in immunoregulatory cytokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments of HIV-1-infected commercial sex workers in Benin. *Mucosal Immunol*. **2008**; 1(4):309–16.
14. Gaudet RG, Breden F, Plummer F, Berry JD. Molecular characterization of the cervical and systemic B-cell repertoire: Unique, yet overlapping, immune compartments of an HIV-1 resistant individual. *MAbs*. **2011**; 3(2):181–91.
15. Poudrier J, Chagnon-Choquet J, Roger M. Influence of dendritic cells on B-cell responses during HIV infection. *Clin Dev Immunol*. **2012**; 2012:592187.
16. Fontaine J, Chagnon-Choquet J, Valcke HS, Poudrier J, Roger M. High expression levels of B lymphocyte stimulator (BLyS) by dendritic cells correlate with HIV-related B-cell disease progression in humans. *Blood*. **2011**; 117(1):145–55.
17. Chagnon-Choquet J, Fontaine J, Poudrier J, Roger M. IL-10 and lymphotoxin- α expression profiles within marginal zone-like B-cell populations are associated with control of HIV-1 disease progression. *PLoS One*. **2014**; 9(7):e101949.
18. Vincent, FB, Saulep-Easton D, Figget WA, et al., The BAFF/APRIL system: emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev*, **2013**. 24(3): :203-15.
19. Tacke F, Randolph GJ. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology*. **2006**; 211(6-8):609–18.
20. Borhis G, Burelout C, Chaoul N, et al. Plasmacytoid dendritic cells and myeloid cells differently contribute to B-cell-activating factor belonging to the tumor necrosis factor superfamily overexpression during primary HIV infection. *AIDS*. **2016**; 30(3):365–76.
21. Chagnon-Choquet J, Gauvin J RJ, Fontaine J, Poudrier J, Roger M. HIV Nef Promotes Expression of B-Lymphocyte Stimulator by Blood Dendritic Cells During HIV Infection in Humans. *J Infect Dis*. **2009**; 199: 1007-1018.

22. He B, Qiao X, Klasse PJ, et al. HIV-1 envelope triggers polyclonal Ig class switch recombination through a CD40-independent mechanism involving BAFF and C-type lectin receptors. *J Immunol.* **2006**; 176(7):3931–41.
23. The World Factbook. 2013-2014. <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/index.html>.
24. Puga I, Cols M, Barra CM, et al. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol.* **2012**; 13(2):170–80.
25. Moir S, Fauci AS. B cells in HIV infection and disease. *Nat Rev Immunol.* **2009**; 9(4):235–45.
26. Moir S, Fauci AS. Insights into B cells and HIV-specific B-cell responses in HIV-infected individuals. *Immunol Rev.* **2013**; 254(1):207–24.
27. Buckner CM, Moir S, Ho J, et al. Characterization of plasmablasts in the blood of HIV-infected viremic individuals: evidence for nonspecific immune activation. *J Virol.* **2013**; 87(10):5800–11.
28. Qiao X, He B, Chiu A, et al. Human immunodeficiency virus 1 Nef suppresses CD40-dependent immunoglobulin class switching in bystander B cells. *Nat Immunol.* **2006**; 7(3):302–10.
29. Xu W, Santini P a, Sullivan JS, et al. HIV-1 evades virus-specific IgG2 and IgA responses by targeting systemic and intestinal B cells via long-range intercellular conduits. *Nat Immunol.* **2009**; 10(9):1008–17.
30. Fontaine J, Coutlée F, Tremblay C, et al. HIV infection affects blood myeloid dendritic cells after successful therapy and despite nonprogressing clinical disease. *J Infect Dis.* **2009**; 199(7):1007–18.
31. Fontaine J, Poudrier J, Roger M. Short communication: persistence of high blood levels of the chemokines CCL2, CCL19, and CCL20 during the course of HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **2011**; 27(6):655–7.
32. Poudrier J, Weng X, Kay DG, Hanna Z, Jolicoeur P. The AIDS-Like Disease of CD4C/Human Immunodeficiency Virus Transgenic Mice Is Associated with Accumulation of Immature CD11bHi Dendritic Cells. *J Virol.* **2003**; 77(21):11733–11744.
33. Poudrier J, Weng X, Kay DG, 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.* **2001**; 15(2):173–85.
34. Batista FD, Harwood NE. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol.* **2009**; 9(1):15–27.
35. MacPherson G, Kushnir N, Wykes M. Dendritic cells, B cells and the regulation of antibody synthesis. *Immunol Rev.* **1999**; 172:325–34.
36. Mackay F, Schneider P. Cracking the BAFF code. *Nat Rev Immunol.* **2009**; 9(7):491–502.

37. Garcia-Carmona Y, Cols M, Ting AT, et al. Differential induction of plasma cells by isoforms of human TACI. *Blood*. **2015**; 125(11):1749–58.
38. Yates NL, Stacey a R, Nolen TL, et al. HIV-1 gp41 envelope IgA is frequently elicited after transmission but has an initial short response half-life. *Mucosal Immunol*. **2013**; 6(4):692–703.
39. Pujanauski L, Janoff E, McCarter M, Pelanda R, Torres R. Mouse marginal zone B cells harbor specificities similar to human broadly neutralizing HIV antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* **2013**; 110(4):1422–1427.
40. Poudrier J, Roger M. Dendritic cell status modulates the outcome of HIV-related B cell disease progression. *PLoS Pathog*. **2011**; 7(8):e1002154.
41. Borrow P. Innate immunity in acute HIV-1 infection. *Curr Opin HIV AIDS*. **2011**; 6(5):353–63.
42. Cerutti A, Cols M, Puga I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol*. **2013**; 13(2):118–32.

Figure legends

Figure 1. Concentration of BLYS in the serum of HIV-1 uninfected non-commercial sex workers (CSWs), HIV-1 uninfected CSWs and HIV-1 infected CSWs. Concentrations (pg/ml) were compared with unpaired T test. Significance levels are shown as *(p<0.05)

Figure 2. Frequencies of T-cells, monocytes, myeloid DC (mDC) precursors and mDC in the blood of HIV-1 uninfected non-commercial sex workers (CSWs), HIV-1 uninfected CSWs and HIV-1 infected CSWs. A) Cells were gated on live PBMCs and then on HLA-DR⁻CD3⁺ (HLA-DR⁻ T-cells), HLA-DR⁺ CD3⁺ (HLA-DR⁺ T-cells) and HLA-DR⁺CD3⁻ (APCs). APCs were further characterized as monocytes (CD14⁺CD11c⁻), mDC precursors (CD14⁺CD11c⁺) and mDC (CD14⁻CD11c⁺). Frequencies (%) of B) HLA-DR⁻ T-cells, C) HLA-DR⁺ T-cells, D) monocytes, E) mDC precursors, and F) mDC are relative to live PBMCs. Significance levels are shown as *(p<0.05), **(p<0.01), ***(p<0.001)

Figure 3. BLYS expression by T-cells, monocytes, myeloid DC (mDC) precursors and mDC in the blood of HIV-1 uninfected non-commercial sex workers (CSWs), HIV-1 uninfected CSWs and HIV-1 infected CSWs. A) Cells were gated on live PBMCs and then on HLA-DR⁻CD3⁺ (HLA-DR⁻ T-cells), HLA-DR⁺CD3⁺ (HLA-DR⁺ T-cells) and HLA-DR⁺CD3⁻ (APC). APCs were further characterized as monocytes (CD14⁺CD11c⁻), mDC precursors (CD14⁺CD11c⁺) and mDC (CD14⁻CD11c⁺). Relative Frequencies (%) of B) HLA-DR⁻ T-cells, C) HLA-DR⁺ T-cells cells, D) monocytes, E) mDC precursors, and F) mDC expressing BLYS (left panels) and Geometric mean fluorescence intensity (GeoMFI) of membrane BLYS expression levels (right panels) are relative to each population. Significance levels are shown as *(p<0.05), **(p<0.01), ***(p<0.001)

Figure 4. B-cell populations in the blood of HIV-1 uninfected non-commercial sex workers (CSWs), HIV-1 uninfected CSWs and HIV-1 infected CSWs. A) Cells were gated on live PBMCs and then on total B-cells (CD19⁺). Cells were further characterized based on their expression of CD27, IgM, CD21, CD10 and CD1c. The Frequencies (%) of B) naïve resting (CD27⁻IgM⁺CD21^{hi}CD10⁻), C) mature activated (CD27⁺IgM⁻CD21^{lo}CD10⁻), D) resting

switched memory (CD27⁺IgM⁻CD21^{hi}CD10⁻), E) transitional immature (CD27⁻IgM⁺CD21^{hi}CD10⁺), F) mature marginal zone (MZ)-like (CD27⁺IgM⁺CD21^{hi}CD10⁻CD1c⁺), G) precursor MZ-like (CD27⁺IgM⁺CD21^{lo}CD10⁺CD1c⁺), H) (CD27⁻IgM⁺CD21^{lo}CD10⁺CD1c⁻), I) (CD27⁺IgM⁺CD21^{lo}CD10⁺CD1c⁻), and J) (CD27⁺IgM⁻CD21^{lo}CD10⁺CD1c⁻). B-cell populations and/or differentiation stages are relative to total B-cells. Significance levels are shown as *(p<0.05), **(p<0.01), *** (p<0.001)

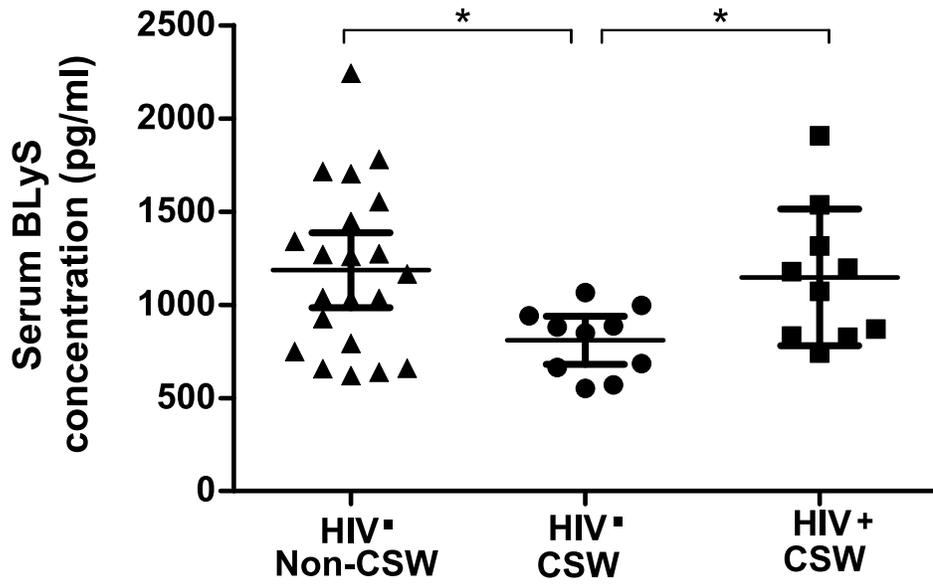
Figure 5. Plasmablasts isotypes frequencies in the blood of HIV-1 uninfected non-commercial sex workers (CSWs), HIV-1 uninfected CSWs and HIV-1 infected CSWs. A) Cells were gated on live PBMCs and then on total B-cells (CD19⁺CD3⁻CD56⁻). Plasmablasts were gated on CD20⁻CD38⁺⁺ B- cells and further characterized as IgM⁺, IgA⁺ or IgG⁺. B) The frequencies (%) of IgM⁺ (left panel), IgA⁺ (middle panel) and IgG⁺ (right panel) plasmablasts are relative to total plasmablasts. Significance levels are shown as *(p<0.05), **(p<0.01), *** (p<0.001)

Figure 6. Immunoglobulin isotype frequencies in the blood of HIV-1 uninfected non-commercial sex workers (CSWs), HIV-1 uninfected CSWs and HIV-1 infected CSWs. Serum concentrations (ng/ml) were compared with unpaired T test. Significance levels are shown as *(p<0.05), **(p<0.01), *** (p<0.001)

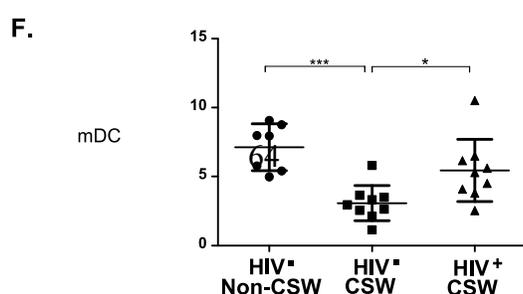
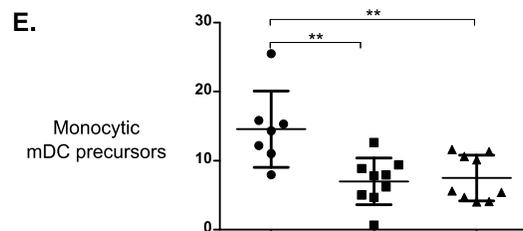
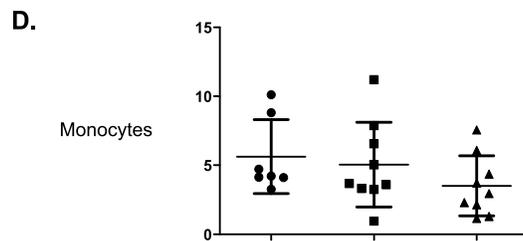
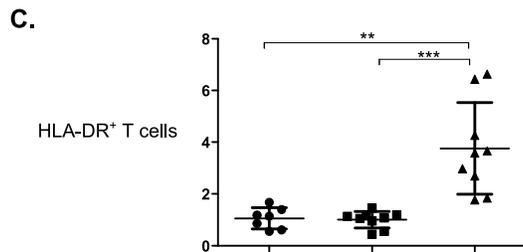
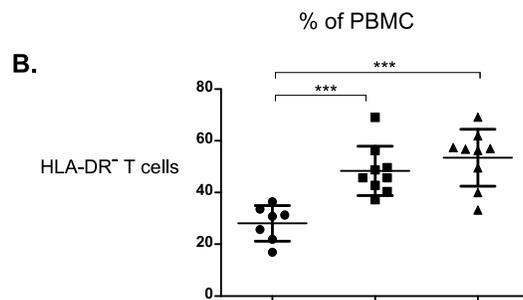
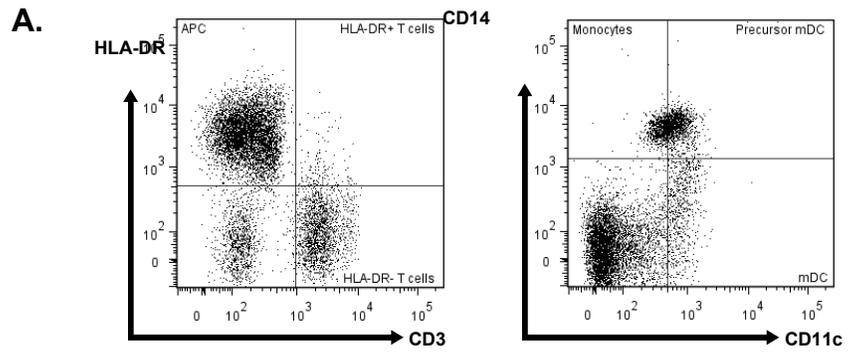
Supplementary Figure 1. Total B-cell frequency in the blood of HIV-1 uninfected non-commercial sex workers (CSWs), HIV-1 uninfected CSWs and HIV-1 infected CSWs. Cells were gated on live PBMCs and then on total B-cells (CD19⁺). Significance levels are shown as *** (p<0.001)

Supplementary Figure 2. Concentration of lipopolysaccharide (LPS), lipopolysaccharide binding protein (LBP) and soluble CD14 (CD14s) in the blood of HIV-1 uninfected non-commercial sex workers (CSWs), HIV-1 uninfected CSWs and HIV-1 infected CSWs Serum concentrations (pg/ml), (ng/ml) and (ng/ml) respectively, were compared with unpaired T test. Significance levels are shown as *(p<0.05), **(p<0.01), *** (p<0.001)

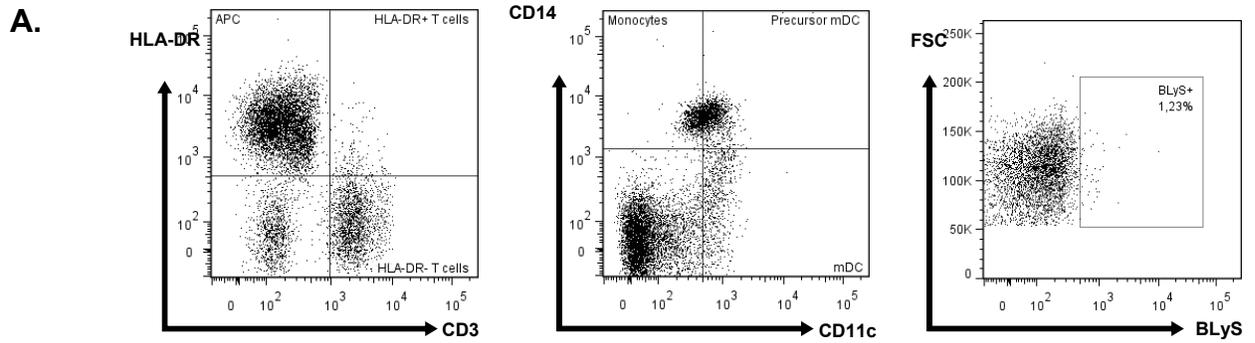
Article- Figure 1



Article- Figure 2

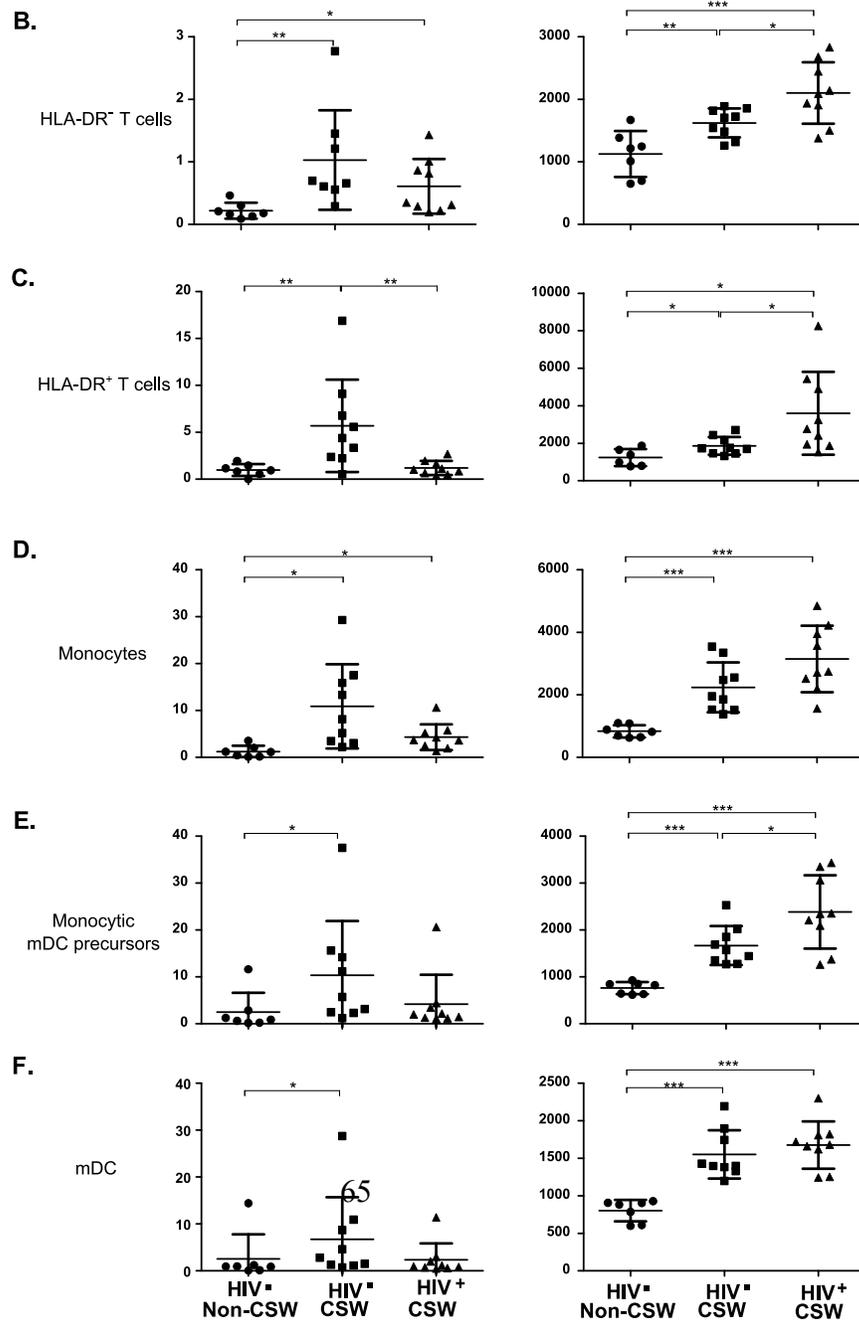


Article-Figure 3

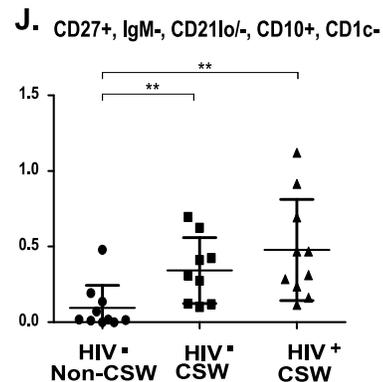
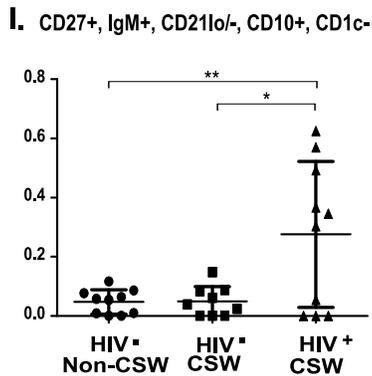
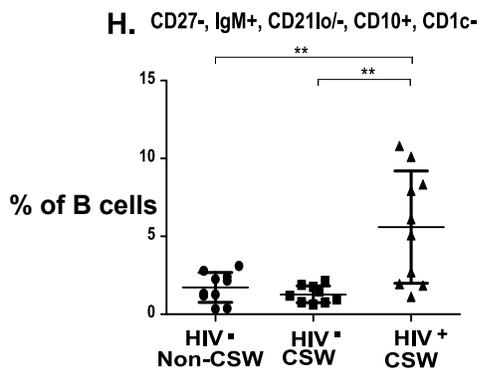
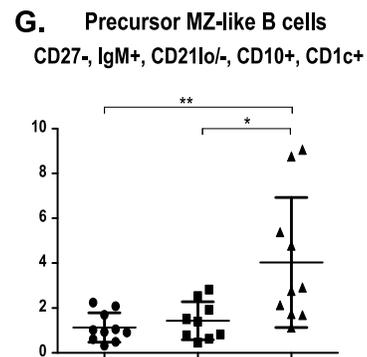
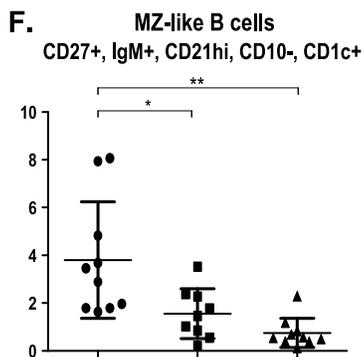
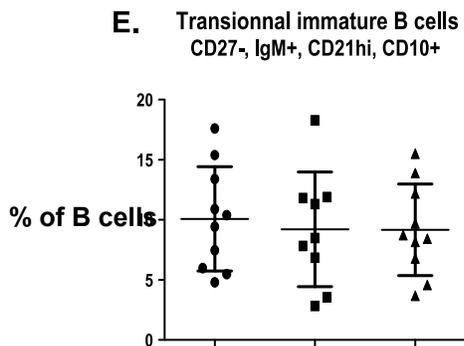
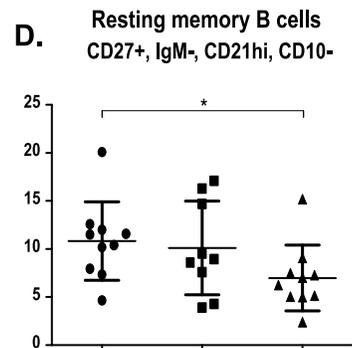
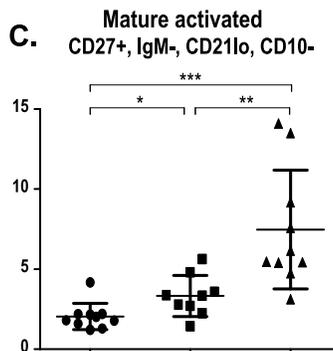
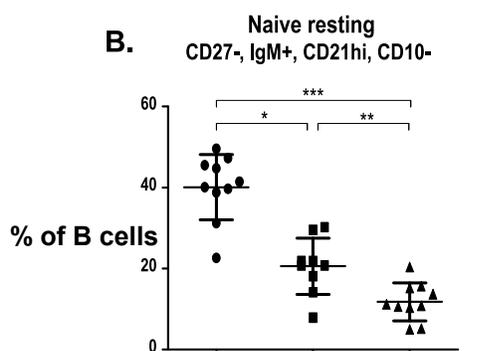
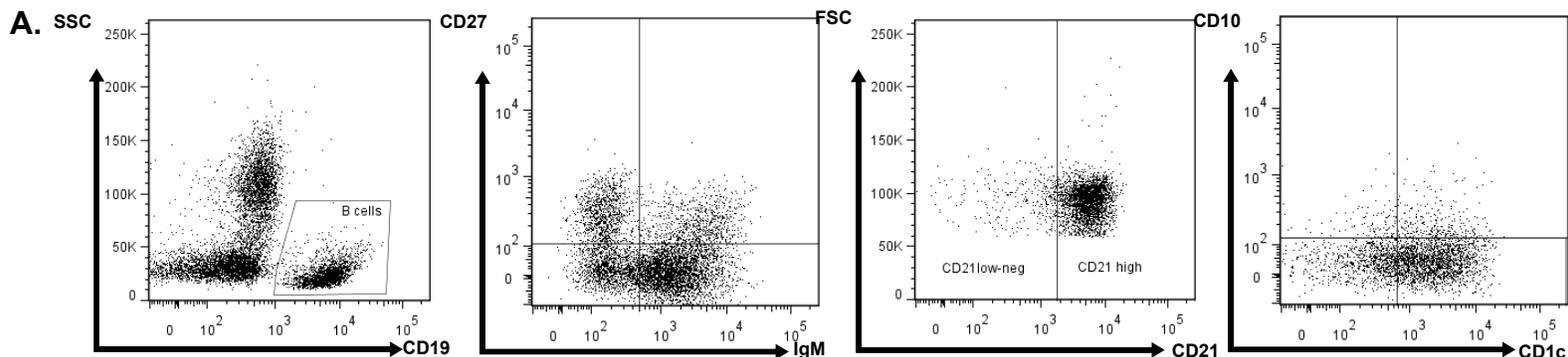


Cells expressing BLYS (%)

BLYS expression (GeoMFI)

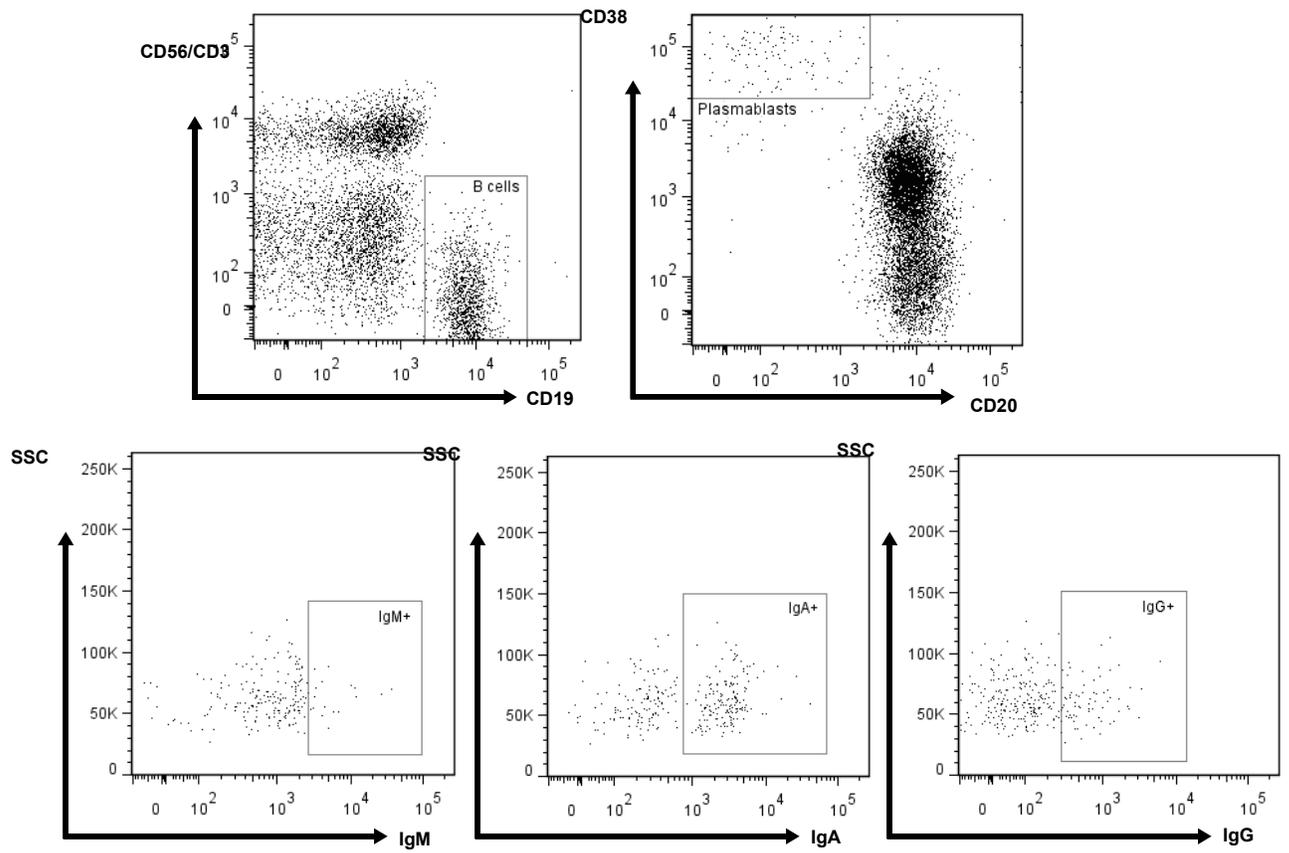


Article- Figure 4

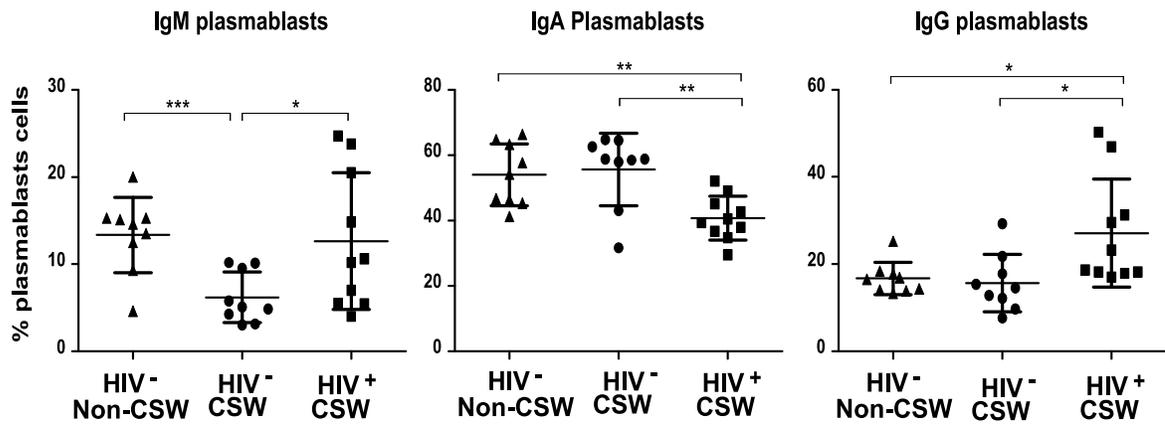


Article- Figure 5

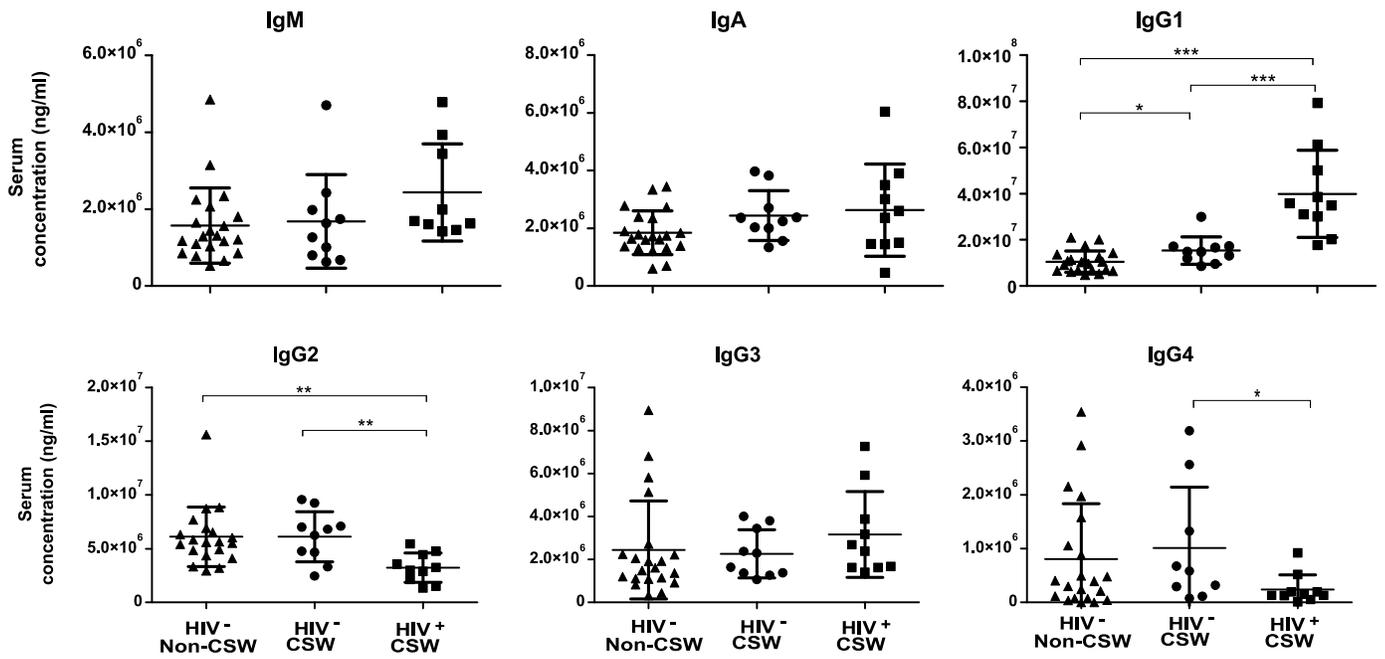
A.



B.



Article- Figure 6



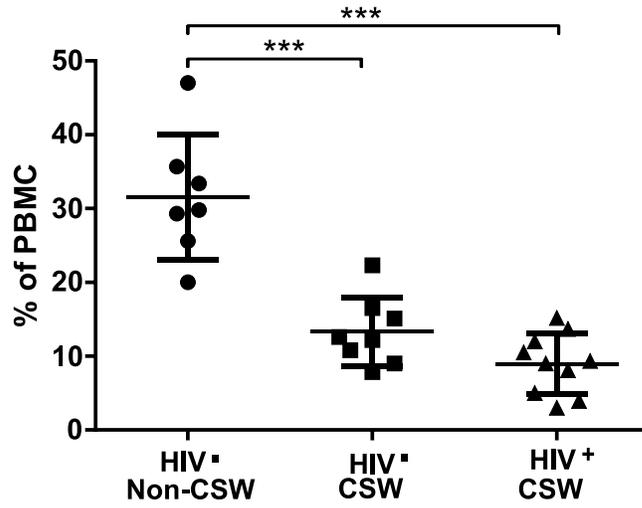
Article- Table 1 Distribution of demographic and sexual behavior in HIV⁻ non-CSWs, HIV⁻ CSWs, and HIV⁺ CSWs

	HIV ⁻ non-CSWs	HIV ⁻ CSWs	HIV ⁺ CSWs	p-value ^a
	N=21	N=10	N=10	
Age, mean (SD), years	37.6 (9.5)	41.4 (8.3)	43.1 (10.1)	NS
Duration of sex work , mean (SD), years	NA	5.6 (1.4)	5.4 (3.3)	NS
Number of clients past week, mean (SD)	NA	17.6 (14.9)	19.6 (14.3)	NS
Condom always used with clients past week	NA	8/10 (80%)	3/10 (30%)	NS
Vaginal douching	21/21 (100%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)	NS

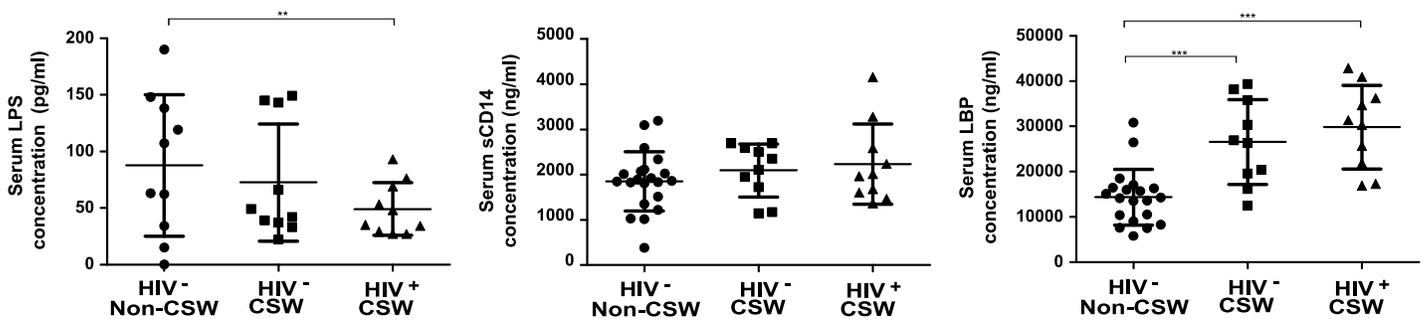
CSW, commercial sex workers; HIV, human immunodeficiency virus; N, number of participants; NA, non-applicable; NS, non-significant; SD, standard deviation.

^a p-value for the comparison across all groups were calculated with one-way ANOVA analysis for variance of the age; Mann-Whitney U test for the duration of sex work and number of clients; Fisher's exact test for condom use and vaginal douching.

Article-Supplementary Figure 1



Article-Supplementary Figure 2



Discussion

La découverte d'un vaccin efficace et d'un traitement curatif contre le VIH représente probablement l'un des plus importants « Saint Graal » en recherche biomédicale. Comme il a été mentionné plus tôt, l'infection au VIH s'accompagne de dérégulations du compartiment B qui compromettent la réponse humorale envers le virus. Caractérisées par une activation polyclonale, un taux de renouvellement accéléré et une altération de la fréquence de certaines populations cellulaires, ces perturbations sont détectées tôt après l'infection, perdurent et ne sont pas totalement restaurées par la thérapie. Très peu d'études se sont penchées sur le profil des lymphocytes B dans un contexte de résistance ou d'immunité naturelle envers le VIH. Pourtant, l'étude d'individus présentant de telles caractéristiques pourrait permettre de mettre en lumière des facteurs génétiques ou immunologiques favorisant le maintien de l'intégrité du compartiment des lymphocytes B et éventuellement de développer des stratégies thérapeutiques ou préventives.

Dans cette optique, une étude préalable faite par notre équipe de recherche avait été faite au sein d'une cohorte de patients séropositifs présentant différents profils de progression de la maladie causée par le VIH (cohortes primo-infection et non-progresseurs à long terme (LTNP) du Réseau FRQS-SIDA). Cette étude a démontré que les patients progresseurs rapides et classiques avaient des niveaux supérieurs de BLyS, dans le sang et à la surface des DC, et qui étaient concomitants avec une dérégulation du compartiment B. De ce fait, une augmentation de la fréquence d'une population de lymphocytes B exprimant IL-10 [253] et présentant des caractéristiques communes aux lymphocytes B MZ et B_{ti} a été trouvée chez les progresseurs. Au contraire, les niveaux de BLyS et le compartiment B étaient relativement préservés chez les non-progresseurs avirémiques [70]. Nous avons donc émis l'hypothèse que la résistance au VIH pourrait aussi impliquer les lymphocytes B et le maintien des niveaux de BLyS. Pour valider cette hypothèse, nous avons eu recours à une cohorte de travailleuses du sexe (TS) à Cotonou (Bénin) dans laquelle nous avons identifié des femmes qui demeurent séronégatives malgré une exposition soutenue au virus. Nous avons démontré chez ces femmes l'existence d'une réponse inflammatoire distincte, dans le sang et au niveau du TGF, associée à la résistance ou à la susceptibilité au VIH et qui suggère que le maintien d'un profil

inflammatoire bas et une certaine activité cellulaire sont associés à une résistance active envers le VIH [133].

Niveaux et expression de BLyS

Dans un premier temps, nous avons démontré que les niveaux de BLyS solubles dans le sang et dans le CVL (Figure 6, page suivante) des femmes « résistantes » TS VIH⁻ étaient inférieurs à ceux mesurés chez les TS VIH⁺ et les non-TS VIH⁻ (groupe contrôle). Le niveau de BLyS mesuré chez les TS VIH⁺ peut être attribué à leur statut VIH. De ce fait, comme mentionné précédemment, plusieurs études ont déjà démontré une augmentation des niveaux de BLyS chez les personnes séropositives avec maladie progressive [70, 243, 244]. Cette augmentation pourrait être attribuable à des effets directs ou indirects du virus, bien qu'il n'y ait pas de corrélation significative entre les niveaux de BLyS et la charge virale ou le compte de lymphocytes T CD4⁺ chez les TS VIH⁺. Cependant, une étude de notre équipe a montré que la protéine virale Nef avait la capacité de directement moduler l'expression de BLyS et son relargage par les DC dérivées de monocytes [241]. De plus, une étude de Cerutti *et al.* a démontré que l'enveloppe du VIH pouvait induire la production de BLyS par les monocytes [254]. Il est toutefois étonnant de remarquer que les niveaux de BLyS mesurés chez les non-TS VIH⁻ sont similaires à ceux des TS VIH⁺. En effet, lors de notre étude avec la cohorte Primo-infection, le groupe contrôle avait des niveaux de BLyS inférieurs aux progresseurs et similaires aux non-progresseurs avirémiques [70]. Les niveaux plus élevés que l'on observe chez les non-TS VIH⁻ pourraient donc s'expliquer par un environnement inflammatoire plus important chez ce groupe d'individus. En effet, on sait que ces femmes vivent dans des conditions distinctes de celles en Amérique du Nord, notamment une exposition plus soutenue à certains pathogènes entériques ou vectorielles [255]. De plus, elles ont des pratiques, comme des douches vaginales qui pourraient accroître les risques de translocations microbiennes au niveau de la muqueuse vaginale et causer de l'inflammation [256]. En ce sens, les niveaux de LPS et sCD14 sont relativement similaires pour les trois groupes étudiés, ce qui implique qu'ils sont exposés à des produits microbiens pouvant moduler la production de BLyS. Le fait que les TS VIH⁻ aient les niveaux les moins élevés de BLyS pourraient suggérer un contrôle des niveaux de BLyS intrinsèque aux TS VIH⁻ et qui est indépendant des conditions

environnementales inflammatoires et de l'exposition au VIH. Cependant, on ne peut exclure qu'il y ait aussi une composante génétique et/ou une condition particulière favorisant un statut immunitaire non permissif à l'infection au VIH. Par exemple, ces femmes pourraient avoir une infection parasitaire déviant la réponse immunitaire vers un type Th2. De ce fait, une étude de notre laboratoire sur une autre cohorte béninoise de TS a démontré un niveau sanguin élevé d'IL-4, une cytokine stimulant la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocyte Th2, chez les TS VIH⁻ [257]. IL-4 est aussi un facteur de prolifération et de survie des lymphocytes B, ce qui pourrait contribuer à une réponse B tout en maintenant de plus faibles niveaux de BLyS [258].

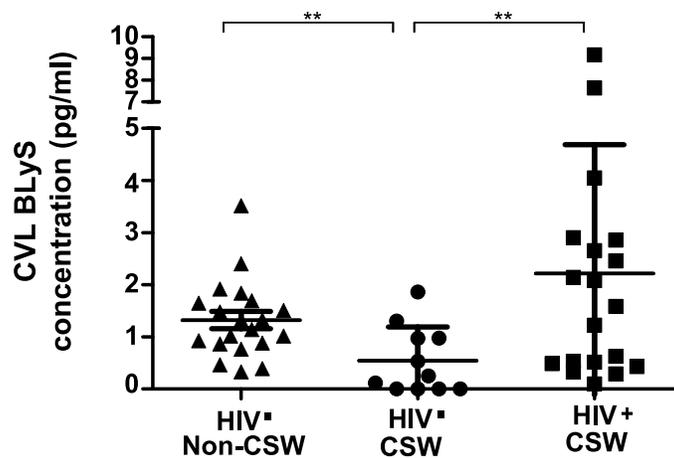


Figure 6. Concentration de BLyS dans le CVL de non TS-VIH- (HIV⁻ non-CSW) TS VIH⁻ (HIV⁻ CSW) et TS VIH⁺ (HIV⁺ CSW). Les concentrations (pg/ml) ont été comparées par test de Student. La signifiante est montrée comme *(p<0.01)

Il est tout de même intéressant de noter que malgré une plus faible concentration de BLyS soluble dans le sang et dans le CVL, les TS VIH⁻ ont une plus grande fréquence de cellules exprimant BLyS. Ces cellules ont aussi un niveau d'expression plus élevé que les non-TS VIH⁻, mais demeurent moins élevé que chez les TS VIH⁺. Des études ont démontré que les pDC provenant de donneurs sains expriment BLyS à leur surface, mais sans le relâcher. De plus, les pDC exposés au VIH *in vitro* augmentent aussi leur niveau d'expression de BLyS, mais sans le relarguer. Cette expression membranaire de BLyS se fait de façon INF-

indépendante et implique un mécanisme d'expression et de relargage intrinsèque à la cellule [247]. Malgré le fait que ces études restent à confirmer *ex vivo* en tenant compte du contexte inflammatoire de l'hôte, on ne peut pas exclure qu'un tel mécanisme, inconnu à ce jour, existe chez les TS VIH⁻ et qui pourrait expliquer les fréquences d'expressions que l'on observe dans ce groupe. Aussi, il se pourrait que chez les TS VIH⁻ ces niveaux de BLyS membranaire soient suffisants pour maintenir l'intégrité des populations B tout en favorisant la survie et l'activation des lymphocytes B. De plus, il a été démontré que BLyS membranaire a la capacité d'activer préférentiellement le récepteur TACI. En ce sens, une étude récente de notre laboratoire sur la cohorte de Primo-infection a démontré qu'un niveau plus élevé de BLyS chez les progresseurs était concomitant avec une augmentation de la fréquence de lymphocytes B au profil immature et MZ que nous avons nommés « Précurseurs MZ-like » [70] et qui expriment préférentiellement TACI (Chagnon-Choquet, Poudrier, Roger non publié). De plus, ces cellules expriment IL-10, une interleukine associée à un potentiel Breg [253]. Bien qu'aucun type de lymphocytes B n'ait pu être directement défini comme Breg, on sait qu'une production accrue d'IL-10 est associée à un déséquilibre du ratio Treg/ T effecteur [259] ce qui pourrait contribuer à une diminution de la suppression virale lors d'une infection au VIH [260]. De plus, une étude récente de l'équipe de Fabienne Mackay a démontré que la production d'IL-10 stimulait l'activation du récepteur TACI par BLyS [261]. Sachant que la fréquence de cellules exprimant BLyS à leur surface est élevée chez les TS VIH⁻, il serait possible de suggérer que ces niveaux soient suffisants pour maintenir un faible niveau d'inflammation tandis que les niveaux élevés chez les TS VIH⁺ pourraient être en lien avec une immunosuppression délétère.

Enfin, pour ce qui est des non-TS VIH⁻, il est vrai qu'il est contradictoire d'observer des niveaux élevés de BLyS soluble, mais un niveau et une fréquence d'expression membranaire faible. Par contre, le BLyS soluble détecté pourrait provenir de cellules pour lesquelles nous n'avons pas mesuré l'expression. De ce fait, les neutrophiles sont une grande source de BLyS [210]. De plus, notre équipe a récemment démontré qu'il y avait une augmentation de l'expression de BLyS par les granulocytes chez des macaques infectés par le SIV [245]. Il serait donc raisonnable d'extrapoler ces résultats au VIH chez l'homme.

Fréquences des populations de lymphocytes B

L'étude des populations B nous indique que la fréquence relative de lymphocytes B naïfs chez les TS VIH⁻ est plus élevée que chez les TS VIH⁺, mais plus basse que chez les non-TS VIH⁻. Inversement, la fréquence des lymphocytes B matures activés est plus basse chez les TS VIH⁻ que chez les TS VIH⁺, mais plus élevée que chez les non-TS VIH⁻. L'augmentation de lymphocytes B matures activés chez les TS VIH⁺ concorde avec les niveaux élevés de BLYS soluble et à la surface des mDC, lymphocytes T et monocytes. De plus, il est connu que l'infection au VIH entraîne aussi la production de plusieurs autres facteurs d'activation des lymphocytes B [198, 203]. Le fait que les TS VIH⁻ aient une fréquence plus élevée de lymphocytes B matures activés que les non-TS VIH⁻, malgré un plus faible niveau de BLYS pourrait indiquer que l'activation observée est attribuable au travail du sexe et/ou à une bataille contre le VIH. De ce fait, l'exposition répétée au sperme des clients peut avoir un effet pro-inflammatoire en induisant la production de cytokines comme Il-6 et Il-8 et de chémokines accentuant le recrutement de cellules cibles [262, 263]. Au contraire, nous pourrions aussi penser que cette plus faible activation des lymphocytes B chez les TS VIH⁻ que chez les TS VIH⁺ reflète une réponse B contrôlée/régulée et impliquée dans l'immunité contre le VIH.

En plus d'une différence dans le profil d'activation des lymphocytes B matures, on remarque que les fréquences des lymphocytes B MZ « matures » sont diminuées autant chez les TS VIH⁺ que chez les TS VIH⁻. Ultérieurement, une étude de notre laboratoire avait associé une diminution de la fréquence des lymphocytes B MZ « matures » dans le sang à un meilleur contrôle du VIH [70]. Il avait alors été suggéré que cette diminution de fréquence pourrait être expliquée par un recrutement de ces cellules en périphérie, aux sites de « bataille du virus ». Récemment, nous avons démontré que les contrôleurs d'élite avaient un index migratoire plus élevé des lymphocytes B MZ contrairement aux progressseurs rapides et classiques (Gauvin *et al.* 2015, en révision). La diminution de la fréquence des lymphocytes B MZ « matures » observée chez les TS VIH⁻ pourrait donc suggérer qu'un recrutement de ces cellules au niveau des muqueuses serait impliqué dans leur résistance aux VIH. Toutefois, il est surprenant de constater que les TS VIH⁺ arborent un profil similaire à celui que nous avons

rapporté pour les contrôleurs d'élite et les progresseurs lents [70]. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que l'on ne connaît pas le type de progression des TS VIH⁺ ni depuis combien de temps elles sont séropositives. Cependant, le fait que nous ayons sélectionné des TS non traitées ne présentant pas de signe d'inflammation ou d'infection autre que le VIH pourrait impliquer que nous ayons involontairement éliminé de la cohorte des TS ayant un profil de progression classique ou rapide. D'ailleurs la charge virale ($3,3 \pm 1.1$ log copies/ml) et le compte sanguin des lymphocytes T CD4⁺ (714 ± 244 cellules/ml) des TS VIH⁺ étaient similaires à ceux des progresseurs lents virémiques [70]. On ne peut non plus exclure une déficience en MYD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*), IRAK-4 (*Interleukin-1 receptor-associated kinase 4*) ou TIRAP (*Toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein*), des facteurs essentiels de la voie de signalisation des TLR, et pour lesquelles une déficience a été associée à une diminution de la fréquence de cellules similaires aux lymphocytes B MZ [264].

En plus d'une diminution de la fréquence des lymphocytes B MZ « matures », on remarque chez les TS VIH⁺ une augmentation de la fréquence d'une population ayant des caractéristiques communes aux lymphocytes B transitionnels immatures et avec les lymphocytes B MZ que nous avons déjà nommé « Précurseurs MZ-like » [70]. En plus, de cette population prédéfinie, nous remarquons aussi l'augmentation de la fréquence de populations B ayant un profil immature/inné. L'augmentation de la fréquence de ces populations est concomitante avec de plus hauts niveaux de BLyS. De ce fait, BLyS agit particulièrement au niveau de la transition T1-T2 des lymphocytes B transitionnels immatures [5]. L'excès de BLyS observé chez les TS VIH⁺ pourrait donc favoriser le développement de ces populations B immatures. D'ailleurs, un excès de BLyS et l'augmentation de la fréquence de populations B ayant un phénotype similaire ont été répertoriés dans des contextes de cancers et d'infections bactériennes, virales et parasitaires, ce qui dénote un trait commun à l'inflammation [227]. Au contraire, on ne retrouve pas d'augmentation relative de ces populations chez les TS VIH⁻ et les niveaux de BLyS semblent favoriser le maintien de l'intégrité du compartiment B.

Immunoglobulines et isotypes

L'augmentation de la fréquence des lymphocytes B matures activés et de populations innées/immatures chez les TS VIH⁺ s'accompagne d'une hyperglobulinémie, signe d'une activation polyclonale. L'augmentation de la concentration sérique en IgG1 pourrait s'expliquer par une réponse humorale envers le VIH. Cependant, bien que nous n'ayons pas déterminé la spécificité de ces anticorps, il est connu que les IgG des personnes séropositives ont souvent un potentiel autoréactif [265-267], augmentant ainsi les risques de composantes auto-immunes. De plus, des niveaux élevés de B_{LyS} étant corrélés avec un bris de tolérance et l'apparition d'auto-anticorps [4, 5, 229], l'augmentation de populations B immatures/innées chez les TS VIH⁺ pourrait expliquer cette hyperglobulinémie. D'ailleurs, les anticorps largement neutralisants retrouvés chez les personnes VIH⁺ ont souvent des capacités polyréactives et autoréactives [268]. De plus, des anticorps anti-VIH largement neutralisants ont aussi été retrouvés chez des personnes souffrant de maladies auto-immunes comme la sclérose en plaques [269]. Ceci pourrait impliquer que la production d'anticorps largement neutralisant dépend en fait d'une dérégulation du compartiment B et est causé par l'augmentation de la fréquence de populations B immatures/innées suractivées, une condition qui pourrait être difficile de recréer chez une personne saine.

On remarque chez les TS VIH⁺, une diminution significative de la quantité d'IgG2. Il se pourrait que cette diminution se fasse en réponse à l'augmentation des IgG1. Il est cependant intéressant de noter que les IgG2 sont associées à une réponse T-indépendante aux polysaccharides par les lymphocytes B MZ. Une absence de lymphocytes B MZ est d'ailleurs corrélée avec une plus grande susceptibilité aux pneumocoques, pathogène ayant une capsule de polysaccharide [270]. La diminution de la quantité d'IgG2 pourrait donc suggérer un dérèglement de l'activité normale des lymphocytes B MZ.

Certaines études ont attribué la protection contre le VIH à la présence d'IgA spécifiques [271-273]. Bien que nous n'observions pas de différences au niveau de la concentration d'IgA totale sérique entre les TS et les non-TS, on ne peut exclure la présence d'anticorps IgA VIH-spécifiques chez les TS-VIH. De plus, il serait probablement plus pertinent d'étudier la

présence d'anticorps IgA au niveau des muqueuses, lieu de transmission du virus. Il est cependant intéressant de remarquer qu'il y a une proportion plus importante de plasmablastes IgG chez les TS VIH⁺ contrairement à une plus grande proportion de plasmablastes IgA chez les TS VIH⁻. En condition physiologique normale, près de 80 % des plasmablastes sont de type IgA. Le maintien de cette proportion chez les TS VIH⁻ pourrait permettre une meilleure réponse anti-VIH de type IgA au niveau des muqueuses.

Limites de l'étude

Une des limites de notre étude est bien sûr le nombre restreint de participantes ce qui pourrait limiter l'étendue de nos observations et de nos conclusions. Nous sommes conscients de cette limite causée par la difficulté d'obtention des échantillons et du nombre élevé de TS que nous devons retirer de la cohorte en raison notamment de co-infections.

Une autre limite de l'étude est la proportion de TS disant utiliser des préservatifs avec leurs clients. En effet, il est pertinent de mentionner que 80 % des TS VIH⁻ rapportent utiliser le condom contrairement à 30% des TS-VIH⁺ (Article-Table I), ce qui pourrait expliquer la résistance des TS VIH⁻. Cependant, il faut spécifier que nous ne connaissons pas la fréquence exacte d'utilisation du préservatif lors des semaines précédant le questionnaire et que certaines TS n'exigent pas le port du condom à tous leurs clients. De plus, nous ne savons pas si le condom est utilisé tout au long de la relation sexuelle. Enfin, une étude avec une autre cohorte de TS du Bénin a démontré que 15,9% des TS avaient vécu un bris de condom lors d'une relation sexuelle [274].

Conclusion

L'étude d'individus présentant une résistance naturelle au VIH est essentielle dans la course à la recherche de traitements ou d'un vaccin. En effet, l'identification de mécanismes immuns actifs expliquant la résistance apparente de ces personnes permettrait de mettre en lumière les pistes à suivre pour élaborer de tels traitements. Des études longitudinales dans un contexte d'infection au VIH avaient déjà montré l'importance des lymphocytes B et de BLyS dans le contrôle de la progression de la maladie causée par le virus. L'objectif principal de ce projet de maîtrise était donc de déterminer les niveaux de BLyS et de son impact sur les lymphocytes B dans un contexte de résistance au VIH.

Bien que notre étude était restreinte dans le nombre de participantes, ce qui pourraient limiter l'étendue de nos conclusions, les résultats obtenus semblent indiquer qu'il pourrait y avoir un mécanisme actif permettant aux TS-VIH⁻ de contrôler les niveaux d'expression et de sécrétion de BLyS à un niveau inférieur aux TS-VIH⁺, mais supérieur aux non-TS VIH⁻. Ce contrôle permet probablement de maintenir des niveaux de BLyS suffisant pour induire une réponse efficace envers le VIH, sans perturber l'équilibre du compartiment B. En effet, un excès de BLyS semble favoriser une dérégulation du compartiment B et l'augmentation de la fréquence de populations de lymphocytes B immatures/innées. Au contraire les niveaux de BLyS observés chez les TS VIH⁻ semblent favoriser le maintien de l'intégrité du compartiment B. Il semble tout de même avoir une modulation de certaines populations comme les lymphocytes B MZ « matures » qui pourraient participer à une réponse anti-VIH. Le mécanisme exact permettant le contrôle des niveaux de BLyS n'est pas connu, mais pourrait impliquer une activation préférentielle du récepteur TACI via BLyS membranaire.

Ces résultats confirment l'importance de l'étude de l'implication des lymphocytes B MZ et de BLyS dans la résistance au VIH. Cette résistance est sans doute le fruit d'un équilibre précaire : trop de BLyS et la réponse est débalancée, inefficace et délétère; trop peu de BLyS et les lymphocytes B impliqués ne peuvent pas être activés. L'étude d'individus semblant avoir une immunité naturelle envers le VIH (Introduction section 1.8) n'a à ce jour pas permis d'identifier concrètement un mécanisme permettant cette résistance, bien que des

anticorps anti-VIH, la présence de lymphocytes T CD8⁺, ou la modulation de certaines cytokines semblent y être associés. L'implication des lymphocytes B MZ et de BLyS dans l'immunité naturelle au VIH est donc une nouvelle possibilité pouvant expliquer ce phénomène. D'ailleurs, la résistance au VIH est probablement multifactorielle et implique plusieurs mécanismes immunitaires différents.

Perspectives

Mesure des niveaux d'expression des récepteurs de BLyS

Comme il a été déjà mentionné, il existe trois types de récepteurs pour BLyS (BAFF-R, BCMA et TACI). Ceux-ci ont des fonctions différentes, ne sont pas exprimés sur les mêmes populations de lymphocytes B et auraient une capacité différente à répondre aux formes de BLyS. Dans cette optique, il aurait été intéressant de mesurer la fréquence et le niveau d'expression de ces récepteurs sur les populations B décrites dans ce mémoire. En ce sens, il a été démontré que des patients atteints de thrombocytopénie immune avaient des niveaux plus élevés de BAFF-R et TACI. De plus, leurs lymphocytes avaient une capacité proliférative plus grande que des personnes saines, et ce malgré une exposition à des concentrations similaires de BLyS [275].

Dans un même ordre d'idées, l'étude génétique des récepteurs de BLyS pourrait mettre en lumière l'existence de polymorphismes liés à la résistance ou à la susceptibilité au VIH.

Blocage de BLyS et TACI

Il est évident que dans une perspective à plus long terme, il serait intéressant de faire des études *in vitro*, ou même cliniques, dans lesquelles nous pourrions bloquer BLyS. Il existe d'ailleurs déjà un anticorps, Belimumab, qui inhibe les fonctions de BLyS et qui est utilisé dans le traitement contre le lupus [276]. On pourrait donc imaginer son utilisation dans les cas de VIH pour contrôler les niveaux de BLyS et améliorer les pronostics. Cependant, on sait que l'utilisation de cet anticorps pourrait affecter la survie et l'activation de toutes les populations B. À ce niveau, il a été démontré que la délétion du récepteur TACI est plus efficace pour empêcher la survie de lymphocytes B autoréactifs dans un modèle murin de lupus [234]. Sachant que les lymphocytes B MZ peuvent provenir de la différenciation de lymphocytes B autoréactifs, il serait intéressant de bloquer le récepteur TACI dans un contexte d'infection au VIH. Ainsi, on pourrait s'attendre à une diminution de la fréquence des populations « Précurseurs-MZ », tout en maintenant l'intégrité des populations de lymphocytes B participant à une réponse immunitaire efficace contre le VIH.

Étude de l'immunité vaginale

Le projet du présent mémoire s'attardait à la réponse B au niveau systémique. Or, il va de soi que les travailleuses du sexe sont majoritairement exposées au VIH via le tractus génital (TGF) et qu'un mécanisme permettant la résistance impliquerait probablement une réponse immunitaire spécifique à ce site. Il serait donc pertinent d'étudier l'environnement cellulaire, mais aussi inflammatoire du TGF. De ce fait nous avons déjà démontré chez ces femmes l'existence d'une réponse inflammatoire distincte, dans le sang et au niveau du TGF, associée à la résistance ou à la susceptibilité au VIH [133] et les récents résultats de concentration de BLYS dans les CVL viennent soutenir ces résultats. Il serait donc pertinent d'évaluer les conditions pouvant influencer la réponse immunitaire au niveau du TGF. Par exemple, la microflore vaginale, et sa reconnaissance via des récepteurs comme les TLR, modulent la production de BLYS. De plus, l'apparition rapide d'IgA anti-gp41 dans le TGF est corrélée avec une augmentation de BLYS et implique que ces anticorps proviennent probablement de populations B de première ligne/innées [248]. Aussi, il semble que la réponse anti-VIH suite à une vaccination est compromise par la production d'anticorps anti-gp41 polyréactifs aux microorganismes du système digestif [277]. À ce sujet, on retrouve surtout des anticorps anti-gp120 dans le tractus génital de femmes hautement exposées non-TS comparativement à anti-gp41 chez des femmes VIH⁺ [273]. De plus, les cellules B MZ lient gp120 via des lectines et produisent des anticorps polyclonaux dont une partie est gp120 spécifique [254]. Ceci démontre l'importance d'identifier les populations de cellules B impliquées dans la réponse contre le VIH et d'évaluer comment ces populations sont influencées par l'environnement inflammatoire du TGF.

Bibliographie

1. Engelman, A. and P. Cherepanov, *The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights*. Nat Rev Microbiol, 2012. **10**(4): p. 279-90.
2. Pieper, K., B. Grimbacher, and H. Eibel, *B-cell biology and development*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **131**(4): p. 959-71.
3. Grossman, Z., et al., *Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys*. Nat Med, 2006. **12**(3): p. 289-95.
4. Mackay, F. and P. Schneider, *Cracking the BAFF code*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(7): p. 491-502.
5. Mackay, F. and J.L. Browning, *BAFF: a fundamental survival factor for B cells*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(7): p. 465-75.
6. Prusiner, S.B., *Historical essay. Discovering the cause of AIDS*. Science, 2002. **298**(5599): p. 1726.
7. *Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1981. **30**(25): p. 305-8.
8. *A cluster of Kaposi's sarcoma and Pneumocystis carinii pneumonia among homosexual male residents of Los Angeles and Orange Counties, California*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1982. **31**(23): p. 305-7.
9. *Current Trends Prevention of Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS): Report of Inter-Agency Recommendations* MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1983. **32**(08): p. 101-3.
10. *Current Trends Update on Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) -- United States*. Morbidity and Mortality Weekly Report 1982. **31**(37): p. 507-508, 514-515.
11. Gallo, R.C., *Historical essay. The early years of HIV/AIDS*. Science, 2002. **298**(5599): p. 1728-30.
12. Gallo, R.C., et al., *Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 865-7.
13. Gelmann, E.P., et al., *Proviral DNA of a retrovirus, human T-cell leukemia virus, in two patients with AIDS*. Science, 1983. **220**(4599): p. 862-5.
14. Popovic, M., et al., *Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS*. Science, 1984. **224**(4648): p. 497-500.
15. Sarngadharan, M.G., et al., *HTLV-III: the etiologic agent of AIDS*. Princess Takamatsu Symp, 1984. **15**: p. 301-8.
16. Montagnier, L., *Historical essay. A history of HIV discovery*. Science, 2002. **298**(5599): p. 1727-8.

17. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
18. Coffin, J., et al., *Human immunodeficiency viruses*. Science, 1986. **232**(4751): p. 697.
19. Case, K., *Nomenclature: Human Immunodeficiency Virus*. Annals of Internal Medicine, 1986. **105**(1): p. 133-133.
20. Sharp, P.M. and B.H. Hahn, *The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2010. **365**(1552): p. 2487-94.
21. Gao, F., et al., *Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes*. Nature, 1999. **397**(6718): p. 436-41.
22. Hemelaar, J., *The origin and diversity of the HIV-1 pandemic*. Trends Mol Med, 2012. **18**(3): p. 182-92.
23. Sharp, P.M., et al., *The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when?* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2001. **356**(1410): p. 867-76.
24. Hahn, B.H., et al., *AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications*. Science, 2000. **287**(5453): p. 607-14.
25. Plantier, J.C., et al., *A new human immunodeficiency virus derived from gorillas*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 871-2.
26. Takehisa, J., et al., *Origin and biology of simian immunodeficiency virus in wild-living western gorillas*. J Virol, 2009. **83**(4): p. 1635-48.
27. Faria, N.R., et al., *HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations*. Science, 2014. **346**(6205): p. 56-61.
28. UNAIDS, *2013 GLOBAL FACT SHEET*. 2013.
29. *UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013*, United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS).
30. Piot, P., R. Greener, and S. Russell, *Squaring the circle: AIDS, poverty, and human development*. PLoS Med, 2007. **4**(10): p. 1571-5.
31. Gillespie, S., S. Kadiyala, and R. Greener, *Is poverty or wealth driving HIV transmission?* Aids, 2007. **21 Suppl 7**: p. S5-s16.
32. Kim, J., et al., *Exploring the role of economic empowerment in HIV prevention*. Aids, 2008. **22 Suppl 4**: p. S57-71.
33. Jukes, M., S. Simmons, and D. Bundy, *Education and vulnerability: the role of schools in protecting young women and girls from HIV in southern Africa*. Aids, 2008. **22 Suppl 4**: p. S41-56.
34. Iwasaki, A., *Antiviral immune responses in the genital tract: clues for vaccines*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(10): p. 699-711.
35. Fanales-Belasio, E., et al., *HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview*. Ann Ist Super Sanita, 2010. **46**(1): p. 5-14.
36. Wilen, C.B., J.C. Tilton, and R.W. Doms, *HIV: cell binding and entry*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(8).

37. Turner, B.G. and M.F. Summers, *Structural biology of HIV*. J Mol Biol, 1999. **285**(1): p. 1-32.
38. Gelderblom, H.R., M. Ozel, and G. Pauli, *Morphogenesis and morphology of HIV. Structure-function relations*. Arch Virol, 1989. **106**(1-2): p. 1-13.
39. Emerman, M. and M.H. Malim, *HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology*. Science, 1998. **280**(5371): p. 1880-4.
40. Didigu, C.A. and R.W. Doms, *Novel approaches to inhibit HIV entry*. Viruses, 2012. **4**(2): p. 309-24.
41. Naif, H.M., *Pathogenesis of HIV Infection*. Infect Dis Rep, 2013. **5**(Suppl 1): p. e6.
42. Moore, J.P., A. Trkola, and T. Dragic, *Co-receptors for HIV-1 entry*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(4): p. 551-62.
43. Greene, W.C. and B.M. Peterlin, *Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy*. Nat Med, 2002. **8**(7): p. 673-80.
44. Freed, E.O., *HIV-1 replication*. Somat Cell Mol Genet, 2001. **26**(1-6): p. 13-33.
45. Fisher, A.G., et al., *The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication*. Nature, 1986. **320**(6060): p. 367-71.
46. Dayton, A.I., et al., *The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication*. Cell, 1986. **44**(6): p. 941-7.
47. Wei, P., et al., *A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA*. Cell, 1998. **92**(4): p. 451-62.
48. Pollard, V.W. and M.H. Malim, *The HIV-1 Rev protein*. Annu Rev Microbiol, 1998. **52**: p. 491-532.
49. Freed, E.O., *HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle*. Virology, 1998. **251**(1): p. 1-15.
50. Freed, E.O. and M.A. Martin, *The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection*. J Biol Chem, 1995. **270**(41): p. 23883-6.
51. Murakami, T. and E.O. Freed, *Genetic evidence for an interaction between human immunodeficiency virus type 1 matrix and alpha-helix 2 of the gp41 cytoplasmic tail*. J Virol, 2000. **74**(8): p. 3548-54.
52. Bieniasz, P.D., *Late budding domains and host proteins in enveloped virus release*. Virology, 2006. **344**(1): p. 55-63.
53. Hurley, J.H. and S.D. Emr, *The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2006. **35**: p. 277-98.
54. Martin-Serrano, J. and S.J. Neil, *Host factors involved in retroviral budding and release*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(7): p. 519-31.
55. Moir, S., T.W. Chun, and A.S. Fauci, *Pathogenic mechanisms of HIV disease*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 223-48.

56. Cohen, M.S., et al., *Acute HIV-1 Infection*. N Engl J Med, 2011. **364**(20): p. 1943-54.
57. Maartens, G., C. Celum, and S.R. Lewin, *HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention*. Lancet, 2014.
58. Levy, J.A., *HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges*. AIDS, 2009. **23**(2): p. 147-60.
59. Wu, Z., Z. Chen, and D.M. Phillips, *Human genital epithelial cells capture cell-free human immunodeficiency virus type 1 and transmit the virus to CD4+ Cells: implications for mechanisms of sexual transmission*. J Infect Dis, 2003. **188**(10): p. 1473-82.
60. Dezzutti, C.S., et al., *Cervical and prostate primary epithelial cells are not productively infected but sequester human immunodeficiency virus type 1*. J Infect Dis, 2001. **183**(8): p. 1204-13.
61. Maher, D., et al., *HIV binding, penetration, and primary infection in human cervicovaginal tissue*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(32): p. 11504-9.
62. Phillips, D.M., et al., *Mechanism of monocyte-macrophage-mediated transmission of HIV*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1998. **14 Suppl 1**: p. S67-70.
63. Norvell, M.K., G.I. Benrubi, and R.J. Thompson, *Investigation of microtrauma after sexual intercourse*. J Reprod Med, 1984. **29**(4): p. 269-71.
64. Hladik, F. and M.J. McElrath, *Setting the stage: host invasion by HIV*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(6): p. 447-57.
65. Li, Q., et al., *Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV transmission*. Nature, 2009. **458**(7241): p. 1034-8.
66. Haase, A.T., *Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission*. Nature, 2010. **464**(7286): p. 217-23.
67. McMichael, A.J., et al., *The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(1): p. 11-23.
68. Gurunathan, S., et al., *Use of predictive markers of HIV disease progression in vaccine trials*. Vaccine, 2009. **27**(14): p. 1997-2015.
69. Pantaleo, G. and A.S. Fauci, *Immunopathogenesis of HIV infection*. Annu Rev Microbiol, 1996. **50**: p. 825-54.
70. Fontaine, J., et al., *High expression levels of B lymphocyte stimulator (BLyS) by dendritic cells correlate with HIV-related B-cell disease progression in humans*. Blood, 2011. **117**(1): p. 145-55.
71. Chu, C. and P.A. Selwyn, *Complications of HIV infection: a systems-based approach*. Am Fam Physician, 2011. **83**(4): p. 395-406.
72. McCutchan, J.A., *Virology, immunology, and clinical course of HIV infection*. J Consult Clin Psychol, 1990. **58**(1): p. 5-12.
73. *1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults*. MMWR Recomm Rep, 1992. **41**(Rr-17): p. 1-19.

74. Furman, P.A., et al., *Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(21): p. 8333-7.
75. diseases, N.I.o.A.a.I. *Types of HIV/AIDS Antiretroviral Drugs*. 2013 [cited 2015; Available from: http://www.niaid.nih.gov/topics/HIVAIDS/Understanding/Treatment/pages/arvd_rugclasses.aspx.
76. Iyidogan, P. and K.S. Anderson, *Current perspectives on HIV-1 antiretroviral drug resistance*. Viruses, 2014. **6**(10): p. 4095-139.
77. Este, J.A. and T. Cihlar, *Current status and challenges of antiretroviral research and therapy*. Antiviral Res, 2010. **85**(1): p. 25-33.
78. Stetson, D.B. and R. Medzhitov, *Type I interferons in host defense*. Immunity, 2006. **25**(3): p. 373-81.
79. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Regulation of adaptive immunity by the innate immune system*. Science, 2010. **327**(5963): p. 291-5.
80. Jakobsen, M.R., et al., *IFI16 senses DNA forms of the lentiviral replication cycle and controls HIV-1 replication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(48): p. E4571-80.
81. Gao, D., et al., *Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses*. Science, 2013. **341**(6148): p. 903-6.
82. Nazli, A., et al., *HIV-1 gp120 induces TLR2- and TLR4-mediated innate immune activation in human female genital epithelium*. J Immunol, 2013. **191**(8): p. 4246-58.
83. Schlaepfer, E., et al., *TLR7/8 triggering exerts opposing effects in acute versus latent HIV infection*. J Immunol, 2006. **176**(5): p. 2888-95.
84. Malim, M.H. and M. Emerman, *HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(6): p. 388-98.
85. Okumura, A., et al., *HIV-1 accessory proteins VPR and Vif modulate antiviral response by targeting IRF-3 for degradation*. Virology, 2008. **373**(1): p. 85-97.
86. Hardy, G.A., et al., *Interferon-alpha is the primary plasma type-I IFN in HIV-1 infection and correlates with immune activation and disease markers*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e56527.
87. Rustagi, A. and M. Gale, Jr., *Innate antiviral immune signaling, viral evasion and modulation by HIV-1*. J Mol Biol, 2014. **426**(6): p. 1161-77.
88. Altfeld, M. and M. Gale, Jr., *Innate immunity against HIV-1 infection*. Nat Immunol, 2015. **16**(6): p. 554-62.
89. Bernstein, H.B., et al., *CD4+ NK cells can be productively infected with HIV, leading to downregulation of CD4 expression and changes in function*. Virology, 2009. **387**(1): p. 59-66.
90. Cohen, G.B., et al., *The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells*. Immunity, 1999. **10**(6): p. 661-71.

91. Alter, G., et al., *Sequential deregulation of NK cell subset distribution and function starting in acute HIV-1 infection*. Blood, 2005. **106**(10): p. 3366-9.
92. Mavilio, D., et al., *Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(8): p. 2886-91.
93. Donaghy, H., J. Stebbing, and S. Patterson, *Antigen presentation and the role of dendritic cells in HIV*. Curr Opin Infect Dis, 2004. **17**(1): p. 1-6.
94. Fontaine, J., J. Poudrier, and M. Roger, *Short communication: persistence of high blood levels of the chemokines CCL2, CCL19, and CCL20 during the course of HIV infection*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2011. **27**(6): p. 655-7.
95. Buisson, S., et al., *Monocyte-derived dendritic cells from HIV type 1-infected individuals show reduced ability to stimulate T cells and have altered production of interleukin (IL)-12 and IL-10*. J Infect Dis, 2009. **199**(12): p. 1862-71.
96. Donaghy, H., et al., *Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1*. Blood, 2003. **101**(11): p. 4505-11.
97. Derby, N., E. Martinelli, and M. Robbiani, *Myeloid dendritic cells in HIV-1 infection*. Curr Opin HIV AIDS, 2011. **6**(5): p. 379-84.
98. Goonetilleke, N., et al., *The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection*. J Exp Med, 2009. **206**(6): p. 1253-72.
99. Addo, M.M., et al., *Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load*. J Virol, 2003. **77**(3): p. 2081-92.
100. Hall, B.M., et al., *Conditioned dendritic cells as a temporal bridge between T helper and cytotoxic cells*. Transplant Proc, 2001. **33**(1-2): p. 195-6.
101. McMichael, A.J. and S.L. Rowland-Jones, *Cellular immune responses to HIV*. Nature, 2001. **410**(6831): p. 980-7.
102. Gulzar, N. and K.F. Copeland, *CD8+ T-cells: function and response to HIV infection*. Curr HIV Res, 2004. **2**(1): p. 23-37.
103. Walker, B. and A. McMichael, *The T-cell response to HIV*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(11).
104. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
105. Bettelli, E., et al., *Induction and effector functions of T(H)17 cells*. Nature, 2008. **453**(7198): p. 1051-7.
106. Costantino, C.M., C.M. Baecher-Allan, and D.A. Hafler, *Human regulatory T cells and autoimmunity*. Eur J Immunol, 2008. **38**(4): p. 921-4.

107. Sempere, J.M., V. Soriano, and J.M. Benito, *T regulatory cells and HIV infection*. AIDS Rev, 2007. **9**(1): p. 54-60.
108. Fevrier, M., K. Dorgham, and A. Rebollo, *CD4+ T cell depletion in human immunodeficiency virus (HIV) infection: role of apoptosis*. Viruses, 2011. **3**(5): p. 586-612.
109. Brenchley, J.M., et al., *Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections*. Blood, 2008. **112**(7): p. 2826-35.
110. Douek, D.C., L.J. Picker, and R.A. Koup, *T cell dynamics in HIV-1 infection*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 265-304.
111. Eggena, M.P., et al., *Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation*. J Immunol, 2005. **174**(7): p. 4407-14.
112. Kinter, A., et al., *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, 2007. **104**(9): p. 3390-5.
113. Aandahl, E.M., et al., *Human CD4+ CD25+ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens*. J Virol, 2004. **78**(5): p. 2454-9.
114. Brenchley, J.M., et al., *Differential infection patterns of CD4+ T cells and lymphoid tissue viral burden distinguish progressive and nonprogressive lentiviral infections*. Blood, 2012. **120**(20): p. 4172-81.
115. Chahroudi, A., et al., *Natural SIV hosts: showing AIDS the door*. Science, 2012. **335**(6073): p. 1188-93.
116. Paiardini, M. and M. Muller-Trutwin, *HIV-associated chronic immune activation*. Immunol Rev, 2013. **254**(1): p. 78-101.
117. Sodora, D.L. and G. Silvestri, *Immune activation and AIDS pathogenesis*. AIDS, 2008. **22**(4): p. 439-46.
118. Klatt, N.R., et al., *Immune activation and HIV persistence: implications for curative approaches to HIV infection*. Immunol Rev, 2013. **254**(1): p. 326-42.
119. Allers, K. and T. Schneider, *CCR5Delta32 mutation and HIV infection: basis for curative HIV therapy*. Curr Opin Virol, 2015. **14**: p. 24-29.
120. Rowland-Jones, S.L., et al., *Cytotoxic T cell responses to multiple conserved HIV epitopes in HIV-resistant prostitutes in Nairobi*. J Clin Invest, 1998. **102**(9): p. 1758-65.
121. Ranki, A., et al., *T-cell response towards HIV in infected individuals with and without zidovudine therapy, and in HIV-exposed sexual partners*. Aids, 1989. **3**(2): p. 63-9.
122. Kaul, R., et al., *CD8(+) lymphocytes respond to different HIV epitopes in seronegative and infected subjects*. J Clin Invest, 2001. **107**(10): p. 1303-10.
123. Piacentini, L., et al., *Not just sheer luck! Immune correlates of protection against HIV-1 infection*. Vaccine, 2008. **26**(24): p. 3002-7.

124. Kaul, R., et al., *HIV-1-specific mucosal CD8+ lymphocyte responses in the cervix of HIV-1-resistant prostitutes in Nairobi*. J Immunol, 2000. **164**(3): p. 1602-11.
125. Alimonti, J.B., et al., *CD4+ T cell responses in HIV-exposed seronegative women are qualitatively distinct from those in HIV-infected women*. J Infect Dis, 2005. **191**(1): p. 20-4.
126. Card, C.M., et al., *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, 2009. **199**(9): p. 1318-22.
127. Shen, R. and P.D. Smith, *Mucosal correlates of protection in HIV-1-exposed sero-negative persons*. Am J Reprod Immunol, 2014. **72**(2): p. 219-27.
128. Belec, L., et al., *Cervicovaginal secretory antibodies to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) that block viral transcytosis through tight epithelial barriers in highly exposed HIV-1-seronegative African women*. J Infect Dis, 2001. **184**(11): p. 1412-22.
129. Hocini, H. and M. Bomsel, *Infectious human immunodeficiency virus can rapidly penetrate a tight human epithelial barrier by transcytosis in a process impaired by mucosal immunoglobulins*. J Infect Dis, 1999. **179 Suppl 3**: p. S448-53.
130. Devito, C., et al., *Cross-clade HIV-1-specific neutralizing IgA in mucosal and systemic compartments of HIV-1-exposed, persistently seronegative subjects*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2002. **30**(4): p. 413-20.
131. Poudrier, J., V. Thibodeau, and M. Roger, *Natural Immunity to HIV: a delicate balance between strength and control*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 875821.
132. Hirbod, T. and K. Broliden, *Mucosal immune responses in the genital tract of HIV-1-exposed uninfected women*. J Intern Med, 2007. **262**(1): p. 44-58.
133. Lajoie, J., et al., *Chemokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments are associated with HIV-1 infection in women from Benin*. J Clin Immunol, 2010. **30**(1): p. 90-8.
134. Monroe, J.G., et al., *Positive and negative selection during B lymphocyte development*. Immunol Res, 2003. **27**(2-3): p. 427-42.
135. von Boehmer, H. and F. Melchers, *Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease*. Nat Immunol, 2010. **11**(1): p. 14-20.
136. Alt, F.W., et al., *Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments*. Embo j, 1984. **3**(6): p. 1209-19.
137. Ghia, P., et al., *Ordering of human bone marrow B lymphocyte precursors by single-cell polymerase chain reaction analyses of the rearrangement status of the immunoglobulin H and L chain gene loci*. J Exp Med, 1996. **184**(6): p. 2217-29.
138. Hardy, R.R., et al., *Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow*. J Exp Med, 1991. **173**(5): p. 1213-25.

139. Sakaguchi, N. and F. Melchers, *Lambda 5, a new light-chain-related locus selectively expressed in pre-B lymphocytes*. Nature, 1986. **324**(6097): p. 579-82.
140. Kudo, A. and F. Melchers, *A second gene, VpreB in the lambda 5 locus of the mouse, which appears to be selectively expressed in pre-B lymphocytes*. Embo j, 1987. **6**(8): p. 2267-72.
141. Kerr, W.G., et al., *Mu heavy chains can associate with a pseudo-light chain complex (psi L) in human pre-B cell lines*. Int Immunol, 1989. **1**(4): p. 355-61.
142. Melchers, F., *The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(7): p. 578-84.
143. Martensson, I.L. and R. Ceredig, *Review article: role of the surrogate light chain and the pre-B-cell receptor in mouse B-cell development*. Immunology, 2000. **101**(4): p. 435-41.
144. Melchers, F., et al., *The surrogate light chain in B-cell development*. Immunol Today, 1993. **14**(2): p. 60-8.
145. Hardy, R.R. and K. Hayakawa, *B cell development pathways*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 595-621.
146. Melchers, F., et al., *Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells*. Immunol Rev, 2000. **175**: p. 33-46.
147. Hess, J., et al., *Induction of pre-B cell proliferation after de novo synthesis of the pre-B cell receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(4): p. 1745-50.
148. ten Boekel, E., F. Melchers, and A.G. Rolink, *Precursor B cells showing H chain allelic inclusion display allelic exclusion at the level of pre-B cell receptor surface expression*. Immunity, 1998. **8**(2): p. 199-207.
149. Ramsden, D.A. and G.E. Wu, *Mouse kappa light-chain recombination signal sequences mediate recombination more frequently than do those of lambda light chain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(23): p. 10721-5.
150. Gay, D., et al., *Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance*. J Exp Med, 1993. **177**(4): p. 999-1008.
151. Radic, M.Z., et al., *B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors*. J Exp Med, 1993. **177**(4): p. 1165-73.
152. Tiegs, S.L., D.M. Russell, and D. Nemazee, *Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells*. J Exp Med, 1993. **177**(4): p. 1009-20.
153. Prak, E.L. and M. Weigert, *Light chain replacement: a new model for antibody gene rearrangement*. J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 541-8.
154. Nemazee, D. and K. Buerki, *Clonal deletion of autoreactive B lymphocytes in bone marrow chimeras*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(20): p. 8039-43.
155. Hartley, S.B., et al., *Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens*. Nature, 1991. **353**(6346): p. 765-9.

156. Goodnow, C.C., et al., *Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice*. *Nature*, 1988. **334**(6184): p. 676-82.
157. Vossenkamper, A. and J. Spencer, *Transitional B cells: how well are the checkpoints for specificity understood?* *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2011. **59**(5): p. 379-84.
158. Brink, R., et al., *Immunoglobulin M and D antigen receptors are both capable of mediating B lymphocyte activation, deletion, or anergy after interaction with specific antigen*. *J Exp Med*, 1992. **176**(4): p. 991-1005.
159. Allman, D., et al., *Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation*. *J Immunol*, 2001. **167**(12): p. 6834-40.
160. Loder, F., et al., *B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals*. *J Exp Med*, 1999. **190**(1): p. 75-89.
161. Sims, G.P., et al., *Identification and characterization of circulating human transitional B cells*. *Blood*, 2005. **105**(11): p. 4390-8.
162. Nunez, C., et al., *B cells are generated throughout life in humans*. *J Immunol*, 1996. **156**(2): p. 866-72.
163. Tedder, T.F., L.T. Clement, and M.D. Cooper, *Discontinuous expression of a membrane antigen (HB-7) during B lymphocyte differentiation*. *Tissue Antigens*, 1984. **24**(3): p. 140-9.
164. Suryani, S., et al., *Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells*. *Blood*, 2010. **115**(3): p. 519-29.
165. Palanichamy, A., et al., *Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy*. *J Immunol*, 2009. **182**(10): p. 5982-93.
166. Wardemann, H., et al., *Predominant autoantibody production by early human B cell precursors*. *Science*, 2003. **301**(5638): p. 1374-7.
167. Niiron, H. and E.A. Clark, *Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(12): p. 945-56.
168. Schiemann, B., et al., *An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway*. *Science*, 2001. **293**(5537): p. 2111-4.
169. Pillai, S. and A. Cariappa, *The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(11): p. 767-77.
170. Batista, F.D. and N.E. Harwood, *The who, how and where of antigen presentation to B cells*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(1): p. 15-27.
171. De Silva, N.S. and U. Klein, *Dynamics of B cells in germinal centres*. *Nat Rev Immunol*, 2015. **15**(3): p. 137-48.
172. Hamel, K.M., V.M. Liarski, and M.R. Clark, *Germinal center B-cells*. *Autoimmunity*, 2012. **45**(5): p. 333-47.

173. Oropallo, M.A. and A. Cerutti, *Germinal center reaction: antigen affinity and presentation explain it all*. Trends Immunol, 2014. **35**(7): p. 287-9.
174. Victora, G.D. and M.C. Nussenzweig, *Germinal centers*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 429-57.
175. Zotos, D. and D.M. Tarlinton, *Determining germinal centre B cell fate*. Trends Immunol, 2012. **33**(6): p. 281-8.
176. Muller, T., S. Hamm, and S. Bauer, *TLR9-mediated recognition of DNA*. Handb Exp Pharmacol, 2008(183): p. 51-70.
177. Rawlings, D.J., et al., *Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 282-94.
178. Oracki, S.A., et al., *Plasma cell development and survival*. Immunol Rev, 2010. **237**(1): p. 140-59.
179. Vos, Q., et al., *B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms*. Immunol Rev, 2000. **176**: p. 154-70.
180. Fink, K., *Origin and Function of Circulating Plasmablasts during Acute Viral Infections*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 78.
181. Mei, H.E., et al., *Blood-borne human plasma cells in steady state are derived from mucosal immune responses*. Blood, 2009. **113**(11): p. 2461-9.
182. Benckert, J., et al., *The majority of intestinal IgA+ and IgG+ plasmablasts in the human gut are antigen-specific*. J Clin Invest, 2011. **121**(5): p. 1946-55.
183. Boes, M., *Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses*. Mol Immunol, 2000. **37**(18): p. 1141-9.
184. Kapur, R., H.K. Einarsdottir, and G. Vidarsson, *IgG-effector functions: "the good, the bad and the ugly"*. Immunol Lett, 2014. **160**(2): p. 139-44.
185. Vidarsson, G., G. Dekkers, and T. Rispen, *IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 520.
186. Lin, M., et al., *IgA subclass switch recombination in human mucosal and systemic immune compartments*. Mucosal Immunol, 2014. **7**(3): p. 511-20.
187. Macpherson, A.J., et al., *The immune geography of IgA induction and function*. Mucosal Immunol, 2008. **1**(1): p. 11-22.
188. Ribatti, D., *The discovery of immunoglobulin E*. Immunol Lett, 2016. **171**: p. 1-4.
189. Parham, P., *The Immune System*. 2009 New York: Garland Sciences. 506.
190. Weill, J.C., S. Weller, and C.A. Reynaud, *Human marginal zone B cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 267-85.
191. Cerutti, A., M. Cols, and I. Puga, *Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(2): p. 118-32.
192. Martin, F. and J.F. Kearney, *Marginal-zone B cells*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 323-35.

193. Garraud, O., et al., *Revisiting the B-cell compartment in mouse and humans: more than one B-cell subset exists in the marginal zone and beyond*. BMC Immunol, 2012. **13**: p. 63.
194. Weller, S., et al., *Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire*. Blood, 2004. **104**(12): p. 3647-54.
195. Moir, S., 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*. J Virol, 1999. **73**(10): p. 7972-80.
196. Moir, S., et al., *B cells of HIV-1-infected patients bind virions through CD21-complement interactions and transmit infectious virus to activated T cells*. J Exp Med, 2000. **192**(5): p. 637-46.
197. Malaspina, A., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 bound to B cells: relationship to virus replicating in CD4+ T cells and circulating in plasma*. J Virol, 2002. **76**(17): p. 8855-63.
198. Moir, S. and A.S. Fauci, *B cells in HIV infection and disease*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(4): p. 235-45.
199. Patke, C.L. and W.T. Shearer, *gp120- and TNF-alpha-induced modulation of human B cell function: proliferation, cyclic AMP generation, Ig production, and B-cell receptor expression*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(5): p. 975-82.
200. Swingler, S., et al., *Evidence for a pathogenic determinant in HIV-1 Nef involved in B cell dysfunction in HIV/AIDS*. Cell Host Microbe, 2008. **4**(1): p. 63-76.
201. McGowan, J.P., et al., *Relationship of serum immunoglobulin and IgG subclass levels to race, ethnicity and behavioral characteristics in HIV infection*. Med Sci Monit, 2006. **12**(1): p. Cr11-16.
202. Buckner, C.M., et al., *Characterization of plasmablasts in the blood of HIV-infected viremic individuals: evidence for nonspecific immune activation*. J Virol, 2013. **87**(10): p. 5800-11.
203. Moir, S. and A.S. Fauci, *B-cell exhaustion in HIV infection: the role of immune activation*. Curr Opin HIV AIDS, 2014. **9**(5): p. 472-7.
204. Moir, S., et al., *Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals*. J Exp Med, 2008. **205**(8): p. 1797-805.
205. Ehrhardt, G.R., et al., *Expression of the immunoregulatory molecule FcRH4 defines a distinctive tissue-based population of memory B cells*. J Exp Med, 2005. **202**(6): p. 783-91.
206. Hu, Z., et al., *HIV-associated memory B cell perturbations*. Vaccine, 2015. **33**(22): p. 2524-9.

207. Moir, S., et al., *B cells in early and chronic HIV infection: evidence for preservation of immune function associated with early initiation of antiretroviral therapy*. *Blood*, 2010. **116**(25): p. 5571-9.
208. Moore, P.A., et al., *BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator*. *Science*, 1999. **285**(5425): p. 260-3.
209. Nardelli, B., et al., *Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells*. *Blood*, 2001. **97**(1): p. 198-204.
210. Scapini, P., et al., *G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional BLyS*. *J Exp Med*, 2003. **197**(3): p. 297-302.
211. Huard, B., et al., *BAFF production by antigen-presenting cells provides T cell co-stimulation*. *Int Immunol*, 2004. **16**(3): p. 467-75.
212. Litinskiy, M.B., et al., *DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(9): p. 822-9.
213. Panchanathan, R. and D. Choubey, *Murine BAFF expression is up-regulated by estrogen and interferons: implications for sex bias in the development of autoimmunity*. *Mol Immunol*, 2013. **53**(1-2): p. 15-23.
214. Ng, L.G., C.R. Mackay, and F. Mackay, *The BAFF/APRIL system: life beyond B lymphocytes*. *Mol Immunol*, 2005. **42**(7): p. 763-72.
215. Bossen, C., et al., *TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts*. *Blood*, 2008. **111**(3): p. 1004-12.
216. Garcia-Carmona, Y., et al., *Differential induction of plasma cells by isoforms of human TACI*. *Blood*, 2015. **125**(11): p. 1749-58.
217. Mackay, F. and P. Schneider, *TACI, an enigmatic BAFF/APRIL receptor, with new unappreciated biochemical and biological properties*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2008. **19**(3-4): p. 263-76.
218. Seshasayee, D., et al., *Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLyS receptor*. *Immunity*, 2003. **18**(2): p. 279-88.
219. Yan, M., et al., *Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(7): p. 638-43.
220. Baker, K.P., *BLyS--an essential survival factor for B cells: basic biology, links to pathology and therapeutic target*. *Autoimmun Rev*, 2004. **3**(5): p. 368-75.
221. Vincent, F.B., et al., *The BAFF/APRIL system in SLE pathogenesis*. *Nat Rev Rheumatol*, 2014. **10**(6): p. 365-73.
222. Schneider, P., *The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation*. *Curr Opin Immunol*, 2005. **17**(3): p. 282-9.
223. Bossen, C., et al., *Mutation of the BAFF furin cleavage site impairs B-cell homeostasis and antibody responses*. *Eur J Immunol*, 2011. **41**(3): p. 787-97.
224. Zhang, Y., et al., *Effect of TACI signaling on humoral immunity and autoimmune diseases*. *J Immunol Res*, 2015. **2015**: p. 247426.

225. Stohl, W., *Therapeutic targeting of the BAFF/APRIL axis in systemic lupus erythematosus*. Expert Opin Ther Targets, 2014. **18**(4): p. 473-89.
226. Tardivel, A., et al., *The anti-apoptotic factor Bcl-2 can functionally substitute for the B cell survival but not for the marginal zone B cell differentiation activity of BAFF*. Eur J Immunol, 2004. **34**(2): p. 509-18.
227. Vincent, F.B., et al., *The BAFF/APRIL system: emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity*. Cytokine Growth Factor Rev, 2013. **24**(3): p. 203-15.
228. Mackay, F., P.A. Silveira, and R. Brink, *B cells and the BAFF/APRIL axis: fast-forward on autoimmunity and signaling*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(3): p. 327-36.
229. Mackay, F., et al., *BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 231-64.
230. Mackay, F., et al., *Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations*. J Exp Med, 1999. **190**(11): p. 1697-710.
231. Batten, M., et al., *BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes*. J Exp Med, 2000. **192**(10): p. 1453-66.
232. Chen, X., et al., *Evidence for selection of a population of multi-reactive B cells into the splenic marginal zone*. Int Immunol, 1997. **9**(1): p. 27-41.
233. Li, Y., H. Li, and M. Weigert, *Autoreactive B cells in the marginal zone that express dual receptors*. J Exp Med, 2002. **195**(2): p. 181-8.
234. Figgett, W.A., et al., *Deleting the BAFF receptor TACI protects against systemic lupus erythematosus without extensive reduction of B cell numbers*. J Autoimmun, 2015. **61**: p. 9-16.
235. Hanna, Z., et al., *Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice*. Cell, 1998. **95**(2): p. 163-75.
236. Hanna, Z., et al., *Transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1 in immune cells develop a severe AIDS-like disease*. J Virol, 1998. **72**(1): p. 121-32.
237. Poudrier, J., 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, 2001. **15**(2): p. 173-85.
238. Hassler, S., et al., *Aire-deficient mice develop hematopoietic irregularities and marginal zone B-cell lymphoma*. Blood, 2006. **108**(6): p. 1941-8.
239. Poudrier, J., et al., *The AIDS-like disease of CD4C/human immunodeficiency virus transgenic mice is associated with accumulation of immature CD11bHi dendritic cells*. J Virol, 2003. **77**(21): p. 11733-44.
240. Poudrier, J., J. Chagnon-Choquet, and M. Roger, *Influence of dendritic cells on B-cell responses during HIV infection*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 592187.

241. Chagnon-Choquet, J., et al., *HIV Nef promotes expression of B-lymphocyte stimulator by blood dendritic cells during HIV infection in humans*. J Infect Dis, 2015. **211**(8): p. 1229-40.
242. Stohl, W., et al., *B lymphocyte stimulator protein-associated increase in circulating autoantibody levels may require CD4+ T cells: lessons from HIV-infected patients*. Clin Immunol, 2002. **104**(2): p. 115-22.
243. Rodriguez, B., et al., *Plasma levels of B-lymphocyte stimulator increase with HIV disease progression*. Aids, 2003. **17**(13): p. 1983-5.
244. Carbone, J., et al., *Potential role of serum BAFF as a biomarker in HIV infection*. Infect Dis (Lond), 2015. **47**(4): p. 260-2.
245. Poudrier, J., et al., *High expression levels of BLyS/BAFF by blood dendritic cells and granulocytes are associated with B-cell dysregulation in SIV-infected rhesus macaques*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0131513.
246. Chaoul, N., et al., *Default in plasma and intestinal IgA responses during acute infection by simian immunodeficiency virus*. Retrovirology, 2012. **9**: p. 43.
247. Borhis, G., et al., *Plasmacytoid dendritic cells and myeloid cells differently contribute to BAFF over-expression during primary HIV infection*. Aids, 2015.
248. Yates, N.L., et al., *HIV-1 gp41 envelope IgA is frequently elicited after transmission but has an initial short response half-life*. Mucosal Immunol, 2013. **6**(4): p. 692-703.
249. Gupta, S., et al., *DNA vaccine molecular adjuvants SP-D-BAFF and SP-D-APRIL enhance anti-gp120 immune response and increase HIV-1 neutralizing antibody titers*. J Virol, 2015. **89**(8): p. 4158-69.
250. Kanagavelu, S., et al., *HIV-1 adenoviral vector vaccines expressing multi-trimeric BAFF and 4-1BBL enhance T cell mediated anti-viral immunity*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e90100.
251. Dosenovic, P., et al., *BLyS-mediated modulation of naive B cell subsets impacts HIV Env-induced antibody responses*. J Immunol, 2012. **188**(12): p. 6018-26.
252. Pujanauski, L.M., et al., *Mouse marginal zone B cells harbor specificities similar to human broadly neutralizing HIV antibodies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(4): p. 1422-7.
253. Chagnon-Choquet, J., et al., *IL-10 and lymphotoxin-alpha expression profiles within marginal zone-like B-cell populations are associated with control of HIV-1 disease progression*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e101949.
254. He, B., et al., *HIV-1 envelope triggers polyclonal Ig class switch recombination through a CD40-independent mechanism involving BAFF and C-type lectin receptors*. J Immunol, 2006. **176**(7): p. 3931-41.
255. *The World Factbook*. 2013-2014 [cited 2015 01-27]; Available from: <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/index.html>.
256. Cottrell, B.H., *An updated review of evidence to discourage douching*. MCN Am J Matern Child Nurs, 2010. **35**(2): p. 102-7; quiz 108-9.

257. Lajoie, J., et al., *Differences in immunoregulatory cytokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments of HIV-1-infected commercial sex workers in Benin*. *Mucosal Immunol*, 2008. **1**(4): p. 309-16.
258. Kay, N.E. and B.T. Pittner, *IL-4 biology: impact on normal and leukemic CLL B cells*. *Leuk Lymphoma*, 2003. **44**(6): p. 897-903.
259. Lund, F.E. and T.D. Randall, *Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(4): p. 236-47.
260. Siewe, B., et al., *Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV CD8(+) T cell function in vitro*. *J Leukoc Biol*, 2013. **93**(5): p. 811-8.
261. Saulep-Easton, D., et al., *The BAFF receptor TACI controls IL-10 production by regulatory B cells and CLL B cells*. *Leukemia*, 2016. **30**(1): p. 163-72.
262. Sharkey, D.J., et al., *Seminal fluid induces leukocyte recruitment and cytokine and chemokine mRNA expression in the human cervix after coitus*. *J Immunol*, 2012. **188**(5): p. 2445-54.
263. Sharkey, D.J., et al., *Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells*. *Mol Hum Reprod*, 2007. **13**(7): p. 491-501.
264. Weller, S., et al., *IgM+IgD+CD27+ B cells are markedly reduced in IRAK-4-, MyD88-, and TIRAP- but not UNC-93B-deficient patients*. *Blood*, 2012. **120**(25): p. 4992-5001.
265. Shirai, A., et al., *Human immunodeficiency virus infection induces both polyclonal and virus-specific B cell activation*. *J Clin Invest*, 1992. **89**(2): p. 561-6.
266. Wang, Z., et al., *Polyspecific self-reactive antibodies in individuals infected with human immunodeficiency virus facilitate T cell deletion and inhibit costimulatory accessory cell function*. *J Infect Dis*, 1999. **180**(4): p. 1072-9.
267. De Milito, A., et al., *Mechanisms of hypergammaglobulinemia and impaired antigen-specific humoral immunity in HIV-1 infection*. *Blood*, 2004. **103**(6): p. 2180-6.
268. Liu, M., et al., *Polyreactivity and autoreactivity among HIV-1 antibodies*. *J Virol*, 2015. **89**(1): p. 784-98.
269. Bonsignori, M., et al., *An autoreactive antibody from an SLE/HIV-1 individual broadly neutralizes HIV-1*. *J Clin Invest*, 2014. **124**(4): p. 1835-43.
270. Guinamard, R., et al., *Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(1): p. 31-6.
271. Pollara, J., et al., *Association of HIV-1 Envelope-Specific Breast Milk IgA Responses with Reduced Risk of Postnatal Mother-to-Child Transmission of HIV-1*. *J Virol*, 2015. **89**(19): p. 9952-61.
272. Choi, R.Y., et al., *Cervicovaginal HIV-1-neutralizing immunoglobulin A detected among HIV-1-exposed seronegative female partners in HIV-1-discordant couples*. *Aids*, 2012. **26**(17): p. 2155-63.

273. Seaton, K.E., et al., *HIV-1 Specific IgA Detected in Vaginal Secretions of HIV Uninfected Women Participating in a Microbicide Trial in Southern Africa Are Primarily Directed Toward gp120 and gp140 Specificities*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e101863.
274. Tounkara, F.K., et al., *Violence, condom breakage, and HIV infection among female sex workers in Benin, West Africa*. Sex Transm Dis, 2014. **41**(5): p. 312-8.
275. Min, Y.N., et al., *Participation of BAFF receptors in the pathogenesis of immune thrombocytopenia(ITP)*. J Thromb Haemost, 2016.
276. Vilas-Boas, A., S.A. Morais, and D.A. Isenberg, *Belimumab in systemic lupus erythematosus*. RMD Open, 2015. **1**(1): p. e000011.
277. Williams, W.B., et al., *HIV-1 VACCINES. Diversion of HIV-1 vaccine-induced immunity by gp41-microbiota cross-reactive antibodies*. Science, 2015. **349**(6249): p. aab1253.