

Université de Montréal

L'impact de BAFF dans la dérégulation des lymphocytes B de la zone marginale et le développement prématuré des maladies cardiovasculaires chez les individus infectés au VIH-1.

*Par*

Matheus Naegele Aranguren

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise

en Microbiologie et Immunologie

Avril 2022

© Naegele Aranguren, 2022

Université de Montréal

*Ce mémoire intitulé*

**L'impact de BAFF dans la dérégulation des lymphocytes B de la zone marginale et le développement prématuré des maladies cardiovasculaires chez les individus infectés au VIH-**

**1.**

*Présenté par*

**Matheus Naegele Aranguren**

*A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes*

**Nicolas Chomont**

Président-rapporteur

**Michel Roger**

Directeur de recherche

**Johanne Poudrier**

Codirectrice de recherche

**Benoit Barbeau**

Membre du jury

## Résumé

Malgré la présence d'un traitement très efficace disponible pour les personnes vivant avec le virus de l'immunodéficience humaine (PVVIH) qui permet à celles-ci d'avoir une espérance de vie presque normale, une inflammation chronique demeure toujours, et celle-ci est la cause du développement prématuré de comorbidités associées au vieillissement, comme des maladies cardiovasculaires (MCV) telles que l'athérosclérose. Cette inflammation chronique se traduit entre autres par un excès de la molécule « *B-cell activating factor* » (BAFF), un facteur de survie et différenciation des lymphocytes B. L'excès de BAFF dans le contexte du VIH est associé notamment avec la dérégulation du compartiment des lymphocytes B, l'hyperglobulinémie, le bris de tolérance et certaines manifestations autoimmunes. De façon importante, nous avons caractérisé l'augmentation des fréquences des cellules B de la zone marginale de type précurseurs (MZp), une population innée dont la sélection implique BAFF, et qui chez les individus non-infectés a démontré une forte capacité régulatrice et anti-inflammatoire.

L'objectif de ce travail était, dans un premier temps, d'identifier, à l'aide d'analyses transcriptomique et par cytométrie en flux, le phénotype des MZp provenant du sang des PVVIH. Dans un second temps, l'objectif de ce travail était d'étudier la corrélation entre les niveaux de BAFF et de son analogue « *A proliferation-inducing ligand* » (APRIL) avec la dérégulation des MZp ainsi que des marqueurs classiques du développement de MCV dans les spécimens sanguins provenant d'individus de la Cohorte Canadienne VIH et Vieillissement.

Nos résultats démontrent une altération dans le phénotype B régulateur (Breg) des MZp, traduit par une baisse d'expression des récepteurs nucléaires NR4A1, NR4A2 et NR4A3, ainsi qu'une baisse de leur fonction régulatrice. Cette baisse d'expression et de fonction semble être directement en lien avec l'excès de BAFF dans le contexte du VIH. De plus, nous démontrons que BAFF corrèle avec plusieurs facteurs de risque pour le développement des MCV, tandis qu'APRIL corrèle négativement avec ceux-ci. De façon intéressante, APRIL est capable de moduler positivement l'expression des NR4As par les MZp *in vitro*. Nos résultats suggèrent que des stratégies permettant de moduler les niveaux de BAFF et/ou APRIL pourraient être envisagées

afin de réduire le fardeau inflammatoire chez les PVVIH et restaurer l'immunocompétence des MZp.

**Mots-clés** : athérosclérose, BAFF, APRIL, zone marginale, lymphocyte B, Breg, inflammation, VIH, sida, NR4A.

## Abstract

Despite the existence of a very efficient treatment that allows people living with the human immunodeficiency virus (PLHIV) to live a relatively normal life, chronic inflammation persists and is the cause of the premature development of age-associated comorbidities, such as cardiovascular diseases (CVD) like atherosclerosis. This chronic inflammation involves an excess of “*B-cell activation factor*” (BAFF), a survival and differentiation factor for B-cells, especially for Marginal Zone B-cells (MZ), which are innate type B-cells that depend on BAFF for their selection. The excess of BAFF is associated with B-cell deregulations, breakage of tolerance and certain auto-immune manifestations. Notably, we have reported that frequencies of precursor MZ B-cells (MZp) were increased in the blood of HIV-1 infected individuals. As such, we have recently shown that in uninfected individuals, MZp possess strong regulatory and anti-inflammatory capacities.

The objective of this work was to first, identify, based on transcriptomic and flow-cytometry analyses, the gene and molecular phenotype of MZ populations from the blood of PLHIV, and secondly, to study the correlation between levels of BAFF and its analogue, “*A proliferation-inducing ligand*” (APRIL) with MZ deregulation and classical CVD markers in blood samples from individuals of the Canadian HIV and Aging Cohort Study.

Our results show an alteration in the regulatory B-cell (Breg) phenotype of MZp, related to a downregulation of the nuclear receptors NR4A1, NR4A2 and NR4A3. Furthermore, we find a reduction of the regulatory function of blood MZp. This diminished expression and function seems to be linked to the excess of BAFF in the HIV context. Furthermore, we demonstrate that BAFF correlates with several risk factors for atherosclerosis development, while APRIL negatively correlate with these factors. Interestingly, APRIL positively modulates the expression of NR4As by MZp *in vitro*. Our results suggest that BAFF and/or APRIL modulation strategies could be envisaged to lower the inflammatory burden in people living with HIV and restore MZp immunocompetence.

**Keywords:** atherosclerosis, BAFF, APRIL, marginal zone, B lymphocytes, Breg, inflammation, HIV, AIDS, NR4A

# Table des matières

Résumé.....	III
Abstract .....	V
Table des matières .....	VI
Liste des tableaux.....	XI
Liste des figures.....	XII
Liste des sigles et abréviations.....	XIII
Remerciements .....	XVIII
Chapitre 1 – Le Virus de l’Immunodéficience Humaine.....	1
1.1 – Introduction au VIH-1.....	1
1.1.1 – Génome et protéines virales .....	2
1.1.1.1 – Les protéines impliquées dans la réplication et maturation .....	2
1.1.1.2 – Les protéines accessoires.....	3
1.1.2 – Le cycle d’infection et réplication du VIH-1 .....	5
1.1.2.1 – Infection, transcription inverse et intégration .....	5
1.1.2.2 – Production des protéines virales .....	6
1.2 – Épidémiologie du VIH-1.....	7
1.3 – Phases cliniques de l’infection au VIH-1.....	8
1.3.1 – Phase aiguë ou primo-infection .....	10
1.3.2 – Phase chronique .....	11
1.3.3 – Sida .....	11
1.3.4 – Types de progresseurs.....	11
1.3.4.1 – Progresseur normal ou classique.....	12
1.3.4.2 – Progresseur rapide .....	12
1.3.4.3 – Progresseur lent.....	12
1.3.5 – Facteurs de progression et résistance au VIH-1.....	12
1.3.5.1 – Facteurs viraux .....	13
1.3.5.2 – Facteurs de l’hôte .....	13
1.3.5.3 – Individus hautement exposés et séronégatifs.....	15
1.4 – Les traitements pour l’infection au VIH-1 .....	15
Chapitre 2 – Relation entre le VIH-1 et les lymphocytes B.....	18

2.1 – Introduction au compartiment B.....	18
2.2 – Ontogénie des lymphocytes B.....	19
2.3 – Les réponses T-dépendantes et T-indépendantes .....	21
2.3.1 – La réponse T-dépendante .....	21
2.3.2 – La réponse T-indépendante .....	22
2.4 – Le système BAFF/APRIL .....	23
2.5 – Les lymphocytes B de la zone marginale (MZ).....	26
2.5.1 – Caractéristiques et fonctions des MZ.....	26
2.5.2 – Les lymphocytes B de la zone marginale « Precursor-like » (MZp) .....	30
2.6 – Les lymphocytes B régulateurs (Breg).....	31
2.6.1 – Définition .....	31
2.6.2 – Les facteurs de transcription NR4A.....	32
2.6.3 – La molécule régulatrice CD83.....	34
2.6.4 – Les ectonucléotidases CD39 et CD73 .....	35
2.7 – La dérégulation des lymphocytes B par le VIH.....	37
2.7.1 – L’excès de BAFF .....	38
2.7.2 – Bris de la tolérance.....	39
2.7.3 – Hyperglobulinémie .....	39
2.7.4 – Perturbation des lymphocytes B mémoires.....	41
2.7.5 – Perturbations de la zone marginale : observations chez les souris VIH transgéniques .....	43
2.7.6 – Dérégulations des MZp .....	44
Chapitre 3 – Les complications de l’infection au VIH-1 à long terme.....	48
3.1 – L’athérosclérose .....	48
3.1.1 – Définition .....	48
3.1.2 – Rôle des lymphocytes B dans l’athérosclérose .....	52
3.1.2.1 – Rôle athérogène des lymphocytes B.....	54
3.1.2.2 – Rôle athéroprotecteur des lymphocytes B .....	55
3.1.2.3 – Rôle du système BAFF/APRIL dans l’athérosclérose.....	56
3.2 – La Cohorte Canadienne VIH et Vieillesse.....	57
Chapitre 4 – Justification et hypothèses .....	58
Chapitre 5 – Excess BAFF Alters NR4As Expression Levels and Breg Function of Human Precursor Marginal Zone B-cells in the Context of HIV-1 infection.....	60

1 – Abstract .....	62
1 – Résumé .....	63
2 – Introduction.....	64
3 – Materials and Methods .....	66
3.1 – Specimen collection and clinical data .....	66
3.2 – Cell Sorting of Human Blood MZ and MZp B-cells, RNA Isolation and Sequencing.....	66
3.3 – Volcano plot and Gene Set Enrichment Analyses (GSEAs).....	67
3.4 – Multicolour Flow-Cytometry .....	68
3.5 – Human Tonsillar B-cells .....	69
3.6 – qPCR characterisation of NR4A1, NR4A3 and CD83 mRNA expression levels by blood MZp B-cells .....	70
3.7 – Breg Function Assays.....	70
3.7.1 – For assays with tonsillar populations .....	70
3.7.2 – For assays with blood cell populations.....	71
3.8 – MoDC:B-cell cocultures .....	71
3.9 – Statistical Analysis .....	72
4 – Results .....	72
4.1 – Socio-demographic characteristics of the cohorts used in this study .....	72
4.2 – Blood MZp B-cells of HIV-infected progressors show an altered transcriptomic profile .....	73
4.3 – Blood MZp B-cells from HIV-infected progressors express lower levels of regulatory markers.....	74
4.4 – The Breg function of blood MZp B-cells of HIV-infected progressors is altered, despite ART .....	75
4.5 – Excess BAFF alters the Breg potential of MZp B-cells .....	75
4 – Discussion .....	77
5 – Conclusion .....	83
6 – References.....	86
Figure Legends.....	92
Chapitre 5 – Table 1 .....	98
Chapitre 5 – Figure 1 .....	99
Chapitre 5 – Figure 2 .....	100
Chapitre 5 – Figure 3 .....	101
Chapitre 5 – Figure 4 .....	102



Chapitre 5 – Figure Supplémentaire 1 .....	103
Chapitre 5 – Figure Supplémentaire 2 .....	104
Chapitre 5 – Figure Supplémentaire 3 .....	105
Chapitre 5 – Figure Supplémentaire 4 .....	106
Chapitre 5 – Figure Supplémentaire 5 .....	107
Chapitre 5 – Figure Supplement Aire 6 .....	108
Chapitre 6 – Subclinical Atherosclerosis is Associated with Discrepancies in BAFF and APRIL Levels and Altered Breg Potential of Precursor-like Marginal Zone B-cells in HIV-Treated Individuals.	109
1 – Abstract .....	111
Résumé .....	112
2 – Introduction .....	113
3 – Materials and Methods .....	116
3.1 – Specimens and clinical data collection .....	116
3.2 – Characterisation of atherosclerosis plaques .....	117
3.3 – Measure of soluble BAFF, APRIL and CD83 .....	117
3.4 – Flow cytometry characterisation of Breg markers and membrane BAFF expression levels .....	117
3.5 – Culture of blood human B-cells with APRIL and BAFF .....	118
3.6 – Statistical analyses .....	119
3.7 – Ethics Statement .....	119
4 – Results .....	119
4.1 – Socio-demographic characteristics of sub-cohort (A) .....	119
4.2 – Excess BAFF in PLHIV despite long-term ART correlates with atherosclerosis risk factors. ....	120
4.3 – APRIL correlates negatively with BAFF and atherosclerosis risk factors in PLHIV despite long-term ART .....	121
4.4 – Blood MZp from PLHIV are deregulated despite long-term ART .....	121
4.5 – APRIL upregulates expression levels of Breg markers by blood MZp .....	123
5 – Discussion .....	123
6 – Conclusion .....	128
7 – References .....	129
Figure Legends .....	133
Chapitre 6 – Tableau 1 .....	137
Chapitre 6 – Figure 1 .....	138

Chapitre 6 – Figure 2 .....	139
Chapitre 6 – Figure 3 .....	140
Chapitre 6 – Figure 4 .....	141
Chapitre 6 – Figure 5 .....	142
Chapitre 6 – Figure 6 .....	143
Chapitre 6 – Figure Supplemental 1.....	144
Chapitre 6 – Figure Supplemental 2.....	145
Chapitre 7 – Discussion .....	146
7.1 – L’excès de BAFF et la dérégulation des MZp persistent malgré la trithérapie à long terme .....	146
7.2 – L’excès de BAFF est directement relié à la dérégulation de la fonction Breg des MZp dans le contexte du VIH.....	151
7.3 – Les liens entre BAFF et l’athérosclérose dans le contexte du VIH .....	152
7.4 – Le déséquilibre des niveaux de BAFF et APRIL dans le développement de l’athérosclérose.....	154
7.5 – La dérégulation des MZp dans le développement de l’athérosclérose .....	156
7.6 – Avenues thérapeutiques .....	158
Chapitre 8 – Conclusion.....	160
Références Bibliographiques.....	161
Annexe 1 – NR4A Expression by Human Marginal Zone B-Cells.....	180
1 – Abstract .....	182
2 – Introduction.....	183
3 – Materials and Methods .....	184
3.1 – Ethics Statement .....	184
3.2 – Cell Sorting of Human Blood MZ and Precursor-Like MZ B-Cells, RNA Isolation and Sequencing .....	184
3.3 – Validation of the Cross-Reactivity of the PE-Conjugated Human Anti-Mouse Nurr77 (NR4A1) Monoclonal Antibody (mAb) .....	185
3.4 –Flow-Cytometry Characterization of NR4A1, NR4A3, CD83, CD39, and CD73 Expression by Human Tonsillar B-Cells.....	186
3.5 – Flow-Cytometry Characterization of NR4A1, NR4A3, CD83, CD39, and CD73 Expression by Human Tonsillar B-Cells.....	187
3.6 – Functional Assays .....	187
3.7 – Statistical Analysis .....	187
4 – Results and Discussion .....	188

5 – Conclusion .....	191
6 – References .....	194
Figure Legends.....	197
Annexe 1 – Figure 1.....	200
Annexe 1 – Figure 2.....	201
Annexe 1 – Figure 3.....	202
Annexe 1 – Figure 4.....	203
Annexe 1 – Figure 5.....	204
Annexe 1 – Figure 6.....	205
Annexe 1 – Figure Supplémentaire 1 .....	206
Annexe 1 – Figure Supplémentaire 2 .....	207
Annexe 1 – Figure Supplémentaire 3 .....	208
Annexe 2 – Marginal Zone B-Cell Populations and Their Regulatory Potential in the Context of HIV and Other Chronic Inflammatory Conditions.....	209
Abstract .....	211
Annexe 3 – Monocytes’ Gene and Molecular Expression Profiles Demonstrate Distinct Effector and Regulatory Functions in Beninese HIV Highly Exposed Seronegative Female Commercial Sex Workers .....	212
Abstract .....	214
Annexe 4 – The importance of regulation in natural immunity to HIV .....	215
Abstract .....	217
Liste des tableaux	
Tableau 1. – Les marqueurs de surface des lymphocytes B de la zone marginale (MZ), de leurs précurseurs (MZp) et des lymphocytes B folliculaires (FO) .....	31

## Liste des figures

Figure 1. - La structure du VIH-1. ....	1
Figure 2. - Les phases cliniques de l'infection par le VIH .....	9
Figure 3. - Le cycle de réplication du VIH et les cibles des antirétroviraux. ....	16
Figure 4. - Les signaux dictant le destin cellulaire des lymphocytes B transitoires .....	20
Figure 5. - Le système BAFF/APRIL.....	25
Figure 6. - La zone marginale de la rate humaine.....	29
Figure 7 – La voie de l'adénosine .....	37
Figure 8 - Les fonctions effectrices des MZp dans le contexte du VIH .....	47
Figure 9. - La formation des plaques d'athérosclérose .....	50
Figure 10. - Le rôle des lymphocytes B dans l'athérosclérose .....	54

## Liste des sigles et abréviations

ADAM10 – *A disintegrin and metalloproteinase-containing protein 10*

ADN – Acide Désoxyribonucléique

ADNc – ADN complémentaire

ADO – Adenosine

AID – *Activation-induced cytidine deaminase*

AIRE – *autoimmune regulator*

AMP – Adenosine Monophosphate

APOBEC3G – *Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G*

APRIL – *A proliferation-inducing ligand*

ARN – Acide Ribonucléique

ART – *Antiretroviral Therapy*

ATP – Adenosine Triphosphate

AVC – Accident Vasculaire Cérébral

AZT – azidothymidine

BAFF – *B-cell Activation Factor*

BAFF-R – *B-cell Activation Factor Receptor*

BCMA – *B-cell Maturation Antigen*

BCR – *B-cell Receptor*

BLyS – *B Lymphocyte Stimulator*

Breg – Lymphocyte B régulateur

BST-2 – *B-cell Stromal Factor 2*

BTK – *Bruton's tyrosine kinase*

CCLX – *C-C Motif ligand X* (où x est un chiffre quelconque. Ex : CCL3 – C-C Motif ligand 3)

CCL3L1 – *C-C Motif ligand 3 like 1*

CCRX – *C-C Chemokine Receptor X* (où x est un chiffre quelconque. Ex : CCR5 – C-C Chemokine Receptor 5)

CDx – *Cluster of Differentiation x* (où x est un chiffre quelconque. Ex : CD4 – Cluster of Differentiation 4)

CHACS – *Canadian HIV and Aging Cohort Study*

CLP – *Common Lymphoid Progenitor*

CMH – *Complexe Majeur de Histocompatibilité*

CPA – *Cellule Présentatrice d'Antigène*

CPSF6 – *Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6*

CREB – *cyclic AMP (cAMP) response element binding protein*

CRP – *C-reactive Protein*

CXCR4 – *C-X-C Chemokine Receptor 4*

DC – *Dendritic cell* (cellule dendritique)

DC-SIGN – *Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3 Grabbing non-integrin*

DLL1 – *Delta-like protein 1*

ENTPD1 – *ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1*

ESCRT – *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*

FDA – *Food and Drug Administration*

FDC – *Cellule Dendritique Folliculaire*

FO – *Lymphocyte B folliculaire*

FoxO3a - *forkhead box O3a*

FoxP3 – *Forkhead box P3*

GALT – *Gut-Associated Lymphoid Tissues*

GM-CSF – *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulation Factor*

gpX – *Glycoprotein*, où X est son poids en kD.

HARSAH – *Hommes ayant des relations sexuelles avec d'autres hommes*

HDL – *High Density Lipoprotein*

HLA – *Human Leukocyte Antigen*

HSPG – *Heparan sulphate proteoglycan*

IDO-1 - *Indoleamine 2-3 dioxygenase 1*

IFN $\alpha$ ,  $\gamma$  – *Interféron Alpha, Gamma*

IL-x – Interleukine X (où X est un chiffre)  
iNKT - *Invariant natural killer T cells*  
INSTI – *Integrase Strand Transfer Inhibitor*  
ISG – *Interferon Stimulated Genes*  
JAK – *Janus Kinase*  
LDL – *Low Density Lipoprotein*  
LEDGF – *lens epithelium-derived growth factor*  
LTNP – *Long Term Non-Progressors*  
LTR – *Long Terminal Repeat*  
LPS – *Lipopolysaccharide*  
MALT – *mucosal associated lymphoid tissues*  
M-CSF – *Macrophage Colony Stimulation Factor*  
MCV – *Maladie Cardiovasculaire*  
mTOR – *Mechanistic Target of Rapamycin*  
Myd88 – *myeloid differentiation primary response 88*  
MZ – *Lymphocyte B de la Zone Marginale*  
MZp – *Lymphocyte B de la Zone Marginale « Precursor-like »*  
N<sub>BH</sub> – *Neutrophile B helper*  
Nef – *Negative regulating factor*  
NET – *Neutrophil Extracellular Trap*  
NF-κB – *Nuclear factor kappa B*  
NK – *Natural Killer cell*  
NNRTI – *Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor*  
NOR-1 – *neuron-derived orphan receptor 1*  
NR4A – *nuclear receptors subfamily 4 group A*  
NRBE – *Nerve Growth Factor-induced clone B-responsive element*  
NRTI – *Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor*  
NT5E – *Ecto-5'-nucleotidase*  
NurRE – *Nur-responsive element*

Nurr1 – *Nuclear receptor related-1 protein*  
OMS – *Organisation Mondiale de la Santé*  
oxLDL – *Oxidised LDL*  
PBMC – *Peripheral blood mononuclear cells*  
PD-1 – *Programmed death 1*  
PD-L1 – *Programmed Death Ligand 1*  
PI3K – *phosphatidylinositol 3 kinase*  
PKA – *Protéine Kinase A*  
PPT – *Polypurine Tract*  
PRR – *Pattern Recognition Receptor*  
PVVIH – *personnes vivant avec le VIH*  
RAG – *Recombination-activating gene*  
RANTES – *Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*  
Rev – *Regulator of expression of virion proteins*  
RRE – *Rev Regulator Element*  
SAMHD1 – *Sterile Alpha Motif (SAM) domain and HD domain-containing protein 1*  
Sida – *Syndrôme de l'Immunodéficience Acquise*  
STAT – *Signal Transducer and Activator of Transcription*  
Tat – *Transactivator of Transcription*  
TACI – *Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interator*  
T-bet – *T-box expressed in T cells*  
TCR – *T cell receptor*  
TGF- $\beta$  – *Transforming Growth Factor beta*  
T<sub>h</sub> – *Helper T-cell*  
TI – *T-indépendante*  
TIM3 – *T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 3*  
TLR – *Toll-like receptor*  
TRAF – *TNF receptor-associated factors*  
TRAIL – *TNF-related apoptosis inducing ligand*



Treg – Lymphocyte T régulateur

tRNA – ARN de transfert

TWEAK – *TNF-related weak inducer of apoptosis*

VLDL – *Very Low-Density Lipoprotein*

VIH – Virus de l'Immunodéficience Humaine

Vif – *Viral Infectivity Factor*

Vpr – *Viral Protein R*

Vpu – *Viral Protein Unique*

Vpx – *Viral protein X*

## Remerciements

Premièrement, j'aimerais remercier mes directeurs de recherche, Michel et Johanne, pour m'avoir accepté en tant que leur étudiant et pour avoir eu confiance en moi, en m'ayant donné un projet avec une si grande envergure dès le début de mon stage au baccalauréat. J'aimerais remercier particulièrement Johanne, avec qui j'ai eu des discussions fort pertinentes, qui a su alimenter ma curiosité scientifique et qui m'a donné la liberté de décider la direction de mon projet. Si j'ai grandi et si j'ai accompli autant en tant qu'étudiant-chercheur au long de ces années, c'est grâce à toi.

J'aimerais, par la suite, remercier mes collègues de laboratoire, autant les anciens que les présents. Merci Kim, Lyvia, Michelle, Alessandro, Marie-Claude, Laurence, Émilie et Julie. Je vous remercie pour les bons diners, discussions et moments cocasses vécus. Je remercie spécialement à Kim, avec qui j'ai partagé de nombreuses heures de discussion et de travail, ainsi que de très beaux moments. On fait une belle équipe, nous deux!

J'aimerais aussi remercier mes amis de Sénescence, avec qui j'ai eu le plaisir de côtoyer pendant mon baccalauréat et qui sont heureusement encore très présents dans ma vie. Merci Karolane, Emilie, Marie-Michèle, Aléhandra, Alexandrine, Terrie, Guillaume et Richard. Votre amitié a été intégrale à ma réussite. J'aimerais plus spécifiquement remercier mon meilleur ami, Francis. Sans ton amitié et ton support dès la reprise de mes études en 2016, je ne serais probablement pas rendu si loin.

Je remercie également ma famille pour leur support inconditionnel. Merci maman, Lucas, Roch, Christiane et Jérémie. J'aimerais remercier surtout mes grands-parents, qui depuis ma petite enfance m'ont toujours poussé pour continuer mes études et aller plus loin. Grand-papa et grand-maman, vous n'êtes malheureusement plus d'entre nous, mais je veux quand-même vous dire que j'ai réussi, et que je vais y aller beaucoup plus loin. Je promets continuer de vous rendre fières de moi.

J'aimerais aussi remercier les organismes qui ont financé mes études, comme les Fonds de Recherche en Santé – Québec (FRQS), les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC) et les bourses des Études Supérieures et Postdoctorales (ESP), qui m'ont permis de poursuivre ma maîtrise malgré les difficultés financières vécus par le laboratoire. Merci également à la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal pour financer le début de mon doctorat.

J'aimerais aussi remercier ma future directrice de recherche, Marie-Claude, qui a su faire preuve de flexibilité et qui m'a donné amplement de temps pour finaliser ma maîtrise et mon projet. Merci beaucoup de m'avoir accepté dans ton laboratoire aussi tôt. Cela m'a enlevé du poids sur mes épaules lorsque mon avenir était incertain.

Finalement, j'aimerais remercier mon copain Matthew. Sans ton support et ta compagnie pendant ma rédaction, le travail de la maison aurait été impossible pour moi. Merci de tout mon cœur.

# Chapitre 1 – Le Virus de l’Immunodéficience Humaine

Le Virus de l’Immunodéficience Humaine (VIH) est l’agent causal du Syndrome de l’Immunodéficience Acquise (sida), une maladie dont la prévalence reste importante, surtout en Afrique et en Asie du Sud. En effet, actuellement, environ 37 millions de personnes vivent avec ce virus et plusieurs milliers d’autres sont mortes des complications causées par son infection<sup>1</sup>. Dans ce chapitre, la structure, l’organisation génomique, le cycle d’infection du virus et la progression des phases cliniques y seront présentés. Il est important de noter que nous allons traiter, dans ce travail, du VIH-1. Le VIH-2, quoique similaire à ce dernier, possède des différences importantes au niveau génomique qui ne seront que brièvement abordées dans ce travail.

## 1.1 – Introduction au VIH-1

Le VIH-1 est un lentivirus appartenant à la famille des *Retroviridae*. Sa structure se retrouve dans la Figure 1. Celui-ci est un virus enveloppé (son enveloppe est d’origine cellulaire, donc composé d’une bicouche phospholipidique) qui possède à sa surface les glycoprotéines gp120, sous forme trimérique et ancrées sur la gp41, également sous forme trimérique. À l’intérieur de l’enveloppe, nous retrouvons la matrice virale, composée de la p17 et la capsid virale, composée de la protéine p24. C’est à l’intérieur de la capsid virale que nous retrouvons son génome, composé de deux copies d’acide ribonucléique (ARN), ainsi que certaines enzymes virales telles, que la protéase, l’intégrase et la transcriptase inverse (ce qui le qualifie de rétrovirus)<sup>2</sup>.

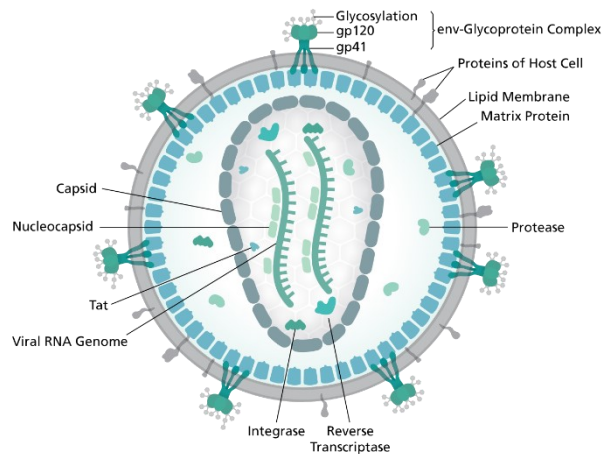


Figure 1. - La structure du VIH-1.

Il est possible d’observer les molécules de surface virales, les deux brins d’ARN et certaines protéines qui font partie du virion. Image tirée de Wikimedia, réalisée par Thomas Spletstoeser, à l’aide de SciStyle.

### 1.1.1 – Génome et protéines virales

Le génome du VIH-1 est un génome composé d'ARN simple brin à polarité positive. Il possède environ 9000 paires de base et 9 gènes, qui encodent environ 15 protéines différentes. La séquence du génome est flanquée par deux séquences *Long Terminal Repeat* (LTR), importantes pour la transcription du génome viral et pour la transcription inverse, soit le processus permettant la conversion de l'ARN en acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc), nécessaire à l'intégration du virus dans le génome de l'hôte<sup>3</sup>. Le premier gène de la séquence, *gag*, permet la production des protéines structurales p17, p24, p7 (la nucléocapside, qui forme un complexe avec l'ARN viral) et p6, protéine impliquée dans le relargage de la particule virale. Le deuxième gène viral, *pol*, encode des enzymes telles que la p51 (transcriptase inverse), p15 (RNase H), p10 (protéase) et p32 (intégrase). Le gène *env*, quant à lui, encode les glycoprotéines gp120 et gp41. Par la suite, nous avons les gènes encodant les protéines régulatrices du VIH, permettant la régulation de la transcription des gènes viraux. Le VIH-1 en possède deux : *tat* et *rev*. Et finalement, nous avons les gènes codant les protéines dites accessoires. Celles-ci sont considérées comme accessoires, car leur présence n'est pas requise au cycle d'infection viral, mais elles permettent une plus grande virulence ou infectiosité *in vivo*. Pour le VIH-1, celles-ci sont *vif*, *vpu*, *vpr* et *nef*. La particularité du VIH-2 par rapport au VIH-1 réside par l'absence de la protéine *vpu*, qui est remplacée par la protéine *vpx*<sup>2</sup>.

#### 1.1.1.1 – Les protéines impliquées dans la réplication et maturation

Ce sont des protéines impliquées directement dans le cycle de réplication ou qui assurent sa régulation au sein de la cellule, notamment l'intégrase, la protéase, parmi d'autres. L'importance de ces protéines et de leurs actions sera mieux abordée dans la section 1.1.2. Comme discuté dans la section précédente, la transcriptase inverse permet la conversion du génome viral (à la base en ARN) en ADNc. La RNase H est une enzyme permettant de dégrader le précurseur ARN restant durant le processus de transcriptase inverse. L'intégrase, quant à elle, permet l'intégration de cet ADNc dans le génome de la cellule-hôte. Ce mécanisme est important afin de permettre l'établissement de la latence virale. La protéase permet le clivage des polypeptides encodés par les ARN viraux en protéines fonctionnelles et elle assure également la maturation de la particule virale, ce qui permet de la rendre infectieuse. Cette particularité fait

en sorte que cette protéine est une cible importante dans le traitement contre l'infection par le VIH (voir section 1.4)<sup>2</sup>.

La protéine *Transactivator of Transcription* (Tat) est une protéine fondamentale pour activer l'expression des gènes viraux. Elle permet la phosphorylation de certains facteurs cellulaires comme *nuclear factor kappa B* (NF-κB), le domaine C-terminal de l'ARN polymérase, parmi d'autres, ce qui augmente l'efficacité du promoteur viral de 1000 fois par rapport aux promoteurs cellulaires<sup>4</sup>. En effet, en absence de Tat, il y a toujours de la transcription des gènes viraux, mais celle-ci est souvent abortive, générant de petits transcrits<sup>5</sup>. La protéine *Regulator of expression of virion proteins* (Rev), quant à elle, va permettre d'exporter l'ARN messager viral non épissé et partiellement épissé du noyau vers le cytoplasme via sa liaison à des séquences nommées *Rev response elements* (RRE). Ceci est possible car Rev possède, dans sa séquence peptidique, un signal d'exportation du noyau, et peut donc exploiter la machinerie cellulaire pour le faire<sup>6</sup>.

#### 1.1.1.2 – Les protéines accessoires

La première protéine accessoire virale est la *Viral Infectivity* (Vif). C'est une protéine essentielle pour la réplication chez des cellules dites non-permissives. Celle-ci permet de bloquer l'activité d'une protéine cellulaire nommée *apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G* (APOBEC3G)<sup>7</sup> et d'induire sa dégradation. APOBEC3G appartient à un groupe de protéines cellulaires nommées « facteurs de restrictions », des protéines qui agissent dans la première ligne de défense des cellules contre une infection virale. APOBEC3G a comme rôle d'introduire des mutations dans la séquence virale avant même que celle-ci soit transcrite, empêchant la production de protéines fonctionnelles<sup>8</sup>.

La deuxième protéine accessoire est la *viral protein unique* (Vpu). Tout comme Vif, Vpu agit sur un autre facteur de restriction, la tétherine, ou *B cell stromal factor 2* (BST-2), un facteur de restriction qui permet de retenir les particules virales produites par une cellule infectée à la surface de celle-ci, les empêchant ainsi d'infecter de nouvelles cellules. De plus, Vpu cause la dégradation de la molécule CD4, la molécule principalement ciblée par le VIH et dont les répercussions seront expliquées plus bas<sup>2</sup>. Chez le VIH-2, Vpu est remplacé par *viral protein x*

(Vpx), qui permet à ce virus de contrecarrer les effets de *Sterile Alpha Motif (SAM) domain and HD domain-containing protein 1* (SAMHD1), un facteur de restriction capable d'empêcher la réplication du VIH dans les cellules de la lignée myéloïde, comme les cellules dendritiques, via la consommation des nucléotides intracellulaires, qui seraient utilisées par le virus par la transcriptase inverse<sup>9</sup>.

Une autre protéine accessoire du VIH-1 est la *viral protein r* (Vpr), une molécule ayant des rôles très divers. Par exemple, Vpr permet l'entrée du complexe de pré-intégration dans le noyau cellulaire, l'arrêt du cycle de réplication cellulaire dans la phase G2, l'activation de la transcription virale via le recrutement de la machinerie cellulaire aux séquences LTR, l'apoptose des lymphocytes T, parmi d'autres<sup>2,10</sup>.

La dernière protéine accessoire est la *negative regulating factor* (Nef). Nous avons étudié l'impact de Nef sur le système immunitaire, y compris son interaction avec les cellules dendritiques (DC) et son impact sur l'inflammation systémique causée par l'infection au VIH-1. Ces études seront abordées dans le Chapitre 2. Nef est une protéine myristoylée d'environ 30 kilo Daltons (kD), abondamment exprimée pendant la phase précoce du cycle viral. Cette protéine a été démontrée fondamentale à l'infection du VIH-1 et peut y jouer multiples rôles, dont certains seront mieux expliqués dans les prochaines sections. Globalement, Nef est responsable d'une baisse de l'expression du récepteur CD4, ce qui pourrait prévenir la surinfection (l'infection répétée par plusieurs particules virales) de la cellule-hôte. Nef est également responsable de la baisse d'expression de certains haplotypes des molécules du Complexe Majeur de Histocompatibilité (CMH) de type I afin de permettre l'échappement à la reconnaissance des cellules infectées par les lymphocytes T cytotoxiques (CD8<sup>+</sup>)<sup>11</sup>. Il est important de mentionner que ce ne sont pas tous les haplotypes qui sont affectés par Nef. En effet, certains haplotypes, comme les *Human Leukocyte Antigen* (HLA)-C, HLA-E et HLA-G, qui agissent en tant qu'inhibiteurs des cellules Natural Killers (NK) ne sont pas affectés par cette protéine virale, ce qui permet, encore une fois, à l'échappement viral, car les cellules NK sont capables de reconnaître la baisse d'expression des molécules du CMH I (une stratégie d'échappement virale classique) et ainsi d'induire la mort cellulaire des cellules qui le font<sup>11,12</sup>.

## 1.1.2 – Le cycle d’infection et réplication du VIH-1

Le cycle d’infection et de réplication du VIH-1 comporte deux phases qui diffèrent dans la régulation des gènes viraux et des protéines produites, soit la phase précoce et la phase tardive.

### 1.1.2.1 – Infection, transcription inverse et intégration

La première étape du cycle de réplication du VIH débute par la liaison de sa glycoprotéine gp120 à son récepteur cellulaire, la molécule membranaire CD4, exprimée à la surface des lymphocytes T auxiliaires (CD4<sup>+</sup>), les monocytes et les cellules qui en dérivent, comme les DC et les macrophages. De façon intéressante, la grande partie des personnes infectées par le VIH sont initialement infectées par un seul virus nommé « transmitted/founder ». La liaison de la gp120 à CD4 engendre un changement conformationnel sur cette première, permettant l’exposition de certains domaines pouvant lier les corécepteurs de ce virus, soit les molécules *C-C chemokine receptor type 5* (CCR5) ou *C-X-C chemokine receptor 4* (CXCR4), dépendamment du tropisme viral. Le virus « transmitted/founder » est presque toujours un virus ayant un tropisme pour CCR5. Cette liaison engendre un deuxième changement de conformation et le rapprochement de la gp41 à la cellule, qui permet la fusion de la membrane phospholipidique virale à celle de la cellule et ainsi le relâchement de la capsid à l’intérieur de cette dernière<sup>2</sup>.

C’est à l’intérieur de la capsid que la transcription inverse aura lieu, afin de protéger le matériel génétique viral de la reconnaissance cellulaire par des protéines cytosoliques. Cette protection serait due à l’interaction de la capsid avec des facteurs cellulaires, tels que *cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6* (CPSF6)<sup>13</sup>. À ce stade, la capsid virale contient de nombreuses protéines virales telles que l’intégrase, la matrice, Vpr ainsi que la transcriptase inverse elle-même. Toutes ces protéines composent ce que l’on nomme le « complexe de transcription inverse », étape qui doit être entamée avant l’intégration du génome viral dans le génome de la cellule-hôte<sup>2,14</sup>. Le processus de transcription inverse est amorcé immédiatement à la suite de la fusion virale en utilisant l’ARN de transfert de la lysine (tARN<sup>Lys3</sup>) comme amorce.

Une fois que la transcription inverse est accomplie, le complexe de transcription inverse est renommé « complexe de pré-intégration ». Celui-ci est transporté, du cytoplasme vers le noyau, en utilisant le réseau de microtubules et le réseau d’actine, et entre dans ce dernier grâce



à Vpr et à CPSF6<sup>15,16</sup>. À l'intérieur du noyau, l'intégrase permettra l'intégration du génome viral dans des régions hautement actives de la chromatine (et ainsi moins compactées) de la cellule-hôte. Il n'y a pas un site préférentiel d'intégration, mais celle-ci ne semblerait pas être aléatoire non plus. En effet, les sites d'intégration virales sont dépendants des protéines de l'hôte capables de se lier à la chromatine et qui interagissent avec l'intégrase, notamment CPSF6 et *lens epithelium-derived growth factor* (LEDGF/p75)<sup>17,18</sup>. Il est possible que l'ADN viral soit retrouvé sous forme circulaire ou linéaire avant son intégration dans le noyau, permettant la synthèse de certains gènes viraux même si le génome sous ces formes ne peut pas produire des particules virales infectieuses<sup>19</sup>.

#### 1.1.2.2 – Production des protéines virales

Une fois que le génome viral est intégré dans le génome de la cellule-hôte, ses gènes peuvent commencer à être transcrits par la machinerie cellulaire, permettant la synthèse d'un ARN messenger (également génome viral), qui sera épissé et qui encode pour Tat, Rev et Nef grâce à la présence des séquences qui sont reconnues par la machinerie d'épissage cellulaire<sup>20</sup>. Puisque cet ARN a été épissé par la machinerie cellulaire, il ne nécessite pas l'action de Rev pour son exportation du noyau<sup>2</sup>. Une fois que Tat et Rev ont été synthétisés, ces protéines sont trafiquées de retour au noyau, où Tat pourra se lier à la séquence LTR du génome viral et ainsi augmenter l'efficacité de sa transcription. L'accumulation de Rev dans le noyau permet l'exportation des ARN messagers partiellement épissés ou non-épissés, comme ceux codant pour les polyprotéines Gag et Gag-Pro-Pol, ainsi que ceux codant pour les protéines accessoires virales et Env<sup>6</sup>. La polyprotéine Gag possède les protéines structurales nécessaires pour son assemblage (comme la matrice, la nucléocapside, la capsid et p6), tandis que la polyprotéine Gag-Pro-Pol encode pour les protéines régulatrices nécessaires pour tout le cycle de réplication (comme la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase).

Toutes les protéines virales nécessaires pour le fonctionnement de la particule virale, une fois synthétisées, seront acheminées vers la membrane plasmique de la cellule, dans ses radeaux lipidiques. Là, les deux copies de l'ARN messenger viral non-épissé (qui servira de génome), l'ARN de transfert de la lysine cellulaire (pour la transcription inverse), les protéines de l'enveloppe gp120 et gp41 ainsi que les polyprotéines Gag et Gag-Pro-Pol s'y retrouvent et s'assemblent. La

particule virale est ainsi presque complétée. En utilisant la machinerie d'exocytose cellulaire *endosomal sorting complexes required for transport* (ESCRT), la particule virale bourgeonne et ainsi incorpore une membrane cellulaire, pouvant même incorporer certaines protéines de surface de l'hôte. L'utilisation de la protéase virale (toujours présente dans le virion) est nécessaire pour cliver les polyprotéines en protéines fonctionnelles, étape fondamentale pour la maturation du virion, le rendant infectieux. Le cycle de réplication du VIH se termine ainsi<sup>20</sup>.

## 1.2 – Épidémiologie du VIH-1

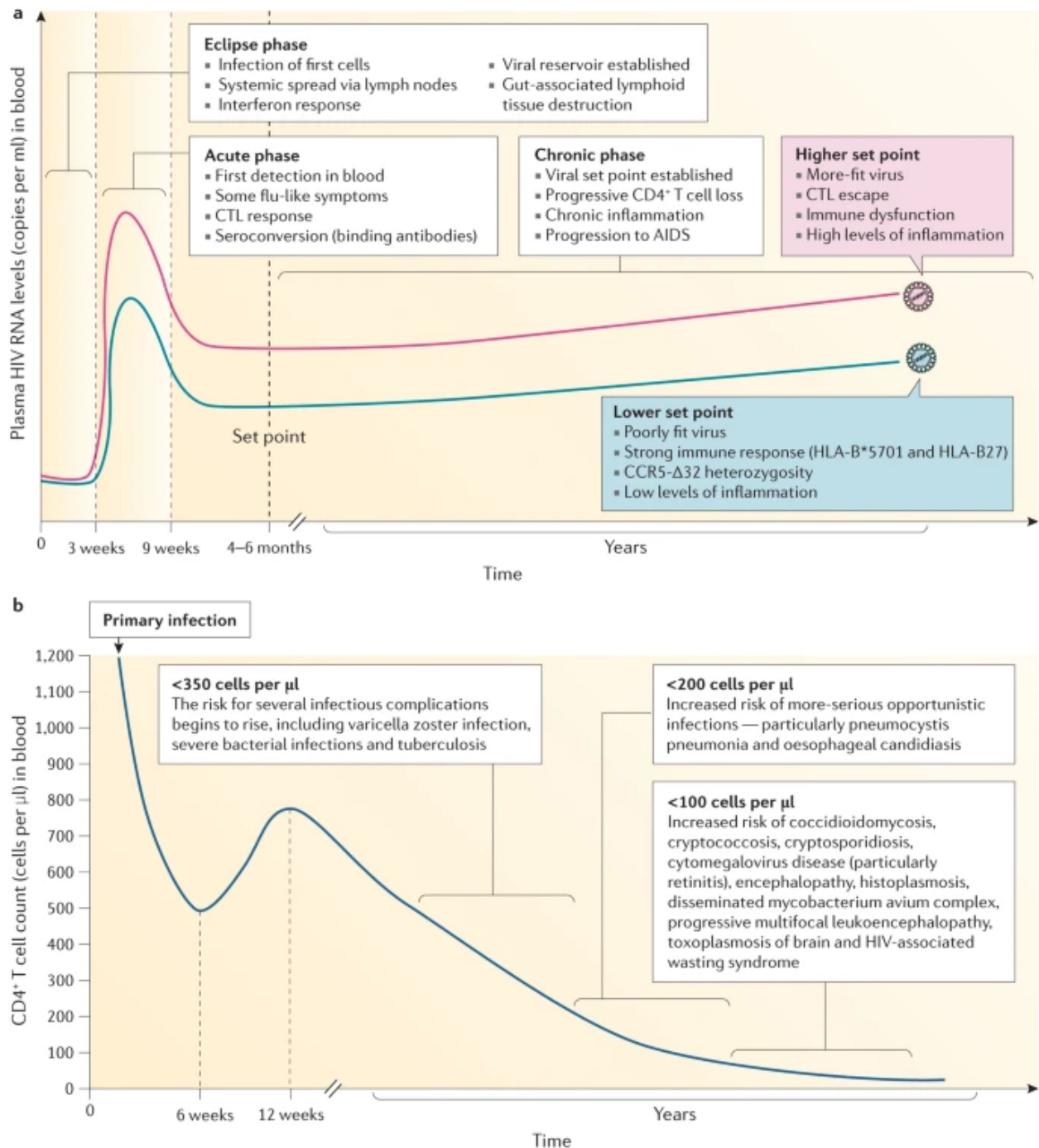
Le VIH-1 est responsable d'une pandémie qui touche actuellement 37 millions de personnes<sup>1</sup>. Les premiers cas ont commencé à être documentés dans les années 80, mais il y a des évidences que le virus circulait chez l'homme depuis au minimum 1959<sup>21</sup>. Il est transmis par des relations sexuelles non protégées et par des contacts avec le sang contaminé (seringues contaminées, transmission mère-enfant, allaitement, parmi d'autres). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les personnes les plus vulnérables à l'infection sont les hommes ayant des relations sexuelles avec d'autres hommes (HARSAH), les personnes *trans* genres, les travailleurs et travailleuses du sexe et les utilisateurs de drogues injectables. Cependant, et malgré la vision populaire, la majorité des nouvelles infections sont reliées à des relations hétérosexuelles (environ 85% de nouvelles infections), et ce surtout dans des pays en voie de développement<sup>22</sup>, où la majorité de celles-ci se produisent chez les femmes<sup>1</sup>.

Le VIH-1 possède quatre groupes principaux : Majeur (M), Non-majeur (N), Outlier (O) et P<sup>2,23-25</sup>. Les groupes O, N et P ont eu une incidence très restreinte : le groupe O n'est retrouvé que dans certains pays en Afrique, et les groupes N et P ont été retrouvés dans seulement quelques individus<sup>25,26</sup>. Le groupe M est de loin le plus répandu, étant retrouvé dans les quatre coins du globe et le responsable de la pandémie du sida. Il peut être divisé en plusieurs sous-groupes : A, B, C, D, F, G, H, J et K. Chacun de ces sous-groupes domine différentes régions du monde. Par exemple, le sous-groupe A est plutôt présent dans l'Afrique subsaharienne et en Europe orientale tandis que le groupe B est retrouvé majoritairement en Amérique du Nord et en Europe occidentale. Le sous-groupe C, quant à lui, est celui qui domine tous les autres sous-groupes, avec

approximativement 50% de la prévalence attribué groupe M. Il est majoritairement retrouvé en Inde, et dans l’Afrique subsaharienne<sup>2,27</sup>.

### **1.3 – Phases cliniques de l’infection au VIH-1**

L’infection au VIH-1 et la progression de la maladie associée à celle-ci peut être divisée en trois phases distinctes, selon le compte de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par millilitre dans le sang et la charge virale : la phase aiguë, la phase chronique et la phase sida. La Figure 2 ci-dessous illustre bien ces phases et les critères cliniques qui les distinguent.



Nature Reviews | Disease Primers

Figure 2. - Les phases cliniques de l'infection par le VIH

L'infection par le VIH comporte trois grandes phases : la primo-infection, la phase chronique et la phase sida. Le compte de CD4 à son niveau plus bas (le compte CD4 nadir) ainsi que la charge virale déterminent la phase clinique dans laquelle l'individu se retrouve. La figure 2.a démontre les phases cliniques selon la charge virale. La figure 2.b démontre l'immuno-incompétence associée au compte CD4 nadir tout au long de l'infection par le VIH. Image tirée de Deeks, S. et al. (2015) sous l'autorisation de Springer Nature (numéro de licence : 5157770258629)

### 1.3.1 – Phase aiguë ou primo-infection

La première phase de l'infection au VIH est la phase aiguë ou primo-infection. Celle-ci peut être sous-divisée en deux sous-phases : la phase d'éclipse et la phase aiguë proprement dite.

La phase d'éclipse est la phase où le virus infecte premièrement ces cellules cibles aux portes d'entrées principales du virus, soit dans les muqueuses. Ce sont les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, les cellules dendritiques et/ou les cellules de Langerhans. Par l'intermédiaire de celles-ci, le virus commence à se multiplier et à être disséminé dans les organes lymphoïdes secondaires. De plus, c'est pendant la phase d'éclipse que les premiers réservoirs viraux sont établis<sup>28</sup>.

C'est dans la phase aiguë que le virus peut être détecté dans le sang pour la première fois. Durant la phase aiguë, la charge virale atteint un pic et certains patients (mais pas tous) commencent à développer des symptômes grippaux, correspondant aux symptômes d'un syndrome rétroviral aiguë<sup>29</sup>. Le système immunitaire de l'hôte est capable de partiellement contrer la réplication virale, mais pas complètement, dû à des mécanismes d'échappement immunitaire viraux et à la mort des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sanguins à cause de l'infection elle-même. À la fin de la primo-infection, le compte de cellules CD4<sup>+</sup> remonte jusqu'à des niveaux quasi-normaux temporairement<sup>28</sup>. Cependant, certains dommages causés par la primo-infection sont irréversibles. En effet, les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (*gut-associated lymphoid tissues*, GALT), comme les plaques de Peyer, les agrégats lymphoïdes et les ganglions lymphatiques mésentériques, voient une destruction massive pendant les premières semaines d'infection. Ceci se produit car des cellules hautement susceptibles à l'infection par le VIH s'y localisent<sup>28,30,31</sup>. Cette destruction mène à une perturbation de l'épithélium intestinal, notamment via la perte des populations immunitaires importantes pour son maintien, comme les lymphocytes T de type Th17 (les premières cellules à mourir dans l'infection par le VIH dans le GALT). La perturbation et dommage subséquent de l'épithélium intestinal observée lors de l'infection au VIH est associée à ce que l'on nomme la translocation microbienne, où éléments du microbiote intestinal comme le lipopolysaccharide composant la paroi des bactéries Gram- se retrouve dans le sang des individus infectés au VIH, étant en partie responsable de l'inflammation chronique observée chez ces individus<sup>32,33</sup>.

### **1.3.2 – Phase chronique**

La phase chronique de l'infection est la plus longue. Après le contrôle partiel de l'infection par le système immunitaire de l'hôte, la charge virale atteint un plateau (appelé « set point ») et l'individu devient asymptomatique. Cette condition peut se maintenir pendant plusieurs années. Tout au long de la phase chronique, il y a maintenance de l'inflammation chronique et une destruction graduelle des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, ce qui entraîne une immunodéficience progressive pendant les années de la maladie. L'immuno-incompétence que nourrit cette inflammation chronique ainsi que la destruction des lymphocytes CD4<sup>+</sup> affectent la capacité du système immunitaire du patient à répondre aux infections, surtout lorsque le compte des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sanguins à son niveau plus bas (le compte CD4 nadir) descend en dessous de 350 cellules/ $\mu$ l de sang<sup>28</sup>.

### **1.3.3 – Sida**

La phase sida est le dernier stade de l'infection par le VIH. Santé Canada définit le statut SIDA lorsque le compte CD4 nadir d'un individu infecté au VIH est inférieur à 200 cellules/ $\mu$ l de sang et/ou lorsqu'une complication qui y est associée est présente (similaire aux critères utilisés par le CDC aux États-Unis)<sup>34</sup>. À ce stade, le patient est vulnérable à plusieurs infections opportunistes (infections par Cytomégalovirus, *Cryptococcus*, *Candida*, des pneumonies, parmi d'autres), généralement facilement contrées chez un individu sain. Le patient atteint du sida est également à risque de certains types de cancers qui sont généralement très rares dans la population générale, comme les Sarcomes de Kaposi, certains types de lymphomes et le cancer cervical invasif, par exemple. D'autres symptômes, comme la cachexie (perte de poids involontaire), des encéphalopathies, sont également présents lorsque la maladie est en état avancé<sup>28,34,35</sup>. Ultiment, l'individu vient à décéder de ces complications.

### **1.3.4 – Types de progresseurs**

Comme dans la majorité des infections humaines, les individus atteints d'une infection au VIH répondent différemment à celle-ci. Selon la vitesse de la progression de la maladie et de la capacité à maintenir la virémie contrôlée, plusieurs catégories de progresseurs ont été décrites. Généralement, celle-ci peut être déterminée par la charge virale stable (le « set point ») que

l'individu est capable de maintenir pendant la phase chronique : ceux qui réussissent à maintenir une charge virale plus faible progressent plus lentement dans l'infection au VIH<sup>36</sup>. La présence de certains facteurs de résistance ou même des mutations dans le virus « transmitted / founder » peuvent également dicter la vitesse de progression de la maladie.

#### *1.3.4.1 – Progresseur normal ou classique*

Comme le nom le dit, le progresseur normal est le type de progresseur le plus couramment observé chez les individus infectés au VIH, soit environ 80% de toutes les personnes infectées. Ces individus gardent le compte CD4 supérieur à 200 cellules/ $\mu$ l pendant au minimum entre 8 et 10 ans et vivent une phase chronique asymptomatique, comme décrit ci-dessus<sup>37</sup>.

#### *1.3.4.2 – Progresseur rapide*

Les progresseurs rapides composent environ 15% des personnes infectées au VIH. Ces individus ne réussissent pas à maintenir un contrôle de la virémie, ayant leur compte CD4 en dessous de 350 cellules/ $\mu$ l (premiers symptômes d'immunodéficience) en moins d'un an et 200 cellules/ $\mu$ l (et donc en phase sida) en moins de 3 ans. À cause de la charge virale élevée lors du « set point », ces individus ne vivent pas une phase chronique asymptomatique<sup>37,38</sup>.

#### *1.3.4.3 – Progresseur lent*

Les progresseurs lents (*long-term non-progressors*, LTNP) sont des individus qui réussissent à maintenir une virémie stable pendant plusieurs années, et ce en absence de la trithérapie (discuté dans la section 1.4). Ils sont le groupe le moins fréquent, environ moins de 5% de tous les individus infectés. Certains développeront éventuellement le sida, et d'autres semblent ne jamais progresser à ce niveau. Ces individus maintiennent un compte CD4 élevé durant toute la progression de la maladie, tout en gardant la charge virale très faible (LTNP virémique), voir indétectable (LTNP avirémique, ou « élite contrôleur »)<sup>37,39</sup>.

### **1.3.5 – Facteurs de progression et résistance au VIH-1**

Il y a plusieurs facteurs qui dictent la vitesse de progression de la maladie. Ceux-ci sont des facteurs viraux et/ou des facteurs de l'hôte.

#### *1.3.5.1 – Facteurs viraux*

Le facteur viral le plus évident est la charge virale : une charge virale plus élevée corrèle avec une progression plus rapide de la maladie.

Le VIH est un virus ayant un très haut taux de mutations. Tout comme ce fait lui permet de s'échapper du système immunitaire de l'hôte, il mène aussi à la formation des particules virales défectueuses et/ou atténuées. En effet, il est estimé que 90% de toutes les particules virales produites sont défectueuses, portant des délétions mineures ou majeures dans le génome. Si la souche « transmitted/founder » est une souche mutée, ceci pourrait affecter sa capacité à infecter l'hôte. En effet, des mutations (délétions ou polymorphismes) dans des protéines accessoires, comme Nef, Vpr, Vif (et possiblement d'autres) corrélerent avec la vitesse ou même la capacité de progression de la maladie<sup>40-43</sup>.

Un autre facteur viral impliqué dans la progression du virus est son tropisme. Comme décrit plus haut, le VIH possède deux tropismes différents : soit pour le corécepteur CCR5 (souche R5) ou pour le corécepteur CXCR4 (souche X4). Pour des raisons incomplètement connues, la presque majorité des virus « transmitted/founder » sont des virus de tropisme R5<sup>44,45</sup>. Cependant, dans la moitié des individus infectés au VIH, il y a une conversion du tropisme des souches virales pendant la progression de la maladie. En effet, la conversion de la population de virus R5 en X4 ou même R5X4 (ayant le tropisme pour les deux récepteurs) chez l'individu corrèle avec un fort déclin de la population de lymphocytes T et une progression plus rapide de la maladie<sup>46-48</sup>.

#### *1.3.5.2 – Facteurs de l'hôte*

Tout comme pour le VIH, des mutations et polymorphismes dans des protéines de l'hôte sont également associés à une progression plus lente ou plus rapide de l'infection. La mieux décrite est une délétion de 32 paires de base dans le corécepteur CCR5 (CCR5 $\Delta$ 32), une mutation plus présente chez les caucasiens que dans d'autres ethnicités au monde. Les individus homozygotes pour cet allèle sont presque complètement résistants à l'infection par le VIH (quoique celle-ci puisse arriver, surtout via l'infection par des souches X4) et les individus hétérozygotes voient une progression plus lente de la maladie<sup>49-51</sup>.



Des mutations dans le corécepteur ne sont pas le seul mécanisme de résistance à l'infection au VIH. La compétition ou la disponibilité pour ces récepteurs peut également être protectrice face à l'infection. En effet, la quantité de molécules CCR5 à la surface des lymphocytes T corrèle avec la capacité d'infection du virus et la charge virale nécessaire pour infecter ces cellules<sup>52</sup>. Celle-ci corrèle également avec la charge virale du patient et la progression de la maladie : les progresseurs lents expriment moins de CCR5 à la surface que les progresseurs normaux<sup>53,54</sup>.

Le récepteur CCR5 possède plusieurs ligands, dont les  $\beta$ -chimiokines *C-C Motif ligand 3* ou CCL3 (*Macrophage-Inflammatory Protein 1 $\alpha$* , MIP-1 $\alpha$ ), *C-C Motif ligand 3 like 1* ou CCL3L1 (*Macrophage-Inflammatory Protein 1 $\alpha$ P*, MIP-1 $\alpha$ P), *C-C Motif ligand 4* ou CCL4 (*Macrophage-Inflammatory Protein 1 $\beta$* , MIP-1 $\beta$ ) et *C-C Motif ligand 5* ou CCL5 (*Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*, RANTES). La liaison d'une de ces chimiokines à son récepteur engendre l'internalisation de ce dernier, ce qui le rend moins disponible pour le virus<sup>55</sup>. De ce fait, des individus présentant de hautes concentrations de ces ligands, y compris certaines cohortes de HESN, sont plus résistants à l'infection par le VIH<sup>56</sup>. En effet, les individus possédant plusieurs copies du gène de CCL3L1 (un ligand très puissant de CCR5) sont plus résistants à l'infection, tandis que les individus qui possèdent un faible nombre de copies de ce gène sont plus susceptibles à celle-ci. La progression de la maladie est également plus lente chez les individus qui possèdent plusieurs copies de ce gène. De façon intéressante, les populations caucasiennes possèdent généralement un plus faible nombre de copies de ce gène que les populations africaines<sup>57</sup>.

Un autre facteur de l'hôte qui peut affecter la progression de la maladie est relié aux molécules du CMH. Les gènes encodant les molécules du CMH sont des gènes ayant la plus grande variabilité entre deux individus parmi tous les gènes humains<sup>58</sup>. Des polymorphismes dans ces molécules peuvent être soit protecteurs, soit délétères à l'infection au VIH. Par exemple, il a été observé que certains polymorphismes d'un allèle de la molécule de classe 1 HLA-B, notamment HLA-B\*57 et HLA-B\*27, confèrent une grande protection contre l'infection. En revanche, la présence de certains autres allèles comme HLA-A\*24, HLA-B\*35-Cw\*04 augmente la susceptibilité à l'infection<sup>59</sup>.

### 1.3.5.3 – Individus hautement exposés et séronégatifs

Les individus hautement exposés et séronégatifs (*highly exposed seronegative, HESN*) sont des individus qui semblent démontrer une « résistance naturelle » à l'infection au VIH, et ce malgré une exposition soutenue au virus pendant plusieurs années. Parmi ceux-ci, nous retrouvons les utilisateurs de drogues injectables, les travailleurs et travailleuses du sexe et les couples sérodiscordants (dont l'un des partenaires est séropositif et l'autre non). Malgré le fait que ces individus ne soient pas infectés, l'étude de cette population permet de mieux comprendre les mécanismes de contrôle de l'infection, ce qui pourrait être utilisé dans des avenues thérapeutiques ou exploré dans le développement de nouvelles stratégies de vaccination, prévention ou utilisation de microbicides afin de protéger les populations plus vulnérables et à risque<sup>60-62</sup>.

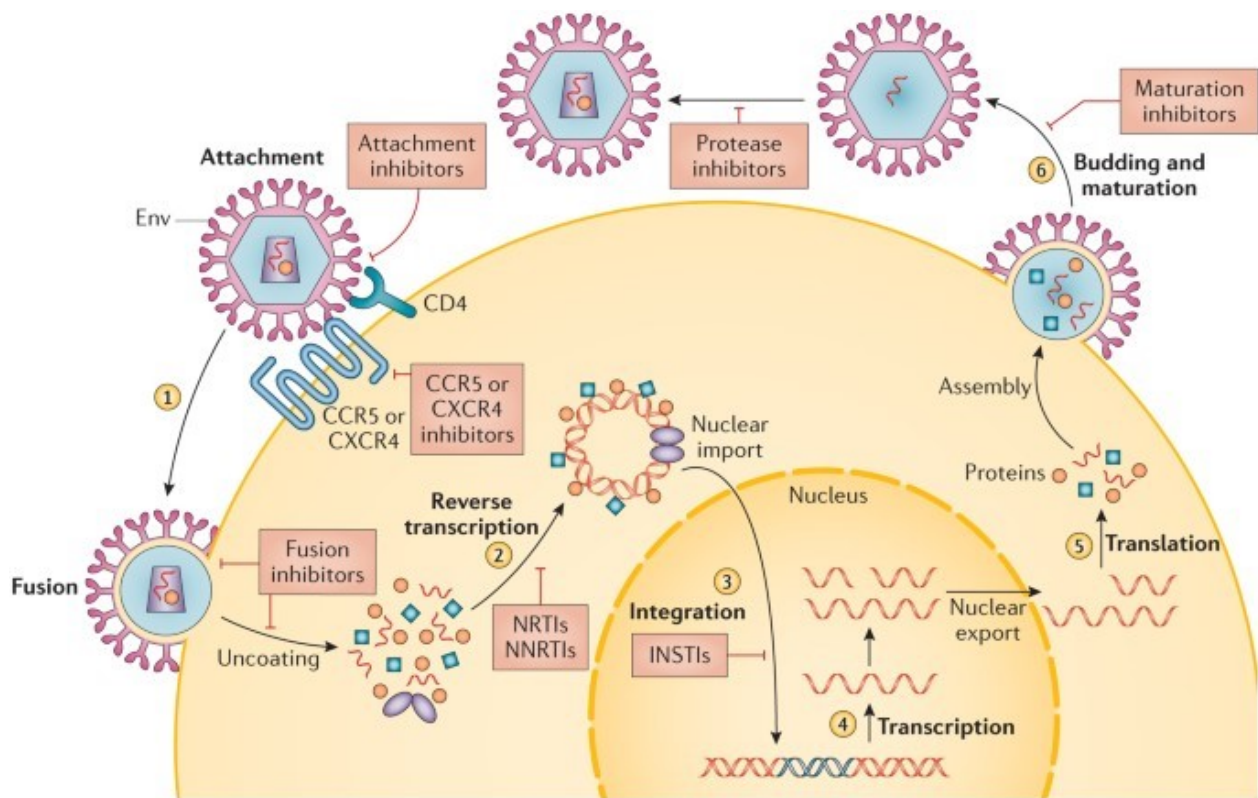
## 1.4 – Les traitements pour l'infection au VIH-1

Jusqu'à aujourd'hui, il n'y a pas de guérison pour l'infection au VIH. Ceci est dû à la formation de ce que l'on nomme le « réservoir » viral : la persistance et latence du virus dans des cellules de longue durée de vie, comme les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires générés à la suite de la primo-infection. Ces cellules, quiescentes, possèdent le virus intégré dans leur génome, mais produisent peu ou pas de protéines virales et donc demeurent invisibles face au système immunitaire<sup>63</sup>.

À date, seulement trois patients ont eu ce que l'on nomme une « élimination complète » de l'infection au VIH. Dans les trois cas, celle-ci a été réalisée dans le cadre d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques d'un donneur compatible homozygote pour l'allèle CCR5Δ32 lors d'un traitement d'un lymphome<sup>64-66</sup>. Depuis que le 1<sup>er</sup> cas a été reporté en 2009, ce traitement a été essayé à plusieurs reprises, sans succès<sup>67-69</sup>. Le haut taux de mortalité associé avec ce traitement couplé à son faible taux de succès est la raison pour laquelle nous ne pouvons pas considérer le traitement utilisé dans ces cas précis comme étant un traitement applicable à large échelle.

Le seul traitement (non-curatif) disponible pour les individus infectés au VIH est la thérapie antirétrovirale (ART). Cette thérapie a pour but d'inhiber plusieurs étapes fondamentales pour la réplication du virus. Les diverses classes d'antirétroviraux utilisés lors du traitement de l'infection

par le VIH peuvent être retrouvés à la Figure 3. Le traitement ART est dit non-curatif car son arrêt est rapidement suivi d'une remontée de la charge virale. Ceci est dû au réservoir viral : puisqu'il est souvent localisé dans des endroits plus difficilement accessibles pharmacologiquement, ce traitement ne permet donc pas d'éliminer les cellules capables de produire des virions. Effectivement, des études longitudinales ont démontré que le réservoir diminue si lentement pendant la thérapie qu'il est peu probable qu'il soit complètement éliminé durant la vie de l'individu<sup>70</sup>.



Nature Reviews | Disease Primers

Figure 3. - Le cycle de réplication du VIH et les cibles des antirétroviraux.

Comme observé ci-haut, il y a des antirétroviraux ciblant pratiquement toutes les étapes du cycle de réplication virale. De haut en bas, gauche à droite : Inhibiteurs d'attachement, inhibiteurs de la protéase virale, inhibiteurs de maturation, inhibiteurs des corécepteurs CCR5 et CXCR4, inhibiteurs de fusion, inhibiteurs (non) nucléosidiques de la transcriptase inverse (NRTI et NNRTI) et inhibiteurs de transfert de brin de l'intégrase (INSTI). Image tirée de Deeks, S. et al. (2015) sous l'autorisation de Springer Nature (numéro de licence : 5157770258629)

Le premier antirétroviral approuvé par la FDA contre l'infection par le VIH est l'azidothymidine (AZT), un analogue de nucléotide et un inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse<sup>71</sup>. Malgré sa capacité à inhiber la réplication virale et même de permettre le rétablissement partiel du compte sanguin des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, il était suivi d'une forte

toxicité ainsi que de l'apparition des souches résistantes à celui-ci<sup>72,73</sup>. Effectivement, le fort taux de mutation du VIH lui permet non seulement de s'échapper de la réponse immunitaire, mais également des antirétroviraux.

La monothérapie a été laissée de côté en faveur de la thérapie avec multiples antirétroviraux (deux ou trois à la fois, de différentes classes) à la fin des années 90, ce que l'on nomme thérapie antirétrovirale (*Antiretroviral Therapy*, ART)<sup>74</sup>. La pression sélective de la ART étant trop grande pour la vitesse de mutation du virus, cette thérapie a eu un énorme succès. En effet, la trithérapie permet de diminuer la charge virale à des niveaux indétectables tant et aussi longtemps que le patient maintient l'adhésion au traitement. Il a également été démontré que lorsque la charge virale est indétectable, le virus est non-transmissible, déterminant le début de la campagne U = U (undetectable equals untransmittable). Cette thérapie est considérée l'un des miracles de la médecine du 20<sup>e</sup> siècle, capable de renverser une sentence de mort à une condition très bien contrôlée, donnant aux individus infectés au VIH une qualité de vie presque identique à celle des individus non-infectés, malgré les effets secondaires et le fait qu'il y reste énormément de stigma chez ces individus. La haute efficacité de la trithérapie a permis l'établissement de campagnes épidémiologiques comme la campagne 90-90-90, un objectif qui essaie d'être atteint par tous les pays et détermine que 90% des individus infectés au VIH connaissent leur statut, 90% de ceux qui connaissent leur statut soient sous traitement et 90% de ceux qui sont sous traitement possèdent une charge virale indétectable<sup>1</sup>.

Cela dit, la thérapie ART n'est pas parfaite. En effet, la thérapie ne restaure pas complètement l'immunocompétence des personnes vivant avec le VIH. Aussi, comme décrit plus haut, dès que la thérapie est arrêtée, il y a une remontée de la charge virale. De plus, le risque de mutations permettant à la résistance à l'un ou l'autre antiviral n'est pas impossible. Et finalement, malgré les tentatives d'atténuation des effets secondaires et de la toxicité associée au traitement, ceux-ci sont toujours présents, surtout au fil des années. Ceci sera discuté plus en détail lors du Chapitre 3.

## Chapitre 2 – Relation entre le VIH-1 et les lymphocytes B

Comme décrit dans le Chapitre 1, le VIH infecte certaines cellules qui expriment le récepteur CD4 et les corécepteurs CCR5 et CXCR4. Cependant, les effets de l'infection peuvent être ressentis dans tous les aspects de l'immunité de l'hôte, causant de profondes dérégulations dans plusieurs compartiments du système immunitaire. Ces complications sont la cause de l'immunodéficience induite par le VIH. Dans ce chapitre, nous allons nous pencher plus en détail sur le compartiment des lymphocytes B, ainsi que les impacts de l'infection au VIH sur ceux-ci.

### 2.1 – Introduction au compartiment B

Avec les lymphocytes T, les lymphocytes B composent la deuxième partie du système immunitaire adaptatif, et composent environ 5 à 10% des cellules mononuclées du sang circulant (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) Ces cellules sont reconnues par l'expression de CD19 et CD20 et par l'expression du récepteur des cellules B (*B-cell receptor*, BCR), une immunoglobuline de surface et analogue au TCR chez les lymphocytes T. En bref, ces cellules sont responsables de la production des anticorps et de la réponse humorale. Il y a deux classes de lymphocytes B chez l'humain : les lymphocytes B-1 de nature innée, qui peuvent être sous-divisés en B-1a et B-1b (dont les populations ont été surtout caractérisées chez la souris, et dont l'existence chez l'humain reste controversée) et les lymphocytes B-2, qui peuvent être sous-divisés en lymphocytes B de la zone marginale (MZ), de nature innée, et lymphocytes B folliculaire (FO)<sup>75,76</sup>. Malgré le fait que ces cellules ne sont pas infectées par le VIH, celles-ci sont profondément altérées, comme il sera décrit dans la section 2.7.

Comme pour les lymphocytes T, les lymphocytes B doivent être activés afin d'effectuer leurs fonctions. De façon générale, les lymphocytes B peuvent s'activer soit de façon T-dépendante, soit de façon T-indépendante, dépendamment de la population cellulaire et de l'antigène en jeu.

## 2.2 – Ontogénie des lymphocytes B

Les lymphocytes B commencent leur développement à partir du progéniteur lymphoïde commun (*common lymphoid progenitor*, CLP), dans le foie fœtal (pour les B-1) ou dans la moelle osseuse (pour les B-2). Pendant leur développement et maturation, ces cellules vont passer par des étapes de réarrangement de la chaîne légère et lourde de leurs immunoglobulines, via l'expression des gènes *Recombination-activating gene 1* et *2* (RAG1 et RAG2)<sup>77</sup>. Ce réarrangement est la cause de leur capacité extraordinaire de reconnaître pratiquement n'importe quel antigène existant, de façon similaire à ce qui arrive aux lymphocytes T, à la suite du réarrangement des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de leur *T-cell receptor* (TCR). Les cellules dites pro-B réarrangeront les gènes de leur chaîne lourde, puis les cellules de type pré-B réarrangeront les gènes de leur chaîne légère. À chaque étape de réarrangement, les lymphocytes B passent par une étape de sélection afin de vérifier leur capacité d'auto-réactivité : les cellules qui sont auto-réactives sont éliminées<sup>78</sup>.

Lorsque le réarrangement du BCR des lymphocytes B-2 est fini, ils afficheront en surface l'immunoglobuline de surface IgM et seront nommés lymphocytes B transitoires. Ils peuvent être de type T1 ou T2, dépendamment de certains marqueurs exprimés et de leur capacité à recirculer. Une partie de ces cellules finira sa maturation dans la moelle osseuse, mais la majorité va recevoir des signaux de migration pour compléter leur maturation dans la rate, où celles-ci feront face à son destin cellulaire : soit maturer en lymphocyte B FO ou MZ<sup>78</sup>.

Le choix entre MZ et FO est dépendant d'une balance entre plusieurs signaux différents : l'intensité du signal de liaison du BCR, le signal de liaison de la molécule *B-cell Activation Factor* (BAFF, voir section 2.4) à son récepteur, *BAFF-receptor* (BAFF-R) et le signal de NOTCH2<sup>78</sup>. L'importance de BAFF est dû à l'engagement des voies de transcription *nuclear factor kappa B* NF- $\kappa$ B : l'activation de la voie canonique de NF- $\kappa$ B, engagée par la cascade de signalisation de BAFF-R, semble être importante pour la différenciation en MZ et FO<sup>79</sup>. De façon simplifiée, lorsque les signaux du BCR prédominent par rapport aux signaux du BAFF-R, le choix FO est privilégié. Alternativement, lorsque les signaux du BAFF-R prédominent, le choix MZ est privilégié<sup>78</sup>. Effectivement, l'engagement robuste de la voie du BCR induit une cascade de signalisation dépendante de *Bruton's tyrosine kinase* (BTK). Les signaux de BTK inhibent les signaux de

NOTCH2, une molécule démontrée essentielle pour la génération des MZ, lorsque celle-ci se lie à son ligand *Delta-like 1* (DLL1). Cependant, une absence des signaux du BCR inhibe également la formation des MZ via l'absence de l'expression d'*a disintegrin and metalloproteinase-containing protein 10* (ADAM10), une métalloprotéase importante pour le clivage de NOTCH2, permettant sa translocation vers le noyau<sup>80-83</sup>. Ainsi, un signal plus faible du BCR permet un engagement de la voie NOTCH2 et le choix vers le phénotype MZ, tandis qu'un signal plus puissant du BCR empêche l'engagement de NOTCH2 et ainsi le choix vers le phénotype FO, pendant que les signaux de BAFF-R permettent l'engagement de la voie canonique de NF- $\kappa$ B chez les MZ, et nécessaire pour la survie et maturation des lymphocytes B FO. La Figure 4 ci-dessous résume cette balance de signaux.

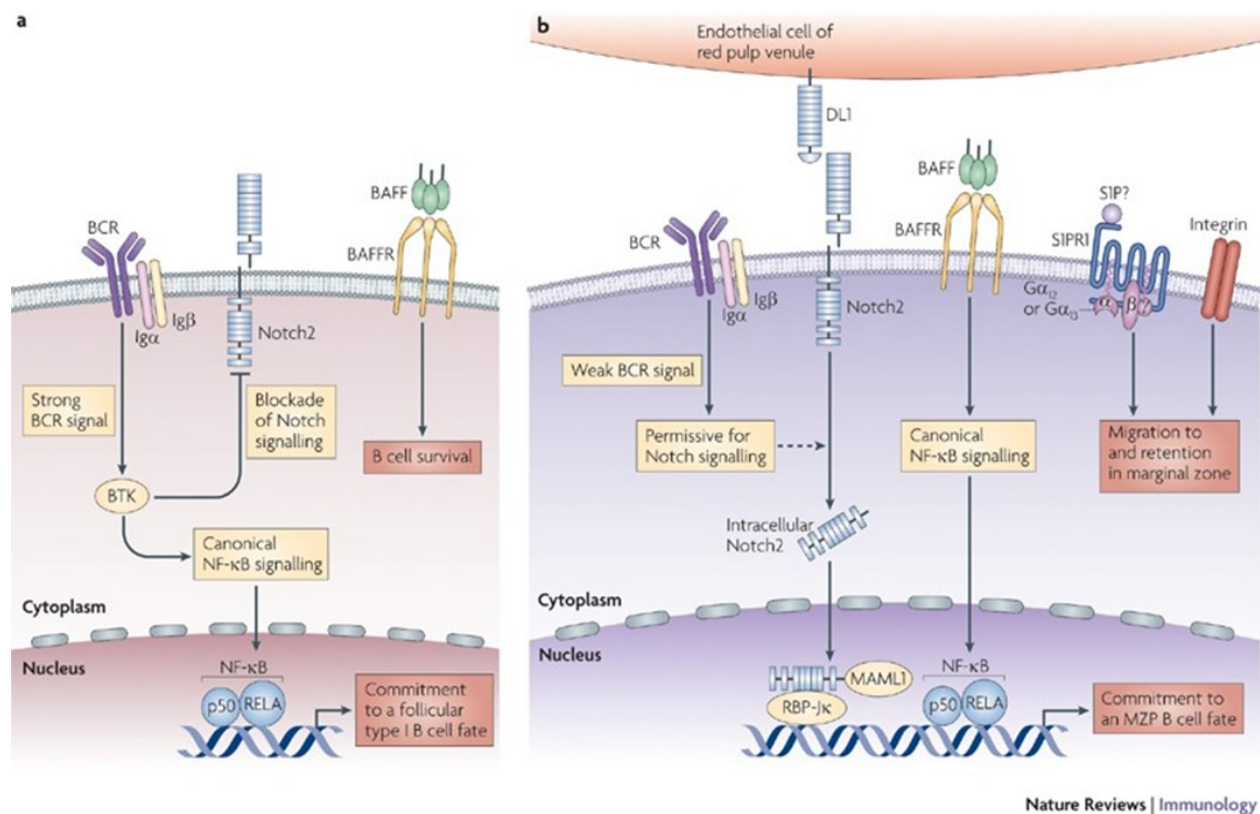


Figure 4. - Les signaux dictant le destin cellulaire des lymphocytes B transitoires

Les lymphocytes B transitoires peuvent se différencier soit en lymphocytes B folliculaires (FO) ou de la zone marginale (MZ). L'intensité des signaux reçus par leur BCR, les signaux de BAFF-R ainsi que les signaux de NOTCH2 déterminent quel phénotype ces cellules choisiront. De façon simplifiée, un fort signal du BCR empêche la cascade de signalisation de NOTCH2, ce qui dirige vers le phénotype FO, alors qu'un faible signal du BCR permet la cascade de signalisation de NOTCH2, ce qui dirige vers un phénotype MZ. Image tirée de Pillai, S., Cariappa, A (2009), sous l'autorisation de Springer Nature (numéro de licence : 5157771346454).

## 2.3 – Les réponses T-dépendantes et T-indépendantes

### 2.3.1 – La réponse T-dépendante

Lors de la réponse T-dépendante, l'activation des lymphocytes B, notamment les lymphocytes B folliculaires, engendre la formation des centres germinatifs dans les organes lymphoïdes secondaires. Dans les centres germinatifs, les lymphocytes B, avec l'aide des cellules dendritiques folliculaires et des lymphocytes T *follicular helper* ( $T_{FH}$ ) vont mûrir davantage, proliférer et devenir des plasmocytes à longue durée de vie, de véritables usines à anticorps, ou des lymphocytes B mémoires, qui possèdent des caractéristiques similaires à celles des lymphocytes T mémoires<sup>84,85</sup>.

Un signal en trois étapes est nécessaire pour la formation des centres germinatifs. Premièrement, un lymphocyte T  $CD4^+$  naïf a reconnu via son TCR l'antigène présenté par une DC et s'est différencié en lymphocyte  $T_{FH}$ , gagnant l'expression de CXCR5 et pouvant migrer vers le gradient de CXCL13, produit dans les follicules B. De façon parallèle, un lymphocyte B a reconnu le même antigène via son BCR, ce qui entraîne sa migration vers la jonction entre les zones T et B grâce à l'augmentation de l'expression de CCR7, ce qui permet à cette cellule de suivre le gradient de CCL21 et CCL19, produits davantage dans la zone T. Cette migration fait en sorte qu'un lymphocyte  $T_{FH}$  et un lymphocyte B réactifs pour le même antigène puissent se rencontrer. L'engagement de la molécule de costimulation des lymphocytes B CD40 par CD40L, exprimé par les lymphocytes activés  $T_{FH}$  ainsi que les signaux des cytokines produites agissent comme le troisième signal permettant la formation des centres germinatifs<sup>84,85</sup>.

Dans les centres germinatifs, les lymphocytes B passeront par deux étapes de maturation de leurs immunoglobulines : la commutation de classe et l'hypermutation somatique. Ces deux processus se produisent grâce à l'expression d'*activation-induced cytidine deaminase* (AID), une enzyme qui n'est exprimée que par les lymphocytes B folliculaires à l'intérieur des centres germinatifs<sup>86</sup>. La commutation de classe est le processus par lequel les lymphocytes B vont modifier la classe des domaines constants des chaînes lourdes de leurs immunoglobulines, afin d'acquérir de meilleures capacités effectrices. Ce processus implique le changement de IgM vers IgG, IgA ou IgE, dépendamment des cytokines environnantes. L'hypermutation somatique est le



processus par lequel les lymphocytes B modifient l'affinité de leurs immunoglobulines via l'insertion de mutations aléatoires dans la région variable de celles-ci. Ceci s'effectue aussi grâce à l'action d'AID<sup>84,85</sup>.

Dans la zone sombre du centre germinatif, les lymphocytes B ayant reçu un signal via CD40, ce qui leur permettra la commutation de classe de leurs immunoglobulines, vont proliférer assidument, ce qui leur permettra de réaliser l'hypermutation somatique. Après quelques rondes de ce processus, ces lymphocytes B quittent la zone sombre et migrent vers la zone claire du centre germinatif, où ils vont entrer en contact avec les cellules dendritiques folliculaires (FDC) portant à leur surface des antigènes complexés. Si l'affinité de leur BCR envers l'antigène est trop faible, à cause des mutations induites, ces cellules ne recevront pas assez de signaux de survie et vont entrer en apoptose. Si leur affinité est élevée, ils pourront entrer en contact et le présenter aux lymphocytes T<sub>FH</sub>, qui ne sont disponibles qu'en faible quantité dans les centres germinatifs. La compétition pour la faible disponibilité des T<sub>FH</sub> assure que seulement les lymphocytes B ayant les immunoglobulines de surface de la plus haute affinité soient sélectionnés, car seulement les cellules ayant réussi à avoir des contacts avec les lymphocytes T recevront des signaux de survie. Après leur sélection, les lymphocytes B peuvent gagner encore la zone sombre afin de continuer à maturer leurs anticorps. À la fin du processus, il y aura une véritable armée de lymphocytes B capables de produire des anticorps à très haute affinité envers leur antigène. La majorité des cellules vont devenir des plasmocytes à longue durée de vie, des cellules qui produiront des anticorps pendant toute leur durée de vie. Une petite partie des cellules quittant les centres germinatifs vont devenir des lymphocytes B mémoires qui, lors d'une rencontre subséquente avec leur antigène pourront générer, de façon très rapide, à nouveau des centres germinatifs et produire des cellules mémoires et plasmocytes<sup>84,85</sup>.

### **2.3.2 – La réponse T-indépendante**

La réponse T-indépendante est la réponse choisie par les lymphocytes B de type « inné », comme les lymphocytes B de type B-1 et les lymphocytes B de la zone marginale<sup>76,87</sup>. Dans cette réponse, ces cellules n'ont pas besoin de l'aide des lymphocytes T ou de la costimulation de CD40 afin de réaliser leurs fonctions effectrices. Ces cellules peuvent cependant avoir l'aide de

populations telles que les DC ou neutrophiles afin d'engendrer ce type de réponse. En effet, dans la réponse T-indépendante, les cellules vont reconnaître directement l'antigène via leur BCR, qui est polyréactif ou via des molécules de l'immunité innée, comme les *Toll-Like Receptors* (TLR) ou des molécules du complément comme CD21. Il y a deux types d'antigènes considérés T-indépendant (TI) : les antigènes TI-1 et les antigènes TI-2. Les antigènes TI-1 activent les lymphocytes B via la liaison conjointe des TLR et du BCR (avec l'aide des signaux des récepteurs de BAFF), tandis que les TI-2 activent les cellules directement via leur BCR. Un exemple d'antigène de type TI-2 sont des polysaccharides, ou d'autres antigènes ayant des épitopes répétés. Ces épitopes répétés peuvent activer les lymphocytes B via l'engagement de plusieurs molécules du BCR de façon concomitante, et ainsi donner assez de signaux pour initier la cascade d'activation du BCR. Différemment de la réponse T-dépendante, la réponse T-indépendante est rapide et surtout extra-folliculaire et n'engendre généralement pas la formation d'une réponse mémoire type, et les plasmocytes qui en sont générés sont des plasmocytes à courte durée de vie et qui produisent souvent des IgM. Néanmoins, la réponse T-indépendante est un élément clé de la réponse immunitaire, permettant à ces cellules d'agir en tant que des combattants de première ligne, en attendant que la réponse T-dépendante puisse se produire (normalement entre 5 à 7 jours avant d'être détectée)<sup>88,89</sup>.

## 2.4 – Le système BAFF/APRIL

Sans doute, l'une des molécules les plus importantes pour les lymphocytes B est BAFF. BAFF (aussi nommé *B lymphocyte Stimulator*, BlyS) est un membre de la superfamille des facteurs de nécrose tumoraux (TNF) encodé par le gène *TNFSF13B*. Cette molécule, de 33 kDa, est un facteur de survie et différenciation des lymphocytes B, capable de pencher la balance entre l'apoptose ou la sélection des lymphocytes B lors de leur maturation dans la moelle osseuse. BAFF possède un analogue, *A Proliferation Inducing Ligand* (APRIL). APRIL, un autre membre de la superfamille des TNF, est encodé par le gène *TNFSF13*. En tant qu'analogues, ces molécules partagent certains récepteurs et rôles, mais peuvent accomplir des fonctions différentes dans l'immunité humorale<sup>90,91</sup>. En effet, alors que BAFF est indispensable pour la maturation des lymphocytes B, des souris déficientes en APRIL possèdent un développement « normal » de leur compartiment B, mise à part des défauts dans la génération des IgA<sup>92,93</sup>.

BAFF et APRIL sont notamment exprimés par les cellules myéloïdes telles que les DC, les monocytes, les macrophages ainsi que par des granulocytes comme les neutrophiles. La modulation des niveaux d'expression de ces molécules varie selon le contexte inflammatoire : l'engagement des *Pattern Recognition Receptors* (PRR) tels que les TLR ou de la réponse interféron par les cellules qui expriment BAFF ou APRIL cause une augmentation de l'expression de ces molécules. Un sous-type de neutrophile produit particulièrement de hauts niveaux de BAFF, les neutrophiles B auxiliaires (*B helpers*, ou N<sub>BH</sub>), et jouent des rôles importants dans la sélection et activation des MZ chez l'humain. Les lymphocytes T auxiliaires et les lymphocytes B activés produisent également BAFF et APRIL. Dernièrement, il a été démontré que d'autres types cellulaires non-hématopoïétiques, comme les cellules adipeuses ou les cellules stromales des organes lymphoïdes secondaires, peuvent exprimer BAFF<sup>87,90,91</sup>.

BAFF et APRIL possèdent plusieurs ligands exprimés à la surface des cellules B, soit BAFF-R, *Transmembrane Activator and Calcium Modulator and Cyclophilin Ligand Interactor* (TACI) et *B-Cell Maturation Antigen* (BCMA). La Figure 5 ci-dessous illustre l'affinité de BAFF et APRIL sur les différents récepteurs ainsi que les effets de leur liaison. La signalisation via BAFF-R donne aux cellules immatures des signaux de survie, parfois si puissants qu'ils peuvent aller à l'encontre des signaux d'apoptose médiés lors de la sélection positive des lymphocytes B, permettant la survie des cellules autoréactives. La signalisation via TACI, quant à elle, mène à des réponses T-indépendantes, comme l'activation des lymphocytes B et la commutation de classe. Et finalement, la signalisation via BCMA a été démontrée importante pour la survie des plasmocytes<sup>90,91,94</sup>.

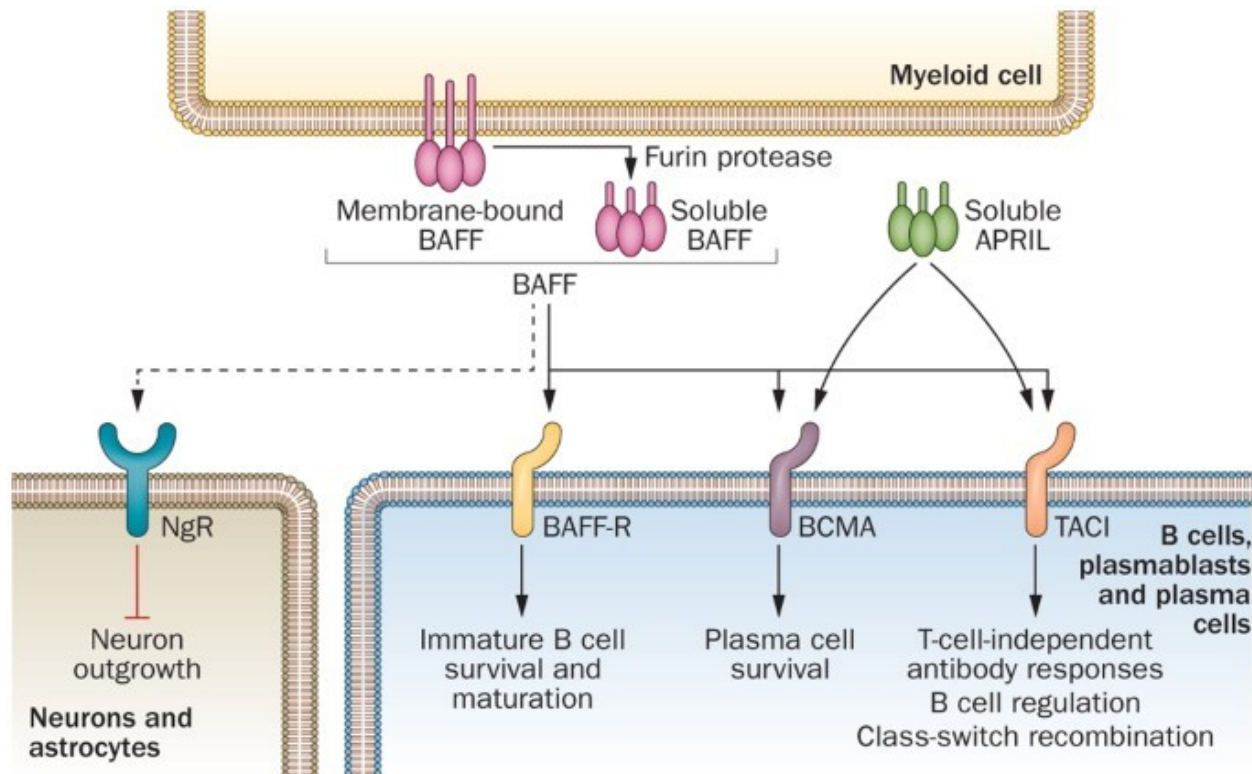


Figure 5. - Le système BAFF/APRIL

Le système BAFF et APRIL possède deux ligands, soit BAFF et APRIL, ainsi que trois récepteurs différents, soit BAFF-R, TACI et BCMA. BAFF est capable de se lier aux trois récepteurs, tandis qu'APRIL ne se lie que sur TACI et BCMA. Photo tirée de Vincent, F., Morand, E., Schneider, P. et al. (2014), sous l'autorisation de Springer Nature (numéro de licence : 5157771454685)

BAFF est une molécule membranaire trimérique. Cependant, celle-ci possède un consensus dans sa séquence peptidique la permettant d'être clivée par des furines protéases. Ainsi, BAFF peut être à la fois sous forme membranaire ou soluble. BAFF peut se retrouver non seulement en trimères dans sa forme soluble, mais il peut se complexer avec vingt autres molécules de BAFF afin de former un 60-mère, une immense structure représentant une capsid. APRIL, en revanche, n'est retrouvé que sous forme soluble canoniquement, et doit se complexer avec des *heparan sulphate proteoglycan* (HSPG) sur la cellule-cible avant de se lier à ses récepteurs. Une version membranaire d'APRIL nommée TWE-PRIL a été retrouvée. À la différence d'APRIL canonique, celle-ci est formée via le *trans-épissage* entre les ARN messagers d'APRIL et *TNF-related weak inducer of apoptosis* (TWEAK, ou *TNFSF12*), résultant en une molécule chimérique possédant le domaine de liaison d'APRIL en entier et dont le rôle physiologique n'est pas très bien élucidé<sup>90,91,95,96</sup>.

Comme pour la plupart des molécules de la famille des TNF, l'engagement des récepteurs de cette famille engendre le recrutement des molécules de la famille des *TNF receptor-associated factors* (TRAF). Chacune des formes de BAFF active une voie de signalisation différente : BAFF trimérique, lorsqu'il se lie à BAFF-R, active la voie non-canonique de NF- $\kappa$ B via la dégradation de TRAF3 à la suite de son recrutement, ce qui permet d'enlever l'inhibition que cette dernière cause sur les molécules impliquées dans cette voie. Le 60-mère, cependant, active la voie canonique de NF- $\kappa$ B via le recrutement de TRAF2 ou TRAF6 lors de sa liaison à TACI<sup>91</sup>. De plus, BAFF permet l'engagement de la voie AKT et *mechanistic target of rapamycin* (mTOR), important pour les signaux de survie nécessaires pour la sélection des lymphocytes B<sup>91,97</sup>.

BAFF et APRIL sont généralement retrouvés en homotrimères, mais dans des conditions physiologiques, il a été démontré que les monomères de BAFF et APRIL peuvent se complexer pour former des hétérotrimères (par exemple, un trimère BAFF-BAFF-APRIL ou BAFF-APRIL-APRIL). Ces hétérotrimères possèdent des affinités différentes pour les récepteurs du système BAFF/APRIL, dépendamment de leur composition, et il a été estimé qu'ils jouent des rôles différents dans l'immunité. Cependant, ceux-ci ne sont pas bien connus étant donné la difficulté d'étudier ces variants<sup>90,91,96,98</sup>.

## **2.5 – Les lymphocytes B de la zone marginale (MZ)**

### **2.5.1 – Caractéristiques et fonctions des MZ**

Les lymphocytes B de la zone marginale composent une mineure partie des lymphocytes B de type B-2. Comme décrit ci-haut, ils sont des lymphocytes B de type inné qui répondent à des antigènes T-indépendants. Ces cellules expriment des BCR polyréactifs, permettant de reconnaître plusieurs types de pathogènes, comme des bactéries encapsulées, et expriment fortement plusieurs types de PRR tels les TLR et lectines de type-C, de façon similaire aux cellules dendritiques et aux monocytes<sup>87,99</sup>.

Principalement caractérisées chez la souris, chez l'humain, ces cellules expriment certains marqueurs de surface qui les diffèrent des lymphocytes B FO. Ces cellules sont caractérisées par une forte expression de CD1c, IgM et CD21, une faible expression d'IgD et une faible expression

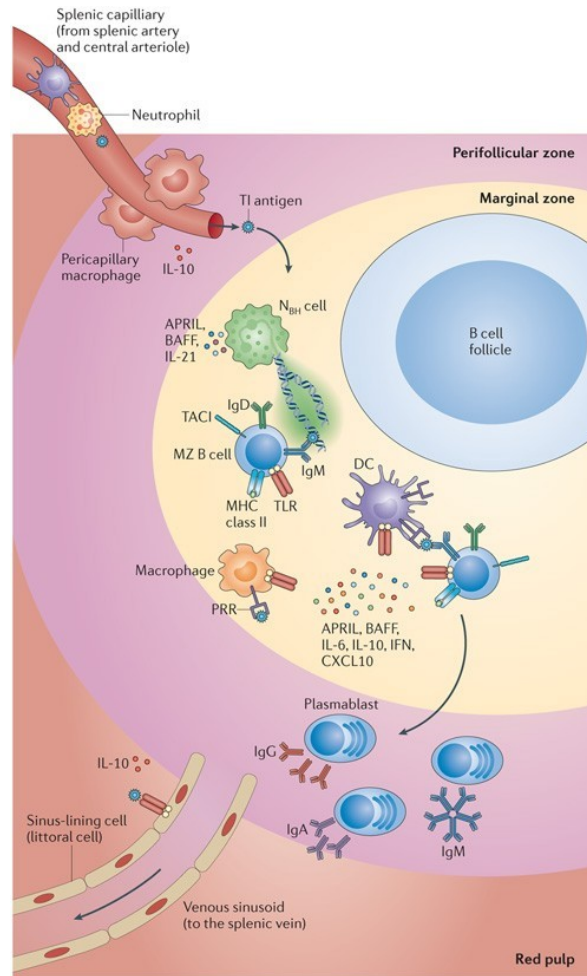
transitoire de CD23. De façon intéressante, les lymphocytes B MZ humains expriment le marqueur de lymphocyte B mémoire CD27, malgré le fait que celles-ci ne possèdent pas toutes les caractéristiques de lymphocytes B mémoires (les MZ possèdent certaines caractéristiques de cellules « antigen experienced ») et ne partagent pas la même origine, ce qui souligne l'importance d'utiliser plusieurs marqueurs pour caractériser des populations de lymphocytes B<sup>87,99-101</sup>.

Ces cellules sont généralement localisées dans la zone marginale, une région de la rate à l'interface de la pulpe rouge et la pulpe blanche. Chez la souris, ces cellules sont confinées à cet endroit, alors que chez l'humain, elles sont non seulement retrouvées dans la rate, mais celles-ci sont également localisées dans le sinus subcapsulaire des ganglions lymphatiques, dans les amygdales et dans le GALT, notamment dans les plaques de Peyer. De plus, ces cellules peuvent être également retrouvées dans la circulation sanguine chez l'humain. À cet effet, il semblerait que les MZ circulants et les MZ dans les organes lymphoïdes secondaires sont la même population chez l'humain, possédant le même phénotype et accomplissant les mêmes rôles<sup>87,102</sup>.

La zone marginale est localisée dans un endroit stratégique dans la rate (voir Figure 6). Chez la souris, elle reste à l'intersection de la pulpe blanche et la pulpe rouge, comme décrit ci-haut. Chez l'humain, la zone marginale reste toujours proche de la pulpe rouge, mais celle-ci est surtout présente au pourtour des centres germinatifs, à l'encontre de la zone T et des follicules B. En restant à proximité de la pulpe rouge (par où le sang circule dans la rate), les cellules de la zone marginale, comme des macrophages ou des cellules dendritiques, peuvent agir en tant que sentinelles, pouvant interagir avec des antigènes circulant dans le sang. Ces cellules peuvent donc capturer ces antigènes via les récepteurs de l'immunité innée, des lectines de surface ou autres, ce qui leur permet de présenter l'antigène entier aux lymphocytes B MZ et de les activer, via la production de BAFF et APRIL. En effet, BAFF, tel que mentionné précédemment (voir section 2.2 et 2.4), et APRIL sont spécialement importants pour les MZ : ces cellules expriment des hauts niveaux de TACI, dont l'expression augmente davantage à la suite de l'engagement des TLR, et cette liaison agit en tant que molécule de costimulation. Les neutrophiles dits B-auxiliaires sont particulièrement importants pour l'activation des MZ. En utilisant leurs *neutrophil extracellular traps* (NET), ils peuvent capturer des antigènes et les présenter aux MZ. De plus, leur forte

expression de BAFF, APRIL et *Interleukine-21* (IL-21) contribue à l'activation de ces dernières<sup>87,99,100,103,104</sup>.

Il est à noter que chez l'humain, les MZ peuvent reconnaître leurs antigènes via les DC ou d'autres cellules présentatrices d'antigène (CPA), ou directement, leur permettant soit de s'activer, soit de les présenter aux lymphocytes T via leur migration vers la zone T des organes lymphoïdes secondaires grâce à leur expression des molécules du CMH de classe II<sup>87,99</sup>. De façon intéressante, les MZ expriment fortement CD1c et CD1a chez l'humain ainsi que CD1d chez la souris. L'expression de ces molécules est d'intérêt, car ce récepteur est une molécule du CMH de classe I atypique, permettant la présentation de molécules lipidiques à des cellules telles que les *invariant natural killer T cells* (iNKT), une sous-classe de cellule lymphoïde innée ayant une chaîne de leur TCR fixe et qui reconnaît spécifiquement des lipides<sup>105</sup>. Chez la souris, l'interaction CD1d-dépendante des lymphocytes B CD19<sup>+</sup> CD1d<sup>+</sup> CD21<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup> CD23<sup>+</sup> (nommés T2-MZP et considérés comme lymphocytes B régulateurs, voir section 2.6) est essentielle pour la maintenance et génération des iNKT ayant des fonctions suppressives, et les iNKT peuvent donner des signaux d'activation aux MZ via CD40<sup>87,106,107-109</sup>.



Nature Reviews | Immunology

Figure 6. - La zone marginale de la rate humaine

La zone marginale humaine est la zone localisée au pourtour des centres germinatifs, entre les follicules B et la zone T (la zone en jaune), proche de l'intersection entre la pulpe rouge et la pulpe blanche. Dans la zone marginale, les lymphocytes B de la zone marginale (MZ) peuvent reconnaître des pathogènes provenant du sang, s'activer et devenir des plasmablastes à courte durée de vie afin de répondre rapidement à l'infection. Photo tirée de Cerutti, A., Cols, M. & Puga, I. (2013), sous l'autorisation de Springer Nature (numéro de licence : 5157780043449)

Une autre particularité des MZ est la capacité de lier les complexes immuns et molécules opsonisées par le système du complément. En effet, ces cellules expriment à leur surface des récepteurs pour la partie Fc des anticorps comme CD32 et des récepteurs du complément, comme CD21 et CD35, ce qui leur permet de se lier à ceux-ci et de les délivrer aux lymphocytes T dans la zone T et lymphocytes B folliculaires dans les follicules B afin de les activer. De plus, les MZ pourraient délivrer ces mêmes complexes immuns aux FDC, ce qui contribue à la formation des centres germinatifs et au développement de la réponse T-dépendante. Leur emplacement au pourtour de ceux-ci supporte cette notion<sup>87,99,110-112</sup>.



Une fois activés, les MZ vont rapidement se différencier en plasmablastes à courte durée de vie et sécréter de grandes quantités d'IgM, permettant une réponse rapide contre les pathogènes. Cependant, ces cellules ne sont pas confinées à sécréter seulement des IgM. Effectivement, et surtout chez l'humain, celles-ci peuvent réaliser la commutation de classe et un certain niveau d'hypermutation somatique de façon indépendante des centres germinatifs, grâce à la signalisation via entre autres, des TLR, de la liaison de BAFF à TACI et à des interactions avec d'autres populations cellulaires comme les iNKT, les cellules dendritiques et les N<sub>BH</sub>. Ainsi, les MZ peuvent commuter de classe vers des IgG ou des IgA. Cependant, il demeure que ces cellules produisent des anticorps de plus faible affinité lorsque comparés avec ceux produits par des cellules qui ont subi le processus de maturation d'affinité dans les centres germinatifs<sup>87,103,113-117</sup>.

### **2.5.2 – Les lymphocytes B de la zone marginale « Precursor-like » (MZp)**

Notre équipe de recherche a caractérisé une sous-population de lymphocyte B de la zone marginale qui exprime à la fois des marqueurs de lymphocyte B transitionnel immature et de lymphocytes B MZ, qui pourrait s'apparenter à des populations semblables dites « précurseurs des MZ »<sup>118,119</sup> et que nous nommerons dans ce travail MZ « precursor-like » (MZp)<sup>120-123</sup>. Les MZp ne composent qu'une partie mineure des MZ, mais nous avons démontré que cette population est capable d'engendrer une puissante fonction régulatrice (similaire à d'autres populations dites régulatrices retrouvées chez la souris, comme les T2-MZP décrits plus haut), leur conférant la fonction de lymphocytes B régulateurs<sup>123</sup>. Nos études se sont consacrées surtout dans leur dérégulation dans le contexte du VIH, ce qui sera expliqué plus en détail dans la section 2.7. Le Tableau 1 ci-dessous illustre les similarités et différences entre les MZ et les MZp au niveau de leurs marqueurs de surface que nous utilisons afin de les distinguer, basés sur des études d'autres groupes travaillant sur des populations similaires à celles-ci.

Marqueur	Fonction	MZ	MZp	FO
CD19	Corécepteur du BCR	+	+	+
IgM	Immunoglobuline de surface	++	++	+/-
CD1c	Présentation des lipides	+	+	-
CD10	Marqueur d'immaturité; métalloprotéase	-	+	-
CD21	Récepteur du complément	Hi	Lo	Lo/-
CD27	Marqueur de cellule mémoire	+	+	-/+
IgD	Immunoglobuline de surface	Lo	Lo	+ / ++
CD23	Récepteur de la partie Fc des anticorps de type IgE	Lo/-	Lo/-	+

Tableau 1. – Les marqueurs de surface des lymphocytes B de la zone marginale (MZ), de leurs précurseurs (MZp) et des lymphocytes B folliculaires (FO)

## 2.6 – Les lymphocytes B régulateurs (Breg)

### 2.6.1 – Définition

Les lymphocytes B régulateurs, ou Bregs, sont des cellules ayant des rôles immunomodulateurs et immunosuppresseurs, de façon similaire aux lymphocytes T régulateurs (Tregs). Ces cellules ont premièrement été décrites chez la souris comme des lymphocytes B dits B10, car ils produisaient la cytokine anti-inflammatoire IL-10. Cependant, cette définition ne s'est pas avérée, car la plupart des lymphocytes B peuvent sécréter de l'IL-10, dépendamment du contexte inflammatoire. Différemment des Tregs, où l'expression du facteur de transcription *Forkhead Box P3* (FoxP3) est un marqueur classique de cette population, il n'y a pas de marqueur décrit dans la littérature qui englobe toutes les populations dites Breg. Ainsi, il est difficile de faire une étude globale sur les Bregs, et la majorité des auteurs se consacrent à une population précise<sup>118,119</sup>.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés surtout aux MZp comme population Breg. Comme décrit ci-haut, ce sont des cellules CD19<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> CD1c<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> CD10<sup>+</sup> CD21<sup>lo</sup>. Celles-ci expriment plusieurs molécules d'intérêt pour leur fonction régulatrice, possédant ainsi un potentiel et une fonction Breg (voir Annexe 1). Certaines molécules ayant plus d'intérêt pour ce travail seront décrites ci-dessous, notamment les molécules de la famille des NR4A, CD83, CD39 et CD73, des molécules dont l'expression protéique a été confirmée chez cette population par le

passé. Cependant, en tant que Breg, les MZp expriment plusieurs autres molécules immunorégulatrices associées à des populations et fonctions Breg, comme IL-10, *Transforming Growth Factor beta* (TGF- $\beta$ ), IL-35, TLR10, HLA-G, *Programmed Death Ligand 1* (PD-L1) parmi d'autres (voir Annexe 1)<sup>123-126</sup>.

## 2.6.2 – Les facteurs de transcription NR4A

Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription qui doivent se lier à des petites molécules nommées ligands endogènes avant d'effectuer un changement conformationnel permettant leur liaison à l'ADN et ainsi l'activation de leur programme transcriptionnel. Les facteurs de transcription de la famille des récepteurs nucléaires de la sous-famille 4 groupe A (*nuclear receptors subfamily 4 group A*, NR4A) sont des récepteurs nucléaires dits orphelins, puisque leur ligand endogène n'est pas connu. Cependant, il semblerait que les molécules de cette famille n'ont pas besoin d'un ligand endogène pour s'activer, car leur conformation naturelle est une conformation constitutivement active<sup>127,128</sup>.

Il y a trois facteurs de transcription connus dans cette famille : NR4A1 (*Nuclear hormone receptor NUR/77*, ou Nur77), NR4A2 (*Nuclear receptor related-1 protein*, Nurr1) et NR4A3 (*neuron-derived orphan receptor 1*, NOR-1), tous les trois ayant une certaine homologie et des rôles redondants. Globalement, ces facteurs de transcription se lient aux consensus *Nerve Growth Factor-induced clone B-responsive element* (NRBE) de séquence AAAGGTCA s'ils sont en monomère, ou aux *Nur-responsive element* (NurRE), composés de répétitions de la séquence AAAT(G/A)(C/T)CA, s'ils sont en homodimères. Ces facteurs de transcription sont exprimés dans quasiment tous les tissus et leur expression est fondamentale pour le bon développement de l'organisme<sup>128</sup>.

Ces molécules sont impliquées dans une grande variété de processus importants dans le système immunitaire, et sont globalement impliquées dans des réponses anti-inflammatoires et dans des réponses apoptotiques à la suite de l'expansion clonale<sup>129</sup>. Par exemple, l'expression des NR4A est fondamentale pour l'expression de FoxP3 chez les Tregs : une délétion spécifique des membres de cette famille chez les lymphocytes T abolit complètement la génération de cette population cellulaire et engendre le développement de manifestations autoimmunes chez la

souris<sup>130-132</sup>. De plus, les NR4A voient une augmentation de leur expression à la suite de l'engagement par le TCR, et ceux-ci sont impliqués dans des voies d'apoptose. En effet, la délétion de ces facteurs induit la perte de la délétion clonale des lymphocytes T activés. Il semblerait ainsi que ces facteurs de transcription sont impliqués dans la maintenance de l'homéostasie immunitaire et dans le contrôle de l'autoimmunité<sup>133-136</sup>.

Ces facteurs sont également impliqués dans la maturation des monocytes et dans la différenciation et formation des MoDC dans des contextes inflammatoires chez la souris. Par exemple, une délétion spécifique de NR4A3 empêche leur formation à la suite d'une infection bactérienne, induisant leur différenciation en macrophages à la place. De plus, une augmentation de NR4A1 est nécessaire pour la maturation des monocytes classiques (soit les monocytes CD14<sup>++</sup> CD16<sup>-</sup>) envers le phénotype non-classique (les monocytes CD14<sup>lo</sup> CD16<sup>++</sup>)<sup>137,138</sup>.

Récemment, le rôle des NR4A dans l'épuisement des lymphocytes T a été démontré. Ces molécules sont hautement exprimées dans des lymphocytes T ayant des phénotypes d'épuisement, ouvrant la chromatine des gènes encodant pour les protéines de point de contrôle immunitaire, comme *Programmed Death-1* (PD-1) et *T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 3* (TIM3), tout en fermant la chromatine des gènes ayant des séquences reconnues par NF-κB. La participation de ces facteurs de transcription dans le phénotype d'épuisement démontre davantage leur importance dans les étapes de contraction de la réponse immunitaire<sup>139-142</sup>.

Les NR4A voient une augmentation rapide de leur expression à la suite de l'engagement de la cascade de signalisation du BCR, ce qui est consistant avec leur caractérisation en tant que gènes précoces. Cette augmentation est importante afin de contrôler l'activation des lymphocytes B en absence d'un deuxième signal, ce qui pourrait engendrer une réponse en absence d'un contexte inflammatoire adéquat et possiblement de l'autoimmunité. En ce sens, il a été démontré qu'une délétion de NR4A1 provoque une augmentation des niveaux sériques des anticorps et une augmentation des lymphocytes B activés et des lymphocytes B mémoires, alors que des lymphocytes B autoréactifs démontrent une augmentation de l'expression des NR4A et

ainsi une survie réduite dans la périphérie (dans un contexte de compétition pour BAFF, et donc de baisse de signaux de survie fournis par cette molécule)<sup>143,144</sup>.

Notre analyse transcriptomique des MZp sanguins a démontré que ces cellules expriment très fortement les NR4A1, NR4A2 et NR4A3. De plus, que ce soit dans les amygdales ou dans le sang, ces cellules les expriment plus fortement que les lymphocytes B totaux et les MZ matures, illustrant ainsi leur potentiel régulateur (voir Annexe 1)<sup>123</sup>.

### **2.6.3 – La molécule régulatrice CD83**

CD83 est une molécule de la superfamille des immunoglobulines d'environ 45 kDa, encodée par le gène du même nom et dont le promoteur est sous le contrôle des NR4A<sup>145</sup>. Comme d'autres membres de la famille B7, il a été démontré que CD83 peut former des homodimères, mais une interaction physiologique n'a pas encore été démontrée. De plus, sa structure (analysée par cristallographie) a illustré le potentiel de liaison à d'autres ligands, qui à ce jour demeurent inconnus. Ainsi, il semblerait que CD83 effectue ses fonctions via des interactions homotypiques<sup>146</sup>.

CD83 peut se retrouver sous une forme membranaire ou soluble et est considéré comme un marqueur d'activation de plusieurs populations immunitaires, comme les cellules dendritiques, les Treg et même les lymphocytes B (chez qui cette molécule a été premièrement décrite). Tandis que CD83 membranaire semble jouer un rôle d'activation et maturation des cellules immunitaires, CD83 soluble semble plutôt jouer un rôle immunosuppresseur<sup>146</sup>.

CD83 soluble a été démontré comme un inhibiteur de la différenciation des monocytes en DC, de la maturation des DC et de la prolifération et activation des lymphocytes T médié par les DC. De plus, l'expression de CD83 par les cellules dendritiques a été démontrée fondamentale pour le maintien de l'homéostasie mucoale et pour le contrôle de l'immunité dirigée contre le soi et le non-soi<sup>147-150</sup>. En effet, des cellules dendritiques dites tolérogéniques (capables d'engendrer une tolérance envers le soi) ainsi que la production d'*Indoleamine 2-3 dioxygenase 1* (IDO-1) et la génération des Tregs sont induites via l'action de CD83 soluble, illustrant ainsi le

potentiel anti-inflammatoire de cette molécule<sup>151-154</sup>. De plus, l'expression de CD83 s'est avérée essentielle pour la maintenance des Tregs<sup>154</sup>.

De façon intéressante, l'administration de CD83 soluble a été étudiée récemment dans le contrôle de certaines manifestations autoimmunes dans des modèles murins d'autoimmunité<sup>155-157</sup>. En revanche, de hauts niveaux de CD83 soluble ont également été associés à des manifestations autoimmunes chez l'humain, ce qui indique qu'une meilleure compréhension des mécanismes d'action de cette molécule se fait nécessaire<sup>158-160</sup>.

L'expression de CD83 est directement induite par les NR4A, notamment NR4A1<sup>145</sup>. En accord avec cette notion, nous avons démontré que l'expression de CD83 est la plus élevée chez les MZp par rapport aux MZ et aux lymphocytes B totaux, tout comme NR4A1 et NR4A3. De plus, nous avons démontré que, chez des sujets non-infectés, les MZp possèdent une fonction Breg dépendante de CD83 : l'administration d'un anticorps anti-CD83 empêche le contrôle de la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> *in vitro* (voir Annexe 1)<sup>123</sup>.

#### **2.6.4 – Les ectonucléotidases CD39 et CD73**

CD39 (*ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1*, ou ENTPD1) et CD73 (*ecto-5'-nucleotidase*, ou NT5E) sont deux enzymes impliquées dans la voie de l'adénosine. Dans cette voie, CD39 va hydrolyser l'ATP extracellulaire (généralement présent dans ce milieu via la mort cellulaire) en AMP, et celui-ci va être hydrolysé à son tour en adénosine (ADO) par CD73. L'adénosine peut, par la suite, être convertie davantage en inosine ou agir directement sur les cellules<sup>161</sup>. Différemment de l'ATP, qui est une molécule pro-inflammatoire (notamment via l'activation des voies comme l'inflammasome médié par *NOD*-, *LRR*-, and *pyrin domain-containing protein 3*, NLRP3), l'adénosine est une molécule anti-inflammatoire. Ainsi, l'action de CD39 et CD73 permet la conversion d'un milieu immunostimulateur (généré par la présence de l'ATP extracellulaire) vers un milieu immunosuppresseur, soit par la consommation de l'ATP, soit par la liaison de l'ADO à ses récepteurs. L'expression de CD39 (notamment CD39<sup>hi</sup>) et CD73 a été associée à plusieurs populations régulatrices telles que les Tregs, des cellules dendritiques et même certaines populations Bregs, dont les MZp<sup>123,162-165</sup>.

L'adénosine peut se lier à plusieurs récepteurs, comme les récepteurs purinergiques de type 1, soit A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> et A<sub>3</sub>. Ces récepteurs sont des récepteurs couplés à la protéine G exprimés à la surface de plusieurs types cellulaires. Les récepteurs A<sub>2A</sub> et A<sub>2B</sub> sont les récepteurs impliqués dans l'action immunosuppressive de l'adénosine. La majorité des cellules immunitaires exprime le récepteur A<sub>2A</sub>, tandis que le récepteur A<sub>2B</sub> est exprimé surtout par des cellules myéloïdes<sup>161</sup>.

Une fois que l'adénosine est générée, celle-ci peut soit se lier directement aux récepteurs purinergiques, soit être convertie davantage en inosine et après se lier à ces récepteurs. La liaison aux récepteurs A<sub>2A</sub> et A<sub>2B</sub> active l'adénylate cyclase, permettant la conversion de l'ATP intracellulaire en AMP cyclique, une molécule démontrée importante pour supprimer la réponse immunitaire via l'activation de la voie de signalisation impliquant la *Protein Kinase A* (PKA), qui à son tour va inhiber les cascades de signalisation NF- $\kappa$ B et *Janus Kinase* (JAK)-STAT, des voies importantes pour les réponses inflammatoires<sup>161</sup>.

Ces récepteurs peuvent également activer des cascades de signalisation indépendantes de l'AMP cyclique, comme la cascade de signalisation impliquant *phosphatidylinositol 3 kinase* (PI3K) et les molécules en aval AKT et mTOR, composant la cascade PI3K/AKT/mTOR, importante pour la survie cellulaire dans des situations de stress<sup>161</sup>. De façon intéressante, les lymphocytes B de la zone marginale ont été démontrés enrichis pour l'expression de la voie mTOR : celle-ci a été démontrée importante pour l'état pré-activé (ou « antigen experienced ») des MZ humains. À cet effet, l'expression de TACI a été corrélée avec une activation accrue de mTOR, et l'interaction de ce dernier avec la cascade de signalisation des TLR confère aux MZ un seuil d'activation plus bas comparativement à celui des B FO, leur permettant de produire rapidement des anticorps, en accord avec la notion que ces cellules sont des cellules de première ligne<sup>166</sup>.

Chez les lymphocytes B FO, la liaison de l'adénosine au récepteur A<sub>2A</sub> inhibe la formation des centres germinatifs, bloque la signalisation du BCR et des voies TLR, et agit contre les signaux de survie de ces cellules via la suppression de la voie NF- $\kappa$ B par une voie dépendante de l'AMP cyclique<sup>161,167</sup>. De plus, la liaison de l'ADO à A<sub>2A</sub> promeut l'expression des NR4A et chez les lymphocytes T, la liaison de l'ADO à ses récepteurs induit la génération des Tregs (possiblement

via la promotion de ces facteurs de transcription), qui vont à leur tour exprimer CD39 et CD73<sup>168-170</sup>. De plus, la signalisation via A<sub>2A</sub> par les Treg augmente l'expression de molécules immunosuppressives telles qu'IL-10 et TGF-β<sup>165</sup>. De façon importante, l'accumulation de l'AMP cyclique permet d'induire l'expression de *cyclic AMP (cAMP) response element binding protein* (CREB), un facteur de transcription qui induit l'expression des NR4A et des molécules telles l'IL-10. Ainsi, l'expression de CD39 et CD73 par les MZp est un autre indice de leur fonction régulatrice. La Figure 7 ci-dessous résume la cascade de signalisation activée par la voie de l'adénosine.

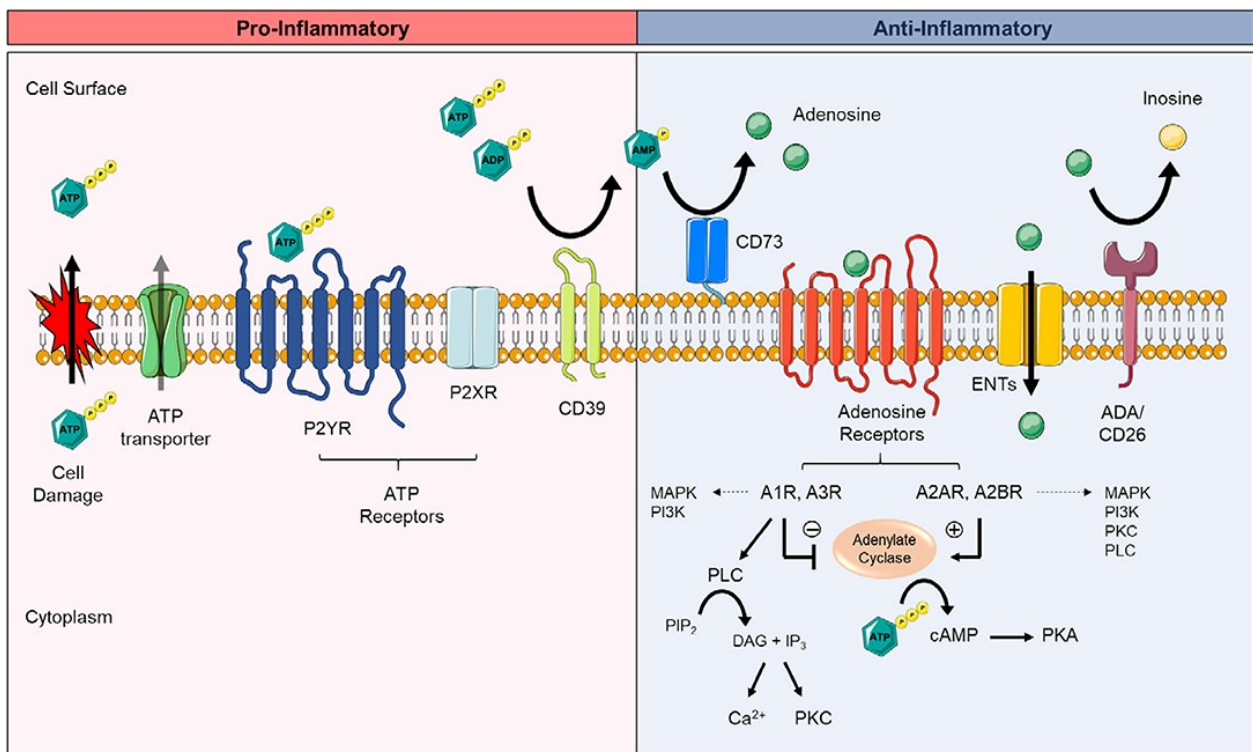


Figure 7 – La voie de l'adénosine

La voie de l'adénosine implique deux ectonucléotidases, soit CD39 et CD73. Cette première verra la conversion de l'ATP extracellulaire (pro-inflammatoire) en ADP et AMP, et CD73 verra la conversion de l'AMP en ADO (anti-inflammatoire). L'ADO, par la suite, pourra être lié par les récepteurs purinergiques A<sub>2A</sub> ou A<sub>2B</sub>, ce qui induira l'expression de l'adénylate cyclase, permettant la conversion de l'ATP cytoplasmique en AMP cyclique. Finalement, l'AMP cyclique induira l'expression de molécules telles la PKA, la voie PI3K/AKT/mTOR, parmi d'autres. Image tirée de Harvey, J. B., Phan, L. H., Villarreal, O. E. et Bowser, J. L. (2020) sous la permission de Creative Commons Attribution Licence 4.0 International (CC BY).

## 2.7 – La dérégulation des lymphocytes B par le VIH

Malgré le fait que les lymphocytes B ne soient pas infectés par le VIH *in vivo* (il y a des évidences pour l'infection *in vitro*), faute de l'expression des récepteurs nécessaires, ils sont



profondément affectés par le contexte de l'infection par ce virus ainsi que par l'inflammation chronique qu'il engendre<sup>171</sup>.

C'était en 1983 que la première étude décrivant la dérégulation du compartiment B chez des individus atteints du sida avait été décrite, démontrant une hyperactivation de ces cellules et la production d'autoanticorps<sup>172</sup>. Par la suite, plusieurs autres études ont démontré que la dérégulation de ce compartiment se fait à plusieurs niveaux, pouvant comporter des manifestations de type autoimmun retrouvées dans des polyarthrites rhumatoïdes, telles que le lupus érythémateux disséminé, le syndrome de Sjögren, l'arthrite rhumatoïde, parmi d'autres<sup>171</sup>.

Il est important de noter que la majorité des dérégulations dans le compartiment B décrites ci-bas sont généralement des dérégulations présentes chez les individus non-traités. En effet, les individus traités voient une excellente réponse humorale, notamment si ceux-ci sont traités dès le début de l'infection. Néanmoins, certaines dérégulations peuvent être encore retrouvées chez des individus traités, comme ce sera discuté dans les prochaines sections.

### **2.7.1 – L'excès de BAFF**

En 2002, les niveaux de BAFF sanguins chez des individus infectés au VIH ont été mesurés pour la première fois, démontrant qu'ils sont augmentés dans le contexte du VIH et qu'ils corrélaient avec la présence des autoanticorps circulants<sup>173</sup>, ce qui avait été décrit dans des contextes de maladies autoimmunes<sup>174,175</sup>. Par la suite, plusieurs équipes, y compris la nôtre, sont arrivées à la même conclusion. En effet, nous avons démontré dans plusieurs cohortes qu'il y avait une augmentation des niveaux de BAFF sanguins, solubles et membranaires, dans le contexte du VIH, et que ceci était observé dès la primo-infection et jusqu'à 1 an de thérapie<sup>120,176-178</sup>. Cette augmentation des niveaux de BAFF a également été observée chez des macaques infectés au virus de l'immunodéficience simien (SIV), un virus appartenant à la famille du VIH et un modèle pour son étude<sup>179,180</sup>. De plus, nous avons initialement réalisé ces mêmes observations dans un modèle de souris HIV-transgéniques dépendantes de Nef (voir section 2.7.5). De façon intéressante, les souris BAFF transgéniques ont démontré le même phénotype d'autoimmunité<sup>181,182</sup>.

L'excès de BAFF dans le contexte du VIH corréla avec l'inflammation chronique persistante chez les individus infectés. Celui-ci est engendré par un ensemble de facteurs viraux et non-viraux.

Par exemple, notre groupe a démontré que la protéine Nef du VIH est capable de moduler l'expression de BAFF chez les cellules dendritiques dérivées des monocytes (MoDC)<sup>176</sup>. D'autres groupes ont également démontré que la glycoprotéine gp120 module l'expression de BAFF chez les monocytes<sup>183</sup>. En ce qui concerne les facteurs non-viraux, la translocation microbienne (comme la présence de LPS dans le sang) a été démontrée capable d'induire la production de BAFF chez les MoDC<sup>176</sup>. De plus, le contexte inflammatoire de l'infection par le VIH en soi peut également contribuer : des cytokines comme IFN- $\alpha$ , produites naturellement lors d'une infection virale (y compris l'infection par le VIH), ainsi que l'engagement des TLR, peuvent moduler l'expression de BAFF<sup>184-186</sup>. De façon intéressante, certains types de lymphocytes B activés peuvent produire BAFF suite à l'engagement des TLR<sup>185</sup>.

### **2.7.2 – Bris de la tolérance**

Tel qu'exprimé à l'aide du modèle de souris BAFF-Tg introduit plus haut, l'excès de BAFF engendre plusieurs conséquences dans l'homéostasie du compartiment B, dont la perte de la tolérance du soi de ce compartiment<sup>187</sup>. En effet, les populations de cellules B deviennent dépendantes de BAFF lorsqu'il est en excès et peuvent échapper aux mécanismes de sélection et survivre en périphérie, donnant lieu à la survie de cellules à potentiel autoréactif. De façon intéressante, une bonne partie de celles-ci seraient de type transitionnel immature et des MZ<sup>188</sup>. Ceci a été observé non seulement dans le cas du VIH, mais également dans des maladies auto-immunes, ce qui explique pourquoi la dérégulation des lymphocytes B dans le contexte du VIH est autant similaire à celle observée chez ces dernières. Effectivement, il a été démontré que dans des maladies telles que le lupus et certains cancers, il y a un maintien de leur survie en périphérie via la production autocrine de BAFF<sup>189,190</sup>.

### **2.7.3 – Hyperglobulinémie**

Une des premières manifestations de la dérégulation des lymphocytes B observée dans le contexte du VIH est une activation polyclonale et l'hyperglobulinémie, autrement dit l'excès d'anticorps totaux dans le sang, notamment ceux de type IgG (hypergammaglobulinémie), certains d'entre eux de nature autoréactive. De façon similaire à ce qui a été observé dans les modèles BAFF-transgéniques et VIH-transgéniques (décrit plus bas), il est possible de faire un lien

entre l'excès de BAFF et cette condition. De plus, comme mentionné plus haut, la surexpression de BAFF a été associée à la production d'autoanticorps<sup>175</sup>. La production d'anticorps dépend de l'activation des lymphocytes B, et comme décrit plus haut, les lymphocytes B sont dans un état de suractivation dans le contexte du VIH<sup>171</sup>. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cette hyperactivation. Premièrement, mTOR a été démontré capable d'amplifier les signaux fournis par TACI afin d'activer les lymphocytes B (notamment les MZ) de façon T-indépendante en abaissant leur seuil d'activation<sup>166</sup>. Or, l'expression de mTOR est induite par BAFF, et BAFF a été démontré capable d'augmenter l'expression de TACI<sup>191,192</sup>. De plus, les populations MZ expriment davantage TACI que d'autres populations B, et certaines équipes ont associé une population de lymphocytes B ayant des caractéristiques des MZp (CD21<sup>lo</sup>). En même temps, une augmentation des plasmablastes de type IgM et IgG est également observée. Ces cellules, principalement ces dernières, seraient en partie responsables de l'hypergammaglobulinémie observée chez ces individus<sup>193</sup>. Ainsi, l'augmentation conjointe de l'expression de TACI et mTOR pourrait permettre une activation plus facile des lymphocytes B de type MZ. Deuxièmement, la gp120 du VIH peut directement activer les lymphocytes B de façon T-indépendante via la liaison en tandem à des lectines de surface comme CD21 (fortement exprimée chez les MZ). De façon intéressante, cette activation est dépendante de BAFF, et BAFF lui-même peut augmenter l'expression de ces lectines<sup>183</sup>. Ainsi, par plusieurs mécanismes, BAFF peut rendre ces cellules dans un stade d'hyperactivation, leur permettant de produire des anticorps possiblement autoréactifs en excès de façon T-indépendante, et ainsi contribuer à l'hyperglobulinémie. Malgré le fait que les MZ produisent généralement des IgM, la liaison de BAFF à TACI peut induire la commutation de classe de façon T-indépendante<sup>90,91,94</sup>. Ainsi, ils peuvent également contribuer à l'hypergammaglobulinémie lorsqu'ils sont dérégulés.

Autre que BAFF, l'inflammation chronique dans le contexte du VIH peut également maintenir les lymphocytes B dans un stade d'hyperactivation, notamment par la présence accrue dans le sang des individus infectés au VIH de cytokines proinflammatoires et stimulatrices des lymphocytes B comme IFN $\alpha$ , IL-6, TNF, IL-10, parmi d'autres. La translocation microbienne présente chez les individus infectés au VIH pourrait également contribuer à ce phénotype d'activation, via la stimulation des lymphocytes B et aussi des CPA via leurs PRR. Dans un contexte

d'excès de BAFF, la stimulation de ces cellules par les PRR permettrait une activation non-spécifique de celles-ci et ainsi la production d'anticorps, résultant dans l'hyperglobulinémie.

#### **2.7.4 – Perturbation des lymphocytes B mémoires**

Une des perturbations observées dans le compartiment B dans le contexte de l'infection au VIH est la perte et le dysfonctionnement des lymphocytes B mémoires (définies dans ce contexte comme étant les lymphocytes B CD27<sup>+</sup>) circulants. Nous et d'autres avons démontré que ces altérations apparaissent dès la primo-infection et ne seraient pas complètement restaurées par la thérapie ART<sup>194-196</sup>. La conséquence de ces altérations est la perte de la réponse humorale dirigée contre des pathogènes autres que le VIH, ainsi qu'une incapacité à répondre à l'infection par celui-ci. En effet, le titre d'anticorps dirigés contre plusieurs pathogènes opportunistes diminue chez les individus vivant avec le VIH, y compris ceux pour qui une exposition antécédente avait eu lieu, et même pour les anticorps vaccinaux générés pendant la petite enfance<sup>197,198</sup>.

Une des raisons pour cette perte des lymphocytes B mémoires vient des altérations au niveau de l'expression de BAFF-R et des marqueurs d'apoptose. En effet, les lymphocytes B mémoires des individus infectés au VIH possèdent une survie réduite à cause de l'induction de leur apoptose de façon spontanée. Celle-ci pourrait être due à plusieurs effets : la perte de l'expression de BAFF-R (dont les signaux mènent généralement à la survie des lymphocytes B) en faveur de l'expression de TACI ou BCMA à cause des excès de BAFF et du contexte de l'infection au VIH, ainsi que l'expression des marqueurs d'apoptose comme CD95 (Fas), *forkhead box o3a* (FOXO3a), *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL), parmi d'autres<sup>199-201</sup>.

La perte des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, surtout en périphérie, dû à l'infection au VIH est également un facteur affectant la génération de la mémoire humorale. Effectivement, une perte des centres germinatifs en périphérie a été observée chez les individus infectés au VIH<sup>202</sup>. Ceci semblerait être relié à la baisse des populations T CD4<sup>+</sup> au niveau gastro-intestinal (là où se situent d'ailleurs la majorité des cellules immunitaires), car ceux-ci sont fondamentaux pour la formation des centres germinatifs, y compris les centres germinatifs localisés dans les plaques de Payer<sup>31</sup>. De plus, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans le contexte du VIH expriment des niveaux de CD40L plus

faibles, ce qui les empêche de fournir les signaux nécessaires pour la bonne formation des centres germinatifs<sup>203</sup>.

Les centres germinatifs en périphérie ne sont pas les seuls affectés par le contexte de l'infection par le VIH. L'une des caractéristiques histologiques les plus marquées dans l'infection par le VIH est l'hyperplasie folliculaire et une lymphadénopathie pendant la phase aiguë de l'infection suivie d'une involution folliculaire pendant la progression de la maladie<sup>204-206</sup>. Celle-ci serait causée par la destruction des réseaux réticulaires formés par les FDC, fondamentaux pour l'architecture des organes lymphoïdes secondaires et pour la formation des centres germinatifs folliculaires<sup>206</sup>. La perturbation de ces réseaux serait, à son tour, médiée par la perte des signaux fournis par les lymphocytes B (dû à leur apoptose)<sup>196,207</sup>, par le dépôt des particules virales dans ceux-ci ou par l'attaque indirecte des lymphocytes T CD8<sup>+</sup><sup>204,208,209</sup>. Effectivement, l'importance des lymphocytes B dans la maintenance des FDC peut être observée dans les souris BAFF-déficientes, où il y a un impact considérable sur le compartiment B : le réseau de FDC chez ces souris n'est pas organisé et les centres germinatifs qui y sont générés sont de petite taille et courte durée de vie<sup>210,211</sup>.

De façon intéressante, l'infection par le VIH engendre un déséquilibre de la population des plasmablastes en périphérie. En effet, nous et d'autres avons démontré que les individus infectés au VIH voient une augmentation dans le sang de la population des plasmablastes de type IgG au détriment des plasmablastes de type IgA, normalement la majorité qui se dirige vers les muqueuses chez des individus non-infectés<sup>121,212</sup>. D'autres groupes ont rapporté des altérations similaires chez les macaques infectés au SIV<sup>179</sup>. Considérant l'importance des IgA dans la maintenance du microbiote intestinal et le fait que les individus vivant avec le VIH voient une dysbiose de leur microbiote, il est possible d'hypothétiser un lien entre ces faits<sup>213,214</sup>.

En résumé, l'infection par le VIH engendre la perte de la capacité à générer et maintenir des lymphocytes B mémoires et ainsi la mémoire humorale déjà établie. Il est important de souligner cependant que ces troubles ont été décrits notamment chez les individus non-traités. En effet, les individus infectés et sous traitement démontrent une excellente réponse humorale suite à des vaccinations.

### **2.7.5 – Perturbations de la zone marginale : observations chez les souris VIH transgéniques**

L'intérêt de notre laboratoire à étudier le compartiment B et les impacts de BAFF dans le contexte du VIH viennent des observations réalisées par ma codirectrice, la Dre Johanne Poudrier, chez les souris transgéniques VIH lors de son passage au laboratoire du Dr Paul Jolicoeur, à l'Institut de Recherche Clinique de Montréal. Ces animaux possèdent, sous le contrôle du promoteur du gène CD4 humain, les gènes du VIH et développent une maladie similaire au sida humain, dépendante de Nef<sup>215</sup>. Le fait d'ajouter la séquence sur le promoteur CD4 indique que seulement les cellules exprimant ce dernier produiraient les protéines virales, ce qui a permis de générer un modèle plus pertinent pour l'étude de la maladie causée par le VIH<sup>215</sup>. L'ajout de la séquence complète du VIH dans des souris avait déjà été réalisé auparavant, mais celles-ci n'avaient pas développé de symptômes. Le croisement entre ces souris transgéniques et des souris non-transgéniques ont généré seulement une souris avec des symptômes, causant celle-ci à développer également une maladie similaire au sida<sup>216</sup>.

Les premières observations réalisées chez ces souris ont permis de démontrer une augmentation des lymphocytes B dans les ganglions lymphatiques et dans la rate. De plus, cette dernière démontrait une grande augmentation de la zone marginale. De façon intéressante, ces lymphocytes B possédaient un phénotype d'activation polyclonale, qui se caractérisait par l'hyperglobulinémie et le titre élevé d'auto-anticorps dirigés contre l'ADN double-brin. De plus, les cellules B de ces animaux proliféraient et produisaient des anticorps spontanément *in vitro*. Il a été également observé que ces observations étaient dépendantes de la protéine Nef. Une autre observation intéressante chez ces animaux était la réduction de la capacité à générer des centres germinatifs et une réponse humorale adéquate à la suite de l'immunisation avec l'ovalbumine<sup>215,217,218</sup>. En effet, la réduction des réseaux des FDC a été observée chez ces animaux, de façon similaire à celle observée chez l'humain<sup>217</sup>.

Un phénotype similaire à celui observé chez les souris VIH-transgéniques (augmentation de la zone marginale, lymphocytes B hyperactifs et hyperglobulinémie) est également observé chez des souris BAFF-transgéniques et chez des souris qui n'expriment pas *autoimmune regulator*

(AIRE), ces dernières ayant également des niveaux de BAFF en excès<sup>181,182,219</sup>. Effectivement, AIRE est impliqué dans la signalisation de *Signal Transducer and Activator of Transcription 1* (STAT1), voie de signalisation qui est modulée par Nef et qui module, à son tour, l'expression de BAFF<sup>220-223</sup>. En accord avec cette idée, les niveaux de BAFF sérique des souris VIH transgéniques ont été retrouvés en excès (Poudrier, J. *et al.*, résultats non publiés).

L'augmentation de la zone marginale chez les souris VIH-transgéniques a été associée avec l'accumulation de DC possédant un phénotype d'immaturation (MHC II<sup>low</sup> CD86<sup>low</sup> CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>hi</sup>) dans cette région. De façon intéressante, des plasmocytes IgM<sup>hi</sup> extrafolliculaires, ainsi que des lymphocytes B IgM<sup>hi</sup> IgD<sup>low</sup> s'accumulaient dans les mêmes régions que ces DC immatures<sup>224</sup>. Il est possible que ces plasmocytes IgM<sup>hi</sup> dérivent des MZ qui ont été activés par les signaux délivrés par ces DC (les MZ étant généralement IgM<sup>hi</sup> et IgD<sup>low</sup>)<sup>87</sup>. Effectivement, la présence accrue de ces cellules dendritiques dans la zone marginale pourrait leur délivrer des signaux (possiblement via BAFF) menant au phénotype d'hyperactivation des lymphocytes B de ces animaux, et ainsi le développement de la maladie similaire au sida<sup>224</sup>.

Une dernière conséquence observée chez les souris VIH transgéniques est leur incapacité à générer des centres germinatifs dû à la perturbation des réseaux réticulaires des FDC et aux bas niveaux d'expression de CD40L sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ainsi que la perte graduelle de leur population en périphérie<sup>217</sup>. Ces observations correspondent à celles observées chez les individus infectés au VIH (voir section précédente).

### **2.7.6 – Dérégulations des MZp**

Comme expliqué dans la section 2.5.2, nous avons identifié une population de lymphocytes B qui possèdent des caractéristiques des lymphocytes B MZ et lymphocytes B transitionnels immatures, que nous avons nommé MZp, une population ayant un phénotype et une fonction Breg très marquée chez l'humain<sup>120-123</sup>.

Nos premières observations indiquent que la fréquence des MZp est augmentée en périphérie dans le contexte du VIH. Cette observation a été réalisée dans le contexte de nos diverses cohortes, et semble être un marqueur reproductible de l'infection par le VIH<sup>120-122</sup>. Cette augmentation en fréquence semble mimer l'augmentation de fréquence d'autres populations

régulatrices comme les Tregs chez les individus infectés par ce virus<sup>225-227</sup>. Elle est en accord aussi avec une augmentation des populations des lymphocytes B transitionnels immatures en périphérie, et même d'autres populations Breg dans le contexte du VIH, comme observé par d'autres équipes<sup>228,229</sup>. De façon intéressante, dans des contextes de pathologie chronique, les lymphocytes B transitoires peuvent donner origine à des lymphocytes B MZ<sup>230</sup>.

Nous et d'autres avons démontré que les individus vivant avec le VIH possèdent des niveaux élevés de la chimiokine CXCL13, le ligand du récepteur CXCR5, et ce même durant la thérapie ART<sup>231-233</sup>. En accord avec cette notion, les niveaux de CXCR5 chez les lymphocytes B matures de ces individus est plus faible que ceux des individus non-infectés. Effectivement, la liaison de CXCL13 à CXCR5 induit l'internalisation de ce dernier, et promeut la migration des lymphocytes B vers les follicules B des organes lymphoïdes secondaires<sup>84,85,232</sup>. Finalement, nous avons également démontré que les MZp des individus infectés au VIH possèdent des capacités migratoires augmentées pour les chimiokines CCL20 et CCL25, qui à leur tour sont augmentées dans le sang des individus infectés au VIH<sup>231</sup>. Ces chimiokines promeuvent la migration des lymphocytes B vers les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (*mucosal associated lymphoid tissues*, MALT) et le GALT, respectivement, possiblement dû à un recrutement actif vers la périphérie, ce qui pourrait contribuer à l'augmentation des MZp dans le sang<sup>234,235</sup>. Dans ce sens, et considérant que les MZp possèdent des récepteurs de surface permettant la liaison directe avec le VIH comme CD21, *Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3 Grabbing non-integrin* (DC-SIGN) et TLR10<sup>123</sup>, il est possible que cette migration affectée puisse contribuer à la dissémination des virions dans les tissus profonds. Ceci serait possible notamment par des mécanismes telles la *trans-infection* (l'infection d'une cellule « receveuse » par des particules virales à la surface de la cellule « donneuse » lors de l'interaction entre ces deux cellules) qui a été démontrée être 1000 fois plus efficace que la *cis-infection* (ou l'infection d'une cellule) par des particules virales libres) et que les lymphocytes B ont été démontrés capables de le faire<sup>236,237</sup>.

Ainsi, il nous a été possible d'émettre l'hypothèse que le contexte d'excès de BAFF dans l'infection par le VIH peut biaiser le destin cellulaire des lymphocytes B transitoires vers le phénotype MZ, contribuant à l'augmentation de cette population en périphérie et dans les organes lymphoïdes secondaires (observé via l'hyperplasie et augmentation de la zone



marginale). La migration des lymphocytes B matures périphériques vers les follicules peut contribuer davantage à cette augmentation.

Nous avons également démontré que les MZp en périphérie des individus infectés au VIH expriment davantage IL-10<sup>122</sup>. Malgré ce fait, l'inflammation chronique dans le contexte du VIH persiste. Ceci est dû à la dérégulation des populations régulatrices, qui malgré leur capacité de produire IL-10, voient leur phénotype altéré et ne peuvent donc pas réaliser leur fonction régulatrice de façon adéquate. Effectivement, il a été démontré que la production en excès d'IL-10 par des populations Breg peut empêcher la fonction cytotoxique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques au VIH *in vitro*<sup>229</sup>. Ainsi, l'augmentation de la fréquence des MZp en périphérie dans le contexte du VIH, couplé à leur augmentation d'expression d'IL-10 et à leur phénotype altéré, pourrait affecter la capacité de l'hôte à monter une réponse immunitaire contre le VIH adéquate, et ainsi contribuer à la progression de la maladie. La Figure 8 ci-dessous décrit en résumé les fonctions des MZp et comment le VIH dérégule celle-ci.

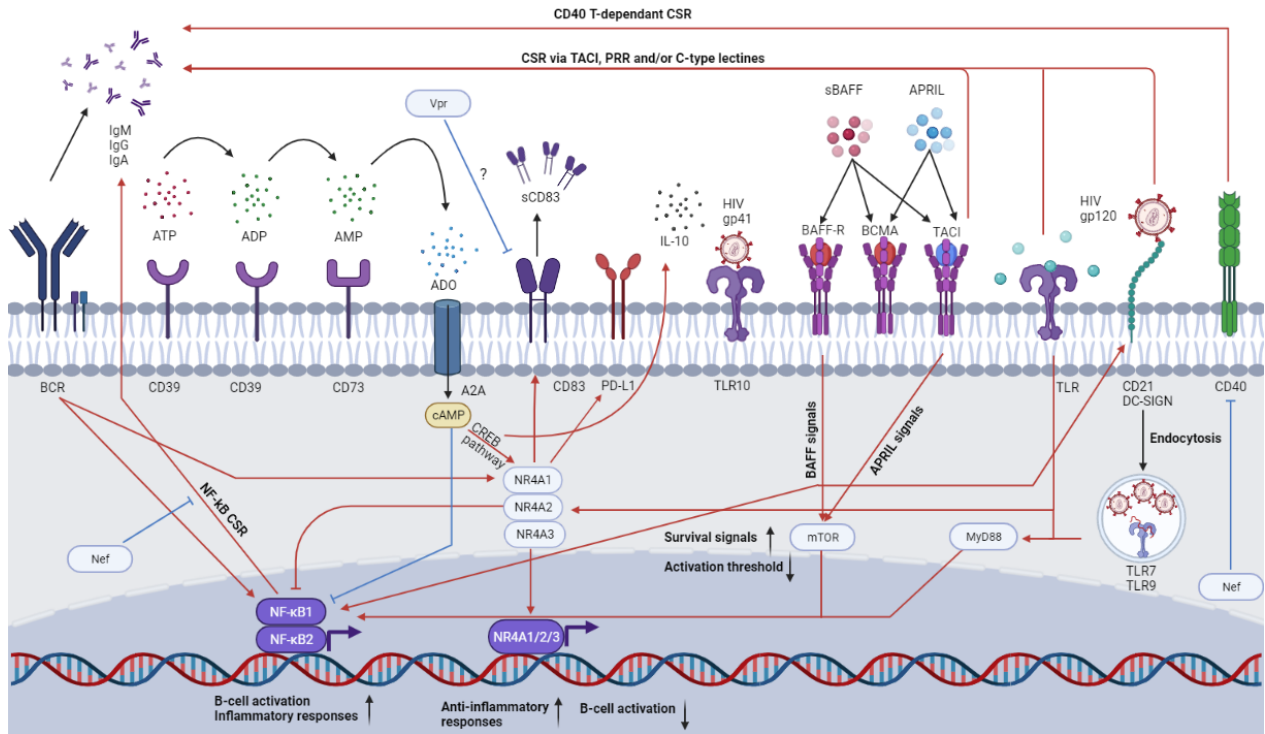


Figure 8 - Les fonctions effectrices des MZp dans le contexte du VIH

Les MZp possèdent un fort potentiel Breg grâce à l'expression de plusieurs molécules immunorégulatrices. En effet, les MZp expriment à la fois CD39 et CD73, permettant la génération de l'ADO, ce qui induira l'expression de l'adénylate cyclase et ainsi une accumulation de l'AMP cyclique, qui à son tour va activer la voie CREB. CREB induira l'expression des molécules immunorégulatrices telles les NR4A et IL-10, permettant à ces cellules de maintenir un phénotype régulateur et anti-inflammatoire. À leur tour, les NR4A induiront l'expression d'autres molécules anti-inflammatoires comme CD83 et PD-L1 tout en empêchant une activation inutile des MZp via le BCR ou les TLR. Cependant, cette homéostasie est changée dans le contexte du VIH à cause de l'inflammation chronique, des protéines virales ou l'excès de BAFF. Par exemple, en temps normal, les MZ et MZp peuvent subir une commutation de classe via la liaison de CD40 à CD40L, ce qui induit la voie NF-κB. Dans le contexte du VIH, Nef empêche cette commutation de classe en induisant une baisse d'expression de CD40. À son tour, la gp120 du VIH peut activer les MZ via la liaison de celle-ci à des molécules telles CD21, un effet qui est amplifié dans un contexte de BAFF. BAFF peut également induire la commutation de classe via TACI en activant la voie mTOR, qui entrecroise la cascade de signalisation des TLR (qui se voit engagée grâce à la forte expression de TLR7 par les MZ), permettant de réduire le seuil d'activation des MZ. Des protéines virales peuvent également affecter l'expression de molécules immunorégulatrices des MZp. Par exemple, Vpr a été démontré capable de baisser l'expression de CD83. Ainsi, dans le contexte du VIH, les MZ et MZp voient un changement phénotypique important : ces cellules perdent leurs fonctions régulatrices, s'activent facilement et ainsi pourraient produire des anticorps de faible affinité, possiblement auto-réactifs (considérant la capacité de BAFF à sauver de l'apoptose des populations qui seraient éliminées par les mécanismes de sélection positive et négative). Ultiment, ce changement phénotypique pourrait contribuer à l'hyperglobulinémie associée à l'infection par le VIH. Image tirée de Doyon-Laliberté, K., Aranguren, M., Poudrier, J., Roger, M. (2022), sous autorisation des auteurs eux-mêmes.

## **Chapitre 3 – Les complications de l’infection au VIH-1 à long terme**

Comme expliqué dans le Chapitre 2, le VIH cause une dérégulation de tous les compartiments du système immunitaire de son hôte, causée soit par l’infection directe du virus ou bien par l’inflammation chronique persistante dans le contexte de cette infection, même pendant la thérapie ART. Plusieurs facteurs sont impliqués dans cette inflammation chronique : certains sont des facteurs viraux, comme l’effet des protéines virales (produites par des cellules du réservoir latent) ou bien le contexte d’une infection virale elle-même (via la réponse interféron) et d’autres sont des facteurs non-viraux, comme la translocation microbienne engendrée par le dommage à l’épithélium intestinal lors de la lutte contre le virus, la perte de fonction des populations régulatrices dans le contexte du VIH, l’état d’hyperactivation de certaines populations immunitaires comme les lymphocytes B, les DC, parmi d’autres.

Cette inflammation chronique est associée à l’épuisement du système immunitaire, mais peut aussi engendrer des comorbidités. En effet, il a été observé que chez des personnes vivant avec le VIH (PVVIH), il y a un développement prématuré des troubles qui sont associés au vieillissement<sup>238-242</sup>. De façon importante, l’infection par le VIH, le débalancement du système immunitaire ou même la toxicité inhérente à la trithérapie peut amener à des problèmes au niveau du système nerveux, des néphropathies et des hépatopathies, et même des maladies cardiovasculaires (MCV)<sup>242</sup>. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés surtout à ces dernières, notamment l’athérosclérose.

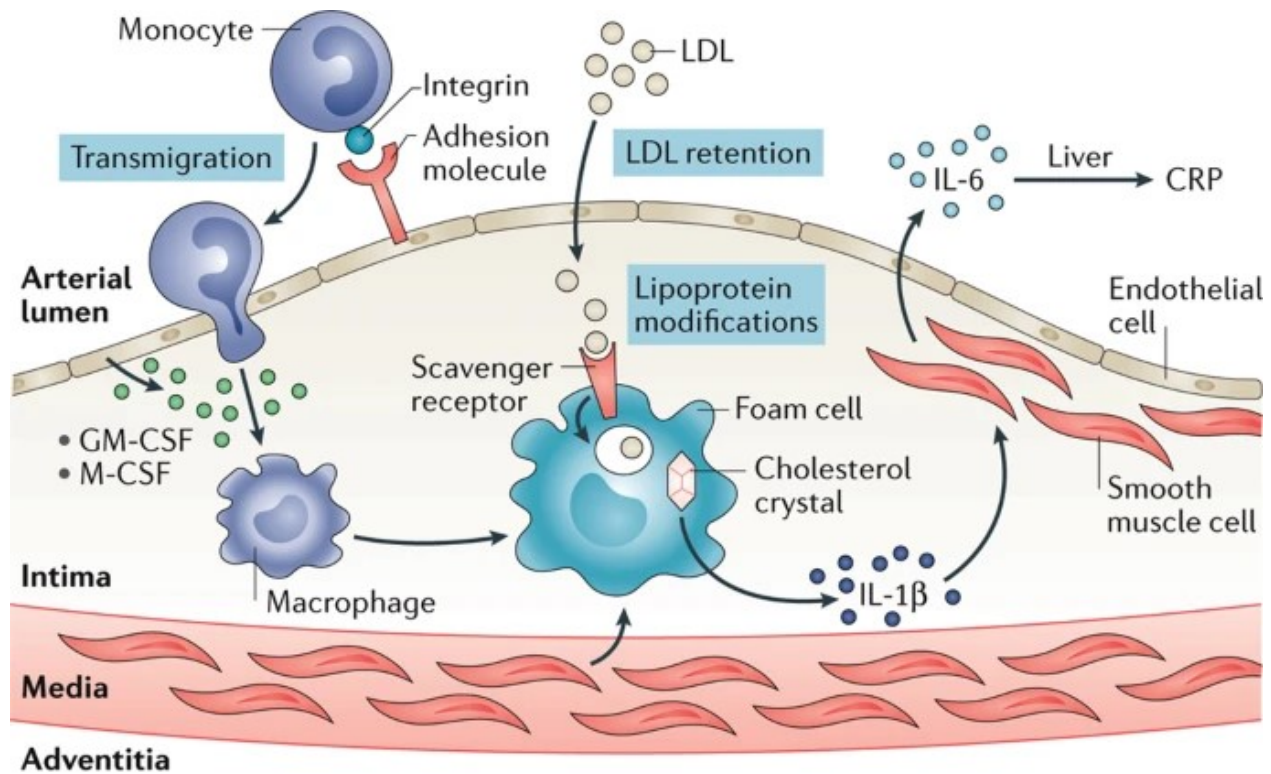
### **3.1 – L’athérosclérose**

#### **3.1.1 – Définition**

L’athérosclérose est, par définition, une maladie inflammatoire et un facteur de risque majeur au développement de maladies plus sévères<sup>243,244</sup>. Effectivement, depuis le 19<sup>e</sup> siècle, l’athérosclérose a été associée à l’inflammation<sup>245</sup>. Cette maladie est également la plus grande

cause de mortalité dans le monde<sup>246</sup>. Celle-ci est causée par la formation des dépôts lipidiques et fibreux (lesdites plaques d'athérosclérose) dans la paroi interne (la *tunica intima*) des vaisseaux sanguins. Cette accumulation peut finir par engendrer une obstruction (une sténose) du vaisseau et ainsi affecter le tissu qui est nourri par celui-ci, causant une condition nommée ischémie. Dépendamment d'où la maladie se développe, cette ischémie peut engendrer différentes complications, parfois mortelles : si l'athérosclérose se développe dans les artères coronariennes (des artères qui alimentent le muscle cardiaque de sang oxygéné), il y a des risques de développement de l'infarctus du myocarde (la mort du tissu cardiaque); si celle-ci se développe dans les artères carotides (qui alimentent l'encéphale), celle-ci peut engendrer des accidents vasculaires cérébraux (AVC), également de nature ischémique. De plus, les plaques d'athérosclérose sont propices au développement de thrombus qui peuvent se déloger (une condition nommée athérombose) et ainsi former des embolies et causer les ischémies dans des régions distales<sup>243,244,246</sup>.

Il y a plusieurs facteurs de risque pour la génération des plaques d'athérosclérose, comme l'alimentation, le tabagisme, le manque d'activités physiques, les facteurs génétiques, parmi d'autres, mais ultimement, l'athérosclérose débute comme une maladie inflammatoire<sup>243,244</sup>. La Figure 9 ci-dessous résume les étapes impliquées dans la formation des plaques d'athérosclérose. Les étapes qui décrivent le début de la formation des plaques d'athérosclérose ont été bien décrites au fil des années d'étude, notamment par l'utilisation des modèles animaux comme les souris.



Nature Reviews | Nephrology

Figure 9. - La formation des plaques d'athérosclérose

La formation des plaques d'athérosclérose débute par l'accumulation de LDL à l'intérieur de la « tunica intima » des vaisseaux sanguins des artères coronariennes. Ce LDL sera par la suite oxydé à cause des déchets oxydatifs produits par les cellules musculaires lisses qui composent la « tunica media » de ces vaisseaux. Le LDL oxydé (nommé oxLDL) permet le recrutement des monocytes à l'intérieur de la tunica intima, ce qui les fait se différencier en macrophages. Ces derniers vont consommer le oxLDL et ainsi devenir des « cellules mousseuses », qui à leur tour vont recruter davantage des cellules immunitaires à l'intérieur du vaisseau sanguin, débutant le processus de formation des plaques. Image tirée de Gisterå, A. et al (2017), sous l'autorisation de Springer Nature (numéro de licence : 5167210493896)

Premièrement, des cholestérols retrouvés en circulation, comme les lipoprotéines à basse densité ou à très basse densité (*low density lipoproteins*, LDL; *very low density lipoproteins*, VLDL) pénètrent l'intérieur des vaisseaux sanguins et sont retenues par des protéoglycans retrouvés à l'intérieur de la *tunica intima* de ceux-ci via des interactions ioniques. Cette rétention (grâce à la présence des apolipoprotéines B100 qui composent les particules de LDL) fait en sorte que le LDL devient exposé aux déchets oxydatifs des myocytes du muscle lisse composant la *tunica intima* ainsi que ceux de la *tunica media* (la partie intermédiaire des vaisseaux sanguins), permettant leur conversion en LDL oxydé (oxLDL). L'action des enzymes comme les myéloperoxydases et lipoxygénases peuvent également contribuer à cette oxydation<sup>243,244,246</sup>.

L'accumulation d'oxLDL à l'intérieur de l'*intima* cause l'activation des cellules endothéliales (les composantes de la *tunica intima*), ce qui engendre l'expression des molécules d'adhésion (qui ne sont pas généralement exprimées autre que dans des situations de dommage ou inflammation) et des chimiokines, permettant aux cellules immunitaires de s'attacher à la paroi des vaisseaux sanguins et de les infiltrer. Les monocytes sont l'une des cellules les plus importantes pour la formation des plaques d'athérosclérose. L'activation des cellules endothéliales par l'oxLDL cause également l'expression de *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulation Factor* (GM-CSF) et *Macrophage Colony Stimulation Factor* (M-CSF), permettant la différenciation des monocytes en macrophages proinflammatoires de type 1 (M1). Ces macrophages expriment, à leur tour, des récepteurs « scavengers » comme CD36, leur permettant de phagocyter l'oxLDL à l'intérieur de l'*intima*. L'accumulation de ces gouttelettes lipidiques à l'intérieur des macrophages leur donne une apparence particulière lorsque ceux-ci sont regardés en microscopie, ce qui leur confère le nom de « cellules mousseuses »<sup>243,244,246</sup>. Ces cellules possèdent des capacités migratoires limitées et restent coincées à l'intérieur de la *tunica intima*<sup>247</sup>. De façon intéressante, les cellules mousseuses ne dérivent pas toutes des macrophages. En effet, il semblerait que les myocytes présents dans l'*intima* chez l'humain peuvent se « transdifférencier » en cellules mousseuses via le développement de capacités de phagocytose et ainsi acquérir un phénotype similaire à des macrophages<sup>248-250</sup>.

De façon intéressante, l'oxLDL peut également lier des PRR comme le TLR2, et ainsi activer les macrophages davantage, permettant la sécrétion d'autres cytokines proinflammatoires, des chimiokines ainsi que l'expression de molécules costimulatrices<sup>251</sup>. De plus, l'accumulation de cholestérol à l'intérieur des macrophages, ainsi que la reconnaissance d'oxLDL par les récepteurs « scavengers » permet le déclenchement de l'inflammasome, culminant à la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et IL-18, des cytokines hautement proinflammatoires qui doivent être clivées par la Caspase 1 (un composant de l'inflammasome) avant de s'activer, et dont les précurseurs (pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18) voient l'expression induite par la signalisation des TLRs. L'IL-1 $\beta$  va à son tour engendrer la sécrétion d'autres molécules telles que l'IL-6, responsable de la production de la *C-reactive protein* (CRP) par le foie (un marqueur classique de la progression de l'athérosclérose)<sup>243,244,252,253</sup>.

Le milieu proinflammatoire créé par l'oxLDL et les cellules mousseuses permet de recruter davantage de cellules immunitaires à l'intérieur de la *tunica intima*, notamment d'autres monocytes et des cellules dendritiques, qui à leur tour vont s'activer par l'oxLDL et présenter des antigènes des lipoprotéines aux lymphocytes T naïfs dans les organes lymphoïdes secondaires, permettant leur activation et différenciation, notamment en T<sub>H</sub>1. Ces lymphocytes T migrent par la suite à l'intérieur de l'*intima* et contribuent au développement des plaques d'athérosclérose via la modulation du milieu inflammatoire au sein de celles-ci, en sécrétant des molécules telles que IFN- $\gamma$ , TNF, IL-2 et IL-3<sup>243,254</sup>. Ainsi, une boucle d'activation et recrutement des cellules immunitaires se fait dans l'*intima* des vaisseaux sanguins, ce qui résulte dans l'accumulation de ces dernières à l'intérieur de celle-ci. Cette accumulation devient la plaque d'athérosclérose en soi, avec un centre formé de cellules immunitaires mortes (nommé centre nécrotique). Il est également possible d'avoir la fusion de celle-ci avec des fibres de collagène provenant de la matrice extracellulaire présente dans la *tunica intima* et dans la *tunica media*<sup>243,244,246</sup>.

Les plaques d'athérosclérose, une fois développées, peuvent demeurer stables pendant plusieurs années. Parfois une calcification est observée au centre de celles-ci, afin de former ce que l'on nomme plaques calcifiées ou plaques mixtes, dépendamment du taux de calcification de celles-ci, ce qui les rend généralement encore plus stables, mais qui sont des marques de progression de l'athérosclérose<sup>246,255</sup>. Parfois, il peut y avoir une rupture de l'endothélium recouvrant la *tunica intima*, ce qui amène au déclenchement de la cascade de coagulation et ainsi la génération d'un thrombus. Ce thrombus peut causer une sténose majeure du vaisseau, ce qui amène à l'ischémie du tissu en question, ou bien se déloger de celui-ci, ce qui cause une embolie, pouvant engendrer une sténose et une ischémie ailleurs dans l'organisme. Cette complication contribue ainsi à la létalité de l'athérosclérose, comme décrit ci-haut<sup>246</sup>.

### **3.1.2 – Rôle des lymphocytes B dans l'athérosclérose**

Le rôle des lymphocytes B dans l'athérosclérose demeure controversé, notamment par le fait que le modèle expérimental le plus utilisé pour l'étude de cette maladie, la souris, possède des différences majeures dans le compartiment des lymphocytes B comparés à celui des humains. Ces différences font en sorte que certaines conclusions qui ont été tirés du rôle de ces cellules

dans le développement de l'athérosclérose chez la souris ne se traduisent pas parfaitement chez l'homme. Néanmoins, les études qui y ont été réalisés sont la base de notre connaissance sur le sujet.

L'analyse de la composition cellulaire des plaques d'athérosclérose démontre cependant que les lymphocytes B ne sont pas présents en grande quantité dans ces plaques<sup>256</sup>. En effet, ces cellules sont localisées au pourtour des plaques, l'extérieur de la *tunica adventitia* (la partie externe des vaisseaux sanguins). Ces lymphocytes B, activés par le milieu proinflammatoire à proximité des plaques d'athérosclérose, s'accumulent dans ces endroits avec d'autres cellules comme des mastocytes, lymphocytes T et DCs, et engendrent la formation des structures lymphoïdes tertiaires (des structures lymphocytaires générés temporairement lors des réponses inflammatoires qui ne sont pas résolues). Ces structures permettent la génération des centres germinatifs extrafolliculaires et ainsi la différenciation en plasmocytes produisant des anticorps *in situ*<sup>257,258</sup>. Dans cette section, nous allons regarder à la fois le rôle athérogène et le rôle athéroprotecteur des lymphocytes B. La Figure 10 ci-dessous fait le résumé de ces deux rôles.



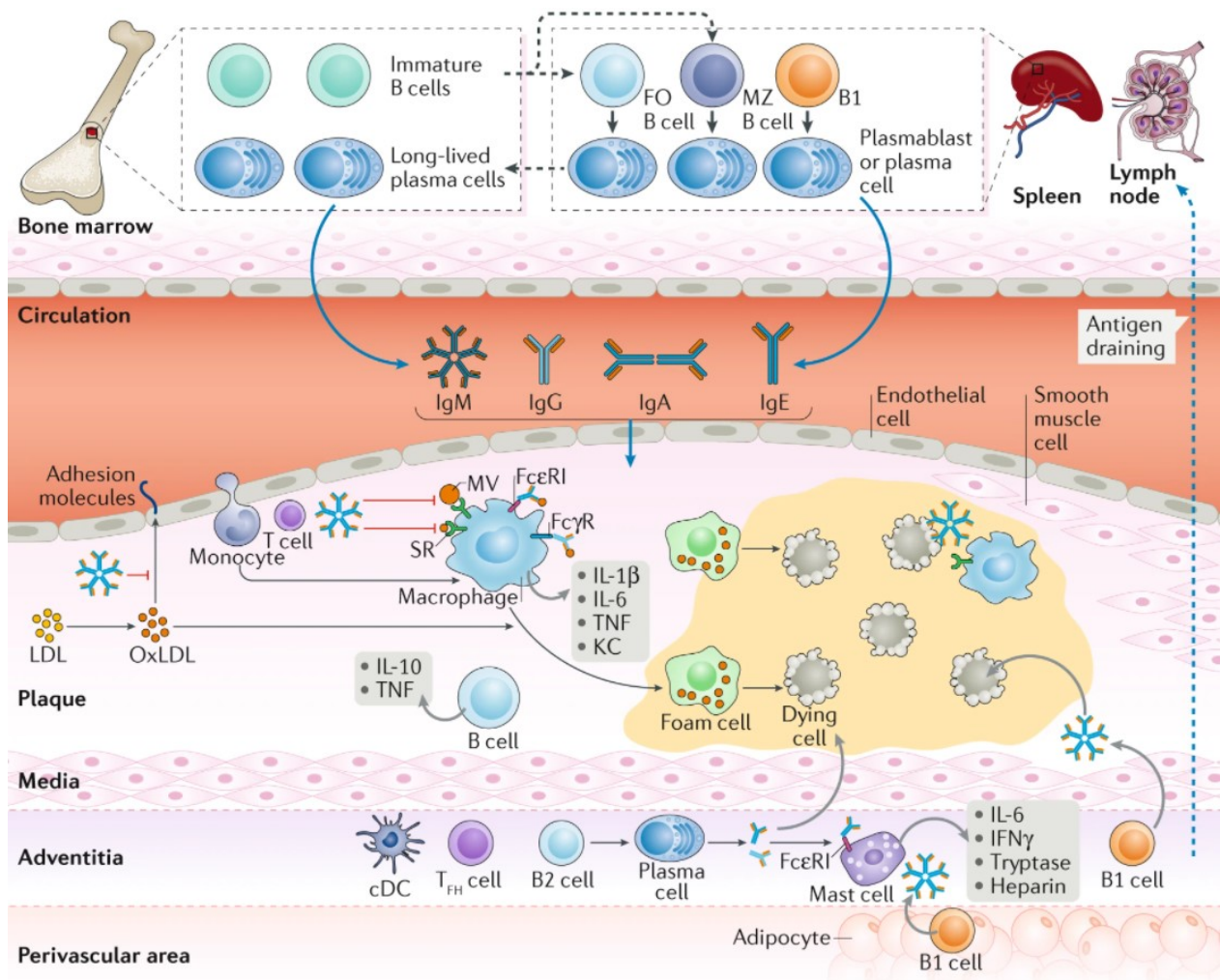


Figure 10. - Le rôle des lymphocytes B dans l'athérosclérose

Le rôle des lymphocytes B dans l'athérosclérose est mixte, étant à la fois protecteur et pathogène, dépendamment des sous-types de lymphocytes B en jeu, le type de réponse engendré ainsi que le type et l'affinité des anticorps produits. Globalement, les lymphocytes B FO sont athérogènes en se différenciant en plasmocytes et produisant des anticorps de type IgG anti-oxLDL, ce qui active davantage d'autres cellules immunitaires via leurs récepteurs Fc, tandis que les lymphocytes B MZ sont athéroprotecteurs en produisant des IgM anti ox-LDL et en empêchant l'action des T<sub>FH</sub> qui pourraient générer des réponses athérogènes des B FO. Les Bregs sont également athéroprotecteurs en maintenant un profil inflammatoire bas au niveau des plaques d'athérosclérose. Figure tirée de Sage, A. P. et al, sous l'autorisation de Springer Nature (numéro de licence : 5173701365225)

### 3.1.2.1 – Rôle athérogène des lymphocytes B

Le rôle athérogène des lymphocytes B matures a été démontré chez des souris qui ne possèdent pas de lymphocytes B : l'ablation de ces cellules réduit la taille et le développement de l'athérosclérose chez ces animaux alors que le transfert adoptif de ces cellules par la suite l'aggrave<sup>259,260</sup>. De plus, le statut d'activation et prolifération des lymphocytes B est un facteur de risque au développement des MCV<sup>261</sup>. Il est important de noter que dans ces observations,

aucune distinction entre les sous-types des lymphocytes B matures n'a été réalisée. En effet, en réalisant des knock-outs des sous-types spécifiques, il a été observé que les lymphocytes B FO sont ceux responsables du rôle athérogène de ces cellules : leur activation via la présentation d'antigènes comme l'oxLDL et différenciation en plasmocyte à longue durée de vie résulte en la production d'anticorps de type IgG dirigés contre cette lipoprotéine. Effectivement, il y a une corrélation entre les niveaux d'IgG dirigés contre les lipoprotéines et le développement des MCV. Cette différenciation peut avoir lieu, soit dans les organes lymphoïdes secondaires, ou *in situ*, dans les organes lymphoïdes tertiaires localisés à l'intérieur de la *tunica adventitia*<sup>262,263</sup>.

### 3.1.2.2 – Rôle athéroprotecteur des lymphocytes B

Malgré le fait que la majorité des lymphocytes B ont été démontrés athérogènes, il y a des populations qui sont activement athéroprotectrices. Une telle population est la population des MZ. Effectivement, il a été démontré que leur ablation spécifique contribue à la génération de l'athérosclérose. Ces cellules ont été démontrées comme des importants paliers contre cette maladie en contrôlant la réponse des lymphocytes T<sub>FH</sub>, ce qui empêcherait la génération des centres germinatifs et ainsi d'anticorps spécifiques dirigés contre les antigènes des plaques d'athérosclérose<sup>264</sup>. De plus, les anticorps de type IgM dirigés contre l'oxLDL ont été démontrés athéroprotecteurs, contrairement aux anticorps de type IgG. Les lymphocytes B MZ sont des producteurs majeurs d'IgM<sup>87</sup>. Il n'est donc pas surprenant que ces cellules puissent engendrer des rôles protecteurs, comme démontré par d'autres équipes<sup>264,265</sup>.

Les populations Bregs ont également été démontrés importantes contre le développement de l'athérosclérose en contribuant à la diminution de l'inflammation locale, responsable au développement de ces plaques<sup>266</sup>. De façon intéressante, il a été démontré que le rôle athéroprotecteur des MZ dépend de NR4A1 : une délétion de ce facteur de transcription aggrave l'athérosclérose chez la souris. Effectivement, les souris NR4A1 knock-out voient une baisse de l'expression de PD-L1, et ainsi une perte des fonctions régulatrices engendrés par les MZ<sup>267</sup>.

### 3.1.2.3 – Rôle du système BAFF/APRIL dans l'athérosclérose

Comme décrit dans le Chapitre 2, BAFF et APRIL sont des analogues qui engendrent des rôles à la fois similaires et différents. Ceci est vrai dans l'homéostasie et ontologie des lymphocytes B, mais également dans l'athérosclérose.

Le rôle de BAFF dans l'athérosclérose, tout comme le rôle des lymphocytes B, est controversé, encore à cause des divergences entre le compartiment B murin et humain. En effet, dans un premier point de vue, BAFF semblerait être athéroprotecteur : le blocage de BAFF est athérogène, et la surexpression de BAFF chez la souris est athéroprotectrice, rôle dépendant de la liaison de cette protéine à TACI (chez les lymphocytes B et chez les cellules myéloïdes)<sup>268,269</sup>. Cependant, chez l'homme, une augmentation de BAFF corrèle non seulement avec le risque de complications cardiaques sévères (comme l'infarctus), mais l'excès de BAFF dans le contexte de maladies autoimmunes tel le lupus ou le syndrome de Sjögren corrèle avec le développement prématuré des MCV chez ces individus<sup>270,271</sup>. Certainement, le rôle de BAFF dans l'activation des lymphocytes B pourrait contribuer à son rôle athérogène : les anticorps dirigés contre l'oxLDL sont considérés comme des auto-anticorps<sup>258</sup>. Ainsi, la capacité de BAFF à sélectionner des lymphocytes B autoréactifs et de les activer pourrait permettre leur réponse athérogène<sup>187,188</sup>. De plus, il est possible que le blocage de BAFF mène à la perte des populations B athéroprotectrices, comme les MZ, qui sont très dépendants de BAFF pour leur sélection et survie<sup>87,264</sup>. De façon intéressante, BAFF est produit par les adipocytes et pourrait agir en tant qu'adipokine (cytokines produites par les adipocytes), faisant le lien entre l'obésité (facteur de risque majeur des MCV) et l'inflammation<sup>272,273</sup>.

En ce qui concerne APRIL, il semblerait que celui-ci est seulement considéré athéroprotecteur. En effet, la liaison d'APRIL à des HSPG, notamment le perlecan dans la *tunica intima* des vaisseaux semble empêcher la rétention du LDL, et ainsi empêcher l'athérosclérose. Effectivement, les niveaux d'un isoforme d'APRIL qui se lie aux protéoglycans (nommé APRIL non-canonique, ou nc-APRIL) semblent corrélés négativement avec le développement des MCV chez l'humain<sup>274</sup>. De façon intéressante, APRIL est également impliqué dans la génération des Bregs, qui pourraient posséder un rôle athéroprotecteur : non seulement APRIL augmente l'expression

d'IL-10 chez les Breg humains, mais APRIL permet également la génération des Bregs murins qui produisent IL-10 et expriment PD-L1<sup>275,276</sup>.

### **3.2 – La Cohorte Canadienne VIH et Vieillessement**

Grâce à la trithérapie, les individus vivant avec le VIH peuvent avoir une espérance de vie presque pareille à celle des individus non-infectés. En effet, au Canada, en 2015, 50% des PVVIH sont âgés d'au moins 50 ans<sup>242</sup>. Comme décrit dans le préambule de ce chapitre, l'infection par le VIH est associée au développement prématuré de troubles normalement associés au vieillissement, comme les maladies cardiovasculaires telles l'athérosclérose. Ceci semblerait se produire même lorsque les individus sont sous ART et ayant une charge virale indétectable. Ainsi, une meilleure compréhension de la relation entre le VIH et le vieillissement se fait nécessaire.

Le phénomène de vieillissement précoce chez les individus infectés au VIH a été attribué à plusieurs facteurs, notamment l'inflammation chronique présente chez les individus vivant avec le VIH, la translocation microbienne, la perte des populations régulatrices, les infections opportunistes, parmi d'autres. L'inflammation chronique, à son tour, faciliterait l'activation immunitaire nécessaire pour la formation des plaques d'athérosclérose<sup>240,241</sup>.

Afin d'étudier ce phénomène, la Cohorte Canadienne VIH et Vieillessement (*Canadian HIV and Aging Cohort Study*, CHACS) a été créée. Celle-ci est une cohorte pancanadienne sur laquelle plusieurs études sont réalisés, y compris des études sur le développement des MCV (dont une partie de ce travail). Afin de participer dans cette cohorte, le participant doit être âgé d'au moins 40 ans et avoir été infecté au VIH pendant au moins 15 ans (prouvé par des tests d'anticorps anti-VIH). Les participants doivent également avoir une espérance de vie supérieure à un an et être en mesure de fournir un consentement libre et éclairé. Un autre groupe d'individus, non infectés, a également été recruté afin de servir de groupe témoin. De plus, les participants de l'étude ont subi une tomographie des artères coronaires afin de vérifier la présence ou non des plaques d'athérosclérose, critère qui détermine si ceux-ci possèdent ou non des MCV<sup>242</sup>. Plusieurs données cliniques sont également récoltées, comme des biomarqueurs classiques au développement des MCV.

## Chapitre 4 – Justification et hypothèses

L'infection par le VIH engendre une dérégulation du système immunitaire dont l'origine est multifactorielle, par son effet direct ou indirect, notamment via l'inflammation chronique qui s'installe dans le contexte de l'infection par ce virus. Effectivement, celle-ci affecte particulièrement les lymphocytes B, causant des dérégulations à tous les niveaux de ce compartiment. La dérégulation de populations B semble être reliée avec l'excès de BAFF retrouvé dans le sang des PVVIH. Tel que décrit dans la section 2.7, on retrouve entre autres : l'hyperactivation polyclonale, l'hyperglobulinémie, l'expansion de la zone marginale et les manifestations autoimmunes présentes chez les PVVIV qui peuvent tous être reliés à l'excès de BAFF.

Nous avons préalablement observé des dérégulations au niveau des MZp du sang des PVVIH, soit par leur fréquence augmentée, par leur capacité migratoire altérée ou par leur phénotype modulé. Celles-ci semblaient corrélées avec les niveaux de BAFF sanguins des PVVIH. Considérant l'importance de BAFF pour la sélection et maintenance du compartiment MZ, nous avons eu comme **hypothèse principale** que le compartiment des MZp est fondamentalement dérégulé chez les PVVIH, et que ceci serait relié à l'excès de BAFF présent dans le contexte du VIH. De façon importante, les **hypothèses spécifiques** pour ce travail sont que **1)** le potentiel Breg de cette population et **2)** sa contribution à la surveillance immunologique seraient grandement affectés.

Afin de mieux comprendre les dérégulations de cette population, nous avons décidé de réaliser une analyse transcriptomique des MZp des individus infectés au VIH. Nous avons également évalué l'impact de l'infection au VIH et d'un excès de BAFF sur le phénotype et la fonction Breg de cette population. Les résultats de cette étude font partie du premier article de ce travail (Chapitre 5).

L'inflammation chronique dans le contexte du VIH pourrait contribuer à l'apparition prématurée de manifestations reliées au vieillissement chez les PVVIH. L'athérosclérose est une de ces manifestations. Considérant l'importance des lymphocytes B de type MZ pour la

surveillance immunologique contre cette maladie, et l'importance de BAFF et APRIL dans son développement, nous avons analysé les niveaux sanguins de BAFF et APRIL, ainsi que la dérégulation des MZp pour explorer leur possible contribution dans le développement des MCV chez les PVVIH. Afin de ce faire, nous avons effectué nos études sur les échantillons sanguins des individus de la CHACS.

Plus précisément, nous avons effectué des études de corrélation entre les niveaux sanguins de BAFF et APRIL et les marqueurs cliniques couramment associés au développement de l'athérosclérose. Nous avons également vérifié le phénotype Breg des MZp chez ces individus. Les résultats de cette étude font partie du deuxième article de ce travail (Chapitre 6).

# **Chapitre 5 – Excess BAFF Alters NR4As Expression Levels and Breg Function of Human Precursor Marginal Zone B-cells in the Context of HIV-1 infection**

Kim Doyon-Laliberté\*, Matheus Aranguren\*, Michelle Byrns, Josiane Chagnon-Choquet, Matteo Paniconi, Jean-Pierre Routy, Cécile Tremblay, Marie-Claude Quintal, Nathalie Brassard, Daniel E. Kaufmann, Johanne Poudrier, Michel Roger

\*Co-Premier Auteurs

**Statut** : Soumis au journal *PLoS Pathogens*

## **Contribution des co-auteurs :**

Kim Doyon-Laliberté a réalisé les analyses du RNAseq des donneurs, les analyses de cytométrie en flux des donneurs VIH+, les essais de la fonction Breg sur des donneurs VIH+ et les donneurs non-infectés et les essais de BAFF *in vitro* sur les amygdales humaines. Matheus Aranguren a réalisé les analyses du transcriptome des donneurs (GSEA et Volcano Plots), les analyses de cytométrie en flux des individus sains, les analyses de BAFF membranaire des donneurs d'amygdales, la coculture des MoDC et des B et les analyses de qPCR des MZp. Michelle Byrns a fait les premiers essais de BAFF sur les lymphocytes B des amygdales ainsi que les premières études sur les amygdales. Josiane Chagnon-Choquet a préparé les PBMC humains pour le tri cellulaire des MZ et MZp humains, et a fait l'extraction de l'ARN. Matteo Paniconi a écrit le code permettant de générer le Volcano Plot et les GSEA pour l'analyse du transcriptome des MZ et MZp humains. Jean-Pierre Routy et Cécile Tremblay ont fourni les spécimens VIH+ de la Cohorte de Primo-Infection de Montréal et spécimens sains. Marie-Claude Quintal, Nathalie Brassard et Daniel E Kaufmann ont fourni les spécimens d'amygdales. Johanne Poudrier et Michel Roger ont contribué au design du projet, à l'élaboration des expériences, l'analyse des données et à la rédaction du manuscrit.

# **Excess BAFF Alters NR4As Expression Levels and Breg Function of Human Precursor Marginal Zone B-cells in the Context of HIV-1 infection**

Kim Doyon-Laliberté<sup>1, 2 \*</sup>, Matheus Aranguren<sup>1, 2 \*</sup>, Michelle Byrns<sup>1, 2</sup>, Josiane Chagnon-Choquet<sup>1, 2</sup>, Matteo Paniconi<sup>3</sup>, Jean-Pierre Routy<sup>4</sup>, Cécile Tremblay<sup>1, 2</sup>, Marie-Claude Quintal<sup>5</sup>, Nathalie Brassard<sup>1, 2</sup>, Daniel E Kaufmann<sup>1, 6</sup>, Johanne Poudrier<sup>1, 2\*\*</sup>, and Michel Roger<sup>1, 2\*\*</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Qc, Canada ; <sup>2</sup>Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie de l'Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada ; <sup>3</sup>Service d'Aide à la Formation Interdisciplinaire et à la Réussite Étudiante (SAFIRE), Faculté des Arts et Sciences, Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada ; <sup>4</sup>Department of Medicine, McGill University Health Centre, McGill University, Montréal, Canada ; <sup>5</sup>Centre Hospitalier Ste-Justine de l'Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada ; <sup>6</sup>Département de Médecine de l'Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada.

\*contributed equally to this study

\*\*Co-seniors;

Word count in text: 10557

Word count in abstract: 364

Running Title: Excess BAFF and altered Breg capacities in the context of HIV.

Number of Figures and Tables: 4 Figures, 6 Supplemental Figures, 1 Table

Reference count: 65



## 1 – Abstract

We have shown that excess B-cell activating factor (BAFF) in the blood of HIV-infected individuals, is concomitant with increased frequencies of precursor-like marginal zone (MZp) B-cells, early on and despite successful antiretroviral therapy (ART). We have recently reported that in uninfected individuals, MZp possess a strong B-cell regulatory (Breg) potential. As such, MZp B-cells highly express IL-10, the orphan nuclear receptors (NR)4A1, NR4A2, NR4A3, the regulatory molecule CD83, as well as the ectonucleotidases CD39 and CD73, all of which are associated with regulation of inflammation. Moreover, the Breg function of MZp B-cells involves CD83 signals. Herein, in order to address the impact of HIV infection and excessive BAFF environment on MZp B-cells and their regulatory capacities, we have performed transcriptomic analyses by RNA-seq of sorted MZp B-cells from the blood of HIV-infected progressors. The Breg profile and function of blood MZp B-cells from HIV-infected progressors were assessed by flow-cytometry and light microscopy high content screening (HCS) analyses, respectively. In addition, the effects of excess BAFF on the Breg profile of MZp B-cells from uninfected controls were investigated *in vitro*. We report significant downregulation of NR4A1, NR4A2, NR4A3 and CD83 gene transcripts in blood MZp B-cells from HIV-infected progressors when compared to uninfected controls. NR4A1, NR4A3 and CD83 protein expression levels and Breg function were also downregulated in blood MZp B-cells from HIV-infected progressors and not restored by ART. We observe decreased expression levels of NR4A1, NR4A3, CD83 and IL-10 by MZp B-cells from blood and tonsils following treatment with excess BAFF, which significantly diminished their regulatory function. Overall suggesting that excess BAFF contributes to the alteration of the Breg potential of MZp B-cells, which could contribute to a loss of immune surveillance, in the context of HIV and possibly in other situations where BAFF is found in excess.

**Keywords:** HIV, Breg, NR4A, MZp, BAFF

## 1 – Résumé

Nous avons démontré que l'excès de la molécule « B-cell activating factor » (BAFF) dans le sang des individus infectés au VIH est concomitant avec l'augmentation de la fréquence des lymphocytes B de la zone marginale « precursor-like » (MZp), dès le début de l'infection et malgré la thérapie ART. Nous avons également démontré récemment que chez les individus non-infectés, les MZp possèdent un puissant potentiel Breg. En effet, les MZp expriment fortement IL-10, les récepteurs nucléaires orphelins NR4A1, NR4A2, NR4A3, la molécule régulatrice CD83 ainsi que les ectonucléotidases CD39 et CD73, molécules associées avec la régulation de l'inflammation. De plus, la fonction Breg des MZp semble impliquer des signaux de CD83. Dans ce manuscrit, afin d'évaluer l'impact de l'infection du VIH et de l'environnement d'excès de BAFF sur les MZp et leurs capacités régulatrices, nous avons réalisé une analyse transcriptomique par séquençage de l'ARN des MZp triés du sang des progressseurs infectés au VIH. Le profil et la fonction Breg des MZp a été évalué par cytométrie en flux et microscopie optique via une analyse de criblage à haut contenu (HCS), respectivement. De plus, les effets de l'excès de BAFF sur le profil Breg des MZp des contrôles non-infectés a été évalué *in vitro*. On démontre une baisse significative de l'expression des transcrits des gènes codant pour NR4A1, NR4A2, NR4A3 et CD83 par les MZp du sang des progressseurs infectés au VIH lorsque comparés à des contrôles non-infectés. Les niveaux des protéines de NR4A1, NR4A3 et CD83, ainsi que la fonction Breg des MZp du sang des progressseurs VIH a également été affaibli, et cette baisse ne semble pas être restauré par la thérapie ART. Nous avons observé une baisse des niveaux d'expression de NR4A1, NR4A3, CD83 et IL-10 des MZp du sang et des amygdales des donneurs non-infectés après traitement avec du BAFF en excès, ce qui a significativement impacté leur fonction régulatrice. Globalement, ces résultats suggèrent que l'excès de BAFF contribue à une altération du potentiel Breg des MZp, ce qui pourrait contribuer à une perte de la surveillance immunologique dans le contexte du VIH et possiblement dans d'autres contextes où BAFF se retrouve en excès.

**Mots-clés:** VIH, Breg, NR4A, MZp, BAFF

## 2 – Introduction

Currently, over 37 million individuals are living with the human immunodeficiency virus (HIV) [1]. Although over 66% of these individuals are successfully treated with antiretroviral therapy (ART), inflammation persists [1, 2]. Consistently, we have previously reported that expression levels of the tumor necrosis factor (TNF) family member B-cell Activating Factor (BAFF) are in excess in the blood of HIV-infected progressors from the Montreal Primary HIV Infection (PHI) cohort. This upregulation is already present in the acute phase of infection and is still observed 9-12 months post-ART [3]. Moreover, our recent studies suggest that excess BAFF perseveres in long-term treated individuals of the Canadian HIV and Aging Cohort Study (CHACS) (Aranguren et al; unpublished observations). Excess BAFF is associated with viral factors, such as Nef, and non-viral factors, such as elements of microbial translocation, and correlates with hypergammaglobulinemia and deregulation of the B-cell compartment [4-6]. BAFF is an important growth factor that helps shape the marginal zone (MZ) B-cell pool. As such, we found that excess BAFF is associated with increased frequencies of a CD19<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup>CD21<sup>lo</sup>IgM<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup> B-cell population, sharing features of transitional immature and MZ B-cells, designated “Precursor-like” Marginal Zone (MZp) B-cells, in the blood of PHI HIV-infected progressors [3], and more recently in the blood of CHACS participants (Aranguren et al; unpublished observations). We have reported similar observations with HIV-Transgenic (Tg) mice [7], SIV-infected macaques [8] and with HIV-infected Beninese commercial sex workers [9, 10], suggesting that excess BAFF and deregulated MZp B-cells are reliable markers of inflammation and disease progression in the context of HIV.

BAFF binds to three receptors among B-cell subsets: BAFF-R, transmembrane activator and calcium modulator and cytophilin ligand interactor (TACI) and B-cell maturation antigen (BCMA), the second which is highly expressed by MZ populations [11]. MZ are first-line B-cells that respond quickly to blood borne antigens via their polyreactive BCR and numerous Pattern Recognition Receptors (PRR) such as C-type lectins and Toll-like Receptors (TLR). MZ B-cells have been shown to class switch their immunoglobulins (Ig) from IgM to IgG or IgA in a BAFF-dependant manner via TACI [11]. Importantly, MZ B-cells were shown to bind to the envelope (Env) proteins gp120 and gp41 of HIV, via C-type lectins and TLR10, respectively [12, 13]. Whether Ig produced

by MZ B-cells confer some level of protection or contribute to hyperglobulinemia and autoimmune manifestations in excessive BAFF contexts such as with HIV is currently under investigation.

Importantly, we have recently reported that in healthy individuals, blood and tonsil MZp B-cells present features associated with strong B-cell regulatory (Breg) capacities [14]. Indeed, transcriptomic and flow-cytometry analyses demonstrated that MZp B-cells express high levels of IL-10, IL-35 and TGF $\beta$ , as well as the ectonucleotidases CD39 and CD73. Strikingly, as for regulatory T-cells (Tregs) [15, 16], we found that MZp B-cells highly express the orphan Nuclear Receptors (NR)4A1, NR4A2 and NR4A3, as well as the immunoregulatory molecule CD83 [14], whose expression was shown to be directly modulated by NR4As [17]. Notably, we have shown that the *in vitro* Breg function of tonsil MZp B-cells involved CD83 signaling [14].

NR4As transcription factors are involved in the regulation of the inflammatory response and their expression is increased upon signalling via the TCR or BCR [18], amongst others. They are important regulators of differentiation, proliferation and apoptosis of immune cells [19]. The importance of NR4As in immune regulation is highlighted by their importance for Tregs, as NR4As directly promote and maintain the expression of FoxP3 [16]. Also, increased expression of NR4A1 in myeloid cells is associated with a diminished T-cell activation profile [20]. Furthermore, NR4A1-3 knockout mice develop systemic autoimmune diseases [19, 21].

Given the importance of BAFF for MZ B-cell activity, we have herein assessed the impact of the HIV context and excess BAFF on the Breg profile and function of MZp B-cells. We show that NR4A1-3 as well as CD83 gene and protein expression levels are severely downregulated in blood MZp B-cells from PHI HIV-infected progressors when compared to uninfected controls and elite controllers (EC), whose plasma viral load remain undetectable in absence of ART. Importantly, this downregulation correlates with reduced MZp Breg function. Moreover, this loss of Breg function could be related to the exhaustion profile we describe for this population. We find that excess BAFF, both as soluble and membrane forms, directly downregulate NR4A1-3 and CD83 expression levels by MZp from the tonsils of healthy donors *in vitro*. Total tonsillar membrane BAFF expression levels were also found to correlate with MZp Breg efficiency, as donors

expressing relatively low BAFF levels at baseline had a stronger Breg function than donors who had higher BAFF levels at baseline. Strikingly, adding soluble BAFF was found to impede MZp Breg function in low BAFF expressing tonsillar donors, suggesting that in circumstances of excess BAFF, alteration of MZp Breg function constitutes a major threat to immune surveillance.

### **3 – Materials and Methods**

#### **3.1 – Specimen collection and clinical data**

Cryopreserved blood specimens from 13 male HIV-1 infected classic progressors were selected from the Montreal PHI cohort specimen bank. For simplicity, the term HIV is being used throughout this manuscript. Clinical data from these individuals can be found in Table 1. The date of infection was estimated based on clinical and laboratory results, using criteria established by the Acute HIV Infection and Early Disease Research Program (National Institute of Allergy and Infectious Diseases [NIAID], Bethesda, MD). Blood samples had been collected at two time points: the acute phase of infection (ie: 0-3 months after HIV acquisition) and/or early phase of infection (ie: 5-8 months after HIV acquisition), as well as 96 weeks after HIV acquisition, with an average of 92 weeks of ART treatment (Table 1). Cryopreserved blood samples from 3 male EC were obtained from the Montreal Long Term Non-Progressor (LTNP) cohort [22]. Cryopreserved blood samples from 18 male HIV-negative volunteers were obtained from the Montreal PHI cohort, to be used as uninfected controls. Plasma viral loads and blood CD4+ T-cell counts were determined as reported previously [23]. None of the subjects had syphilis, hepatitis B, or hepatitis C. Written informed consent was obtained from all subjects, and research conformed to the guidelines of, and was approved by, the University of Montreal Hospital Research Center Ethics Review Board (project reference SL05.028).

#### **3.2 – Cell Sorting of Human Blood MZ and MZp B-cells, RNA Isolation and Sequencing**

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 3 uninfected controls, 3 classic progressors at 5-8 months post-infection and 3 EC had been isolated on Ficoll gradients, re-suspended in cryopreservation medium containing 90% heat-inactivated fetal bovine serum (hi-

FBS) (Wisent Inc., Montreal, QC, Canada) and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO), and stored in liquid nitrogen until use. Cells were thawed, washed in IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Gibco Life Technologies, New York, NY, USA), and processed for cell sorting with a FACSAriaIII apparatus. Live/dead exclusion was performed using LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain (Invitrogen Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, USA). Non-specific binding sites were blocked using fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer (1× PBS, 2% hi-FBS) supplemented with 20% hi-FBS and 10 µg mouse IgG (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). Cells were stained using the following conjugated mouse anti-human monoclonal antibodies (mAbs): PacificBlue-anti-CD19, APC-Cy7-anti-CD10 (BioLegend, San Diego, CA, USA), AlexaFluor700-anti-CD27, FITC-anti-IgM, PE-anti-CD21 (BD-Biosciences), PerCP-eFluor710-anti-CD1c (eBioscience, San Diego, CA, USA). Sorted live CD19+CD1c+IgM+CD27+CD21hiCD10- mature MZ and CD19+CD1c+IgM+CD27+CD21loCD10+ MZp B-cells were >95% pure. Total RNA was extracted using RNeasy Micro Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. RNA integrity was validated using a RNA Pico Chip on the Agilent BioAnalyzer 2100, and RNA was sent to the IRIC Genomics Core Facility for RNA-seq transcriptomic profiling and analysis. Libraries were prepared using Clontech Ultra Low RNA SMARTer v4 (Takara) and sequenced on a HiSeq2000. Genes with false discovery rate (FDR) values <0.05 were considered to be differentially expressed. Gene expression levels were compared using raw read counts and the negative binomial distribution model implemented in DESeq2 [24], a differential expression analysis package developed for R, which adjusts for sample variations with the assumption that the vast majority of genes should have correlating expression levels. More specifically, the regularized log transformation (rlog) implemented in DESeq2 was used to transform raw data into log<sub>2</sub> (readcount) for analysis and visualization.

### **3.3 – Volcano plot and Gene Set Enrichment Analyses (GSEAs)**

The volcano plot was created using Python 3.9.5. First, a comma separated value (CSV) file containing the raw RNA-Seq gene expression data was imported into a pandas 1.3.1 DataFrame. Each gene was assigned the colour blue if significantly upregulated/downregulated ( $p < 0.05$  and fold change  $> 1$  or  $< 1$ ), otherwise it was assigned the colour grey. Annotations for the genes were assigned black if significantly upregulated/downregulated beyond the specified p-value and n-

fold change. Otherwise, they were assigned red labels regardless of their p-values or n-fold-changes if they appear in a specified list of genes to highlight. Finally, the volcano plot was generated using Matplotlib 3.4.2. Specified p-values and n-fold lines were drawn as blue lines. The total number of upregulated/downregulated genes were displayed in the upper right/left corners, respectively.

Gene Set Enrichment Analyses (GSEAs) were produced using the software application GSEA 4.1.0, developed by the Broad Institute, as previously published [25, 26]. Required input files are the expression data, the phenotype labels, and the gene set. The expression data file consists of a table whose first column is gene name, followed by gene description, followed by the genes' expression values for each sample. The phenotype labels file associates a phenotype label (e.g., HIV+ or HIV-) with each sample in the group. Gene sets for this manuscript were downloaded from the Broad Institute's Molecular Signatures Database (MSigDB) v.7.4.; they are KEGG's mTOR pathway (KEGG\_MTOR\_SIGNALING\_PATHWAY) and Transcription Factors' CREB/cJUN pathway (CREBP1CJUN\_01) The software generates an analysis for each gene set containing the Net Enrichment Score (NES), false discovery ratio (q-value), and p-value. Gene set is considered significantly modulated if q-value and p-value <0.05.

### **3.4 – Multicolour Flow-Cytometry**

PBMCs from 15 uninfected controls and 10 HIV-infected progressors (without and with ART) were processed for flow-cytometry as previously described [14]. Briefly, live/dead exclusion was performed using Aqua-LIVE/DEAD Fixable Stain (Invitrogen Life technologies, Eugene, OR, USA). Non-specific binding sites were blocked using FACS buffer (1x PBS, 2% hi-FBS, and 0.1% sodium azide) supplemented with 20% hi-FBS, 10 µg mouse IgG (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) and 5 µg Human BD FcBlock (BD Biosciences). The following mouse anti-human conjugated mAbs were used to detect extracellular markers on B-cells: APC Anti-CD19, BB515 Anti-IgM, BV421 Anti-CD10, BUV395 Anti-CD73, BV786 Anti-CD39, PE-Cy7 Anti-CD83 (BD Biosciences), PerCP-eFluor 710 Anti-CD1c (eBioscience, San Diego, CA, USA). For means of identifying MZ and MZp B-cell populations as to CD21 expression levels, we had three different staining cocktails, each identical except for having a variation for the PE slot, ie 1) PE-anti-NR4A1, 2) PE-anti-NR4A3,

and 3) PE-anti-CD21 to verify that the MZp were indeed CD21<sup>lo</sup> when compared to MZ. For Monocyte Derived-Dendritic Cells (MoDC), the following conjugated mouse anti-human mAbs were used: PE-Cy5.5 Anti-CD11c (Invitrogen), PE-Cy7 Anti-HLA-DR, BV786 Anti-CD14, BUV737 Anti-CD16 (BD Biosciences) and PE Anti-BAFF (clone 1D6, Invitrogen). Intra-nuclear labelling was performed using the FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience). Non-specific binding sites were blocked using 20% hi-FBS. mAbs used were the PE-conjugated human REA clone anti-mouse NR4A1, which cross-reactivity with human has been previously assessed [14], and compared to the PE-conjugated human REA isotype control (Miltenyi Biotech), as well as the PE-conjugated mouse anti-human NR4A3 (Santa Cruz Biotechnology). Intra-cellular labelling for detection of IL-10 was performed using the Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set (eBioscience) and the PE mouse anti-human Anti-IL-10 mAb (Biolegend). Cells were kept at 4°C in 1.25% paraformaldehyde until analysis. Data acquisition was performed with FACSFortessa (BD-Biosciences) for blood PBMC samples, and LSRIIB (BD-Biosciences) for tonsillar samples (described below). Analyses were done with FlowJo 10 software and GraphPad Prism. All stainings were compared to that of fluorescence minus one (FMO) values and isotype controls (see gating strategy in Supplementary Figure 1). Anti-mouse Ig(κ) Compbeads and CS&T Beads were used to optimize fluorescence compensation settings and calibrate the LSRIIB, respectively.

### **3.5 – Human Tonsillar B-cells**

Human tonsils from healthy individuals, who had undergone surgical tonsillectomy, were mechanically processed and cells were cryopreserved in liquid nitrogen until use, as described above. Cells were thawed, washed in IMDM and B-cells were negatively enriched >95% by an immunomagnetic based technology (Dynabeads Untouched Invitrogen Life technologies). Total B-cells were subsequently cultured at a concentration of 10<sup>6</sup> cells/mL in IMDM supplemented with 10<sup>-4</sup> β-2-mercaptoethanol, 10% hi-FBS and 1% penicillin/streptomycin, in absence or presence of stimuli (PMA/ionomycin or human recombinant soluble BAFF/BlyS/TNFSF13B Protein (R&D System)) for 18 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Cells were cultured with Brefeldin A for the last 4 hours of incubation prior to staining for intra-cellular IL-10 expression levels. Cells were recovered and processed for flow-cytometry as stated above.



### **3.6 – qPCR characterisation of NR4A1, NR4A3 and CD83 mRNA expression levels by blood MZp B-cells**

Blood MZp B-cells expression levels of NR4A1, NR4A3 and CD83 mRNA were assessed by qPCR, on samples from two uninfected controls. Briefly, blood MZp B-cells were cell-sorted as stated above and lysed with TRIzol solution (ThermoFisher). mRNA was extracted with the phenol/chloroform technique. Quality of extracted mRNA (260/280 and 260/230 ratios) was assessed with a DS-11 FX Spectrophotometer (DeNovix, Delaware, US). RNA was considered pure when 260/280 ratio was above 1.8 and 260/2360 was above 2.0. One-step qPCR was done with the QuantiNova SYBR Green qPCR Kit (QIAGEN) by using 20 ng RNA from each donor. GADPH was used as a housekeeping gene. Primers used were: NR4A1 forward: 5'-CCAGCACTGCCAACTGGACT A-3'; NR4A1 reverse: 5'-CTCAGCAAAGCCAGGGATCTTC-3'; NR4A3 forward: 5'-CCCTTCAGACTATCTGTACGGAC-3'; NR4A3 reverse: 5'-CTCAGTGTGGAATGGTAAAAGAAG-3'; CD83 forward: 5'-TCCTGAGCTGCGCCTACAG-3'; CD83 reverse: 5'-GCAGGGCAAGTCCACATCTT-3'; GADPH forward: 5' - GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG – 3'; GADPH reverse: 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA – 3'; Ct values were determined with the thermocycler Corbett Research RotorGene 6000. Ct is the value of the numbers of cycles necessary for the number of RNA copies to reach a precise fluorescence threshold. The relative expression of mRNAs was determined by the  $\Delta$ Ct method, where Ct values of each gene are subtracted from the Ct value of the GADPH house keeping gene. mRNA expression =  $(2^{-\Delta Ct}) \times 10000$ .

### **3.7 – Breg Function Assays**

#### *3.7.1 – For assays with tonsillar populations*

Autologous MZp B-cells, CD1c- B-cells (negative control) and CD4+ T-cells were sorted (as described above for RNA-Seq) from human tonsillar samples of healthy donors. CD4+ T-cells were cultured alone or co-cultured with either of the B-cell populations at a ratio of 3:1 for 36 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, on anti-CD3 (2 µg/mL) (ULTRA-LEAF Biolegend) coated flat bottomed 96 well plates with soluble anti-CD28 (2 µg/mL) (ULTRA-LEAF Biolegend), and with or without human recombinant soluble BAFF at 500 ng/mL. The read-out of Breg function was based on cell cycle

entry of CD4<sup>+</sup> T-cells, which was assessed by flow-cytometry analyses of intra-nuclear Ki67 expression levels using the PE-mouse anti-human Ki67 mAb (eBioscience), as described above.

### *3.7.2 – For assays with blood cell populations*

Because of limited quantities of cells in our populations of interest, we proceeded to High Content Screening (HCS) assays, which read-out for Breg function was based on mortality of CD4<sup>+</sup> T-cells rather than cell cycle entry. Autologous MZp B-cells, CD1c<sup>-</sup> B-cells (negative control) and CD4<sup>+</sup> T-cells were sorted (as described above for RNA-Seq) from human PBMCs of uninfected controls and HIV-infected progressors (without and with ART) (n=3 for each study group). CD4<sup>+</sup> T-cells were cultured alone or co-cultured with either of the B-cell populations at a ratio of 3:1 for 60 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> on anti-CD3 (2 µg/mL) (ULTRA-LEAF Biolegend) coated flat bottomed 384 CellCarrier Ultra microplates (PerkinElmer) with soluble anti-CD28 (2 µg/mL) (ULTRA-LEAF Biolegend) in the presence or absence of a mouse anti-human PD1 (2 µg/mL) blocking antibody (Biolegend). CD4<sup>+</sup> T-cells were identified using a mouse-anti human CD4 (OKT4 clone) primary mAb and FITC goat anti-mouse secondary antibody (Invitrogen). The cells were then fixed using 4% paraformaldehyde before staining the nuclei with Hoescht 33342 (Invitrogen). Data acquisition was performed with Operetta and analyses done using Harmony and GraphPad Prism. The algorithm excluded debris based on Hoescht intensity, then excluded B-cells based on FITC negativity and dead cells were counted based on the intensity of Live or Dye CellMask signals of a mortality control. To this end, CD4<sup>+</sup> T-cells were cultured alone in a flat bottomed 96 well plate for 60 h in the same conditions and then collected and placed at 56°C in a water bath for 45 min. The cells were then stained with Live or Dye CellsMask for Live/Dead exclusion.

### **3.8 – MoDC:B-cell cocultures**

To assess the impact of membrane-bound BAFF on MZp expression levels of Breg markers, MoDC were generated from blood samples of healthy donors, as previously described [6] (n=2). Briefly, cryopreserved PBMCs were thawed, washed in IMDM and classical monocytes (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>) were negatively enriched >95% by an immunomagnetic based technology (Dynabeads Untouched Invitrogen Life technologies). Total CD14<sup>+</sup> monocytes were subsequently cultured at a concentration of 5x10<sup>5</sup> cells/mL in IMDM supplemented with 10<sup>-4</sup> β-2-

mercaptoethanol, 10% hi-FBS, 1% penicillin/streptomycin, 100 ng/mL Human Recombinant IL-4 and 250 ng/mL Human Recombinant GM-CSF (ThermoFisher) for six days at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. During the third day of incubation, 30% of growth conditions were reinstated. At day 6, MoDC purity was assessed by flow-cytometry as stated above (>90% of cells were HLA-DR+CD11c+CD14+/- CD16-). MoDC were subsequently cultured, with and without LPS (2 µg/ml), overnight at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. MoDC were then assessed for membrane BAFF expression levels by flow-cytometry as stated above, fixed in 0,25% paraformaldehyde, washed and co-cultured with autologous total B-cells (enriched as described above) at a 1:10 ratio overnight at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Lastly, B-cells were harvested and processed for flow cytometry as stated above.

### **3.9 – Statistical Analysis**

Statistical significance of differences between groups was assessed with a one-way ANOVA with post-hoc Tukey test for data normally distributed or otherwise with Kruskal-Wallis test with post-hoc Dunn test. Statistical significance of difference in clinical data between HIV-infected progressors before and after ART was assessed with the Wilcoxon matched-pairs test. Statistical significance of difference between HIV-infected progressors and EC was assessed with the Mann-Whitney U test. Analyses were performed using GraphPad Prism 9.1.1, on Windows. Results were considered significant when  $p < 0.05$ .

## **4 – Results**

### **4.1 – Socio-demographic characteristics of the cohorts used in this study**

Characterizations of the samples from the PHI cohort selected for this study show that there are significant differences for plasma viral loads and blood CD4+ T-cell counts between HIV-infected progressors before and after ART treatment, as expected. No significant difference for age, CD4+ T-cell counts (although a trend is observed) and CD8+ T-cell counts were found between the HIV-infected progressors (5-8 months) and EC (Table 1).

## 4.2 – Blood MZp B-cells of HIV-infected progressors show an altered transcriptomic profile

We have previously shown that HIV-infected progressors from the Montreal PHI cohort presented higher levels of both BAFF and MZp B-cell frequencies in their blood, despite 1 year ART [3]. To further assess the impact of HIV infection and associated excessive BAFF condition on deregulation of MZp, we FACS-sorted MZ and MZp B-cell populations from the blood of three PHI HIV-infected progressors (5-8 months), three EC and three uninfected controls selected from the above-mentioned study, and proceeded to transcriptomic analyses by RNA-seq. As depicted in Figure 1, PCA analyses of the top 5000 varying genes show that the gene expression profiles of blood MZ and MZp B-cell populations from the HIV-infected progressors present a distinct pattern when compared to that of both EC and uninfected controls, who share greater similarity (Fig. 1A). Given this similarity and the scope of this manuscript, we then generated a heat map of the top 100 differently expressed genes (DEG) between blood MZp B-cells of the HIV-infected progressors and uninfected controls. We show that among those, Interferon Stimulated Genes (ISG) such as OAS1 ( $p = 3 \times 10^{-6}$ ), SAMHD1 ( $p = 5 \times 10^{-6}$ ) and SP110 ( $p = 3 \times 10^{-10}$ ) are significantly upregulated in MZp from the HIV-infected progressors, whereas genes that have a role in regulation are severely downregulated in MZp from these same individuals (Fig. 1B and see Figure 2). The DEG were also analysed by a volcano plot, showing that 709 genes are significantly downregulated and 392 are significantly upregulated in blood MZp B-cells from the HIV-infected progressors (Fig. 1C) when compared to uninfected controls. Gene Set Enrichment Analyses (GSEA) show that both PI3K-AKT-mTOR and CREB/cJUN signatures are downregulated in blood MZp B-cells from the HIV-infected progressors (Fig. 1D and 1E, and Supplementary Figure 2). Consistently, blood MZp B-cells from the HIV-infected progressors express higher levels of gene transcripts for exhaustion markers such as T-bet ( $p = 0,1$ ) and CD11c ( $p = 0,009$ ), FCRL5 ( $p = 0,003$ ) and CD85j ( $p = 0,007$ ), as well as the negative regulators CD22 ( $p = 0,05$ ) and CD72 ( $p = 0,003$ ) (Fig. 1F-K) when compared to blood MZp B-cells from uninfected controls. Altogether, these results suggest that HIV progressive infection greatly solicits the activities of MZ B-cell populations, which leads to changes in their transcriptomic profile and possibly functional impairment, especially in the MZp B-cell sub-population, which present signs of exhaustion.

### **4.3 – Blood MZp B-cells from HIV-infected progressors express lower levels of regulatory markers**

Consistent with the severely altered profiles described above, we found highly significant downregulation of gene transcripts for the NR4A family members in blood MZp B-cells of the HIV-infected progressors. Indeed, gene expression levels of NR4A1 ( $p = 0,01$ ), NR4A2 ( $p = 3 \times 10^{-9}$ ), NR4A3 ( $p = 1 \times 10^{-36}$ ) as well as genes that they regulate directly such as CD83 ( $p = 3 \times 10^{-9}$ ) and IL-6 ( $3 \times 10^{-6}$ ) (Fig. 2A-E) were very significantly downregulated in blood MZp B-cells from the HIV-infected progressors when compared to that of uninfected controls. We next sought to assess whether the transcriptomic downregulation of Breg markers was suggestive of their protein downregulation. To this end, blood samples from 15 uninfected controls and 10 HIV-infected progressors (before and after ART) were selected, including samples from the individuals selected for the RNA-seq analyses. We have measured the protein expression levels of the Breg markers NR4A1, NR4A3, CD83, CD39 and CD73 by multicolour flow-cytometry on MZp B-cells from the blood of these individuals. As expected, protein expression levels of NR4A1, NR4A3, CD83 and CD73 were downregulated by blood MZp B-cells from HIV-infected progressors when compared to those of uninfected controls (Fig. 2G-K). Strikingly, ART did not restore expression levels of these Breg markers and some of them, such as NR4A3 and CD83 were further downregulated despite ART (Fig. 2L-P). Of note, consistent with that reported previously, membrane BAFF levels are found to be in excess in samples from these HIV-infected progressors and are not restored by ART (Fig. 2Q-R). Also, as expected, MZp frequencies in the blood of these HIV-infected progressors, without and with ART, were significantly higher when compared to that of uninfected controls (Fig. 2S). However, no significant correlation between MZp frequencies and BAFF levels could be observed for HIV-infected progressors ( $R: 0,1$ ;  $p$  value  $0,95$ ) or after ART treatment ( $R: 0,3$ ;  $p$  value  $0,6833$ ). Of note, the small numbers of samples in our groups did not allow us to reach significance for correlations between blood BAFF levels and MZp frequencies, however we have reported excess BAFF to be concomitant with increased MZp frequencies in several cohorts and study systems. Our data suggest that MZp Breg capacities may be altered in HIV-infected progressors, regardless of therapy. These data also suggest that excess BAFF might contribute to altering the Breg profile of MZp.

#### **4.4 – The Breg function of blood MZp B-cells of HIV-infected progressors is altered, despite ART**

Given the important downregulation of Breg markers by blood MZp B-cells from HIV-infected progressors, and despite ART, we next sought to investigate whether the Breg function of MZp B-cells is altered in these individuals. In order to manage with the low cellular yields of MZp B-cells in blood, High Content Screening (HCS) by fluorescence in a confocal mode was used to assess the Breg function of sorted MZp B-cells on activated autologous CD4<sup>+</sup> T-cells (Fig. 3 A-D). We observe for uninfected controls that while cell count, as determined by the amount of positive CD4<sup>+</sup> cells in each analysed well (indicator of proliferation), seemed to be the same when CD4<sup>+</sup> T-cells were cultured alone or co-cultured with either of MZp or CD1c<sup>-</sup> B-cells (negative control) (Fig 3E), mortality rates of CD4<sup>+</sup> T-cells were strikingly higher in the MZp:T-cell co-culture, suggesting regulation by controlled cell death (Fig. 3F). As such, induction of apoptosis is a common regulatory function, and has been described for Tregs [27]. Accordingly, we find that MZp B-cells strongly express PD-L1 when compared to other B-cell subtypes (Supplementary Figure 3). Furthermore, the addition of an anti-PD-1 blocking antibody to the MZp:T-cell co-culture diminished the mortality rates of CD4<sup>+</sup> T-cells, thus supporting a role for the PD-1/PD-L1 pathway in MZp Breg function (Fig. 3H). However, when assessing the Breg function for blood MZp from HIV-infected progressors, our results rather suggest that there is a lower induction of CD4<sup>+</sup> T-cell mortality in presence of MZp, and strikingly, despite ART (Fig. 3G). Altogether, our data suggest that HIV-infection affects the Breg function of blood MZp B-cells, and this is not restored by ART.

#### **4.5 – Excess BAFF alters the Breg potential of MZp B-cells**

Our RNA-seq analyses show that gene expression levels of BAFF-R were significantly down-regulated by MZp from the blood of HIV-infected progressors when compared to uninfected controls, while those of TACI and BCMA were not significantly affected (Supplementary Figure 4), albeit a trend for BCMA up-regulation by blood MZp from HIV-infected progressors could be observed. To assess the relative contribution of excess BAFF on deregulation of MZp Breg capacities, blood MZp B-cells from healthy donors have been sorted and cultured in presence of

soluble BAFF at 50 ng/mL or 500 ng/mL overnight. Cells were then harvested for RNA extraction and a one-step qPCR for NR4A1, NR4A3 and CD83 mRNA quantification was performed, with GADPH as a housekeeping gene. Our data show that at high concentration (500 ng/mL), BAFF-treated blood MZp B-cells express lower NR4A1, NR4A3 and CD83 mRNA levels when compared to unstimulated MZp B-cells, similarly to that of sorted MZp B-cells from the blood of HIV-infected individuals (Fig. 4A-C). Likewise, we enriched total B-cells from the tonsils of healthy donors and cultured them overnight with soluble BAFF at increasing concentrations. We found that tonsillar MZp B-cells treated with high BAFF concentrations show lower expression levels of NR4A1 and CD83 proteins when compared to those treated with lower BAFF concentrations or medium alone (Fig. 4D-G). Interestingly, we found that as soluble BAFF concentrations increase, IL-10 expression levels decrease (Fig. 4 H, I). Of note, we had previously shown that IL-10 is highly expressed by *ex vivo* unstimulated blood MZp B-cells, when compared to other B-cell populations ([22], and Supplementary Figure 5).

Upon performing experiments with enriched tonsillar B-cells from healthy donors, we observed that the total tonsillar cells from different donors expressed varying levels of total membrane BAFF (Fig 4L). This difference was mainly attributable to DC-like (HLA-DR+CD11c+CD14-CD3-CD19-) and MoDC-like (HLA-DR+CD11c+CD14+CD3-CD19-) populations, as membrane BAFF expression on T-cells was similar between the donors (Fig 4 M-O). Strikingly, tonsils expressing higher total membrane BAFF levels show reduced MZp Breg function, while tonsils expressing lower BAFF levels show a MZp Breg function comparable to that expected at a 1:3 ratio [14] (Fig. 4J-K). Interestingly, this latter Breg function is altered upon addition of high levels of soluble BAFF (Fig. 4P). To further investigate the impact of membrane BAFF levels on MZp Breg capacities, blood derived MoDC stimulated with LPS prior to paraformaldehyde fixation (Supplementary Figure 6), were co-cultured overnight with autologous blood B-cells at a 1:10 ratio. Blood MZp B-cells expression of regulatory markers were then assessed by flow-cytometry (Supplementary Figure 6). Results show a trend for the downregulation of NR4A1 and NR4A3 expression levels. These observations are suggesting that DC-like and MoDC-like populations in secondary lymphoid tissue, which are known to interact with B-cell populations such as MZ B-

cells [11], may influence MZp Breg activity through membrane and/or released BAFF expression levels.

## 4 – Discussion

We have previously shown that excess BAFF in the blood of HIV-infected progressors was concomitant with deregulation of the blood B-cell compartment, notably with increased frequencies of MZp B-cells [3], despite ART. In this study, we report that blood MZ populations, especially MZp B-cells from HIV-infected progressors present a different transcriptomic profile when compared to that of EC and uninfected controls, suggestive of their being highly solicited and functionally impaired, with signs of exhaustion. Importantly, differences include the significant downregulation of gene transcripts for the molecules NR4A1, NR4A2, NR4A3 and CD83, which we have previously associated with the Breg potential of MZp B-cells in healthy individuals [14]. Furthermore, the protein expression levels of these molecules as well as those of CD73, also associated with regulatory capacities [28], are downregulated in blood MZp B-cells of HIV-infected progressors, and despite ART. Even more importantly, we found that the Breg function of blood MZp B-cells is impaired in HIV-infected and ART treated individuals. Consistent with our previous observations [3], levels of BAFF were found to be in excess in the blood of HIV-infected and ART treated individuals selected for this study, when compared to uninfected controls. Importantly, *in vitro* studies show that high levels of BAFF impact on the expression of regulatory proteins by MZp B-cells from tonsils of healthy donors and have a direct effect on their Breg function.

Our findings obtained through transcriptomic analyses of samples from the blood of EC are consistent with our previous reports showing that frequencies of MZp B-cells were not altered in the blood of EC when compared to uninfected controls, consistent with the non-excessive BAFF expression levels found in these individuals. Also, we have shown that highly HIV-exposed seronegative (HESN) Beninese female commercial sex workers (CSWs) presented lower levels of BAFF in their blood and genital mucosa when compared to both HIV-infected CSWs and uninfected controls, and MZp B-cell frequencies were not affected [9]. Altogether, suggesting that regulated BAFF levels and MZp B-cell integrity may be important in natural immunity to HIV.



Alternatively, excess BAFF may drive MZp B-cell alterations and contribute to impaired immune competence, as described herein.

Our results are also consistent with early observations we had made with HIV-Tg mice [7], which, along with excess BAFF, presented enlarged splenic marginal zones, similarly to that observed with BAFF-Tg mice [29]. These are consistent with the importance of BAFF signals for selecting the MZ B-cell pool [30], and with the fact that BAFF promotes NOTCH2 expression [31], which signaling is pivotal for commitment to the MZ B-cell fate [32]. It is therefore reasonable to think that in the context of excess BAFF, there may be some skewing towards the MZ B-cell profile. Also, BAFF levels may dictate MZ B-cell activities, from Breg to antibody production, which in the context of HIV may be expedited, bypassing the Breg capacity, for tentative eradication purposes. More so given the fact that MZ B-cells were shown to naturally bind to glycosylated proteins such as those of HIV Env and to produce first-line antibodies, some of which presented reactivity to HIV Env proteins [12]. Moreover, mice immunized with HIV Env after a treatment with BAFF presented increased MZ B-cells and produced neutralizing antibody responses [33], which could suggest a contribution of MZ B-cells to the production of these antibodies, either directly and/or via follicular shuttling and germinal center promotion [34]. These are suggesting that in the context of HIV, which we characterized as a persistent excessive BAFF environment, MZ populations may be highly solicited, selected, and expanded to produce antibodies at the expense of their immune surveillance competence. Nevertheless, whether MZ B-cells antibody responses are beneficial or a nuisance to the host in the context of HIV remains to be established. As such, given the facts that HIV-Tg and BAFF-Tg animals presented breakage of tolerance and autoimmunity [7, 29, 35, 36], and that excess BAFF and MZ B-cell deregulations have also been reported in the context of autoimmune diseases such as Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and Sjögren Syndrome (SS) [37], it would be sound to bear in mind that MZ B-cell antibody responses in the context of excess BAFF may be nourishing polyclonal, possibly auto-reactive, low-affinity antibody responses, whose pertinence in the battle against HIV have yet to be determined.

Notably, individuals with SLE or SS present a strong IFN signature, which promotes BAFF expression, reminiscent of what was observed in the context of chronic infections such as with HIV [38, 39]. Thus, unsurprisingly, we found that genes that are associated with pro-inflammatory

outcomes and ISG are upregulated in blood MZp B-cells of HIV-infected progressors. As such, we found that transcripts for genes involved in the regulation of IFN responsiveness such as OAS1, SP110 and IRF7 are highly upregulated in MZp B-cells of HIV-infected progressors when compared to EC or uninfected controls. These data suggest that MZp B-cells are in a hyperactive state in the context of HIV, in a similar manner to that observed in autoimmune diseases such as SLE or SS.

Our GSEA analyses show that the major PI3K-AKT-mTOR pathway is downregulated in blood MZp B-cells from HIV-infected progressors. mTOR has been shown to be important for normal MZ B-cell function, as TACI signaling converge towards mTOR in order to lower MZ activation threshold [40], which is in accordance with their role as first-line innate-like cells that respond quickly to blood borne pathogens [11]. Interestingly, the transcript for the gene coding for BAFF-R is significantly downregulated by blood MZp B-cells of HIV-infected progressors while the transcript for TACI remains highly expressed (Supplementary Figure 4). It is therefore possible that BAFF signals are mostly mediated via TACI during HIV infection. Importantly, the binding of BAFF to TACI allows the recruitment of TRAFs such as TRAF3 [41], which has been shown to inhibit the CREB pathway in B-cells [42], known to induce the expression of the NR4As [43, 44], and which we find is also downregulated in MZp B-cells from HIV-infected progressors. Of note, a trend of low TRAF6 gene transcripts were found in HIV-infected individuals ( $p = 0,1$ ), but not TRAF3 (Supplementary Figure 4), which could mean that TRAF3 could see a higher recruitment rate due to a lower competition for TACI signals. This data suggests that the excess BAFF found in the HIV context may lead to CREB and NR4As downregulation via excess TACI signaling, and thus excess TRAF3 recruitment. Given the importance of CREB and NR4As in controlling cell activation [45], it is possible that their downregulation allows for MZp B-cells to maintain a hyperactive state despite mTOR downregulation. The fact that gene expression levels of BCMA show a trend for upregulation by blood MZp from HIV-infected progressors when compared to uninfected controls, could suggest differentiation towards an early plasmablast stage, as they also express CD38 (Supplementary Figure 4L).

Importantly, NR4A1, NR4A2 and NR4A3 gene transcripts were downregulated in a highly significant manner in MZp B-cells from the blood of HIV-infected individuals, with  $p$  values reaching orders of magnitude of 0,01,  $10^{-9}$  and  $10^{-36}$ , respectively. As well, other important

regulatory molecules that are directly modulated by NR4As such as CD83 and IL-6 [17] were also significantly downregulated. Consistently, blood MZp B-cells from HIV-infected individuals presented significantly lower protein expression levels of NR4A1, NR4A3, and CD83, and this was not restored by ART. The importance of NR4A transcription factors in immune regulation has been highlighted by the fact that NR4A1-3 double knockout mice develop systemic autoimmune diseases [46]. Furthermore, in humans, downregulation of NR4As has been observed in the context of autoimmunity [46] and certain leukemia [47] whereby synthetic regulation of NR4A expression is currently used for eliminating cancerous cells [48]. Also, since expression of NR4As is necessary for the maintenance of FoxP3 expression by Tregs [16], there have been reports of several studies where those genes are targeted to modulate Treg responses in cancer [48]. Moreover, increasing NR4A1 expression in myeloid cells led to a diminished T-cell activation profile [20]. It is thus reasonable to think that NR4A modulation could be envisaged in view of restoring MZp Breg capacities, possibly in conjunction with therapies reducing excessive BAFF levels, already FDA approved in the treatment of SLE.

We found similar observations for the ectonucleotidase CD73, the limiting molecule of the ADO pathway [49]. Others have reported that the diminution of CD73+ B-cells and CD39+CD73+ B-cells correlated with a loss of CD4+ T-cells and disease progression during HIV infection [50], [51]. Interestingly, the HIV context is also associated with downregulated CD39 and CD73 expression levels in Tregs, despite ART [52]. In other chronic infections, such as hepatitis, a loss of CD73 and CD39 has also been observed and associated with viral load and high levels of inflammation [53]. It is also important to remember that ADO has been found to modulate NR4As expression levels via purinergic receptors such as A2A [54]. Therefore, the loss of CD39 and CD73 can contribute to a reduction of extracellular ATP conversion into ADO, which could promote a pro-inflammatory environment caused by the accumulation of extracellular ATP and a decrease of NR4A expression due to a decrease in the interaction between ADO and its receptors. Since the mTOR pathway is upregulated by the binding of ADO to its receptors [55], it is possible that the lower levels of ADO production by regulatory cell populations (MZp B-cells and others) contribute to the downregulation observed for the mTOR pathway.

Interestingly, we noticed that gene transcripts for Breg markers such as IL-10 and the IL-10 regulatory transcription factor aryl hydrocarbon receptor (Ahr) (recently shown to be an important Breg marker in mice) [56] were not affected in blood MZp from HIV-infected progressors, whereas others such as transcription factor basic helix-loop-helix family member e40 (BHLHE40), also involved in IL-10 regulation, were diminished (Supplementary Figure 4).

Consistent with their loss of Breg markers, we show that blood MZp B-cells from HIV-infected and ART treated individuals lose their Breg function. We have previously shown that MZp B-cells from healthy individuals can control CD4<sup>+</sup> T-cell proliferation and that this involves signals delivered via CD83 [14]. Here, we show that the control of MZp B-cells on the activation of autologous CD4<sup>+</sup> T-cells may also involve controlled cell-death and PD-1/PD-L1 signalling. Consistently, the reduced Breg function observed for blood MZp from HIV-infected progressors, without and with ART, is concomitant with their lowered expression levels of PD-L1 (Supplementary Figure 3). Of note, the differences observed between PD-L1 gene transcripts, which expression levels were not affected in blood MZp from HIV-infected progressors, and PD-L1 protein expression levels, which were decreased, suggests that protein expression of PD-L1 could be affected by post-transcriptional mechanisms.

Further studies are needed to confirm the relative involvement of all markers engaged in MZp Breg function. Nevertheless, we find that the Breg function of MZp B-cells is equally altered in HIV-infected and ART treated individuals, which suggests that therapy cannot restore Breg function of MZp. We could hypothesize that the Breg function is altered because of the downregulation of NR4As and CD83, or PD-L1. However, further studies are needed to confirm it. It could be interesting in a near future to measure the ADO production, which is also considered to be part of an efficient Breg function. In other chronic infections, the loss of CD73 and CD39 by B-cells has been associated with a loss of ADO production [50]. Since we observed a diminution of CD73 expression by MZp B-cells, we could hypothesize that their ADO production is also altered. Importantly, we show that excess BAFF can directly impact on MZp B-cells Breg capacities. Indeed, gene and protein expression levels of the regulatory markers NR4A1, NR4A3 and CD83 were downregulated in presence of high soluble and membrane BAFF levels, which also

had an impact on IL-10 production, which could contribute further to the loss of Breg function in these cells.

When performing *in vitro* studies with tonsils from healthy donors, we noticed that BAFF levels varied between each donor and even between both tonsils from the same donor, which is why it became important to characterise each tonsil prior to any functional experiment. Due to this variability in BAFF expression levels, some donors only needed a lower concentration (250 ng/mL) of soluble BAFF to exert downregulation of regulatory molecules, as others needed higher concentrations (500 ng/mL) to observe the same effect. Variations of BAFF levels between each donor appear to be especially attributable to levels expressed by myeloid cells such as DC-like and MoDC-like populations. As such, DC are an important source of BAFF, and have been shown to interact with B-cells in T-independent manners [11] and could have thus modulated the tonsillar MZ B-cell environment. Of note, in HIV-Tg mice, we had observed that myeloid DCs accumulated in the expanded MZ of these mice [57]. We had previously published that HIV infection increases BAFF levels on DC and MoDCs via Nef [6]. Likewise, elements of microbial translocation, such as LPS were also shown to increase BAFF expression by MoDCs ([6], Supplementary Figure 6). Our findings point to BAFF as being a main contributor to the loss of immune surveillance in the context of HIV. Similar to that observed for SLE and other rheumatic disorders, there is growing evidence that BAFF is in excess in contexts of cancer, and could also play a role in the pathogenesis of several inflammatory chronicity such as, multiple sclerosis, and HBV infection [38]. Suggesting that excess BAFF and deregulated MZp may be important indicators of deterioration of immune-competence. Altogether, our data suggest that in the context of HIV (and possibly even in other contexts), excess BAFF, and perhaps other inflammation factors, are involved in the loss of MZp Breg potential.

Since our results suggest that MZp Breg potential is altered in the context of HIV, we wanted to know if it could be due to exhaustion, as is the case for Tregs. As such, we found relatively higher gene expression levels of exhaustion markers such as FCRL5 and CD85j and negative regulators such as CD22 and CD72 in blood MZp B-cells of HIV-infected progressors when compared to uninfected controls, which suggest a higher activation index. Also, MZp B-cells express both IL-21R and TLR7 (Supplementary Figure 4), which signals are important to drive B-

cell differentiation towards an “age associated”-like exhausted B-cell profile. As such, blood MZp B-cells from HIV-infected progressors also possess higher gene expression levels of T-bet and CD11c, a characteristic related to age-associated B-cells and shared by a similar heterogeneous population found to be expanded in autoimmunity, chronic infections, antibody-mediated rejection in organ transplants [58-60], and in critically ill patients with SARS-CoV-2 [61]. Interestingly, B-cells that express T-bet and CD11c have been associated with their accumulation at extra-follicular sites and production of immunoglobulins (Ig) of poor affinity [62].

To date, many groups have identified MZ-like populations with Breg capacities vs T-cells, in non-cognate fashions, *in vitro*, in murine models and in humans (Recently Reviewed by [63]). Herein, our data suggest that such Breg capacity of MZp is greatly reduced in HIV-infected progressors, and not restored by ART. And this possibly involves excessive BAFF levels reported for these individuals. As to whether MZp can exert their Breg functions through cognate interactions with CD4+ T-cells, needs further experimentation and is beyond the scope of our manuscript but deserves to be addressed. Mouse MZ B-cell populations have been shown to migrate to T-cell zones of secondary lymphoid organs (SLO) and activate CD4+ T-cells in a HEL-dependent manner [64]. This, and the fact that MZ B-cell populations have the capacity to shuttle to follicular areas [34] and furthermore that MZ B-cells were shown to possess an atheroprotective role attributed to their NR4A1 expression [65, 66], all point to the capacity of MZ populations to be recruited to outer MZ areas of SLO, in given situations. Furthermore, MZ B-cells are able to present lipidic antigens to invariant natural killer T-cells (iNKT), in the context of CD1, which confer activation via notably, the CD40-CD40L pathway [67]. All of which supporting their influence on several cell types. The capacity of MZ B-cell populations to perform antigen presentation, Breg activity or to differentiate towards Ig production may be dictated by the overall situation and environment.

## **5 – Conclusion**

There is a limitation of our study in the number of participants, and we believe adding further contributors in future will strengthen the interpretation of our data. Nevertheless, the present study sheds some light in a better understanding of the important Breg potential of MZp

B-cells, and its deregulation in the context of chronic inflammation involving excess BAFF, such as encountered in HIV infection. Importantly, MZp Breg potential was not restored by therapy. Our observations are essential to help develop strategies viewed at restoring MZp immune surveillance activities. To this end, existing strategies, such as dihydroergotamine (DHE) viewed to upregulate NR4As expression levels could be envisaged to reinstate MZp Breg capacities. Also, BAFF-blocking therapies, such as Belimumab (Benlysta), which is FDA approved in treating SLE, could be contemplated to try to control BAFF levels in order to lower the inflammatory burden and restore B-cell immune competence.

### **Acknowledgements**

We are grateful for Mario Legault for the clinical data. We are grateful to Raphaële Lambert, Jennifer Huber, and Patrick Gendron (IRIC Genomic and Bioinformatics core facilities) for RNASeq transcriptomic and data analyses, respectively. We are grateful to Guillaume Beaudoin-Bussières for the help with the BSL3 cell culture. We are also grateful to Erik Joly for his help during troubleshooting and for establishing the algorithm for HCS experiment. We are grateful to Dre Dominique Gauchat, Philippe St-Onge and Gaël Dulude for their support in the CHUM cytometry platform. We're grateful to Audray Fortin and Elise Caron for their help in establishing the HCS protocol. And lastly, we're grateful for the patients who graciously donated the samples required for this study.

### **Conflict of Interest**

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

### **Author Contributions**

KDL, MA, JP managed all the parameters regarding the study participants. JCC prepared the samples for RNA-sequencing (IRIC). KDL and MA performed the flow-cytometry and Breg experiments. KDL performed Breg experiments by HCS. MA performed the qPCR, and MoDC experiments. MB did the first assays with soluble BAFF and tonsillar samples. KDL, MA, JP, MR analyzed the data and wrote the article. MP and MA performed the Volcano plot and GSEA

statistical analyses. KDL and MA produced graphs and layouts. JP and MR designed the concept. JPR and CT manage the Montreal LTNP and PHI cohorts, and provided all the blood samples. MCQ, NB and DEK managed and provided the human tonsillar samples. All authors revised the last version of the manuscript.

### **Funding**

This work was supported by grant # PJT-148529 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and by the Réseau SIDA from the Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS). D.E.K. is a FRQS Merit Research Scholar.



## 6 – References

1. UNAIDS, Global HIV & AIDS statistics - Fact sheet. 2021.
2. De Pablo-Bernal, R.S., et al., TNF- $\alpha$  levels in HIV-infected patients after long-term suppressive cART persist as high as in elderly, HIV-uninfected subjects. *J Antimicrob Chemother*, 2014. 69(11): p. 3041-6.
3. 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.
4. Moir, S. and A.S. Fauci, B cells in HIV infection and disease. *Nature reviews. Immunology*, 2009. 9(4): p. 235-245.
5. Poudrier, J., J. Chagnon-Choquet, and M. Roger, Influence of Dendritic Cells on B-Cell Responses during HIV Infection. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012. 2012: p. 592187.
6. Chagnon-Choquet, J., et al., HIV Nef Promotes Expression of B-Lymphocyte Stimulator by Blood Dendritic Cells During HIV Infection in Humans. *The Journal of Infectious Diseases*, 2014. 211(8): p. 1229-1240.
7. 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. 173-185.
8. 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-e0131513.
9. Fourcade, L., et al., Natural Immunity to HIV is associated with Low BLyS/BAFF levels and low frequencies of innate marginal zone like CD1c+ B-cells in the genital tract. *PLOS Pathogens*, 2019. 15(6): p. e1007840.

10. Sabourin-Poirier, C., et al., Blood B Lymphocyte Stimulator (BLyS)/BAFF levels may reflect natural immunity to HIV in highly exposed uninfected Beninese Commercial Sex Workers. *Scientific reports*, 2016. 6: p. 32318-32318.
11. Cerutti, A., M. Cols, and I. Puga, Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nature reviews. Immunology*, 2013. 13(2): p. 118-132.
12. 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. *The Journal of Immunology*, 2006. 176(7): p. 3931-3941.
13. Henrick, B.M., et al., TLR10 Senses HIV-1 Proteins and Significantly Enhances HIV-1 Infection. *Frontiers in immunology*, 2019. 10: p. 482-482.
14. Doyon-Laliberté, K., et al., NR4A Expression by Human Marginal Zone B-Cells. *Antibodies (Basel, Switzerland)*, 2019. 8(4): p. 50.
15. Sekiya, T., et al., Nr4a receptors are essential for thymic regulatory T cell development and immune homeostasis. *Nat Immunol*, 2013. 14(3): p. 230-7.
16. Bandukwala, H.S. and A. Rao, 'Nurr'ishing Treg cells: Nr4a transcription factors control Foxp3 expression. *Nat Immunol*, 2013. 14(3): p. 201-3.
17. Duren, R.P., S.P. Boudreaux, and O.M. Conneely, Genome Wide Mapping of NR4A Binding Reveals Cooperativity with ETS Factors to Promote Epigenetic Activation of Distal Enhancers in Acute Myeloid Leukemia Cells. *PLoS One*, 2016. 11(3): p. e0150450.
18. Ashouri, J.F. and A. Weiss, Endogenous Nur77 Is a Specific Indicator of Antigen Receptor Signaling in Human T and B Cells. *J Immunol*, 2017. 198(2): p. 657-668.
19. Odagiu, L., et al., Role of the Orphan Nuclear Receptor NR4A Family in T-Cell Biology. *Frontiers in Endocrinology*, 2021. 11(1107).
20. Tel-Karthaus, N., et al., Nuclear Receptor Nur77 Deficiency Alters Dendritic Cell Function. *Frontiers in Immunology*, 2018. 9(1797).

21. Iizuka-Koga, M., et al., Induction and maintenance of regulatory T cells by transcription factors and epigenetic modifications. *J Autoimmun*, 2017. 83: p. 113-121.
22. 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-e101949.
23. Mercier, F., et al., Persistent human immunodeficiency virus-1 antigenaemia affects the expression of interleukin-7R $\alpha$  on central and effector memory CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell subsets. *Clin Exp Immunol*, 2008. 152(1): p. 72-80.
24. Love, M.I., W. Huber, and S. Anders, Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 2014. 15(12): p. 550.
25. Subramanian, A., et al., Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005. 102(43): p. 15545-15550.
26. Mootha, V.K., et al., PGC-1 $\alpha$ -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature Genetics*, 2003. 34(3): p. 267-273.
27. Schmidt, A., N. Oberle, and P. Krammer, Molecular Mechanisms of Treg-Mediated T Cell Suppression. *Frontiers in Immunology*, 2012. 3(51).
28. Saze, Z., et al., Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. *Blood*, 2013. 122(1): p. 9-18.
29. Mackay, F., et al., Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *The Journal of experimental medicine*, 1999. 190(11): p. 1697-1710.
30. Smulski, C.R. and H. Eibel, BAFF and BAFF-Receptor in B Cell Selection and Survival. *Frontiers in Immunology*, 2018. 9(2285).
31. Jia, W., et al., BAFF promotes heightened BCR responsiveness and manifestations of chronic GVHD after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, 2021. 137(18): p. 2544-2557.

32. Lechner, M., et al., Notch2-mediated plasticity between marginal zone and follicular B cells. *Nature Communications*, 2021. 12(1): p. 1111.
33. Dosenovic, P., et al., BlyS-Mediated Modulation of Naive B Cell Subsets Impacts HIV Env-Induced Antibody Responses. *The Journal of Immunology*, 2012. 188(12): p. 6018-6026.
34. Cinamon, G., et al., Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nature immunology*, 2008. 9(1): p. 54-62.
35. Hanna, Z., et al., Transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1 in immune cells develop a severe AIDS-like disease. *Journal of virology*, 1998. 72(1): p. 121-132.
36. 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.
37. Steri, M., et al., Overexpression of the Cytokine BAFF and Autoimmunity Risk. *New England Journal of Medicine*, 2017. 376(17): p. 1615-1626.
38. Nakayamada, S. and Y. Tanaka, BAFF- and APRIL-targeted therapy in systemic autoimmune diseases. *Inflammation and Regeneration*, 2016. 36(1): p. 6.
39. Borhis, G., et al., B-Cell-Activating Factor and the B-Cell Compartment in HIV/SIV Infection. *Frontiers in Immunology*, 2017. 8(1338).
40. Sintes, J., et al., mTOR intersects antibody-inducing signals from TACI in marginal zone B cells. *Nature Communications*, 2017. 8(1): p. 1462.
41. Yi, Z., et al., Roles for TNF-receptor associated factor 3 (TRAF3) in lymphocyte functions. *Cytokine & growth factor reviews*, 2014. 25(2): p. 147-156.
42. Mambetsariev, N., et al., Nuclear TRAF3 is a negative regulator of CREB in B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016. 113(4): p. 1032.
43. Volakakis, N., et al., NR4A orphan nuclear receptors as mediators of CREB-dependent neuroprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010. 107(27): p. 12317.

44. Bridi, M.S., et al., Pharmacological Activators of the NR4A Nuclear Receptors Enhance LTP in a CREB/CBP-Dependent Manner. *Neuropsychopharmacology*, 2017. 42(6): p. 1243-1253.
45. Wen, A.Y., K.M. Sakamoto, and L.S. Miller, The role of the transcription factor CREB in immune function. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2010. 185(11): p. 6413-6419.
46. Safe, S., et al., Nuclear receptor 4A (NR4A) family - orphans no more. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 2016. 157: p. 48-60.
47. Boudreaux, S.P., et al., Drug targeting of NR4A nuclear receptors for treatment of acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2019. 33(1): p. 52-63.
48. Deutsch, A.J., et al., The nuclear orphan receptors NR4A as therapeutic target in cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem*, 2012. 12(9): p. 1001-14.
49. Antonioli, L., et al., CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in molecular medicine*, 2013. 19(6): p. 355-367.
50. Chang, W.-X., et al., Skewed CD39/CD73/adenosine pathway in B cells is associated with innate immune hyperactivation in chronic HIV-1 infection. *Translational Medicine Communications*, 2019. 4(1): p. 4.
51. Kim, E.S., et al., Down-regulation of CD73 on B cells of patients with viremic HIV correlates with B cell activation and disease progression. *J Leukoc Biol*, 2017. 101(5): p. 1263-1271.
52. Rothan, C., et al., Antiretroviral therapy-treated HIV-infected adults with coronary artery disease are characterized by a distinctive regulatory T-cell signature. *Aids*, 2021. 35(7): p. 1003-1014.
53. Zhou, S.-N., et al., Skewed CD39/CD73/adenosine pathway contributes to B-cell hyperactivation and disease progression in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology Report*, 2020. 9(1): p. 49-58.
54. Crean, D., et al., Adenosine Modulates NR4A Orphan Nuclear Receptors To Attenuate Hyperinflammatory Responses in Monocytic Cells. *J Immunol*, 2015. 195(4): p. 1436-48.

55. Allard, B., et al., The adenosine pathway in immuno-oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2020. 17(10): p. 611-629.
56. Piper, C.J.M., et al., Aryl Hydrocarbon Receptor Contributes to the Transcriptional Program of IL-10-Producing Regulatory B Cells. *Cell Reports*, 2019. 29(7): p. 1878-1892.e7.
57. Poudrier, J., et al., The AIDS-Like Disease of CD4C/Human Immunodeficiency Virus Transgenic Mice Is Associated with Accumulation of Immature CD11bHi Dendritic Cells. *Journal of Virology*, 2003. 77(21): p. 11733-11744.
58. Louis, K., et al., T-bet+CD27+CD21- B cells poised for plasma cell differentiation during antibody-mediated rejection of kidney transplants. *JCI insight*, 2021. 6(12): p. e148881.
59. Austin, J.W., et al., Overexpression of T-bet in HIV infection is associated with accumulation of B cells outside germinal centers and poor affinity maturation. *Sci Transl Med*, 2019. 11(520).
60. Knox, J.J., D.E. Kaplan, and M.R. Betts, T-bet-expressing B cells during HIV and HCV infections. *Cellular immunology*, 2017. 321: p. 26-34.
61. Woodruff, M.C., et al., Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. *Nature Immunology*, 2020. 21(12): p. 1506-1516.
62. Knox, J.J., et al., T-bet+ B cells are induced by human viral infections and dominate the HIV gp140 response. *JCI insight*, 2017. 2(8): p. e92943.
63. Mauri, C., Novel Frontiers in Regulatory B cells. *Immunol Rev*, 2021. 299(1): p. 5-9.
64. Attanavanich, K. and J.F. Kearney, Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells. *J Immunol*, 2004. 172(2): p. 803-11.
65. Nus, M., et al., Marginal zone B cells control the response of follicular helper T cells to a high-cholesterol diet. *Nature Medicine*, 2017. 23(5): p. 601-610.
66. Nus, M., et al., NR4A1 Deletion in Marginal Zone B Cells Exacerbates Atherosclerosis in Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 0(0): p. ATVBAHA.120.314607.

67. Bialecki, E., et al., Role of marginal zone B lymphocytes in invariant NKT cell activation. *J Immunol*, 2009. 182(10): p. 6105-13.

## Figure Legends

### Table 1

**Sociodemographic and data characteristics of the cohorts used for the RNAseq and flow cytometry analyses.** Statistical analyses were done between samples selected from HIV-infected progressors (HIV+) and elite controllers (EC), and between HIV+ untreated (ART-) and treated (ART+) individuals. Statistical significance of difference in clinical data between HIV-infected progressors before and after ART was assessed with the Wilcoxon matched-pairs test. Statistical significance of difference between HIV-infected progressors and EC was assessed with the Mann-Whitney U test

### Figure 1

**The transcriptomic profile of blood marginal zone (MZ) B-cell populations from HIV infected progressors is different from that of elite controllers and healthy individuals.** Data exploration of the transcriptomic analyses by RNAseq of sorted mature marginal zone (MZ) and MZ precursor (MZp) B-cells from the blood of 5-8 months HIV-infected progressors (HIV+), elite controllers (EC) and uninfected controls (HIV-). Principal Component Analysis (PCA) of the top 5000 genes (A). Heat Map of the top 100 Differentially Expressed Genes (DEG) between MZp B-cells from HIV-infected progressors and uninfected controls (full-sized Heat Map in Supp. Materials) (B). Volcano Plot between blood MZp B-cells from the uninfected and HIV-infected progressors groups (C). Gene Set Enrichment Analyses (GSEA) of PI3K-AKT-mTOR (NES = -1,32,  $p < 0,0001$ ) (D) and CREB/cJUN (NES = -1,37,  $p < 0,0001$ ) (E) pathways in blood MZp B-cells from HIV-infected progressors when compared to uninfected controls. RNAseq analyses of Tbet (F), CD11c (G), FCRL5 (H), CD22 (I), CD72 (J) and CD85j (K) gene expression levels. N = 3 for each group of participants. The Wald Test with Benjamini-Hochberg correction was used for RNAseq analysis (Fig. 1F-K)

### Figure 2

**The expression levels of the Breg markers NR4A1, NR4A2 and NR4A3 are significantly downregulated in precursor marginal zone (MZp) B-cells populations from the blood of HIV-1 infected progressors.** RNAseq analyses of MZ precursors (MZp) from the blood of uninfected controls (HIV-), 5-8 months HIV-infected progressors (HIV+) and elite controllers (EC) demonstrating gene expression levels of NR4A1 (A), NR4A2 (B), NR4A3 (C), CD83 (D), IL-6 (E) and CD19 (E), the latter which was used as a baseline strongly expressed B-cell gene (n=3 for each study group). Multicolour Flow-Cytometry analyses of protein expression levels of the Breg markers NR4A1, NR4A3, CD83, CD39 and CD73 were assessed on blood MZp B-cells, gated from total PBMCs of 15 uninfected controls and 10 HIV-infected progressors before and after ART. Shown are NR4A1 (G), NR4A3 (H), CD83 (I), CD73 (J) and CD39 (K) expression levels. Comparison between NR4A1 (L), NR4A3 (M), CD83 (N), CD39 (O) and CD73 (P) expression levels between primary infection and following ART for the same donors. Membrane BAFF expression levels were assessed on total PBMCs of 10 uninfected controls and 5 HIV-infected progressors before and after ART (Q). Comparison between membrane BAFF expression levels on total PBMCs of HIV-infected progressors before and after ART for the same donors (R). Relative frequencies of MZp in the blood of 10 uninfected controls and 10 HIV-infected progressors before and after ART (S). Protein expression levels were assessed by Geometric Mean of Fluorescence Intensity (GeoMFI). \*P < 0,05; \*\* P< 0,01; \*\*\* P< 0,001; \*\*\*\*P< 0,0001. HAART = ART-Treated HIV-infected individual. The Wald Test with Benjamini-Hochberg correction was used for RNAseq analysis (Fig. 2A-F). Normality was assessed with the Shapiro-Wilk test. A One-Way ANOVA with a Tukey post-hoc test was used for testing statistical differences between groups in Fig. 2I, J. A Kruskal-Wallis nonparametric test with Dunn's post-hoc test was used to assess statistical differences between groups in Fig. 2 G, H, K, Q and S. A paired T-test was used in assessing differences between HIV-infected individuals before and after ART in Fig. 2.L-P and R.

### Figure 3

**Impaired Breg function of blood MZp B-cells from HIV-1 infected progressors is not restored by ART.** Breg function of MZp, as assessed by High Content Screening (HCS). Shown are cell staining by Hoersch (A), CD4+ T-cells staining by FITC (B), Live or Dye viability stain (C) and merged stains (D). CD4+ T-cell count on each analyzed well (E). CD4+ T-cells mortality following



culture with Medium Alone or when co-cultured (3:1 ratio) with CD1c- B-cells (negative control) or MZp (F). CD4+ T-cells mortality when co-cultured (3:1 ratio) with MZp B-cells from uninfected controls and HIV-infected progressors (with and without ART) (n=3) (G). CD4+ T-cells mortality when co-cultured with MZp from uninfected controls with and without the addition of an anti-PD-1 blocking antibody at 2 µg/mL (H). Mortality was assessed as the relative frequency of Live or Dye cells, when compared to the total CD4+ T-cells. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001. Statistical differences between groups were assessed with the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc test. Normality was assessed with the Shapiro-Wilk test.

#### Figure 4

**High levels of BAFF significantly downregulate precursor-like marginal zone (MZp) B-cell expression levels of immunoregulatory markers and influence their Breg function.** qPCR analyses of NR4A1 (A), NR4A3 (B) and CD83 (C) mRNA relative expression levels by blood MZp B-cells from healthy individuals when cultured with 500 ng/mL soluble BAFF (2 donors, n =3 each). Flow-cytometry analyses of BAFF-treated tonsillar B-cells from healthy donor D-013 (n=3) showing NR4A1 (D) and CD83 (E) protein expression levels. Flow cytometry analyses of BAFF-treated tonsillar B-cells from healthy donor KAG-017 (n = 5) showing NR4A1 (F), CD83 (G) and IL-10 (H) expression levels as well as total relative frequencies of MZp expressing IL-10 (I). Data of (F) and (G) are shown as fold-over Medium Alone (MA) due to variabilities between different tonsillar samples from the same donor. Breg function of MZp B-cells from two different tonsillar donors, LFB-019 (J) and IA-015 (K) have been assessed as relative frequencies of CD4+ T-cells expressing intracellular Ki67, as an indicative of cell cycle entry. Flow cytometry analyses of membrane BAFF levels from total tonsillar cells (L), Mo-DC (M), DC (N) and CD3+ T-cells (O) from different tonsillar donors. Breg function of MZp B-cells from LFB-019 donor after treatment with high soluble BAFF (500 ng/mL) for 18 hours, assessed as relative frequencies of CD4+ T-cells expressing intracellular Ki67 (P). Relative frequencies of MZp expressing IL-10 were assessed relatively to the percentage of total MZp B-cells. Relative frequencies of CD4+ T-cells expressing Ki67 were assessed relatively to the percentage of total CD4+ T-cells. Expression levels were assessed with Geometric Mean of Fluorescence Intensity (GeoMFI). \*P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001; \*\*\*\*P < 0,0001; MA - Medium Alone; BAFF50 - BAFF at 50 ng/mL; BAFF500 - BAFF at 500

ng/mL. Statistical differences between groups were assessed with the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc test. Normality was assessed with the Shapiro-Wilk test.

### **Supplementary Figure 1**

**Gating strategy for multicolour flow-cytometry analyses.** After excluding doublets and dead cells, total B-cells (CD19<sup>+</sup>) were positively gated. Then, CD1c<sup>+</sup> cells were selected, followed by IgM<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> double-positive cells. From the latter, the CD10<sup>-</sup> population was designated as marginal zone (MZ) B-cells, while the CD10<sup>+</sup> population was designated as MZ precursors (MZp).

### **Supplementary Figure 2**

**RNAseq analyses of blood MZp B-cells PI3K-AKT-mTOR and other pathways.** Data exploration of the transcriptomic analyses by RNAseq of sorted mature marginal zone (MZ) and MZ precursor (MZp) B-cells from the blood of 5-8 months HIV-infected progressors (HIV<sup>+</sup>), elite controllers (EC) and uninfected controls (HIV<sup>-</sup>) (n=3 for each group). Shown are the gene transcripts associated with mTORC1: mTOR (A), MLST8 (B), AKT1S1 (C), DEPTOR (D), RPTOR (E). Gene transcripts associated with PI3K: PIK3CD (F), PIK3CG (G). Gene transcripts associated with the AKT family: AKT1 (H), AKT2 (I), AKT3 (J). Gene transcripts associated with the AP-1 genes: Jun (K), Fos (L). Gene transcripts associated with Protein Kinase A (PKA): PRKACA (M), PRKAR1A (N), PRKAR2A (O). N = 3 for each group of participants. Statistical analyses were done between blood MZp B-cells from uninfected controls (HIV<sup>-</sup> MZp) and HIV-infected progressors (HIV<sup>+</sup> MZp). The Wald Test with Benjamini-Hochberg correction was used for RNAseq analysis.

### **Supplementary Figure 3**

**Blood MZp B-cells from HIV-infected progressors express lower levels of PD-L1 than uninfected controls.** Flow cytometry analyses of 1 uninfected control, 2 HIV-infected progressors and 3 ART-treated HIV-infected progressors. Shown are the relative frequencies of PD-L1 expressing total B-cells (A), MZ (C) and MZp (E) as well as the expression levels of PD-L1 by total B-cells (B), MZ (D) and MZp (F). Relative frequencies were assessed relatively to the percentage of total B-cells, MZ and MZp B-cells, respectively. Expression levels were assessed with Geometric Mean of Fluorescence Intensity (GeoMFI). HAART = ART-treated HIV-infected individuals.

Statistical differences between groups were assessed with the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc test. Normality was assessed with the Shapiro-Wilk test.

#### **Supplementary Figure 4**

**Tonsillar MZp B-cells express high levels of IL-10 without stimulation.** Flow cytometry analyses of intracellular IL-10 expression by MZp from one tonsillar donor (n=3) after 4 hours of Brefeldin A incubation. Shown are the relative frequencies of IL-10 expressing total B-cells, MZ and MZp (A), as well as the expression levels of IL-10 in total B-cells, MZ and MZp (B). Frequencies were assessed relatively to the percentage of total B-cells, MZ and MZp B-cells, respectively. Expression levels were assessed with Geometric Mean of Fluorescence Intensity (GeoMFI). \*P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001; \*\*\*\* P < 0,0001. Statistical differences between groups were assessed with the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc test.

#### **Supplementary Figure 5**

**Data exploration of the transcriptomic analyses by RNAseq of blood MZp B-cells.** Data exploration of the transcriptomic analyses by RNAseq of sorted mature marginal zone (MZ) and MZ precursor (MZp) B-cells from the blood of 5-8 months HIV-infected progressors (HIV+), elite controllers (EC) and uninfected controls (HIV-) (n=3 for each group). Shown are gene expression levels of TLR7 (A), IL-21 (B), TLR10 (C), BAFFR (D), TACI (E), BCMA (F), TRAF3 (G), TRAF6 (H), IL-10 (I), AhR (J), BHLHE40 (K). N = 3 for each group of participants. Statistical analyses were done between blood MZp B-cells from uninfected controls (HIV- MZp) and HIV-infected progressors (HIV+ MZp). The Wald Test with Benjamini-Hochberg correction was used for RNAseq analysis.

#### **Supplementary Figure 6**

**LPS stimulated MoDC downregulate NR4A1 and NR4A3 expression levels in autologous co-cultured blood MZp B-cells from healthy individuals.** Flow cytometry analyses of MZp B-cells cultured in medium alone (MA) or with autologous MoDC, which had been stimulated with LPS and fixed prior to co-culture (MoDC LPS). Shown are the relative frequencies of NR4A1 (A) and NR4A3 (C) expressing MZp B-cells as well as expression levels of NR4A1 (B), NR4A3 (D), and membrane BAFF expression levels by MoDC and MoDC LPS (E). Frequencies were assessed

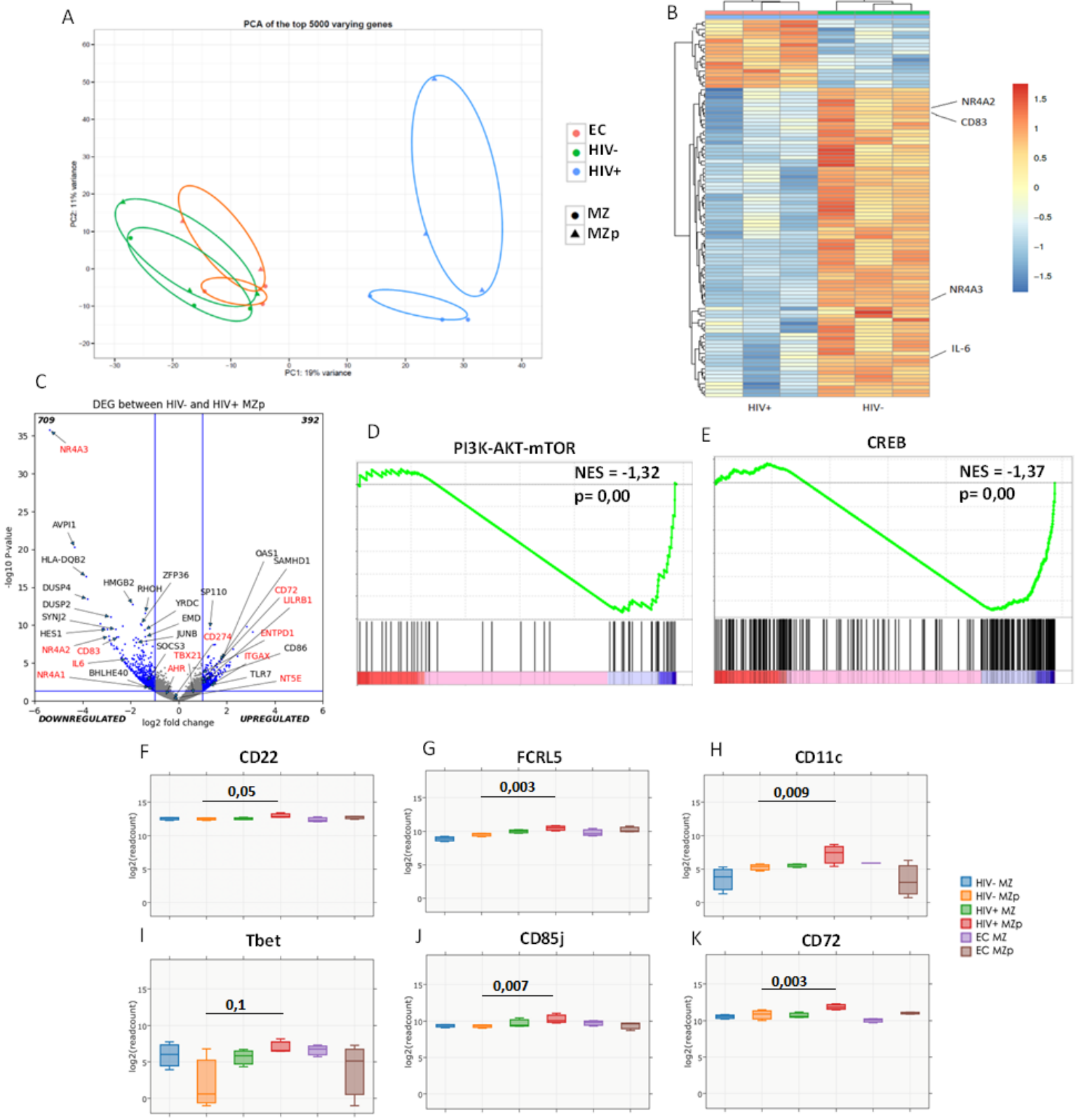
relatively to the percentage of total MZp B-cells. Expression levels were assessed with Geometric Mean of Fluorescence Intensity (GeoMFI). MA - Medium Alone, MoDC - Monocyte Derived Dendritic Cells; LPS - Lipopolysaccharide. Statistical differences between groups were assessed with the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc test (Sup. Fig. 6 A-D).

## Chapitre 5 – Table 1

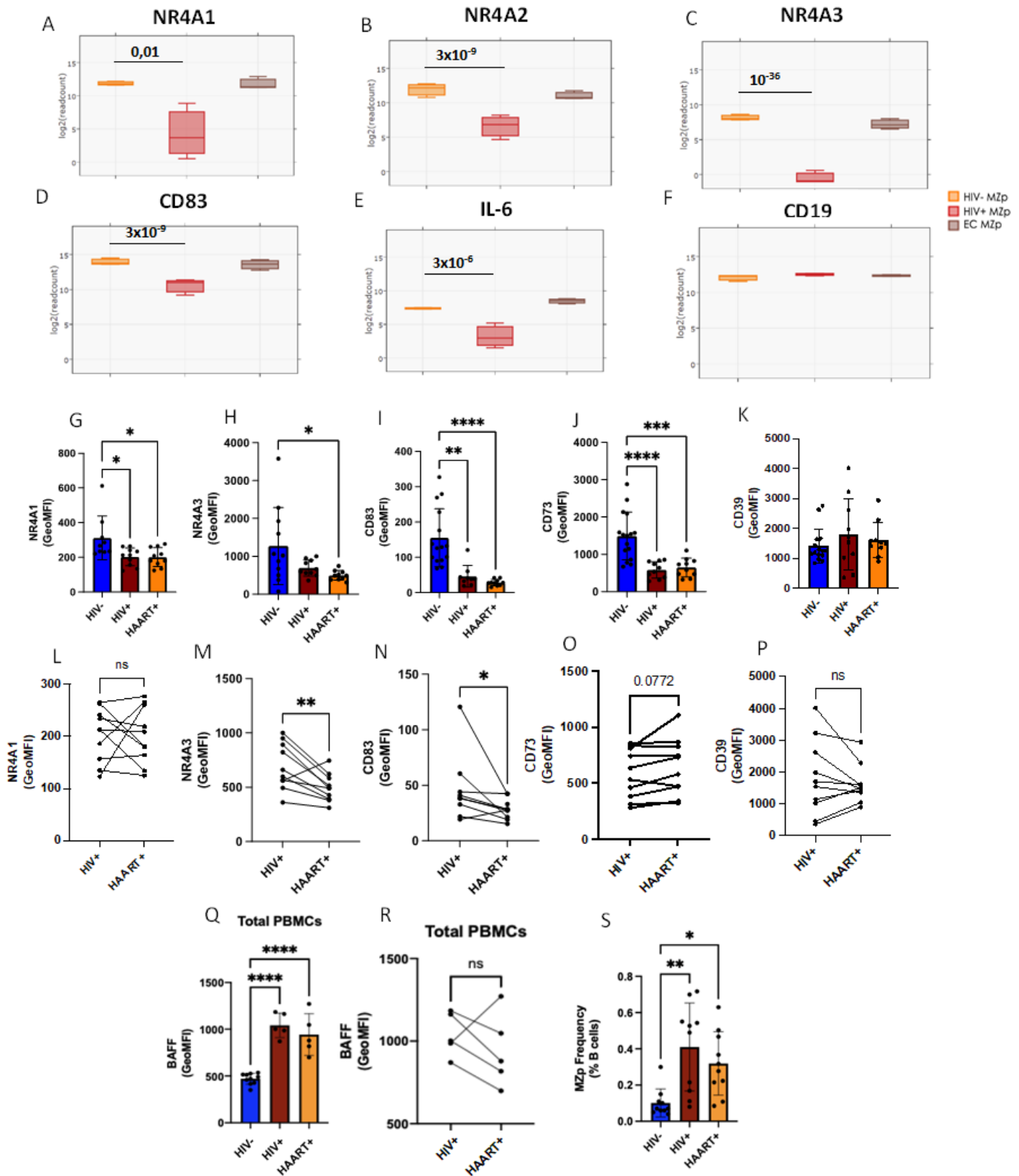
Group	<u>RNA-seq analyses</u>			<u>Flow-Cytometry analyses</u>		
	HIV+ (n = 3)	EC (n = 3)	p-value	HIV+ ART- (n = 10)	HIV+ ART+ (n = 10)	p-value
Age	38,67 (28 – 44)	38,67 (37 – 40)	0,7	NA	NA	NA
Viral load	213353 (51045 – 418465)	NA <sup>1</sup>	0.1	1258139 (374 – 6193724)	41.4 (20 – 234)	0,002
CD4+ T-cell count (cells/mm <sup>3</sup> )	540 (380 – 760)	819 (737 – 920)	0,2	447 (284 – 590)	776.5 (565 – 1210)	0,0006
CD8+ T-cell count (cells/mm <sup>3</sup> )	871 (520 – 1153)	821 (303 – 1130)	>0,99	1128 (0 – 3190)	634.3 (210 – 1080)	0,06
ART duration (weeks)	NA	NA	NA	NA	92 (84 – 96)	NA

<sup>1</sup> Undetectable viral load found in the three EC.

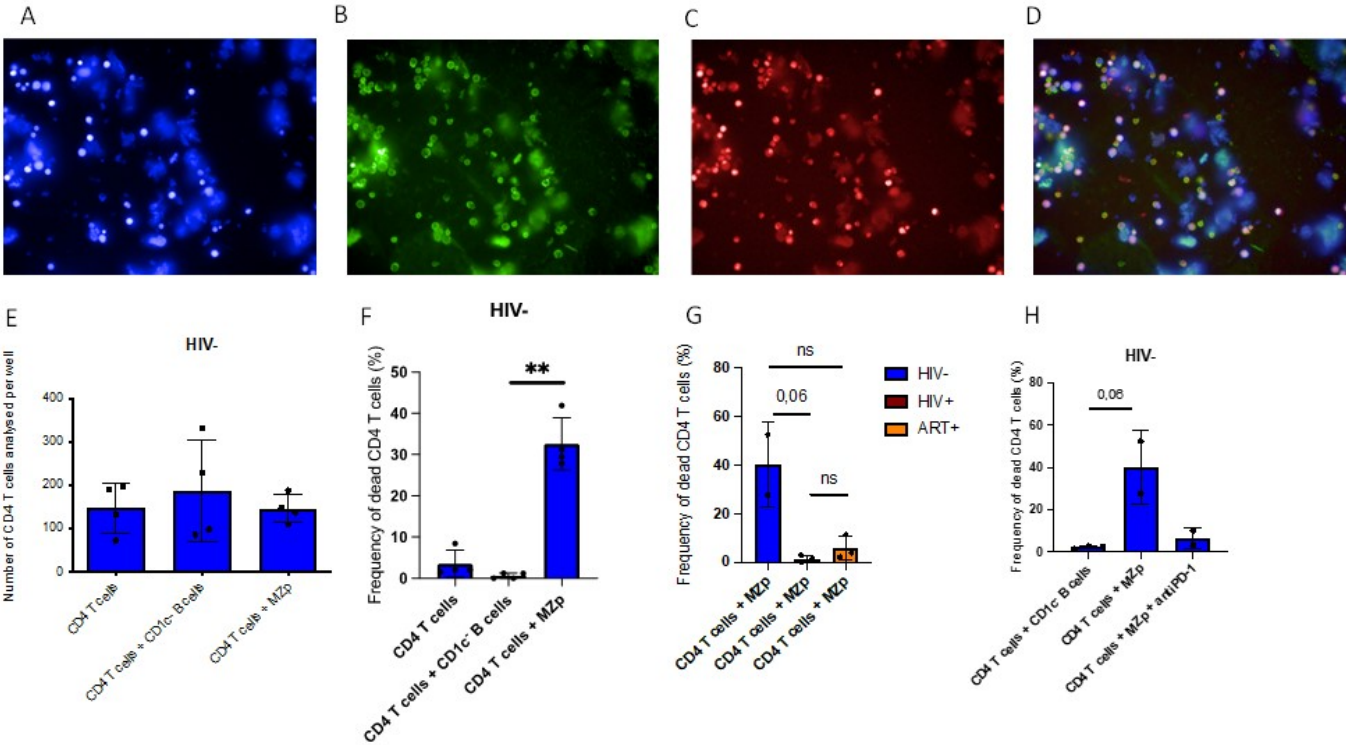
# Chapitre 5 – Figure 1



# Chapitre 5 – Figure 2

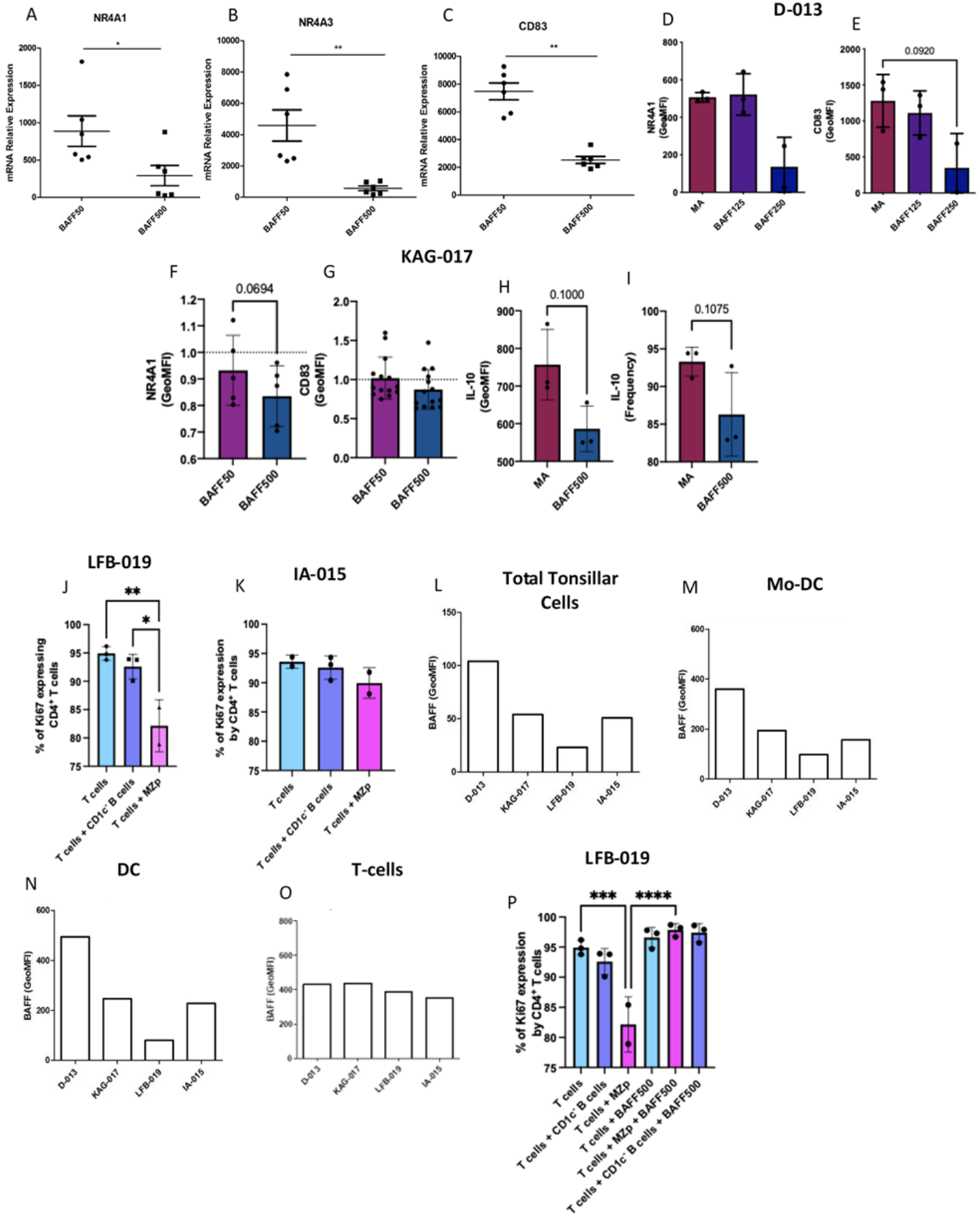


# Chapitre 5 – Figure 3

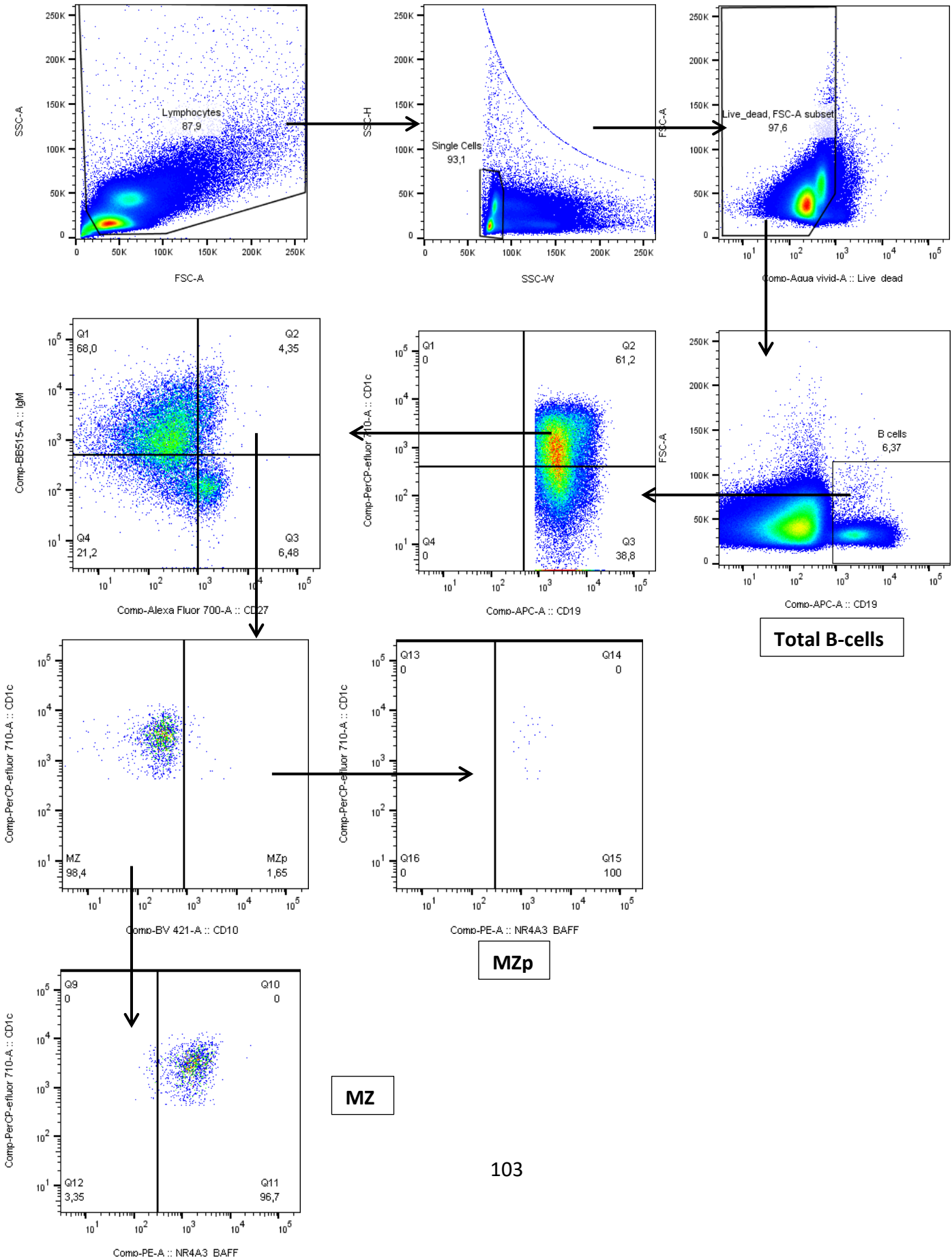




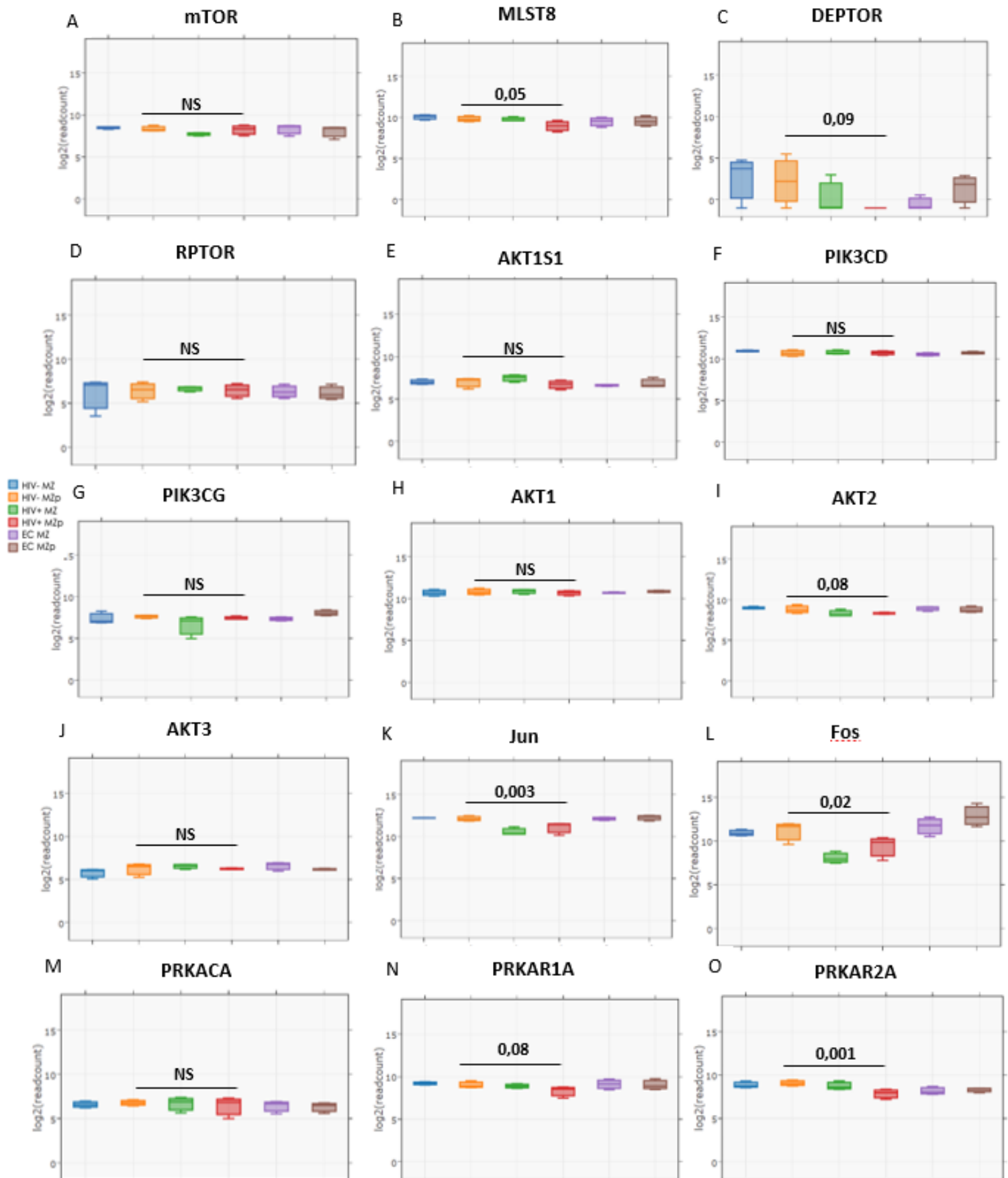
# Chapitre 5 – Figure 4



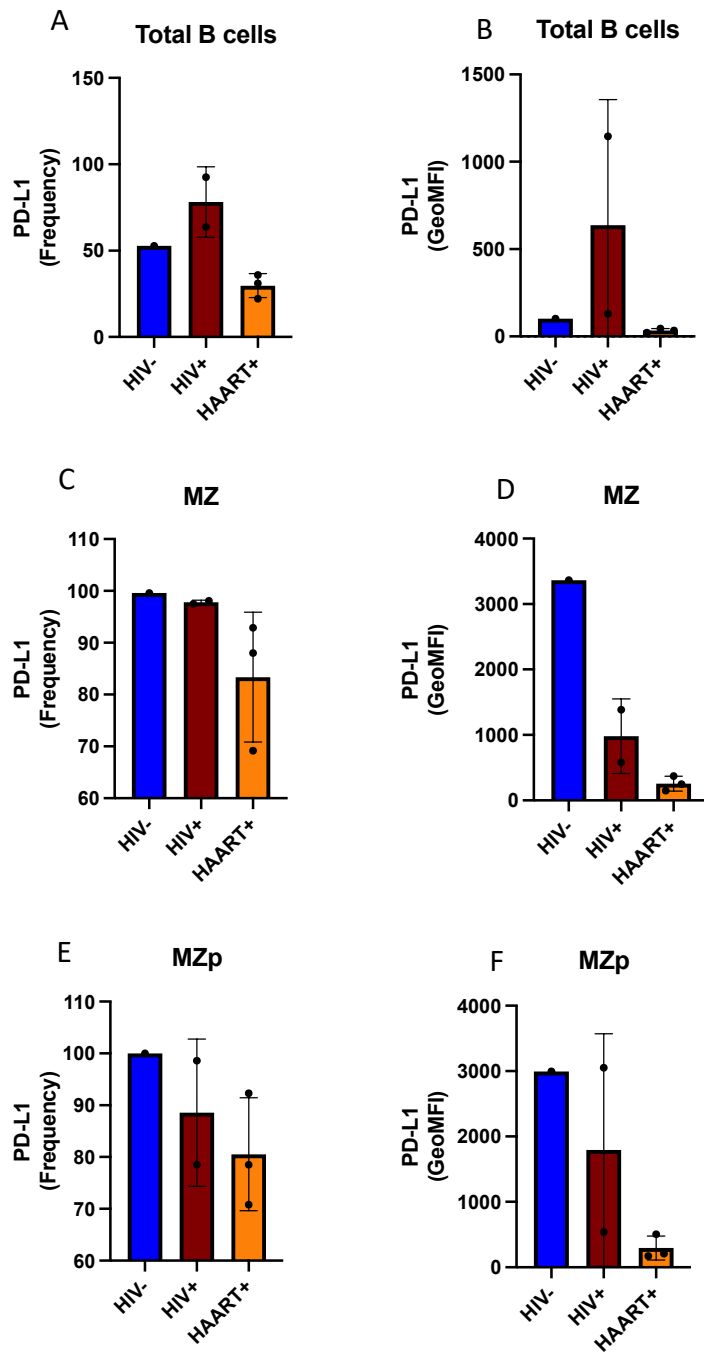
# Chapitre 5 – Figure Supplémentaire 1



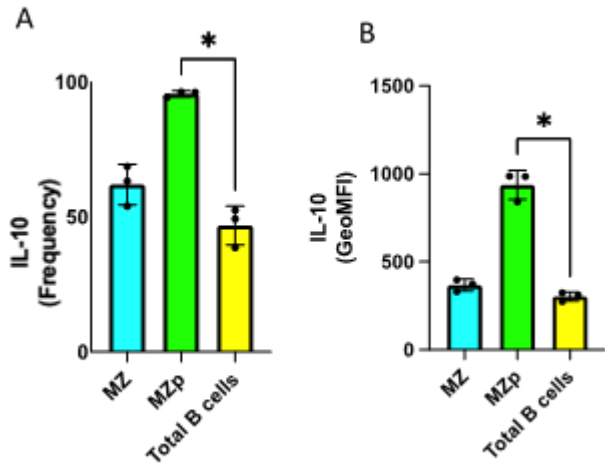
## Chapitre 5 – Figure Supplémentaire 2



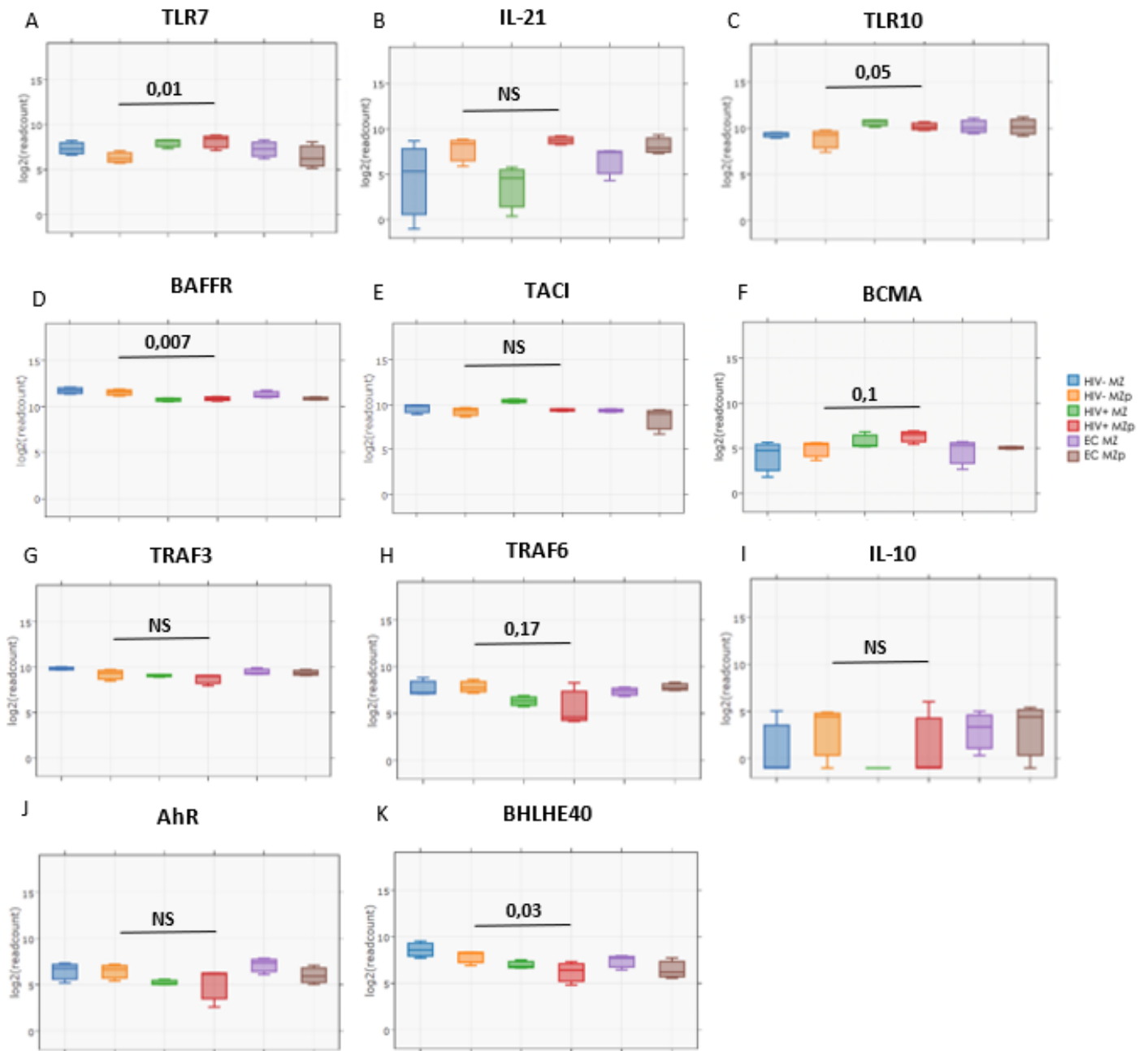
# Chapitre 5 – Figure Supplémentaire 3



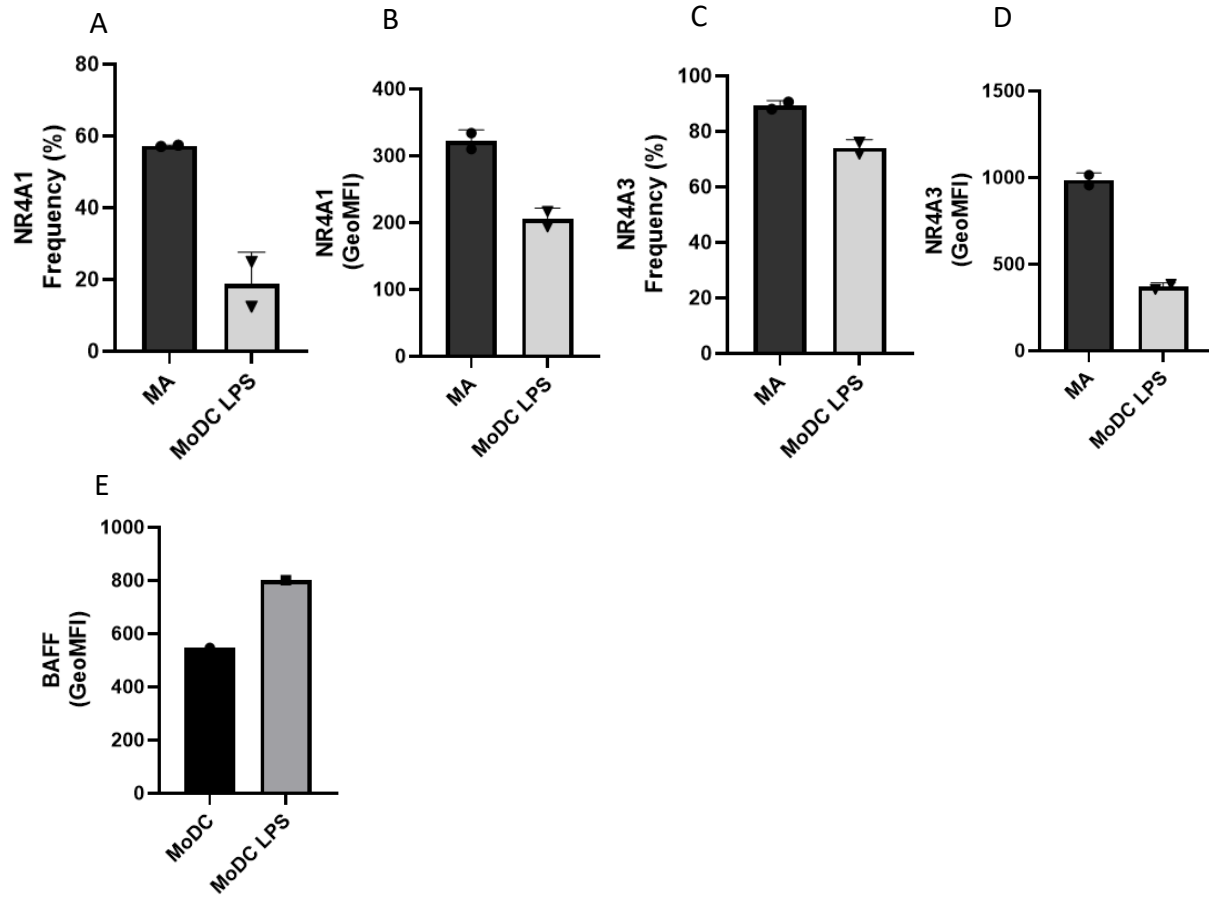
Chapitre 5 – Figure Supplémentaire 4



## Chapitre 5 – Figure Supplémentaire 5



## Chapitre 5 – Figure Supplémentaire 6



# Chapitre 6 – Subclinical Atherosclerosis is Associated with Discrepancies in BAFF and APRIL Levels and Altered Breg Potential of Precursor-like Marginal Zone B-cells in HIV-Treated Individuals

Matheus Aranguren, Kim Doyon-Laliberté, Mohamed El-Far, Carl Chartrand-Lefebvre, Jean-Pierre Routy, Cécile Tremblay, Benoît Trottier, Jean-Guy Barril, Madeleine Durand, Johanne Poudrier, Michel Roger, pour la cohorte CHACS

**Statut** : Prêt à soumettre dans le journal *Journal of Clinical Investigation - Insights*

**Contribution des co-auteurs** : Matheus Aranguren a fait les ELISA pour les mesures de BAFF, APRIL et CD83 solubles, les études de corrélation entre BAFF et APRIL et les données cliniques des individus de la CHACS, les analyses de cytométrie en flux de BAFF membranaire et des MZp de la cohorte, et a fait les essais *in vitro* d'APRIL sur des lymphocytes B totaux des individus sains. Kim Doyon-Laliberté a débuté les études *in vitro* de BAFF soluble et a participé aux mesures de CD83 soluble. Mohamed El-Far a fait les mesures de BAFF soluble par multiplex dans la deuxième cohorte indépendante. Carl Chartrand-Lefebvre a fait les analyses des images de tomodensitométrie permettant de mesurer les plaques d'athérosclérose coronariennes des individus de la CHACS. Jean-Pierre Routy et Cécile Tremblay ont fourni les échantillons sains pour les analyses d'APRIL *in vitro*. Jean Guy-Barril, Benoît Trottier, Cécile Tremblay et Madeleine Durand ont fourni les échantillons de la CHACS ainsi que les données cliniques permettant la confection de cette étude. Johanne Poudrier et Michel Roger ont contribué au design du projet, à l'élaboration des expériences, l'analyse des données et à l'écriture du manuscrit.



# **Subclinical Atherosclerosis is Associated with Discrepancies in BAFF and APRIL Levels and Altered Breg Potential of Precursor-like Marginal Zone B-cells in HIV-Treated Individuals**

Matheus Aranguren<sup>1,2</sup>, Kim Doyon-Laliberté<sup>1,2</sup>, Mohamed El-Far<sup>1,2</sup>, Carl Chartrand-Lefebvre<sup>1,4</sup>, Jean-Pierre Routy<sup>4</sup>, Cécile Tremblay<sup>1,2</sup>, Jean-Guy Barril<sup>5</sup>, Benoît Trottier<sup>5</sup>, Madeleine Durand<sup>1,6</sup>, Johanne Poudrier<sup>1,2\*</sup>, Michel Roger<sup>1,2\*</sup> for the CHACS cohort study

\*Co-seniors

<sup>1</sup>. Centre de Recherche du CHUM, Université de Montréal, Montréal, Canada ; <sup>2</sup>. Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Canada ; <sup>3</sup> Département de Radiologie, Radio-oncologie et Médecine Nucléaire, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Canada ; <sup>4</sup>Department of Medicine, McGill University Health Centre, McGill University, Montréal, Canada ; <sup>5</sup> Clinique Médicale du Quartier Latin, Montréal, Canada <sup>6</sup>Département de Médecine, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Canada.

Word count in text: 8327

Word count in abstract: 334

Running Title: BAFF and APRIL modulate Breg capacities and CVD in long term HIV-infected treated individuals

Number of Figures and Tables: 6 Figures, 2 Supplemental Figures, 1 Table

Reference count: 58

## 1 – Abstract

Despite the existence of antiretroviral therapy (ART) allowing for people living with HIV (PLHIV) to have a relatively normal life, chronic inflammation persists and is involved in the premature development of age-associated comorbidities, notably cardiovascular diseases (CVD) such as atherosclerosis. This chronic inflammation includes an excess of the B-cell survival and differentiation factor “B-cell activating factor” (BAFF), which is especially important for the selection and activation of first line Marginal Zone (MZ) B-cells. Excess BAFF is associated with deregulations of the B-cell compartment, and notably, this includes alteration of MZ precursors (MZp), whose potent regulatory capacities are impaired in the context of HIV despite ART.

Based on these observations, and growing evidence that MZ B-cell populations are involved in atherosclerosis immune surveillance, the objective of this study is to assess and correlate levels of BAFF and its analogue “A proliferation-inducing ligand” (APRIL), along with the regulatory status of MZp B-cells with the volume of coronary atherosclerotic plaques measured by cardiac computerised tomography scans and with CVD risk factors and biomarkers in the blood of CVD+ and CVD- individuals from the Canadian HIV and Aging Cohort Study (CHACS) imaging sub-study group. Our results demonstrate that BAFF is found in excess in the blood of PLHIV from the CHACS despite a mean of 15 years of successful ART and correlates with several biomarkers for atherosclerosis development. Levels of APRIL negatively correlate with these factors, as well as negatively correlate with BAFF. Certain MZp immunoregulatory markers such as the nuclear receptor (NR)4A3 and CD83 are downregulated in PLHIV despite ART, independently of the CVD status, while others such as CD39 and CD73 are more relatively downregulated in PLHIV with CVD. Interestingly, APRIL upregulates the expression of NR4A1 and NR4A3 by blood MZp *in vitro*, while excessive BAFF downregulates expression of these regulatory markers. Our results suggest that strategies viewed to modulate levels of BAFF and/or APRIL could be envisaged to lower the inflammatory burden, restore MZp regulatory capacities and hopefully control the development of CVD in PLHIV.

**Word count in abstract:** 334

**Key Words:** HIV, aging, atherosclerosis, Breg, MZp, BAFF, APRIL, cardiovascular diseases

## Résumé

Malgré le fait que l'existence de la thérapie antirétrovirale (ART) permet aux personnes vivant avec le VIH d'avoir une vie relativement normale, une inflammation chronique persiste chez ces individus et est impliquée dans le développement prématuré des comorbidités associées avec l'âge, notamment des maladies cardiovasculaires (MCV) telles l'athérosclérose. Cette inflammation chronique implique notamment un excès du facteur de survie et différenciation des lymphocytes B « B-cell Activation Factor » (BAFF), une molécule importante pour la sélection et activation des lymphocytes B de la zone marginale (MZ), des cellules de première ligne. L'excès de BAFF est associé avec des dérégulations du compartiment B, notamment une altération des précurseurs des MZ (MZp), dont la capacité régulatrice est affaiblie dans le contexte du VIH malgré la thérapie ART.

Basé sur ces observations ainsi que le fait que des populations MZ sont impliquées dans la surveillance immunologique face à l'athérosclérose, l'objectif de cette étude est de réaliser des corrélations entre BAFF et son analogue « A Proliferation-Inducing Ligand » (APRIL), ainsi que le statut régulateur des MZp avec le volume des plaques d'athérosclérose coronariennes, mesurées via tomodensitométrie, ainsi qu'avec des facteurs de risque et des biomarqueurs des MCV dans le sang des individus MCV+ et MCV- de la sub-étude d'imagerie de la Cohorte Canadienne VIH et Vieillessement (CHACS). Nos résultats démontrent que BAFF est retrouvé en excès dans le sang des PVVIH malgré une moyenne de 15 ans d'ART, et que celui-ci corrèle avec plusieurs biomarqueurs des maladies cardiovasculaires, dont les plaques d'athérosclérose. APRIL corrèle négativement avec ces facteurs et avec BAFF lui-même. Nous avons trouvé également que l'expression de certains marqueurs immunorégulateurs des MZp tels que les récepteurs nucléaires NR4A3 et CD83 demeure affaiblie malgré la thérapie et indépendamment de la présence de MCV, alors que d'autres comme CD39 et CD73 sont relativement plus affectés chez les PVVIH avec des MCV. De façon intéressante, APRIL augmente l'expression de NR4A1, NR4A3 et IL-10 *in vitro*, alors que BAFF en excès baisse l'expression de ces marqueurs. Nos résultats suggèrent donc que des stratégies impliquées dans la modulation des niveaux de BAFF et/ou APRIL peuvent être envisagées afin de possiblement réduire le fardeau inflammatoire, restaurer

les fonctions régulatrices des MZp et possiblement contrôler le développement des MCV chez les PVVIH.

**Mots-clés:** HIV, aging, atherosclerosis, Breg, MZp, BAFF, APRIL, cardiovascular diseases

## 2 – Introduction

Antiretroviral therapy (ART) has been a staple in the treatment of Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection since its appearance in the early 90s. It is considered one of the revolutions of the 20th century in medicine, effectively converting a deadly disease into a manageable condition, and giving people living with HIV (PLHIV) a quasi-normal life expectancy [1]. In 2015, it was estimated that 50% of all PLHIV in Canada are over 50 years old. As such, PLHIV are more commonly being afflicted by aging-associated diseases, which some are developed prematurely (5 to 10 years earlier than the general population), such as cardiovascular diseases (CVD). Indeed, it has been shown that PLHIV are more prone to developing atherosclerosis plaques, the primary cause of heart disease when compared to uninfected individuals, even after adjustment for traditional CVD risk factors such as smoking, hypertension and diabetes [2, 3]. The root cause of this development is not well understood, but ART toxicity, chronic inflammation and pathogenic opportunistic infections have been suggested to contribute to CVD development [4-6]. Given the importance of inflammation in the formation of atherosclerosis plaques, chronic inflammation in the HIV context is therefore considered to be a powerful trigger for this process [7, 8].

Despite the success of ART, low level chronic inflammation associated with HIV infection persists due to factors such as viral transcription by the latent reservoir, microbial translocation, and long-term immune deregulation [9-11]. We have shown that B-cell activating factor (BAFF) is found in excess in the blood of PLHIV from the Montreal Primary HIV Infection Cohort (PHI) and correlated with inflammatory markers such as elements of microbial translocation. We also found that this excess could be detected as early in the acute phase and persists up to two years post-infection, despite ART [12] (Chapitre 5). BAFF is a critical B-cell survival and differentiation factor and helps shape the innate marginal zone (MZ) B-cell pool by contributing to MZ selection during normal B-cell ontogeny [13, 14]. As such, the excess of BAFF we described in PLHIV was

concomitant with hyperglobulinemia and deregulations of the B-cell compartment, notably with increased frequencies of innate marginal zone precursor-like (MZp) B-cells [12]. We reported similar observations for HIV-infected Beninese female commercial sex workers, SIV-infected macaques and initially in HIV-transgenic mice [15-17], suggesting that excess BAFF and deregulated MZ populations are a reliable marker of inflammation in the context of HIV.

BAFF is mainly produced by neutrophils, myeloid cells such as monocytes and dendritic cells, activated T-cells and B-cells, and the stromal cells of secondary lymphoid organs. BAFF can be found in a soluble form, or in a membrane-bound form. A Proliferation-inducing Ligand (APRIL) is a BAFF analog, which can only be found in a soluble form or complexed with heparin sulfate proteoglycans (HSPG). BAFF can signal through three receptors, BAFF-Receptor (BAFF-R), Transmembrane Activator and CAML Interactor (TACI), and B-cell Maturation Antigen (BCMA), while APRIL signals through the latter two receptors [14]. Although they share similar roles, BAFF and APRIL also have different functions in B-cell immunity, as observed in their individual knock-out phenotypes [18, 19].

We have previously shown that in non-infected individuals, MZp present a powerful B-cell regulatory (Breg) potential and function [20, 21]. Indeed, *ex vivo*, MZp strongly express IL-10 as well as the transcription factors Nuclear Receptors (NR)4A1, NR4A2 and NR4A3, which are heavily involved in anti-inflammatory responses. MZp also express the immunoregulatory molecule CD83 [22], whose expression is dependent on NR4As and whose signalling we have shown to be important in MZp Breg function [20]. Moreover, MZp also express the ectonucleotidases CD39 and CD73, involved in the conversion of the pro-inflammatory ATP into the anti-inflammatory adenosine (ADO) [20, 23]. Importantly, we have recently shown that MZp Breg capacities are highly deregulated in the context of HIV-infection, involving downregulation of the immunoregulatory markers NR4A1-3, CD83 and CD73 as well as immune checkpoint molecule Programmed Death Ligand 1 (PD-L1), likely contributing to their altered Breg function. Of note, this deregulation was not restored by ART. Strikingly, MZp loss of Breg capacity appears to be directly related to the excess of BAFF, as *in vitro*, excess BAFF downregulates the expression of NR4A1 and NR4A3, as well as CD83, and alters MZp Breg function (Chapitre 5).

The role of B-cells in atherosclerosis formation is complex and subset-dependant and has been mostly studied in murine models [24]. On one hand, follicular (FO) B-cells are considered atherogenic by generating germinal center (GC) responses and subsequent IgG production directed against oxLDL, and this process was shown to correlate with CVD [25]. Moreover, FO B-cells are also involved in the formation of tertiary lymphoid organs at the tunica adventitia of blood vessels, also affected by atherosclerosis, allowing for the generation of extrafollicular GC and production of anti-oxLDL IgG antibodies in situ [25-27]. On the other hand, MZ B-cells are considered atheroprotective by mitigating follicular helper T-cell function in GC via PD-1/PD-L1 interactions [28]. Interestingly, the atheroprotective role of MZ is dependent on the expression of NR4A1, as its deletion in mice aggravates atherosclerosis development due to the downregulation of PD-L1 [29]. Moreover, anti-oxLDL IgM, as opposite of IgG, is considered atheroprotective. MZ B-cells are a massive producer of IgM [13, 25], which could be related to their atheroprotector role.

Based on these observations, our aim was thus to study the association between BAFF and APRIL levels, as well as MZp deregulation, with the presence of CVD in PLHIV from the Canadian HIV and Aging Cohort Study (CHACS). We show that BAFF blood levels remain relatively elevated in the blood of PLHIV from the CHACS despite 15 or more years of ART, while APRIL blood levels are not affected. Furthermore, BAFF levels correlate positively with traditional CVD risk factors, while APRIL levels correlate negatively with these factors. Moreover, BAFF and APRIL levels correlate negatively with each other. We also show that MZp from the blood of long term treated PLHIV from the CHACS are still deregulated, as expression of NR4A3, CD39, CD73 and CD83 is lower in HIV-infected individuals despite long term ART. In accordance with a seemingly atheroprotective role, APRIL upregulates the expression of Breg markers such as NR4A1, NR4A3 and IL-10 by blood MZp from uninfected individuals, while this modulation is dampened by BAFF. Altogether, our results shed light on a possible atheroprotective role of APRIL, in contrast to that of excess BAFF, which must be assessed in longitudinal studies.

## **3 – Materials and Methods**

### **3.1 – Specimens and clinical data collection**

We conducted a cross sectional study, using data and samples from the CHACS. Briefly, the CHACS recruits PLHIV having either lived with HIV for at least 15 years or are over the age of 40, as well as HIV-negative controls over the age of 40. Controls are recruited at the same clinics as the PLHIV participants, and the full study protocol and data collection forms have been published [6]. Participants from the CHACS cohort who were free of overt cardiovascular disease (had never suffered a myocardial infarction, coronary revascularization, angina, stroke or peripheral vascular revascularization) and had a 10-year Framingham risk score (the probability of developing CVD in the near future) ranging from 5 to 20% were invited to participate in the cardiovascular imaging substudy [30]. Data on all traditional cardiovascular risk factors was collected prospectively as part of the CHACS visits.

For the present study, we have first randomly selected 79 participants from the CHACS cardiovascular imaging prospective sub-study, which included successfully ART-treated PLHIV with or without subclinical CVD and HIV-uninfected controls with or without subclinical CVD. Presence/absence of subclinical CVD was defined as the presence or absence of coronary atherosclerosis plaques, as measured below. This selection is herein referred to as sub-cohort (A). Four study groups were generated as follows: 20 HIV uninfected participants without CVD (HIV-CVD-), 20 HIV uninfected participants with CVD (HIV- CVD+), 20 HIV infected participants without CVD (HIV+ CVD-), and 19 HIV infected participants with CVD (HIV+ CVD+). As part of an independent ongoing study lead by another team (M. E. F) and whose individuals are not the same as sub-cohort A, a sub-cohort, herein called sub-cohort (B) (n=128) of the CHACS participants involved in the cardiovascular imaging sub-study had been selected, and the four study groups described above were generated with 24 HIV- CVD-, 25 HIV- CVD+, 30 HIV+ CVD- and 49 HIV+ CVD+.

### **3.2 – Characterisation of atherosclerosis plaques**

Coronary plaques were measured as previously described [30, 31]. Briefly, individuals recruited from the CHACS were administered 50-75 mg metoprolol (a beta blocker used to lower heart rate) orally when heart rate was higher than 60 beats per minute. Then, coronary computerized tomography (CT) angiography was performed using a 256-section CT scanner (Brilliance iCT; Philips Healthcare) and 370 mg/ml iopamidol as a contrast (Bracco Imaging) at a rate of 5 ml/sec after bolus tracking. Electrocardiogram-gating was used. Slice thickness was 0.625 mm. Plaque images were assessed on a patient-by-patient basis by a board-certified radiologist (C.C.L) and measured afterwards using a semi-automated software application (Aquarius iNtuition 4.4.6; TeraRecon). Image assessors were blinded to CVD risk factors and HIV status.

### **3.3 – Measure of soluble BAFF, APRIL and CD83**

Soluble BAFF, APRIL and CD83 levels were measured in the blood of participants of the four study groups of sub-cohort (A) described above by using the Human BAFF/BLyS/TNFSF13B Quantikine ELISA Kit (R&D systems), APRIL Human ELISA Kit (ThermoFisher) and Human CD83 DuoSet ELISA Kit (R&D systems), respectively, by following the manufacturer's protocol. For measuring soluble CD83, samples were diluted 1:3 prior to testing.

Within the sub-cohort (B), soluble BAFF levels were measured in the plasma and quantified with the ultrasensitive Meso Scale Discovery® multiplex kits. The assay was performed according to the manufacturer's protocol. Data analyses were done with the DISCOVERY WORKBENCH 4.0 Software using curve fitting with 4PL, as previously published [32].

### **3.4 – Flow cytometry characterisation of Breg markers and membrane BAFF expression levels**

Expression levels of the Breg markers NR4A1, NR4A3, CD83, CD39 and CD73 were assessed by multicolour flow-cytometry on blood samples of the participants of the four study groups of sub-cohort (A). Briefly,  $10^7$  Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs), which had been cryopreserved until use, were thawed, washed with Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Thermo Fisher) followed by 1x Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.4 (ThermoFisher)



and processed for flow-cytometry. Live/dead exclusion was performed using Aqua-LIVE/DEAD Fixable Stain (Invitrogen Life technologies, Eugene, OR, USA). Non-specific binding sites were blocked using FACS buffer (1x PBS, 2% heat-inactivated FBS (hi-FBS), and 0.1% sodium azide) supplemented with 20% hi-FBS, 10 µg mouse IgG (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) and 5 µg Human BD FcBlock (BD Biosciences). The following conjugated mouse anti-human monoclonal antibodies were used to detect extracellular markers: APC-mouse Anti-Human CD19, BB515-mouse Anti-Human IgM, BV421-mouse Anti-Human CD10, BUV395-mouse Anti-Human CD73, BV786-mouse Anti-Human CD39, PE-Cy7-mouse Anti-Human CD83 (BD Biosciences), PerCP-eFluor 710 Anti-Human CD1c (eBioscience, San Diego, CA, USA) and PE-mouse Anti-Human BAFF (Invitrogen). Intranuclear labelling was performed using the FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience). Non-specific binding sites were blocked using 20% hi-FBS. The PE-conjugated human REA clone anti-mouse NR4A1 was used and compared to the use of PE-conjugated human REA isotype control, as previously described [20]. The PE-conjugated mouse anti-human NR4A3 was from Santa Cruz Biotechnology. Intra-cellular labelling for IL-10 was performed using the Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set (eBioscience), with the PE-mouse Anti-Human IL-10 antibody. Cells were suspended and kept at 4 °C in 1.25% paraformaldehyde prior to analysis. Data acquisition was performed with LSRIIB (BD), and analysis was done with FlowJo 10.7.1 software and GraphPad Prism. Gating strategy was developed based on Full Minus One (FMO) values and isotype controls (Supplementary Figure 1). Anti-mouse Ig(κ) Compbeads and CS&T Beads were used to optimize fluorescence compensation settings and calibrate the LSRIIB, respectively.

### **3.5 – Culture of blood human B-cells with APRIL and BAFF**

Cryopreserved PBMCs from three uninfected donors were thawed and washed in IMDM. Total blood B-cells were then negatively enriched >95% by an immunomagnetic based technology (Dynabeads Untouched Invitrogen Life technologies). Total B-cells were subsequently cultured at a concentration of 10<sup>6</sup> cells/ml in IMDM supplemented with 10<sup>-4</sup> β-2-mercaptoethanol, 10% hi-FBS and 1% penicillin/streptomycin (ThermoFisher) in absence or presence of APRIL (Recombinant Human APRIL/TNFSF13 Protein, R&D systems) at 50 ng/ml, 250 ng/ml or 500 ng/ml, and/or BAFF (Recombinant Human BAFF/BlyS/TNFSF13B Protein, R&D systems) at the

same concentrations for 18 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Cells were cultured with Brefeldine A for the last 4 hours of incubation prior to staining for intra-cellular IL-10. Cells were then recovered and processed for flow-cytometry as stated above.

### **3.6 – Statistical analyses**

Statistical significance of differences between groups was assessed with a one-way ANOVA with post-hoc Tukey test for data normally distributed or otherwise with Kruskal-Wallis test with post-hoc Dunn tests for multiple comparisons. For the correlations, a Pearson correlation was used if data has been found to be normally distributed, otherwise a Spearman correlation was used instead. For the categorical data, a  $\chi^2$  test was used when analysing groups >2, or a Fisher's exact test when comparing two groups. Analyses were performed using GraphPad Prism 9.1.2, on Windows. Results were considered significant when  $p < 0.05$ .

### **3.7 – Ethics Statement**

Written informed consent was obtained from all subjects who participated in the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The methods reported in this paper were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations and all experimental protocols were approved by the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) Research Ethics Committees and all other Research Ethic Committee of the CHACS cohort (# CE 11.063).

## **4 – Results**

### **4.1 – Socio-demographic characteristics of sub-cohort (A)**

Socio-demographic characteristics of sub-cohort (A) can be found in Table 1. In characterizing sub-cohort (A), which is involved in the majority of the results reported herein, we found that significant differences for age were found between the HIV- CVD- (mean of 54.64) and HIV- CVD+ (mean of 61.93) groups ( $p= 0.015$ ), and between the HIV- CVD+ and HIV+ CVD- (mean of 57.08) groups ( $0.016$ ), as assessed by one-way ANOVA with post-hoc Tukey. No differences were found between HIV- CVD+ and HIV+ CVD+. Moreover, significant differences were found for

the LDL levels between the HIV- CVD- (mean of 3.40 nmol/L) and HIV+ CVD- (mean of 2.45 nmol/L) groups ( $p = 0.0078$ ), and between the HIV- CVD+ (mean of 3.31 nmol/L) and HIV+ CVD- groups ( $p = 0.026$ ), as assessed by Kruskal-Wallis test with post-hoc Dunn, with no difference in between HIV+ CVD- and HIV+ CVD+. Furthermore, a significant difference was found between the HIV- CVD- (mean of 1.49 nmol/L) and HIV+ CVD- (mean of 1.17 nmol/L) groups ( $p = 0.039$ ) for the HDL levels, as assessed by Kruskal-Wallis test with post-hoc Dunn. No differences were found between HIV+ CVD- and HIV+ CVD+ groups. Importantly, statin usage is not controlled in the CHACS, and its usage seem to be augmented in PLHIV [30]. However, we do not see a significant difference between statin usage on sub-cohort (A).

#### **4.2 – Excess BAFF in PLHIV despite long-term ART correlates with atherosclerosis risk factors.**

In order to assess the association between BAFF levels and presence of subclinical CVD in PLHIV from the CHACS and HIV-uninfected controls, blood samples (both plasma and serum as well as PBMC) from the four study groups of sub-cohort (A) were screened and compared for their expression levels of soluble and total membrane BAFF. Our data indicated that HIV+ individuals possessed higher levels of soluble and membrane-bound BAFF than HIV- individuals, and that the HIV+ CVD+ group presented the highest levels amongst the four study groups (Fig. 1.A, B). We also observed a positive correlation trend between total plaque volume (TPV) and blood soluble BAFF levels in the HIV+ CVD+ group (Fig.1.C), and to a lesser extent in the HIV-CVD+ group (Fig. 1.D). Similarly, we found that in the larger sub-cohort (B), HIV+ individuals possessed higher levels of soluble BAFF than HIV- individuals, and that the HIV+ CVD+ group possessed the highest levels amongst the four study groups (Supp. Fig. 2 A). A positive correlation between TPV and soluble blood BAFF levels in HIV+ CVD+ individuals was observed (Supp. Fig. 2 B), and to a lesser extent in HIV-CVD+ individuals (Supp. Fig. 2 C). Importantly, even though HIV- CVD+ individuals are significantly older than the other groups, we do not see a correlation between BAFF and age (data not shown), suggesting that the differences we see in BAFF levels in both uninfected groups are not due to said age discrepancy.

Interestingly, in HIV+CVD+ individuals, soluble BAFF levels seem to correlate negatively with biomarkers considered as atheroprotective, such as HDL levels (Fig. 1.E). In HIV-CVD+ individuals, soluble BAFF levels correlate positively with the 10 years mean Framingham score risk percentage, LDL levels and LDL/HDL ratio (Figs. 1.F-H). BAFF levels of HIV+ CVD+ individuals, however, do not correlate with the Framingham score (data not shown). Overall, our data showed that BAFF levels are not restored despite long term ART and correlate with the presence of coronary atherosclerosis in both HIV-infected and uninfected individuals.

### **4.3 – APRIL correlates negatively with BAFF and atherosclerosis risk factors in PLHIV despite long-term ART**

Next, we investigated the association of the BAFF analog APRIL and the presence of subclinical CVD in PLHIV. Surprisingly, we found similar APRIL blood levels between the four study groups of sub-cohort (A), as measured by ELISA (Fig. 2.A), which contrasts with the relatively higher APRIL levels that we had previously reported during the primary infection [12]. We found out that APRIL, differently than BAFF, does not correlate with TPV (data not shown). Differently than BAFF however, levels of APRIL correlate positively with atheroprotective biomarkers such as HDL levels (Fig. 2.B) in HIV+CVD+ individuals, while they seem to correlate negatively with atherogenic risk factors and biomarkers such as the Framingham Risk Score in both groups with CVD (Figs. 2.C and 2.D), and with the LDL/HDL ratio (Figs. 2.E) in HIV+ CVD+ individuals. Interestingly, APRIL levels seem to correlate negatively with soluble BAFF levels in CVD+ individuals, more so in HIV+ individuals (Figs. 2.F and 2.G). Accordingly, we found that a higher BAFF/APRIL ratio correlated negatively with atheroprotective markers like HDL levels in HIV+ individuals (Fig. 2.H), while correlating positively with atherogenic markers such as the Framingham Risk Score and LDL/HDL ratio in HIV+ individuals (Fig. 2.I-J) and even in HIV- individuals (Fig. 2 K-M). Overall, our data show that BAFF outweighs the impact of APRIL on the presence of subclinical CVD.

### **4.4 – Blood MZp from PLHIV are deregulated despite long-term ART**

Given that BAFF is found in excess in the blood of long term treated PLHIV of the CHACS, we sought to analyse the impact that this may have on the Breg profile of MZp, as we have found

out that the Breg attributes of blood MZp from HIV-infected individuals of the Montreal Primary HIV Infection cohort are deregulated, despite 2 years of ART (Chapitre 5). In agreement with these observations, when analysing expression levels of Breg markers in blood MZp of PLHIV and uninfected controls, we found that while NR4A1 expression levels seem to be similar between the four study groups of sub-cohort (A) (Figs. 3.A and 3.B), NR4A3 (Fig. 3.C) and CD83 (Figs 3.D and 3.E) expression levels were low in HIV-infected individuals when compared to HIV-uninfected individuals. Importantly, this downregulation does not seem to vary depending on the CVD status. We also observed an increase in MZp relative frequencies in the blood of HIV+ individuals as compared to those observed in the HIV uninfected individuals irrespective of CVD status, similar to what we have previously reported [21] (Fig. 3.F).

Upon analysing blood MZp as to the levels of expression of CD39 and CD73, we found that as expected, MZp from PLHIV are the most affected, showing a downregulation of both ectonucleotidases (Figs. 4.A-D) independently of their CVD status. We also found that mature MZ from the blood of HIV+CVD+ individuals present a downregulation in CD39 and CD73 expression levels when compared to uninfected individuals and even when compared to HIV+ CVD- (Figs 4.E-H).

As stated above, membrane CD83 expression levels are decreased in HIV-infected individuals of the CHACS. As CD83 can also be found in a soluble form, which is normally involved in anti-inflammatory functions [33], we sought to investigate the levels of soluble CD83 (sCD83) in individuals with subclinical CVD. We found that HIV-CVD+ individuals possess the highest levels of sCD83 when compared to the other groups (Fig. 5.A). We also observe that levels of sCD83 correlate positively with soluble BAFF levels and with the BAFF/APRIL ratio in this group (Fig. 5.B and 5.C), while correlating negatively with APRIL levels in the HIV+ CVD+ group (Fig. 5.D). Surprisingly, sCD83 levels correlate negatively with HDL levels while correlating positively with the LDL/HDL ratio in the HIV+ CVD+ group (Figs. 5.E and 5.F). Altogether, our data show that in the context of long-term HIV infection, MZp Breg potential is deregulated despite ART, suggesting that MZp immune surveillance capacities may be dampened and thus could contribute to atherosclerosis.

#### **4.5 – APRIL upregulates expression levels of Breg markers by blood MZp**

Lastly, given the seemingly atheroprotective role of APRIL and its reported importance in modulating a Breg profile in humans [34-37] we sought to investigate whether APRIL could have an impact on the expression levels of Breg markers by blood MZp. Hence, to this end, human total B-cells from the blood of uninfected donors were cultured with different concentrations of soluble APRIL overnight, after which, the expression of NR4A1, NR4A3 and IL-10 were analysed by flow-cytometry. We show that while 500 ng/ml APRIL only seems to slightly modulate NR4A1 expression levels (Figs. 6.A and 6.B), it significantly increases those of NR4A3 (Figs. 6.C and 6.D) and IL-10 (Figs. 6.E and 6.F). Interestingly, when soluble BAFF is added along with APRIL, this increase was diminished (Figs. 5.G and 5.I). Overall, our data show that APRIL can modulate the Breg potential of MZp, but this is impeded by excess BAFF.

### **5 – Discussion**

HIV infection is marked by a chronic inflammation that persists despite ART [9-11]. Accordingly, we have shown in this work that the excess of membrane-bound BAFF in the blood of PLHIV from the CHACS persists well beyond 15 years of ART. However, we noticed that excessive levels of soluble BAFF seem to persist on a smaller scale when compared to what we previously observed for other cohorts [12, 16]. This could be related to a certain degree of homeostasis reached after several years of controlled viremia. As such, several inflammatory markers associated with HIV infection such as IL-6 tend to normalise after long-term treatment [38], so it is plausible that the same occurs with levels of soluble BAFF. Interestingly, HIV+CVD+ individuals are those who possess the highest levels of BAFF (in the two sub-cohorts studied in this work), suggesting a link between subclinical atherosclerosis and levels of this molecule, as well as a possible involvement of BAFF in the development of atherosclerosis in these individuals, considering the importance of inflammation in the development of this disease [8].

The role of BAFF in atherosclerosis is complex and seems to differ between mice and humans. Evidence suggests that the neutralisation of BAFF is atherogenic in mice. Furthermore, the overexpression of BAFF in mice may also be atheroprotective. The exact nature of BAFF's atheroprotective role appears to depend on TACI-expressing B-cells [39, 40]. Interestingly, MZ

highly express TACI [13], supporting the atheroprotective role of this population. However, in humans, an excess of BAFF has been found to correlate with CVD development in patients afflicted by autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE) or Sjögren's syndrome (SS) [41, 42]. Furthermore, BAFF has been found to be produced by adipocytes, and could be an adipokine linking obesity (one major cause of CVD development) with inflammation [43, 44]. Lastly, BAFF has been found to induce the apoptosis of precursor endothelial cells in the context of SLE, a marker of endothelial dysfunction, one of the key events implied in atherosclerosis development [45]. Despite being an analog of BAFF, APRIL is considered atheroprotective by its capacity to bind to HSPG such as perlecan, thereby blocking LDL retention and subsequent plaque formation [37]. Interestingly, APRIL has also been shown to favour the differentiation of Bregs, a role which could be involved in protection against atherosclerosis, as Bregs have also been shown to be atheroprotective in mice by dampening the systemic inflammation necessary to the development of the atherosclerosis plaques [34-36].

Our results thus suggest a possible link of excess BAFF in accelerating human atherosclerosis development in the context of HIV. Furthermore, our results provide some evidence for the possibility of the involvement of excess BAFF in the development of atherosclerosis even outside of the HIV context. Indeed, our data show that HIV-CVD+ individuals possess higher levels of membrane-bound BAFF than their uninfected counterparts, which is consistent with the importance of inflammation in this context. In addition, our results demonstrate that BAFF levels correlate positively with many CVD risk factors, notably with TPV, while negatively correlating with CVD protective factors, in both HIV-CVD+ and HIV+CVD+ groups. Indeed, BAFF levels correlate positively with the Framingham Risk Score in HIV-CVD+ but not in HIV+CVD+ individuals. The Framingham Risk Score is the risk percentage of an individual of developing CVD in the next 10 years, based on traditional CVD risk factors such as dyslipidemia, smoking, blood pressure, age and gender [46]. The fact that BAFF levels correlate positively with this score in HIV-CVD+ individuals indicates a link between BAFF levels and CVD development risk factors. Indeed, the fact that BAFF is found to be augmented due to obesity and tabagism could be related to the fact that it correlates with the Framingham risk score [44, 47]. This does not seem to be the case for HIV+CVD+ individuals, where BAFF levels are found in greater excess due

to the HIV context, and not necessarily due to traditional CVD risks. This is in agreement with the fact that PLHIV have a higher risk of developing CVD when compared to uninfected individuals, even when matched for traditional risk factors [6].

APRIL has been shown to directly impede atherosclerosis formation [37]. In accordance with this atheroprotective role, we have shown that APRIL levels correlate negatively with CVD risk factors and positively with CVD protective factors both in HIV-CVD+ and HIV+CVD+ individuals. Interestingly, it was in the latter group that the strongest correlations were made. While we measured total APRIL levels by ELISA, Tsintoulas et al demonstrated an atheroprotective role for the non-canonical APRIL, a form that preferentially binds to HSPG [37]. Further studies are required in order to measure this specific form of APRIL in the CHACS cohort, to assess its importance in HIV-related CVD development.

Differently from what we observed in past studies, APRIL has not been found in excess in HIV-infected individuals of the CHACS. We had previously reported that APRIL was found in excess in the blood of PLHIV from the primary infection cohort and up to one year of ART [12]. The fact that APRIL returns to normal levels after years of treatment is in direct contrast with what has been found for BAFF levels, which are still elevated, especially in HIV+CVD+ individuals. This could represent an imbalance between BAFF's atherogenic role and APRIL's atheroprotective role. Accordingly, we report that the BAFF/APRIL ratio correlates positively with CVD risk factors while correlating negatively with CVD protection markers. This was true for both HIV- and HIV+ individuals. This not only further accentuates the importance of APRIL in protecting from CVD, but also indicates that BAFF atherogenic factor outweighs the impact of APRIL atheroprotective role on CVD development in HIV-infected individuals.

Dyslipidemia is a common comorbidity found with PLHIV. As such, in untreated individuals, total levels of cholesterol, including HDL and LDL are downregulated. Following ART treatment, LDL and total cholesterol increases, while HDL is still downregulated [48]. The fact that high levels of BAFF seem to correlate with low HDL and high LDL could be related to the fact that these modulations are all related to the HIV context, and thus could reflect HIV disease progression. This could also explain APRIL's positive correlation with HDL levels and negative correlation with



the LDL/HDL ratio, as APRIL has also been found to be related to a slower HIV disease progression and a lower immune activation [49]. It is important to note that the CHACS does not control for statin usage. Nevertheless, as seen in Table 1, there are no difference in statin usage between the four groups from our selection.

The excess of BAFF in the HIV context correlates with deregulations in the B-cell compartment, notably on the MZp subset [12, 21]. Indeed, we have recently shown that blood MZp from HIV-infected individuals have a deregulated Breg profile and function, which is directly affected by excess BAFF (Chapter 5). Considering that BAFF is still found in excess in HIV-infected individuals of the CHACS cohort, we expected to find deregulations in their MZp compartments. Given the role of Bregs in atherosclerosis surveillance [36], we also expected that these deregulations would differ between CVD- and CVD+ participants of the HIV-infected groups and HIV-uninfected groups. This hypothesis was found to be only partially true. Indeed, MZp from HIV+ individuals of the CHACS are still deregulated when compared to uninfected individuals even after 15 years of ART, as observed by the downregulation of NR4A3 and CD83 expression levels. Furthermore, CD39 and CD73 expression levels by blood MZp are also lower in HIV-infected individuals, similar to what we and others have reported for MZp and other B-cell populations [50, 51] (Chapter 5). However, we have not found any differences in the expression levels for any of the Breg markers between HIV- CVD- and HIV- CVD+ groups, despite BAFF being found to be relatively higher in the latter. Nonetheless, this was not the case in the HIV-infected groups. Indeed, differently from NR4A3 and CD83, we noticed differences in CD39 and CD73 expression levels between HIV+ CVD- and HIV+ CVD+ individuals, albeit on mature MZ, where HIV+ CVD+ individuals expressed the lowest levels of this molecule, even when compared to the HIV+ CVD- group. This could be of significance, given that the mature MZ are much more frequent in the blood than MZp (Supplementary Figure 1). The adenosine pathway has been shown to be atheroprotective by dampening the inflammation needed to trigger atherosclerosis plaque formation [52, 53]. Thus, by having not only MZp, but also mature MZ expressing lower levels of CD39 and CD73, HIV+ CVD+ individuals are possibly burdened with higher inflammation levels than the other groups, perhaps contributing to atherosclerosis formation. Importantly, the loss of CD39 and CD73 has also been reported in regulatory T-cells of HIV+ CVD+ individuals of the

CHACS cohort, further demonstrating the possible link between deregulations of the adenosine pathway and atherosclerosis [54].

Considering the downregulation of MZp membrane-bound CD83, we sought to measure sCD83 to assess its association with subclinical atherosclerosis. We observed that sCD83 levels are not reflective of MZp membrane CD83 expression levels. Indeed, there are no differences between HIV- and HIV+ individuals, and no correlation between sCD83 levels and MZp CD83 expression (data not shown). This is not surprising however, since CD83 is expressed by several cell populations, such as DCs (for which this molecule is an activation marker) and T-cells, whose CD83 expression might not have been affected by the HIV context [33]. We did, however, notice that HIV- CVD+ individuals possess higher levels of sCD83 in their blood, which could be in response to the inflammatory burden in these individuals. It is possible however that the greater inflammatory burden found in HIV-infected individuals precludes this attempt on regulation. As such, sCD83 correlates positively with BAFF and negatively with APRIL in the HIV+ CVD+ group, while also correlating positively with the BAFF/APRIL ratio and LDL/HDL ratio and negatively with HDL levels in this group. This demonstrates a possible pathological role of sCD83 in atherosclerosis development in HIV-infected individuals as well as a relation between sCD83 levels and HIV disease progression despite ART, as attested by the correlation between this molecule and dyslipdemia. Consistently, sCD83 has been found to be associated with certain pathologies such as malignancies and autoimmune diseases [55-58]. As such, more studies should be conducted to better understand the importance of sCD83 in human atherosclerosis and/or HIV infection.

APRIL has been shown to modulate human Bregs by allowing the generation of an IgA+ Breg population and by increasing IL-10 expression [34, 35]. Thus, we sought to investigate the role of APRIL in modulating the Breg potential of MZp. As expected, APRIL increased NR4A3 and IL-10 expression *in vitro*. Further experiments will need to be conducted to assess if this increase translates to a stronger Breg function. Notably, when B-cells were co-cultured with APRIL and BAFF, the upregulation of Breg markers was dampened. We had previously reported that excess BAFF downregulates NR4As and IL-10 expression levels of MZp from uninfected individuals (Chapter 5). This indicates that in a context of relatively higher levels of BAFF than APRIL, the Breg potential of MZp is affected, impeding atherosclerosis immune surveillance.

## **6 – Conclusion**

In conclusion, we have shown that PLHIV from the CHACS possess an excess level of BAFF in their blood even after 15 years of ART. We have also shown an association between BAFF levels and the presence of subclinical CVD, while also further demonstrating the possible atheroprotective role of APRIL. Lastly, we have shown that MZp in PLHIV are still deregulated even after several years of treatment. Given the cross-sectional aspect of this study, we cannot determine a causal relationship between BAFF and APRIL and CVD development. However, our results suggest a link between levels of BAFF and coronary atherosclerosis presence in PLHIV, which need to be investigated in longitudinal studies. Strategies aimed at the modulation of BAFF and/or APRIL could thus be envisaged to dampen the inflammatory burden, restore Breg immune surveillance and prevent the premature development of CVD in PLHIV.

### **Acknowledgements**

We would like to thank Manel Sadouni, Marc Messier-Peet and Daniel Tremblay-Sher for the clinical data. We would like to thank Matthew Paniconi for the help in doing part of the correlations with BAFF and the clinical data. We would like to thank Mohammed Sylla and Olfa Debbeche for the preparation of the CHACS and healthy donor samples, respectively. We would also like to thank Dre Dominique Gauchat, Philippe St-Onge and Gaël Dulude from the CRCHUM flow cytometry platform. And lastly, we would like to thank all the participants of the CHACS cohort for their invaluable donations.

### **Conflict of Interest**

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

### **Funding**

This work was supported by grant # PJT-148529 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and by the Réseau SIDA from the Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS).

## 7 – References

1. Lewden, C., et al., HIV-infected adults with a CD4 cell count greater than 500 cells/mm<sup>3</sup> on long-term combination antiretroviral therapy reach same mortality rates as the general population. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2007. 46(1): p. 72-7.
2. Triant, V.A., et al., Increased acute myocardial infarction rates and cardiovascular risk factors among patients with human immunodeficiency virus disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2007. 92(7): p. 2506-2512.
3. Lang, S., et al., Increased risk of myocardial infarction in HIV-infected patients in France, relative to the general population. *Aids*, 2010. 24(8): p. 1228-1230.
4. Greene, M., et al., Geriatric Syndromes in Older HIV-Infected Adults. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, 2015. 69(2): p. 161-167.
5. Erlandson, K.M., et al., Functional impairment, disability, and frailty in adults aging with HIV-infection. *Current HIV/AIDS reports*, 2014. 11(3): p. 279-290.
6. Durand, M., et al., The Canadian HIV and aging cohort study - determinants of increased risk of cardio-vascular diseases in HIV-infected individuals: rationale and study protocol. *BMC infectious diseases*, 2017. 17(1): p. 611-611.
7. Vos, A.G., et al., Pro-inflammatory markers in relation to cardiovascular disease in HIV infection. A systematic review. *PloS one*, 2016. 11(1): p. e0147484.
8. Gisterå, A. and G.K. Hansson, The immunology of atherosclerosis. *Nature Reviews Nephrology*, 2017. 13(6): p. 368-380.
9. Brenchley, J.M., et al., Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature Medicine*, 2006. 12(12): p. 1365-1371.
10. Deeks, S.G., HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annual review of medicine*, 2011. 62: p. 141-155.
11. Deeks, S.G., Immune dysfunction, inflammation, and accelerated aging in patients on antiretroviral therapy. *Top HIV Med*, 2009. 17(4): p. 118-23.
12. 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.
13. Cerutti, A., M. Cols, and I. Puga, Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nature reviews. Immunology*, 2013. 13(2): p. 118-132.
14. Mackay, F. and P. Schneider, Cracking the BAFF code. *Nature Reviews Immunology*, 2009. 9(7): p. 491-502.

15. 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.
16. Sabourin-Poirier, C., et al., Blood B Lymphocyte Stimulator (BlyS)/BAFF levels may reflect natural immunity to HIV in highly exposed uninfected Beninese Commercial Sex Workers. *Scientific reports*, 2016. 6: p. 32318-32318.
17. 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. 173-185.
18. Castigli, E., et al., Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. 101(11): p. 3903.
19. Varfolomeev, E., et al., APRIL-Deficient Mice Have Normal Immune System Development. *Molecular and Cellular Biology*, 2004. 24(3): p. 997-1006.
20. Doyon-Laliberté, K., et al., NR4A Expression by Human Marginal Zone B-Cells. *Antibodies (Basel, Switzerland)*, 2019. 8(4): p. 50.
21. 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-e101949.
22. Duren, R.P., S.P. Boudreaux, and O.M. Conneely, Genome Wide Mapping of NR4A Binding Reveals Cooperativity with ETS Factors to Promote Epigenetic Activation of Distal Enhancers in Acute Myeloid Leukemia Cells. *PLOS ONE*, 2016. 11(3): p. e0150450.
23. Allard, B., et al., The adenosine pathway in immuno-oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2020. 17(10): p. 611-629.
24. Sage, A.P., et al., The role of B cells in atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology*, 2019. 16(3): p. 180-196.
25. Prasad, A., et al., Relationship of Autoantibodies to MDA-LDL and ApoB-Immune Complexes to Sex, Ethnicity, Subclinical Atherosclerosis, and Cardiovascular Events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017. 37(6): p. 1213-1221.
26. Tay, C., et al., Follicular B Cells Promote Atherosclerosis via T Cell-Mediated Differentiation Into Plasma Cells and Secreting Pathogenic Immunoglobulin G. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018. 38(5): p. e71-e84.
27. Srikakulapu, P., et al., Artery Tertiary Lymphoid Organs Control Multilayered Territorialized Atherosclerosis B-Cell Responses in Aged ApoE<sup>-/-</sup> Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016. 36(6): p. 1174-85.

28. Nus, M., et al., Marginal zone B cells control the response of follicular helper T cells to a high-cholesterol diet. *Nat Med*, 2017. 23(5): p. 601-610.
29. Nus, M., et al., NR4A1 Deletion in Marginal Zone B Cells Exacerbates Atherosclerosis in Mice-Brief Report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020. 40(11): p. 2598-2604.
30. Boldeanu, I., et al., Prevalence and Characterization of Subclinical Coronary Atherosclerotic Plaque with CT among Individuals with HIV: Results from the Canadian HIV and Aging Cohort Study. *Radiology*, 2021. 299(3): p. 571-580.
31. Chen, Z., et al., In vivo coronary artery plaque assessment with computed tomography angiography: is there an impact of iterative reconstruction on plaque volume and attenuation metrics? *Acta Radiol*, 2017. 58(6): p. 660-669.
32. El-Far, M., et al., Upregulated IL-32 Expression And Reduced Gut Short Chain Fatty Acid Caproic Acid in People Living With HIV With Subclinical Atherosclerosis. *Frontiers in immunology*, 2021. 12: p. 664371-664371.
33. Li, Z., et al., CD83: Activation Marker for Antigen Presenting Cells and Its Therapeutic Potential. *Frontiers in Immunology*, 2019. 10: p. 1312.
34. Hua, C., et al., A proliferation inducing ligand (APRIL) promotes IL-10 production and regulatory functions of human B cells. *J Autoimmun*, 2016. 73: p. 64-72.
35. Fehres, C.M., et al., APRIL Induces a Novel Subset of IgA(+) Regulatory B Cells That Suppress Inflammation via Expression of IL-10 and PD-L1. *Frontiers in immunology*, 2019. 10: p. 1368-1368.
36. Strom, A.C., et al., B regulatory cells are increased in hypercholesterolaemic mice and protect from lesion development via IL-10. *Thromb Haemost*, 2015. 114(4): p. 835-47.
37. Tsiantoulas, D., et al., APRIL limits atherosclerosis by binding to heparan sulfate proteoglycans. *Nature*, 2021. 597(7874): p. 92-96.
38. Sandler, N.G. and I. Sereti, Can early therapy reduce inflammation? *Current opinion in HIV and AIDS*, 2014. 9(1): p. 72-79.
39. Jackson, S.W., et al., Cutting Edge: BAFF Overexpression Reduces Atherosclerosis via TACI-Dependent B Cell Activation. *The Journal of Immunology*, 2016. 197(12): p. 4529.
40. Tsiantoulas, D., et al., B Cell-Activating Factor Neutralization Aggravates Atherosclerosis. *Circulation*, 2018. 138(20): p. 2263-2273.
41. Yong, W.C., A. Sanguankeo, and S. Upala, Association between primary Sjogren's syndrome, arterial stiffness, and subclinical atherosclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Rheumatology*, 2019. 38(2): p. 447-455.

42. Theodorou, E., et al., B-cell activating factor and related genetic variants in lupus related atherosclerosis. *J Autoimmun*, 2018. 92: p. 87-92.
43. Kim, D.-H. and M.-S. Do, BAFF knockout improves systemic inflammation via regulating adipose tissue distribution in high-fat diet-induced obesity. *Experimental & molecular medicine*, 2015. 47(1): p. e129-e129.
44. Kim, Y.-H., et al., B cell activation factor (BAFF) is a novel adipokine that links obesity and inflammation. *Experimental & Molecular Medicine*, 2009. 41(3): p. 208-216.
45. Spinelli, F.R., et al., B lymphocyte stimulator modulates number and function of endothelial progenitor cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy*, 2019. 21(1): p. 245.
46. D'Agostino, R.B., Sr., et al., General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation*, 2008. 117(6): p. 743-53.
47. Nascimento, M., et al., B-Cell Activating Factor Secreted by Neutrophils Is a Critical Player in Lung Inflammation to Cigarette Smoke Exposure. *Front Immunol*, 2020. 11: p. 1622.
48. Malvestutto, C.D. and J.A. Aberg, Management of dyslipidemia in HIV-infected patients. *Clinical lipidology*, 2011. 6(4): p. 447-462.
49. Liu, Y., et al., High APRIL Levels Are Associated With Slow Disease Progression and Low Immune Activation in Chronic HIV-1-Infected Patients. *Frontiers in Medicine*, 2020. 7(299).
50. Chang, W.-X., et al., Skewed CD39/CD73/adenosine pathway in B cells is associated with innate immune hyperactivation in chronic HIV-1 infection. *Translational Medicine Communications*, 2019. 4(1): p. 4.
51. Kim, E.S., et al., Down-regulation of CD73 on B cells of patients with viremic HIV correlates with B cell activation and disease progression. *J Leukoc Biol*, 2017. 101(5): p. 1263-1271.
52. Buchheiser, A., et al., Inactivation of CD73 promotes atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovascular Research*, 2011. 92(2): p. 338-347.
53. Koupenova, M., H. Johnston-Cox, and K. Ravid, Regulation of atherosclerosis and associated risk factors by adenosine and adenosine receptors. *Current atherosclerosis reports*, 2012. 14(5): p. 460-468.
54. Rothan, C., et al., Antiretroviral therapy-treated HIV-infected adults with coronary artery disease are characterized by a distinctive regulatory T-cell signature. *AIDS*, 2021. 35(7).
55. Kristensen, A.M., et al., Expression of soluble CD83 in plasma from early-stage rheumatoid arthritis patients is not modified by anti-TNF- $\alpha$  therapy. *Cytokine*, 2017. 96: p. 1-7.

56. Hock, B.D., et al., Levels of the soluble forms of CD80, CD86, and CD83 are elevated in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients. *Tissue Antigens*, 2006. 67(1): p. 57-60.
57. Hock, B.D., et al., The soluble form of CD83 is present at elevated levels in a number of hematological malignancies. *Leuk Res*, 2004. 28(3): p. 237-41.
58. Hock, B., et al., Release and clinical significance of soluble CD83 in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia research*, 2009. 33(8): p. 1089-1095.

## Figure Legends

### Figure 1

#### **BAFF levels and correlations between soluble BAFF and CVD risk factors in the blood of HIV-uninfected and HIV-infected individuals of the CHACS cohort.**

Levels of soluble (A) and membrane-bound (B) BAFF in the blood of HIV uninfected participants, without and with CVD (HIV-CVD-, HIV-CVD+, respectively), and HIV-infected participants, without and with CVD (HIV+CVD-, HIV+CVD+, respectively) selected in sub-cohort (A). Correlation between total plaque volume (TPV) and soluble BAFF levels in HIV-CVD+ (C) and HIV+CVD+ (D) participants. Correlation between soluble BAFF and HDL (E) levels in HIV+CVD+ participants. Correlation between soluble BAFF and the Framingham risk score (F), LDL (G) and LDL/HDL (H) ratio in HIV- CVD+ participants. LDL – Low Density Lipoprotein; HDL – High Density Lipoprotein; GeoMFI – Geometric Mean Fluorescence Intensity; CVD – Cardiovascular Disease. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

### Figure 2

#### **Soluble APRIL levels and correlations between APRIL, BAFF/APRIL ratio and CVD risk factors in the blood of HIV-uninfected (HIV-) and HIV-infected (HIV+) individuals of the CHACS cohort.**

Levels of soluble APRIL (A) in the blood of HIV uninfected participants, without and with CVD (HIV-CVD-, HIV-CVD+, respectively), and HIV-infected participants, without and with CVD (HIV+CVD-, HIV+CVD+, respectively) selected in sub-cohort (A). Correlation between APRIL and HDL levels (B), Framingham risk score (C) and LDL/HDL ratio (E) in HIV+ CVD+ participants. Correlation between APRIL and Framingham risk score (D) HIV- CVD+ participants. Correlation



between BAFF and APRIL in HIV+ CVD+ (F) and HIV- CVD+ (G) participants. Correlation between BAFF/APRIL ratio and HDL (H), Framingham risk score (I) and LDL/HDL ratio (J) in HIV+ CVD+ participants. Correlation between BAFF/APRIL ratio and Framingham risk score (K), LDL (L) and LDL/HDL ratio (M). LDL – Low Density Lipoprotein; HDL – High Density Lipoprotein. CVD – Cardiovascular Disease. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

### Figure 3

**Expression levels of immunoregulatory markers NR4A1, NR4A3 and CD83 by blood marginal zone precursor (MZp) B-cells of HIV-uninfected (HIV-) and HIV-infected (HIV+) individuals of the CHACS.** Expression levels of NR4A1, NR4A3 and CD83 by blood MZp of HIV uninfected participants, without and with cardiovascular disease (CVD) (HIV-CVD-, HIV-CVD+, respectively), and HIV-infected participants, without and with CVD (HIV+CVD-, HIV+CVD+, respectively) selected in sub-cohort (A). Shown are relative frequency of NR4A1 (A) and CD83 (D), as well as total relative frequencies of MZp in blood (F). MZp NR4A1 (B), NR4A3 (C) and CD83 (E) expression levels. Total relative frequencies of MZp in blood were assessed relatively to the percentage of total blood B-cells, and relative frequencies of MZp expressing NR4A1 and CD83 were assessed relatively to the percentage of total blood MZp B-cells. Expression levels were assessed with Geometric Mean of Fluorescence Intensity (GeoMFI). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

### Figure 4

**Immunoregulatory markers of the adenosine pathway, CD39 and CD73, are downregulated on blood marginal zone precursor (MZp) B-cells of HIV-infected (HIV+) individuals from the CHACS.** Expression levels of CD39 and CD73 by blood MZp and mature MZ of HIV uninfected participants, without and with cardio-vascular disease (CVD) (HIV-CVD-, HIV-CVD+, respectively), and HIV-infected participants, without and with CVD (HIV+CVD-, HIV+CVD+, respectively) selected in sub-cohort (A). Shown are, relative frequencies of MZp and mature MZ expressing CD39 (A, E, respectively) and CD73 (C, G, respectively), as well as their CD39 (B, F) and CD73 (D, H) expression levels. Relative frequencies of MZp and mature MZ B-cells expressing CD39 and CD73 were assessed relatively to the percentage of total blood MZp and mature MZ B-

cells, respectively. Expression levels for these markers were assessed with geometric mean fluorescence intensity (GeoMFI). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

### Figure 5

**Soluble CD83 levels in individuals of the CHACS.** Levels of sCD83 (A) in the blood of HIV uninfected participants, without and with CVD (HIV-CVD-, HIV-CVD+, respectively), and HIV-infected participants, without and with CVD (HIV+CVD-, HIV+CVD+, respectively) selected in sub-cohort (A). Correlation of sCD83 with soluble BAFF levels (B), BAFF/APRIL ratio (C) and APRIL levels (D). Correlation between sCD83 and HDL levels (E) and LDL/HDL ratio (F). CVD – Cardiovascular Diseases LDL – Low Density Lipoprotein; HDL – High Density Lipoprotein; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

### Figure 6

**APRIL upregulates expression levels of immunoregulatory markers such as NR4A1, NR4A3 and IL-10 by blood marginal zone precursor (MZp) B-cells.** MZp relative frequencies of cells expressing and expression levels of NR4A1 (A, B), NR4A3 (C, D) and IL-10 (E, F) following treatment of total B-cells with APRIL at 50 ng/ml, 250 ng/ml and 500 ng/ml. MZp relative frequencies of cells expressing and expression levels of NR4A1 (G, H), NR4A3 (I, J) and IL-10 (K, L) after treatment of total B-cells with BAFF and APRIL at 50 ng/ml and 500 ng/ml. Relative frequencies of MZp expressing NR4A1, NR4A3 and IL-10 were assessed relatively to the percentage of total MZp B-cells. Expression levels for these markers were assessed with geometric mean fluorescence intensity (GeoMFI).  $n = 3$  healthy donors. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

### Supplemental Figure 1

**Gating strategy for flow cytometry analyses.** After excluding doublets and dead cells, total B-cells (CD19+) were positively gated. Then, CD1c+ cells were selected, followed by IgM+ CD27+ double-positive cells. From the latter, the CD10- population was designated as mature marginal zone (MZ) B-cells, while the CD10+ population was designated as MZ precursors (MZp).

### Supplemental Figure 2

**BAFF levels and correlations between soluble BAFF and total plaque volume in the blood of HIV-uninfected and HIV-infected individuals of the CHACS sub-cohort (B).** Levels of soluble BAFF (A) in the blood of HIV uninfected participants, without and with CVD (HIV-CVD-, HIV-CVD+, respectively), and HIV-infected participants, without and with CVD (HIV+CVD-, HIV+CVD+, respectively) selected in sub-cohort (B). Correlation between soluble BAFF and total plaque volume in HIV+ CVD+ (B) and HIV- CVD+ (C) participants of the sub-cohort (B). CVD – Cardiovascular Diseases. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

## Chapitre 6 – Tableau 1

Group	HIV- CVD- (n=20)	HIV- CVD+ (n=20)	HIV+ CVD- (n=20)	HIV+ CVD+ (n=19)	p-value
Age	54.64 (40.5 – 66.5)	61.93 (42.8 – 74.5)	54.66 (44.3 – 65.8)	57.08 (44.8 – 72.8)	0.0085 <sup>1</sup>
No. of male participants	16	13	19	17	0,0700
TPV (mm <sup>3</sup> )	NA	314.1 (10.3 – 2253)	NA	269.1 (25.7 – 1725)	0.2829
LDL (mmol/L)	3.404 (1,910 – 5.280)	3.310 (1,610 – 5,680)	2.449 (1,820 – 4,300)	2.726 (2,090 – 4,300)	0.0024 <sup>2</sup>
HDL (mmol/L)	1.492 (0,94 – 2,67)	1.320 (0,89 – 1,84)	1.168 (0,79 – 1,73)	1.235 (0,59 – 1,73)	0.0394 <sup>3</sup>
Median 10 years Framingham Risk Score (%)	8.474 (2.0 - 18.0)	11.68 (6,0 – 25,0)	10.70 (6,0 – 17,0)	10.95 (6,0 – 19,0)	0.0969
Participants undergoing statin therapy (%)	0	2 (10%)	4 (20%)	2 (10.5%)	1.0000

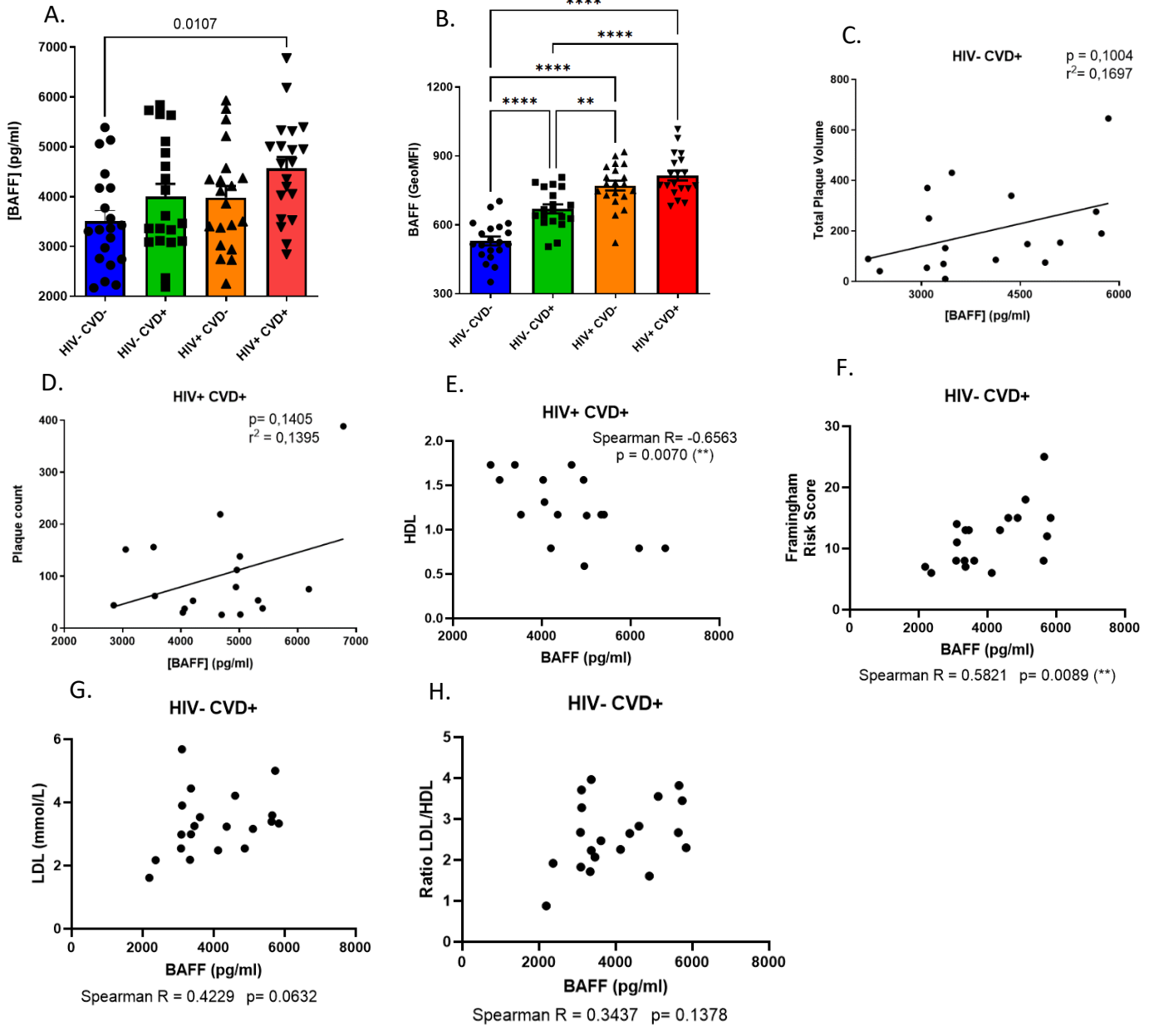
<sup>1</sup>: Significant differences between HIV- CVD- and HIV- CVD+ (p= 0.0153) and between HIV- CVD+ and HIV+ CVD- (0.0155) groups, as assessed by one-way ANOVA with post-hoc Tukey.

<sup>2</sup>: Significant differences between HIV- CVD- and HIV+ CVD- (p = 0.0078) and between HIV- CVD+ and HIV+ CVD- (p = 0.0258) groups, as assessed by Kruskal-Wallis test with post-hoc Dunn.

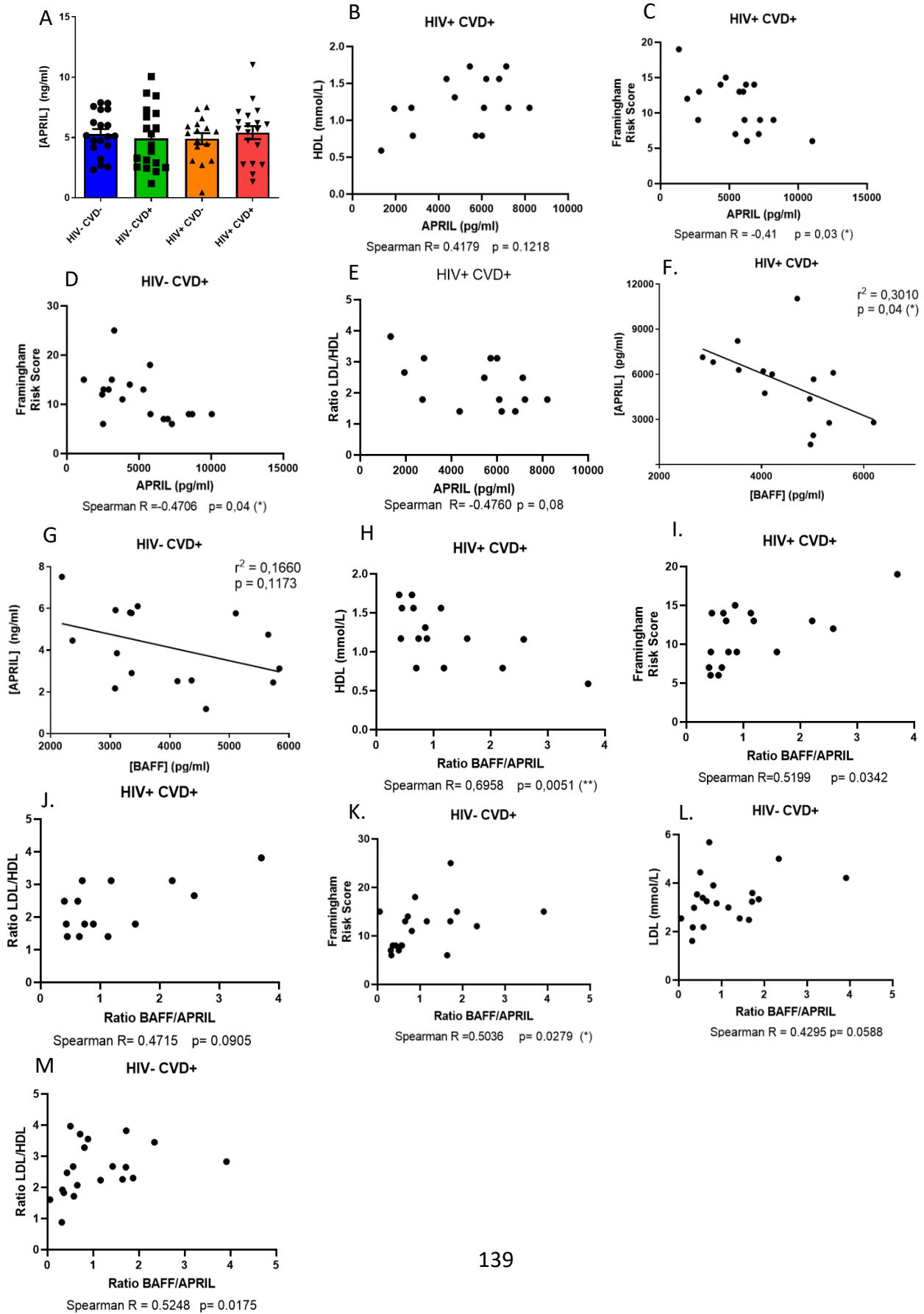
<sup>3</sup>: Significant difference in HIV- CVD- and HIV+ CVD- (p = 0.0394) groups, as assessed by Kruskal-Wallis test with post-hoc Dunn.

LDL – Low Density Lipoprotein; HDL – High Density Lipoprotein; TPV –Total Plaque Volume; CVD – Cardiovascular Diseases

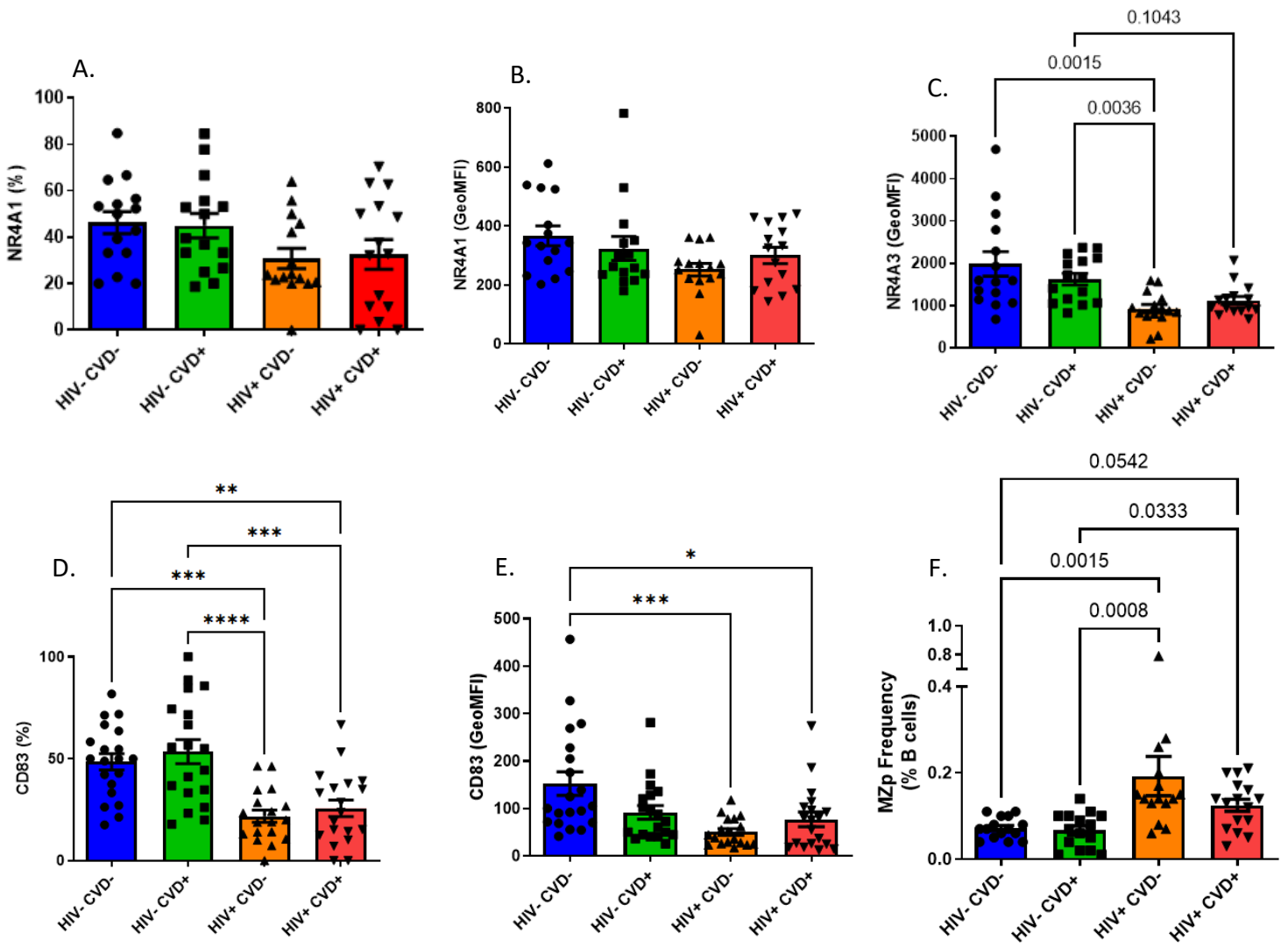
# Chapitre 6 – Figure 1



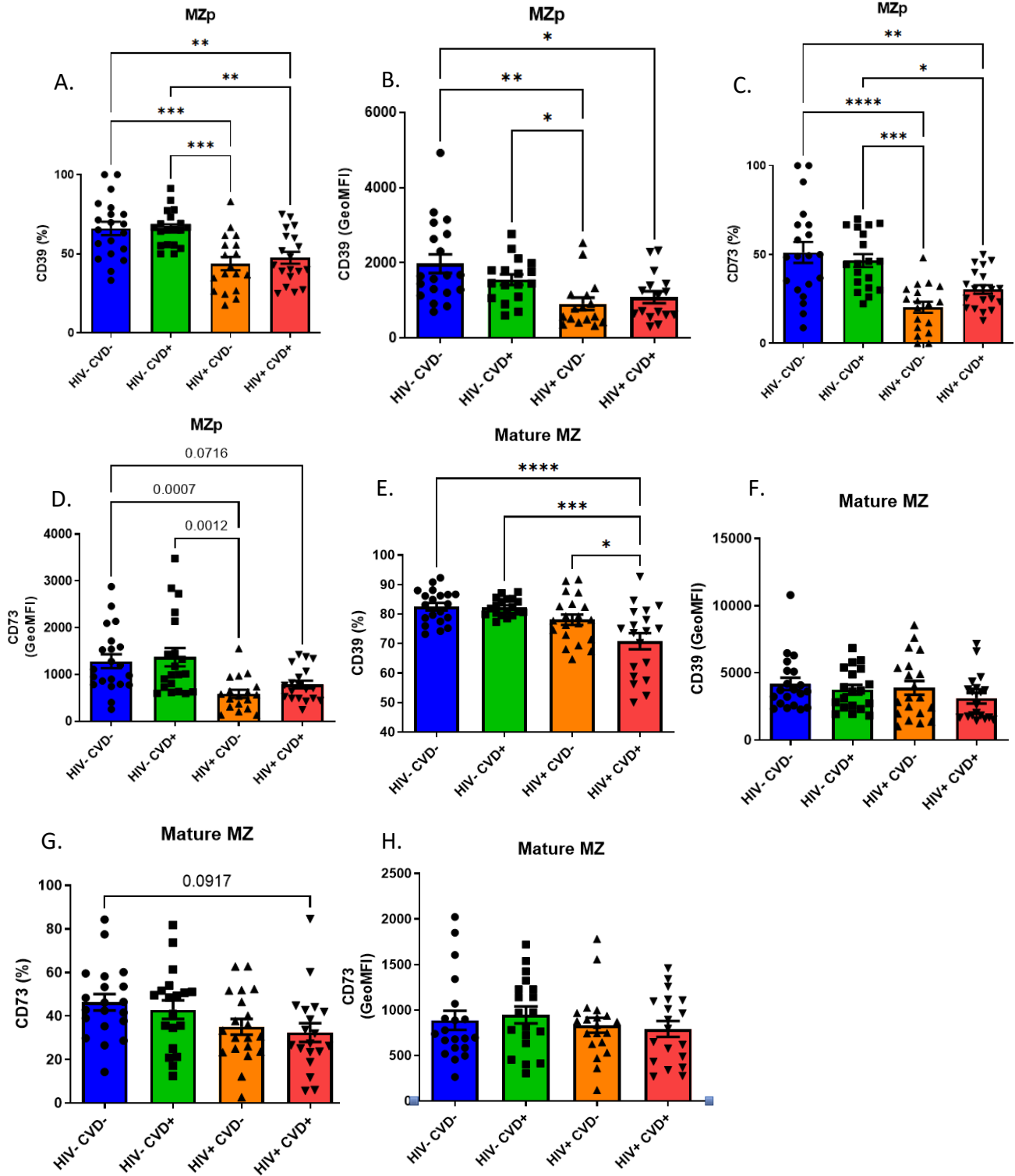
# Chapitre 6 – Figure 2



# Chapitre 6 – Figure 3

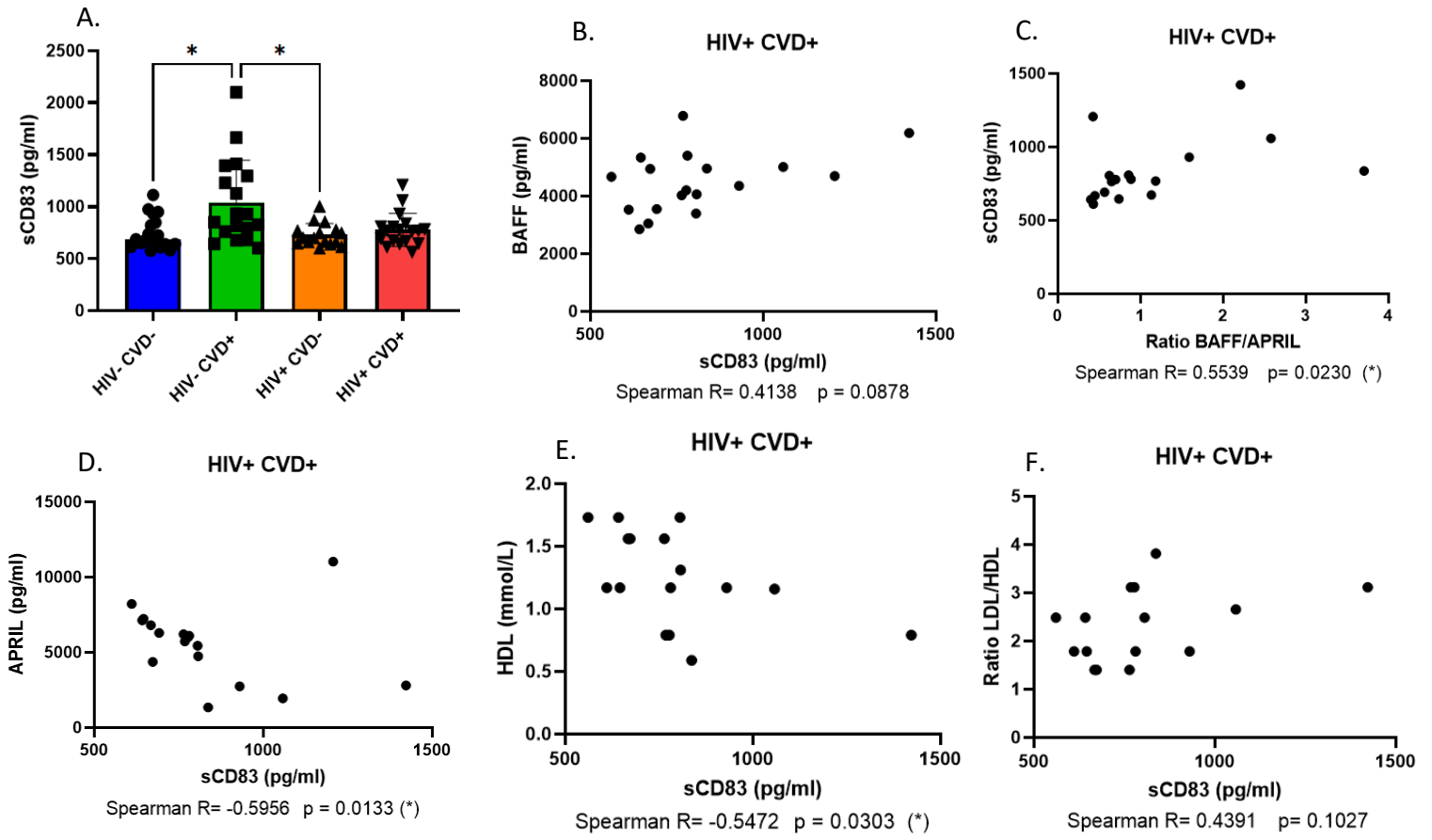


# Chapitre 6 – Figure 4

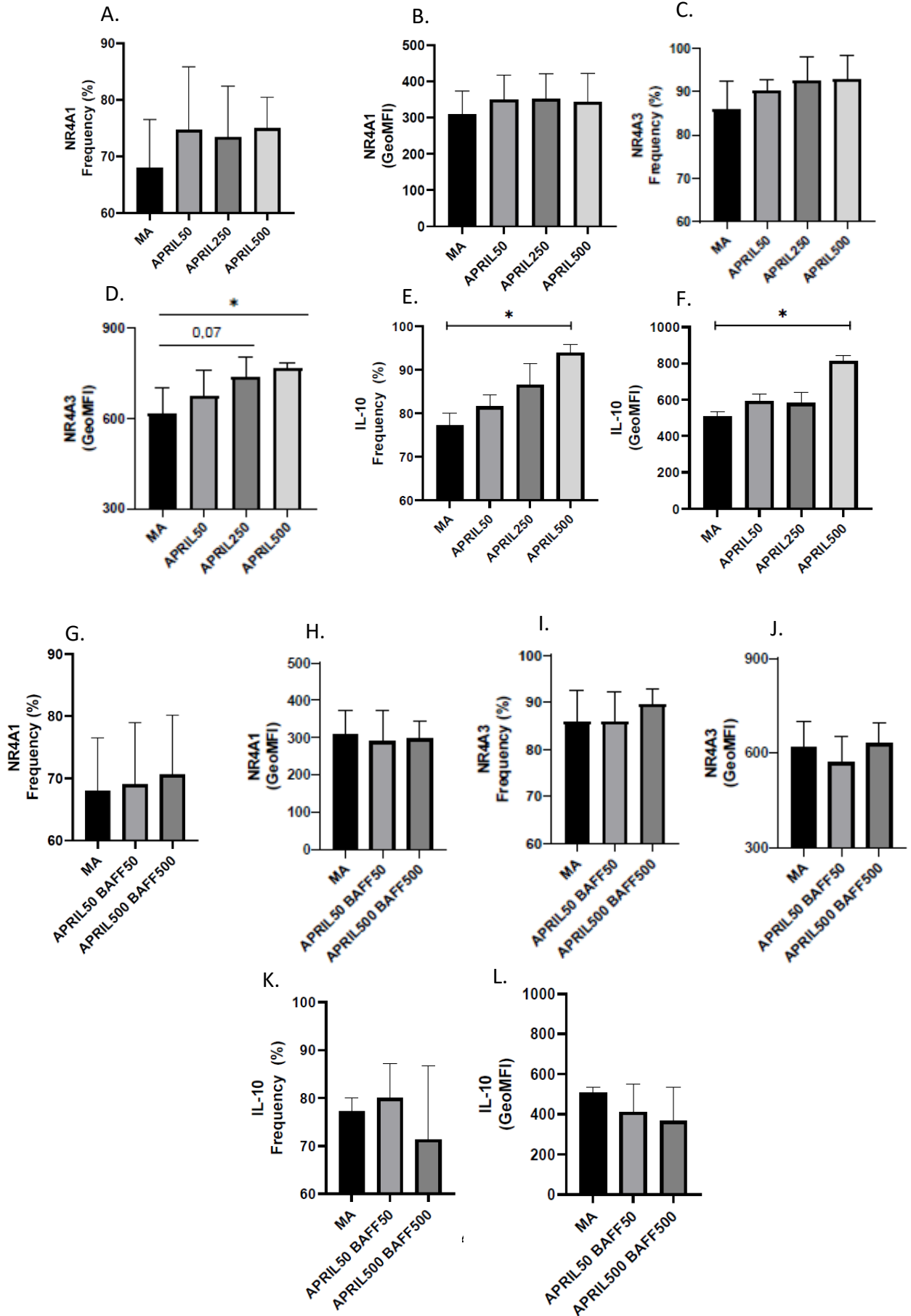




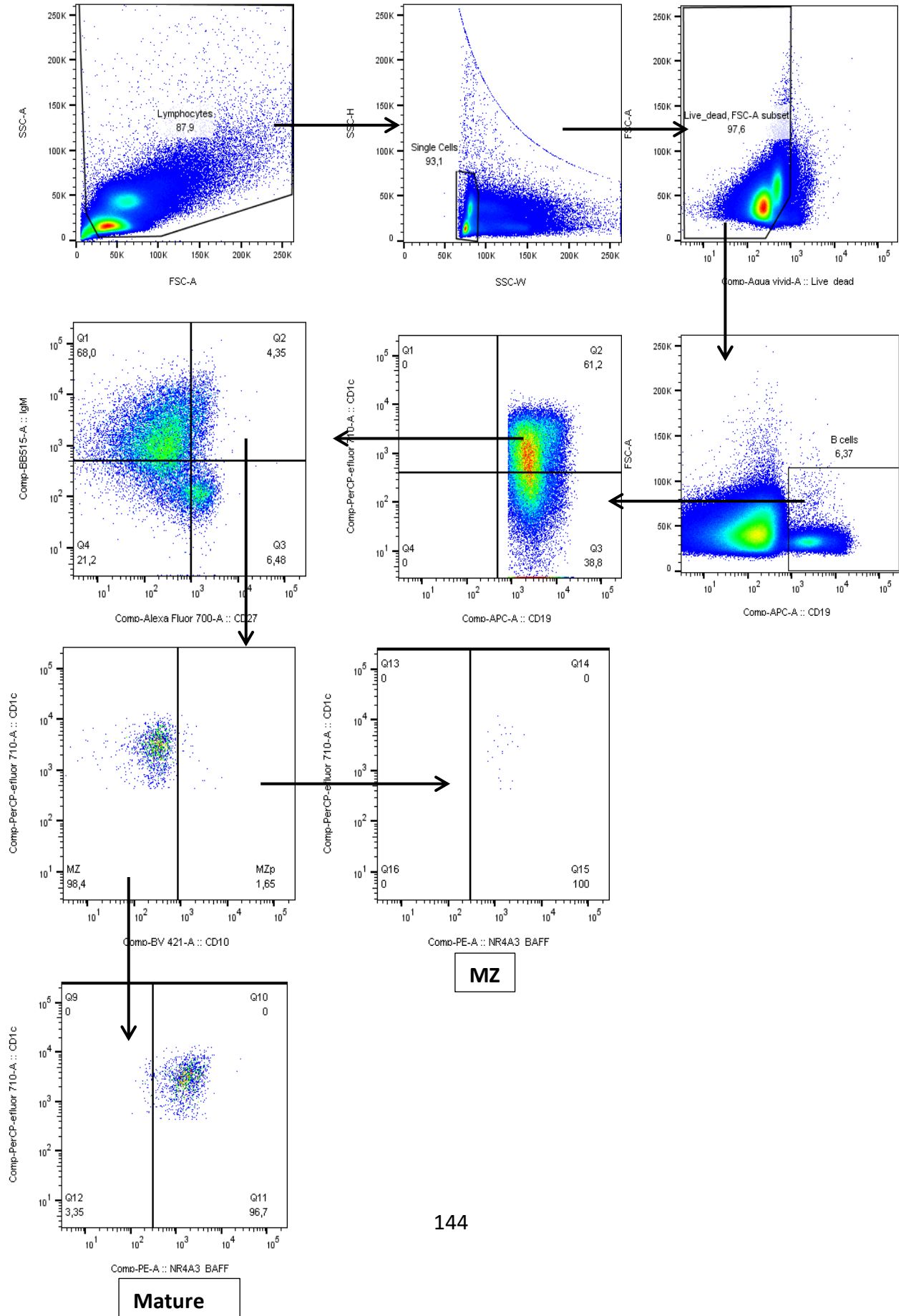
# Chapitre 6 – Figure 5



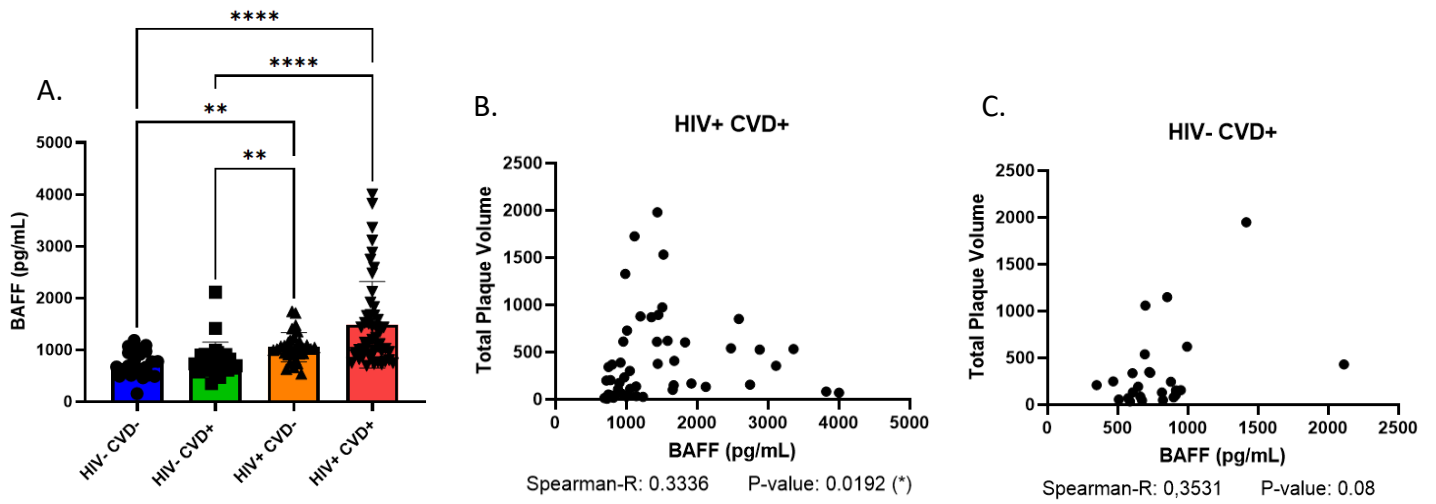
# Chapitre 6 – Figure 6



# Chapitre 6 – Figure Supplemental 1



## Chapitre 6 – Figure Supplemental 2



## Chapitre 7 – Discussion

La thérapie ART a révolutionné la médecine du 20<sup>e</sup> siècle, permettant la conversion de l'infection au VIH d'une maladie mortelle à une maladie chronique contrôlée. Effectivement, de plus en plus, les PVVIH atteignent un âge plus avancé, et leur espérance de vie est comparable à celle de la population générale<sup>242</sup>. Cependant, l'inflammation chronique associée à l'infection par ce virus demeure malgré le traitement, ainsi que les dérégulations qui sont associées à celle-ci<sup>33,277</sup>. Cette inflammation chronique a été associée au développement prématuré des comorbidités associées au vieillissement chez ces individus, lorsque comparés à la population générale<sup>239</sup>.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'excès de BAFF associé à l'infection par le VIH ainsi qu'à la dérégulation du compartiment des cellules B MZ, plus particulièrement quant au potentiel Breg des MZp. Nous nous sommes aussi intéressés à l'impact de ces dérégulations dans le développement prématuré des MCV chez les PVVIH de la CHACS.

### **7.1 – L'excès de BAFF et la dérégulation des MZp persistent malgré la trithérapie à long terme**

Nos résultats démontrent que les individus infectés par le VIH possèdent des niveaux élevés de BAFF dans leur sang même après plusieurs années (15 ans ou plus) de thérapie HAART. Effectivement, nous l'avons démontré dans les deux cohortes utilisées dans ce travail, soit la Cohorte de Primo-Infection (PI) de Montréal du Réseau FRQS (Chapitre 5) et la CHACS (Chapitre 6) : dans la première, BAFF a été retrouvé en excès après presque 2 ans au-delà de la primo-infection, et dans la deuxième, après environ 15 ans. Nous avons démontré par le passé que l'excès de BAFF était associé avec l'inflammation chronique observée chez les individus infectés au VIH<sup>120,121,176,180</sup>. Ainsi, l'excès de BAFF chez ces individus concorde avec la notion que l'inflammation chronique liée au VIH persiste malgré la trithérapie.

Comme décrit dans la section 2.7.1, l'excès de BAFF n'est pas seulement présent dans le contexte du VIH, mais également dans plusieurs maladies autoimmunes comme le lupus ou le

syndrome de Sjögren<sup>90,174</sup>. De même, de façon similaire à ce qui est décrit dans ces conditions, l'excès de BAFF dans le contexte du VIH est relié à plusieurs complications au niveau du compartiment B, notamment la sélection et survie des populations auto-réactives avec production d'auto-anticorps et manifestations auto-immunes. Aussi, on constate le maintien d'un état d'hyperactivation polyclonale des lymphocytes B permettant une production accrue d'anticorps (et ainsi l'hyperglobulinémie) ainsi qu'une perturbation au niveau des fréquences relatives de sous-populations B, avec augmentation de la fréquence des populations MZp<sup>173,177,187,191</sup>. En accord avec ces observations, nos résultats démontrent l'augmentation de la fréquence des MZp sanguins chez les individus infectés au VIH de la CHACS, concomitante avec l'excès de BAFF retrouvé chez ces individus. Ces observations pourraient suggérer que l'excès de BAFF engendrerait un biais dans la différenciation des lymphocytes B transitionnels vers le phénotype MZ. En effet, les signaux de BAFF sont fondamentaux pour cette différenciation, et le fait que BAFF semble augmenter l'expression de NOTCH2 pourrait favoriser davantage un biais<sup>78,278</sup>. De plus, une augmentation de la zone marginale a été observée chez les souris BAFF transgéniques, renforçant cette notion<sup>182</sup>.

Nos résultats démontrent une altération importante du phénotype des MZp reliée au contexte du VIH. Effectivement, l'analyse transcriptomique (par l'intermédiaire du séquençage total de l'ARN) des MZp des individus infectés au VIH de la Cohorte PI démontre une grande modulation de plusieurs centaines de gènes lorsque comparés à des individus non-infectés. Notamment, nous observons une baisse de l'expression des gènes de plusieurs molécules régulatrices, notamment celles de la famille des NR4A et CD83, suggérant que cette population puisse avoir une dérégulation de leur potentiel régulateur. Nous avons également démontré une hausse de l'expression de plusieurs gènes reliés à l'activation des lymphocytes B ainsi que des *interferon stimulated genes* (ISG) telles *CD86*, *SAMHD1*, *OAS1*, *SP110*, parmi d'autres, suggérant que la population des MZ et des MZp est grandement sollicitée pendant l'infection au VIH. Effectivement, nous voyons une augmentation de l'expression de TLR7, important pour la reconnaissance du VIH. Le fait que ces cellules semblent être grandement sollicitée, couplé à l'excès de BAFF, peut être relié à l'état d'hyperactivation des lymphocytes B dans le contexte du

VIH. Puisque les MZ peuvent s'activer via des PRR, une augmentation de l'expression des TLR, par exemple, pourrait contribuer à ce phénotype<sup>87</sup>.

De façon intéressante, nous avons également observé une expression augmentée de certains marqueurs d'épuisement et des régulateurs négatifs de l'activation chez les MZp de la cohorte PI, notamment CD22, CD72, CD85j, et, plus important, de *T-box expressed in T cells* (T-bet) et CD11c<sup>279</sup>. Ces deux dernières sont des molécules qui sont hautement exprimées dans un modèle d'épuisement des lymphocytes B décrit chez la souris, nommé « cellules B associées à l'âge » (*Age-associated B-cells*), ainsi que par des populations de lymphocytes B qui sont augmentées dans des contextes des maladies autoimmunes comme le lupus<sup>280,281</sup>. De façon intéressante, une population similaire (T-bet<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>) a également été décrite dans des patients sévèrement malades de la COVID-19<sup>282</sup>. L'expression de ces marqueurs a également été observée dans le contexte de l'épuisement des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> engendré par une infection virale chronique<sup>283</sup>. Globalement, nos résultats suggèrent que le contexte du VIH engendre une sollicitation des populations MZ (démontrée par leur état d'hyperactivation, comme la signature interféron décrite plus haut) qui pourrait se faire au détriment de leur capacité régulatrice et pourrait même induire un profil d'épuisement de cette population, les empêchant d'effectuer adéquatement leur rôle régulateur, ou même les induisant à engendrer des réponses contribuant à l'hyperglobulinémie ou à des manifestations autoimmunes. Il reste donc à vérifier si l'activation accrue des MZ et MZp dans le contexte du VIH engendrerait la production des anticorps protecteurs ou nuisibles à l'infection ou même dirigés contre l'hôte. En effet, les anticorps produits par les cellules B de premières lignes comme les MZ sont souvent de faible affinité et de nature polyréactive, avec un haut potentiel autoréactif. De façon importante, d'autres groupes ont démontré une augmentation des lymphocytes B exprimant T-bet et qui sont incapables de réaliser la maturation des anticorps, produisant des immunoglobulines de faible affinité envers le virus<sup>284</sup>. De plus, la nature autoréactive de ces anticorps pourrait contribuer au développement de l'athérosclérose, par la production des immunoglobulines de type IgG qui reconnaissent l'oxLDL (les anticorps anti-oxLDL étant des autoanticorps)<sup>262</sup>. La nature de ces anticorps fera l'objet d'études futures.

En utilisant des outils de bioinformatique, nous avons remarqué des baisses d'expression marquées des gènes composant la voie mTOR, fondamentale pour la fonction et l'activation des MZ en baissant son seuil d'activation via la voie de signalisation de TACI et l'adaptateur *myeloid differentiation primary response 88* (Myd88) de la voie des TLR<sup>166</sup>, ainsi que des gènes de la voie *cyclic AMP (cAMP) response element binding protein* (CREB). De façon importante, CREB est responsable de l'expression de plusieurs molécules immunomodulatrices comme IL-6, IL-10 et, notamment, NR4A1, NR4A2 et NR4A3, que nous retrouvons fortement modulés à la baisse dans le contexte du VIH<sup>285-287</sup>. Chez les lymphocytes B, des molécules comme TRAF3 peuvent diminuer l'activité de CREB<sup>288</sup>. De façon intéressante, TRAF3 peut être recruté par TACI lors de la liaison de BAFF à ce dernier<sup>289</sup>. Ainsi, dans un contexte d'excès de BAFF, comme dans le contexte de l'infection par le VIH, l'activation accrue de TACI pourrait favoriser le recrutement de TRAF3, ce qui à son tour permettrait d'inhiber la voie CREB et ainsi l'expression des NR4A. Les NR4A, tout comme CREB, engendrent l'expression des gènes reliés au contrôle de l'activation cellulaire<sup>129,285</sup>. Il est donc possible que la baisse d'expression de ces voies de signalisation permette aux MZp de maintenir leur phénotype hyperactivé, malgré le fait que mTOR, important pour maintenir un seuil d'activation bas des MZ<sup>166</sup>, voit une baisse d'expression des gènes impliqués dans sa voie.

Nous avons confirmé par cytométrie en flux la baisse d'expression des molécules régulatrices des MZp des individus infectés au VIH (NR4A1, NR4A3 et CD83) pendant la primo-infection et même après presque 2 ans de thérapie. De façon intéressante, cette baisse d'expression est également observée chez les individus de la CHACS, suggérant que la perturbation de ce compartiment perdure malgré la thérapie à long-terme. Ces résultats semblent indiquer une perte de la fonction régulatrice des MZp dans le contexte du VIH, une perte qui ne serait pas restaurée par la thérapie ART, suggérant une perte de leur capacité de surveillance immunologique chez ces individus. De plus, nous avons démontré que les niveaux d'expression de certains de ces marqueurs sont davantage diminués lorsque comparés à leur niveau pendant la primo-infection, renforçant la notion d'épuisement cellulaire décrite ci-haut.

Nos résultats démontrent aussi la baisse d'expression d'autres marqueurs Breg des MZp par cytométrie en flux, soit les molécules de la voie de l'adénosine. En effet, il est possible d'observer une baisse d'expression de CD73 chez les individus de la cohorte PI, et de CD39 et



CD73 chez les MZ et les MZp chez les individus de la CHACS. La baisse d'expression de ces molécules par d'autres populations régulatrices comme les Tregs et autres populations B dans le contexte du VIH a déjà été reporté par d'autres équipes, y compris au sein de la CHACS<sup>290-292</sup>. Étant donné la capacité des récepteurs A<sub>2A</sub> et A<sub>2B</sub> à moduler l'expression des NR4A, il est possible que la baisse d'expression de ces molécules puisse se traduire dans une baisse de production globale d'adénosine, qui à son tour pourrait empêcher davantage l'expression des NR4A<sup>168</sup>. De plus, une baisse de production d'adénosine pourrait également affecter l'expression de la voie mTOR, la liaison de l'ADO à ses récepteurs permettant sa modulation<sup>161</sup>. Nous n'avons cependant pas mesuré la production de l'ADO par ces cellules ou sa concentration dans les spécimens sanguins des individus de ces deux cohortes.

Après avoir caractérisé le phénotype Breg des MZp dans le contexte du VIH, il a été question de vérifier leur fonction régulatrice. Afin d'étudier la fonction Breg des MZp du sang, nous avons mis au point une technique de microscopie permettant de visualiser la prolifération et la mort cellulaire de très petites quantités de cellules mises en culture. Nous nous sommes aperçus que la coculture des MZp et des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans un ratio 1:3 ne semblait pas affecter la prolifération cellulaire des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (mesurée par la quantité de cellules CD4<sup>+</sup> dans chaque puits de la plaque à 384 puits utilisée dans cette expérience), mais plutôt la mort cellulaire de ces derniers, ce qui suggère un mécanisme de régulation impliquant les voies d'apoptose. Effectivement, nous avons démontré que les MZp expriment des hauts niveaux de PD-L1, et que l'ajout d'un anticorps anti-PD-1 semblait empêcher l'apoptose des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> médiée par les MZp. De façon importante, les MZp des individus infectés au VIH et de ceux qui ont été sous traitement pendant presque 2 ans, ne sont pas capables d'engendrer cette même régulation. Nous avons également démontré que les niveaux de PD-L1 des MZp semblent diminuer chez les individus infectés au VIH, et ce davantage chez les individus infectés et traités après deux ans, renforçant davantage l'idée d'un épuisement cellulaire à la suite des années d'infection et qui persiste malgré la thérapie.

## 7.2 – L'excès de BAFF est directement relié à la dérégulation de la fonction Breg des MZp dans le contexte du VIH

Tel que mentionné, nos résultats, ainsi que nos anciens travaux démontrent que l'excès de BAFF est un marqueur de l'inflammation chronique présente chez les individus infectés au VIH, qui perdure malgré la thérapie ART<sup>120,121,176,180</sup>. Considérant l'importance de BAFF pour les populations MZ<sup>78</sup>, et considérant leur dérégulation dans le contexte du VIH, nous avons émis l'hypothèse que celle-ci soit reliée à l'excès de cette molécule. Effectivement, nous avons démontré que l'excès de BAFF soluble est capable de moduler à la baisse l'expression des NR4A et CD83 des MZp des individus non-infectés *in vitro*. Puisque BAFF se retrouve en excès chez les individus infectés au VIH, nos résultats suggèrent que cette molécule est responsable de la dérégulation de cette population.

Nous avons démontré antérieurement que la fonction Breg des MZp était reliée à des signaux de CD83, cette molécule étant importante pour le contrôle de la prolifération cellulaire des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés. Donc, nous avons supposé que dans un contexte d'excès de BAFF (et ainsi de baisse d'expression des NR4A et CD83), cette fonction ne pourrait pas être réalisée adéquatement. Nos résultats concordent avec cette hypothèse. Premièrement, en observant les niveaux de BAFF membranaire totaux présents dans des amygdales des donneurs non-infectés, il est possible de voir des différences au niveau de l'expression de cette molécule chez différents donneurs. Considérant le rôle des amygdales en tant que sites effecteurs et le fait que celles-ci sont généralement enlevées par des tonsillectomies à la suite des amygdalites récurrentes<sup>293</sup>, il est logique de penser que le niveau inflammatoire varie au sein des différents donneurs. Ces différences au niveau de BAFF de chaque donneur ont corrélé avec la capacité des MZp de chacun de ceux-ci d'effectuer leur fonction régulatrice : les donneurs dont les amygdales exprimaient les niveaux les plus faibles de BAFF membranaire étaient ceux dont les MZp effectuaient mieux leur fonction régulatrice. En utilisant l'un des donneurs qui possédait des faibles niveaux de BAFF et donc une fonction régulatrice considérée « normale », nous avons démontré que l'ajout de cette molécule en excès empêche la fonction Breg des MZp de s'effectuer adéquatement, faisant un lien entre BAFF en excès et la perte de cette fonction. Ainsi, nous avons démontré un lien entre

les niveaux de BAFF des individus infectés au VIH et la dérégulation de la fonction régulatrice des MZp. En effet, comme décrit ci-haut, les MZp des individus infectés au VIH voient une perte de leur fonction Breg, même après presque deux ans de trithérapie. La fonction régulatrice des MZp des individus de la CHACS n'a pas été mesurée. Cependant, considérant que les cellules de ces individus demeurent dérégulées (par la baisse d'expression de leurs molécules Breg, soit NR4A3, CD83, parmi d'autres) et considérant que les niveaux de BAFF de ceux-ci demeurent élevés, nous croyons que leurs MZp demeurent incapables d'effectuer leur fonction Breg, ce qui pourrait empêcher la surveillance immunologique de cette population face à l'athérosclérose, contribuant au développement prématuré de cette maladie chez les PVVIH. Il aurait été intéressant d'explorer d'autres formes de régulation engendrées par les Bregs chez les PVVIH, comme le contrôle de l'activation des lymphocytes T ou bien la production directe de cytokines anti-inflammatoires autres qu'IL-10, et vérifier si celles-ci sont également affectées dans ce contexte.

### **7.3 – Les liens entre BAFF et l'athérosclérose dans le contexte du VIH**

Comme mentionné auparavant, les individus infectés au VIH développent de manière prématurée des MCV lorsque comparés à la population non-infectée. Plusieurs facteurs sont reliés à celui-ci, notamment l'inflammation chronique associée à l'infection par ce virus<sup>242</sup>. Nous avons démontré que l'excès de BAFF dans le contexte du VIH corrèle avec cette inflammation chronique, et nous avons démontré que BAFF persiste en excès même après plusieurs années de trithérapie. Donc nous nous sommes intéressés à la relation entre BAFF et le développement de l'athérosclérose, étant donné que dans des contextes autoimmuns comme le lupus, l'excès de BAFF est relié avec le développement des MCV chez ces individus<sup>294</sup>.

Nos résultats démontrent que BAFF est retrouvé en excès chez les individus de la CHACS, et que les individus qui sont à la fois infectés au VIH et qui possèdent des plaques d'athérosclérose (VIH<sup>+</sup> MCV<sup>+</sup>) sont ceux qui expriment les niveaux de BAFF les plus élevés, soit sous forme membranaire ou soluble. Nos résultats suggèrent également qu'il y a un lien entre les niveaux de BAFF des individus infectés au VIH de la CHACS et la sévérité de l'athérosclérose. En effet, une corrélation positive entre le volume total des plaques d'athérosclérose coronariennes et les niveaux de BAFF soluble a été retrouvée, ainsi qu'une corrélation positive entre le volume de

plaques mixtes et BAFF soluble, notamment pour les PVVIH, permettant de faire un lien entre la sévérité de l'inflammation chronique retrouvée chez ces individus et la sévérité des MCV développées. En effet, la calcification des plaques est un indicateur de la progression et de la sévérité de l'athérosclérose, notamment lorsque les plaques ne sont pas complètement calcifiées : à ce stade, les plaques d'athérosclérose sont plus fragiles et peuvent se rompre plus facilement, pouvant ainsi causer des embolies et des AVC<sup>255</sup>.

Comme décrit dans la section 3.1.2.3, le rôle de BAFF dans l'athérosclérose est complexe, et peu d'études chez l'humain ont été réalisées en ce sens. Cependant, l'importance de BAFF dans le développement des MCV dans des patients lupiques a été démontré récemment, non seulement les individus atteints du lupus (qui possèdent des niveaux de BAFF en excès) développent de l'athérosclérose plus facilement que les individus non-infectés, mais les MCV sont la cause principale de mortalité chez ces individus<sup>294</sup>. De plus, il a été démontré que le blocage de BAFF chez les individus dont les MCV sont dépendants du contexte du lupus (autrement dit, dans des individus qui ne développent pas de MCV à cause des facteurs traditionnels de risque comme des hauts niveaux de cholestérol) est athéroprotecteur<sup>295</sup>. En effet, cette précision est nécessaire, car le blocage de BAFF lorsque l'athérosclérose est dépendante des facteurs non-reliés aux lymphocytes B (comme des hauts niveaux de cholestérol) chez ces patients est athérogène<sup>295</sup>. Puisque le compartiment B peut être à la fois athéroprotecteur ou athérogène<sup>258</sup>, leur déplétion (causée par le blocage de BAFF) engendra des effets différents dépendamment de la balance des signaux qui mènent au développement de cette maladie, tel qu'observé dans des modèles murins, où BAFF a été démontré athéroprotecteur grâce aux lymphocytes B exprimant TACI<sup>268,269</sup>.

De façon intéressante, BAFF a corrélé inversement avec les niveaux des lipoprotéines de haute densité (*high density lipoprotein* – HDL) chez les individus infectés au VIH. Le HDL est un type de cholestérol dont des hauts niveaux sont considérés comme un facteur protecteur face aux MCV. L'un des symptômes qui afflige souvent les PVVIH au cours de l'infection est la dyslipidémie, où pendant l'infection, les niveaux totaux de cholestérol baissent. Après le début de la thérapie ART, les niveaux de cholestérol totaux, surtout le LDL augmentent, alors que les niveaux de HDL demeurent faibles<sup>296</sup>. Ainsi, il est possible que le fait que BAFF corrèle

négativement avec les HDL puisse être un indicateur de la progression de la MCV en lien avec l'infection au VIH.

Nous avons aussi démontré que BAFF corrèle positivement avec les niveaux de LDL, ainsi que le pourcentage moyen de 10 ans de note de risque Framingham chez les VIH- MCV+. La note de risque Framingham est le risque moyen qu'une personne développe des MCV dans le futur rapproché, basé sur des critères tels que le sexe, l'âge, les niveaux de cholestérol, le tabagisme et la pression artérielle<sup>297</sup>. La dyslipidémie est l'un des critères d'évaluation de la note de risque Framingham. Cette corrélation positive renforce l'importance de BAFF dans le développement des MCV. De façon importante, il a été démontré que BAFF pourrait être produit par des adipocytes, étant ainsi une adipokine permettant de faire un lien entre l'obésité et l'inflammation<sup>272,273</sup>. Puisque l'obésité est intimement reliée aux niveaux de cholestérol et le risque des MCV<sup>298</sup>, il serait important de vérifier si la production de BAFF par les adipocytes pourrait être considérée un facteur de risque pour le développement de l'athérosclérose. De plus, il serait pertinent de vérifier si le contexte du VIH affecte la production de BAFF par ces cellules, notamment dans un contexte d'infection à long terme.

#### **7.4 – Le déséquilibre des niveaux de BAFF et APRIL dans le développement de l'athérosclérose**

Nous avons démontré par le passé que les niveaux d'APRIL sont augmentés dans le contexte du VIH, dès la primo-infection et jusqu'à 1 an de thérapie ART<sup>120</sup>. Or nos résultats démontrent que les niveaux d'APRIL retournent à des niveaux « normaux » (lorsque comparés à des contrôles non-infectés) après plusieurs années de thérapie, suggérant qu'un certain niveau d'homéostasie a été atteint. D'autres molécules pro-inflammatoires associées à l'infection par le VIH, comme IL-6, voient leurs niveaux retournés à des niveaux normaux après que les individus infectés au VIH débutent la thérapie ART<sup>277</sup>. Ce n'est donc pas surprenant de voir que les niveaux d'APRIL se sont stabilisés après plusieurs années de thérapie. Néanmoins, il est intéressant de noter que les niveaux de BAFF ne sont pas stabilisés, malgré le fait que ceux d'APRIL le sont. Ainsi, chez les individus infectés au VIH et traités à long terme, il y a un déséquilibre des niveaux de BAFF et APRIL qui ne semble pas être présent chez ces individus pendant le début de l'infection.

Considérant l'importance d'APRIL pour la protection contre l'athérosclérose<sup>274</sup>, nous nous sommes intéressés à évaluer la corrélation entre les niveaux de cette molécule et certains facteurs de risque ou des facteurs de protection contre les MCV. Nos résultats démontrent que chez les individus VIH+ MCV+, il y a une corrélation positive entre APRIL et des facteurs protecteurs comme le HDL, alors qu'il y a une corrélation négative entre APRIL et des facteurs de risque et des marqueurs de progression de l'athérosclérose comme le ratio LDL/HDL (reconnu comme un facteur de risque important pour le développement des MCV), la note de risque Framingham et le volume de plaques mixtes (des plaques d'athérosclérose qui débutent leur processus de calcification, un indicateur de la progression de la maladie)<sup>255</sup>. De façon importante, chez les VIH- MCV+, APRIL corrèle négativement avec la note de risque Framingham, ce qui renforce le rôle de ce facteur dans la protection contre l'athérosclérose. Le fait qu'APRIL corrèle négativement avec des marqueurs de dyslipidémie, à l'encontre de BAFF, suggère qu'APRIL pourrait corrélérer négativement avec la progression des MCV dans le contexte de l'infection au VIH. Aussi, des hauts niveaux d'APRIL ont été attribués à des niveaux inflammatoires plus bas et à une progression plus lente de l'infection par ce virus<sup>299</sup>.

Considérant le déséquilibre entre BAFF et APRIL chez les PVVIH de la CHACS, il a été question de vérifier si les niveaux de ces deux molécules corrèlent entre eux. Effectivement, nos résultats démontrent que les niveaux de BAFF corrèlent négativement avec les niveaux d'APRIL chez les individus VIH+ MCV+, et une tendance de corrélation négative peut être observée chez les VIH- MCV+. Ainsi, il semblerait que le déséquilibre de BAFF (notamment athérogène) par rapport à APRIL (notamment athéroprotecteur) pourrait être relié au développement de l'athérosclérose chez les PVVIH. Et donc, nous avons voulu vérifier si le ratio BAFF/APRIL pourrait corrélérer avec des marqueurs de risque pour l'athérosclérose. En effet, le ratio BAFF/APRIL corrèle négativement avec le HDL et corrèle positivement avec la note de risque Framingham, le ratio LDL/HDL et le volume de plaques mixtes chez les VIH+ MCV+, ainsi que la note de risque Framingham, le LDL et le ratio LDL/HDL chez les VIH- MCV+, suggérant qu'autant chez les PVVIH que chez les individus non-infectés, le déséquilibre des niveaux de BAFF et APRIL pourrait être relié au développement de l'athérosclérose. Le fait que les individus atteints de maladies autoimmunes caractérisées par l'excès de BAFF développent des MCV plus tôt que la population

générale, couplé au fait que APRIL s'est avéré athéroprotecteur dans la population générale supportent cette notion. Cependant, il est important de noter que nous n'avons que réalisé des études de corrélation. De plus, la nature transversale de notre étude nous empêche de réaliser des liens de causalité entre l'expression de ces molécules et le développement des MCV.

## **7.5 – La dérégulation des MZp dans le développement de l'athérosclérose**

Des populations Breg ont été démontrés importantes pour la protection contre l'athérosclérose<sup>266</sup>. Puisque les MZp voient une dérégulation de leur potentiel Breg dans le contexte du VIH, nous avons émis l'hypothèse qu'il y aurait des différences dans le profil des MZp des individus atteints des MCV lorsque comparés à des individus qui ne sont pas atteints des MCV. Comme décrit ci-haut, nos résultats démontrent que comparativement aux individus VIH-, les MZp des individus infectés au VIH de la CHACS voient une baisse d'expression de NR4A3, CD39, CD73 et CD83 qui n'est pas restaurée par la thérapie ART même après plusieurs années. Cependant, chez les MZp, nous n'observons aucune différence pour l'expression de ces molécules entre le groupe des MCV- et MCV+, ce qui infirme une partie de notre hypothèse, que ce soit chez les individus VIH- que chez les individus VIH+ (malgré le fait que les individus MCV+ possèdent généralement des niveaux plus élevés de BAFF que les individus MCV- du même groupe). Chez les MZ, en revanche, nous observons des différences dans la fréquence des cellules exprimant CD39 et CD73 : les VIH+ MCV+ sont ceux qui expriment le moins ces deux molécules. Considérant l'importance de ces molécules dans la protection contre les MCV<sup>300</sup> ainsi que l'importance reconnue des MZ comme des paliers contre l'athérosclérose<sup>264</sup>, ces résultats suggèrent que la perte d'expression des molécules de la voie de l'adénosine serait reliée au développement des MCV chez les PVVIH. De façon intéressante, la perte de CD39 et CD73 par des Tregs a également été reporté dans le contexte des individus infectés au VIH de la CHACS<sup>290</sup>. Il est important de noter que même si les MZ ont un potentiel Breg plus faible que les MZp, leur plus grande fréquence dans le sang par rapport à ces dernières pourrait faire en sorte que la dérégulation de cette population peut quand même avoir un impact considérable dans la surveillance immunologique des populations MZ face à l'athérosclérose.

Nous avons observé une baisse d'expression de CD83 membranaire par les MZp dans le sang des PVVIH, même après plusieurs années de thérapie ART. Considérant le rôle anti-inflammatoire de CD83 soluble<sup>146</sup>, nous nous sommes intéressés à l'importance de cette molécule face à l'athérosclérose. Nos résultats démontrent que le groupe des individus VIH- MCV+ sont ceux qui possèdent les niveaux de CD83 soluble le plus élevés parmi les quatre groupes. Il est possible que cette molécule puisse être fortement sollicitée pour le contrôle de l'athérosclérose et de l'inflammation qui alimente le développement de cette maladie. De façon intéressante, nous ne voyons pas de différence dans la concentration de sCD83 entre les individus VIH- et VIH+, malgré le fait que nous voyons des différences dans l'expression de cette molécule par les MZp entre ces deux groupes. Ces résultats ne sont pas surprenants, cependant. En effet, CD83 est exprimé par plusieurs types cellulaires, comme les DC et les lymphocytes T, dont l'expression de cette molécule n'est pas nécessairement altérée par le contexte du VIH<sup>146</sup>.

De façon surprenante, nos résultats démontrent que sCD83 corrèle positivement avec BAFF et négativement avec APRIL. De plus, nos résultats démontrent que sCD83 corrèle positivement avec le ratio BAFF/APRIL et avec le volume de LDL, alors qu'il corrèle négativement avec le volume de HDL. Ceci suggère que dans le contexte du VIH, sCD83 semble jouer un rôle plutôt pathogénique, corrélant positivement avec la progression de l'infection par le VIH (et ainsi la dyslipidémie qui s'en suit) ainsi qu'avec l'inflammation chronique, étant possiblement impliqué dans la pathogénèse de l'athérosclérose chez ces individus. En effet, les niveaux de sCD83 ont été démontrés augmentés dans le cas de certaines maladies autoimmunes ainsi que dans le cas de certaines tumeurs<sup>158,159,301,302</sup>. Ainsi, des études se font nécessaires pour mieux comprendre le rôle de sCD83 dans le développement de l'athérosclérose, comme la mesure des niveaux de sCD83 et la corrélation avec l'athérosclérose dans des maladies autoimmunes comme le lupus.

Considérant le rôle d'APRIL dans la différenciation des Bregs ainsi que dans l'expression d'IL-10 par les lymphocytes B humains<sup>275,276</sup>, nous nous sommes intéressés à son potentiel à moduler l'expression des molécules immunorégulatrices des MZp. Nos résultats suggèrent qu'à des hauts niveaux, APRIL est capable d'augmenter l'expression de NR4A3 et IL-10 de façon significative, en accord avec sa capacité à moduler des populations Breg chez l'humain. Il sera important de déterminer si APRIL est capable d'induire une augmentation de la fonction Breg. De



façon intéressante, l'ajout de BAFF conjointement avec APRIL affecte la capacité de cette dernière à moduler le potentiel régulateur des MZp. Ainsi, dans un contexte d'excès de BAFF par rapport à APRIL, il est possible que les effets néfastes de BAFF dépassent les effets bénéfiques d'APRIL dans la modulation du phénotype des MZp. Dans ce même ordre d'idée, il est possible que, dans le contexte du VIH, le rôle athérogène de BAFF dépasse le rôle athéroprotecteur d'APRIL, contribuant au développement prématuré des MCV chez ces individus. Il sera impératif ainsi d'évaluer l'impact de ces deux molécules dans des modèles d'expérimentation *in vivo*.

## 7.6 – Avenues thérapeutiques

Dans le contexte du VIH, il y a un excès de BAFF qui persiste malgré la thérapie ART. Cet excès corrèle avec la dérégulation des cellules du compartiment B, notamment les MZ et MZp. Cette dérégulation est potentiellement une atteinte à la capacité de surveillance immunologique par ces populations à potentiel Breg face à des maladies telles que l'athérosclérose, contribuant de cette manière au développement des MCV chez les PVVIH. Ainsi, des stratégies permettant de restaurer l'immunocompétence de ces populations pourraient être envisagées afin de prévenir le développement prématuré des MCV chez ces individus.

Des approches thérapeutiques ciblant BAFF sont des stratégies fortes intéressantes dans le contexte du VIH, où cette molécule est retrouvée en excès pendant toute la durée de l'infection, et ce même après plusieurs années de thérapie ART. En effet, des anticorps monoclonaux thérapeutiques permettant de neutraliser spécifiquement BAFF (Belimumab, ou couramment connu sous le nom de Benlysta) existent déjà et sont approuvés dans le contexte du lupus<sup>303</sup>. Cependant, l'utilisation de ce type de traitement doit se faire de façon judicieuse. En effet, BAFF étant un facteur de survie fondamental pour les lymphocytes B, des stratégies de neutralisation de BAFF peuvent induire à la déplétion des populations de lymphocytes B autant délétères pour la santé de l'hôte que bénéfiques<sup>91</sup>. Ceci est encore plus important à considérer dans le cas de l'athérosclérose. En effet, il a été démontré dans le contexte du lupus que la neutralisation de BAFF pourrait être autant athéroprotectrice qu'athérogène, dépendamment des niveaux de cholestérol (et ainsi de si celle-ci est une conséquence de la dérégulation des lymphocytes B ou si cette maladie est originaire des habitudes alimentaires de l'individu,

respectivement)<sup>295</sup>. De plus, chez la souris, la neutralisation de BAFF s'est avérée athérogène, à cause de la déplétion des populations de lymphocytes B athéroprotectrices<sup>268,269</sup>. Ainsi, un régime adapté au contexte de l'individu serait le choix souhaitable. En effet, en administrant un tel traitement de façon ponctuelle, il serait possible d'éliminer les populations B indésirables, à potentiel autoréactif, qui ont été sélectionnées grâce à l'excès de cette molécule et qui en dépendant pour leur survie<sup>187,188</sup>.

Des stratégies permettant de restaurer l'expression des NR4A chez les MZp, et ainsi leur potentiel régulateur, pourraient être également envisagées. En effet, des médicaments comme la dihydroergotamine (DHE), un médicament couramment utilisé pour des migraines, a été démontré capable d'augmenter l'expression des NR4A. Son utilisation pour le traitement de certains types de leucémie (qui voient leur niveau d'expression des NR4A plus faible) est en cours en ce moment, afin d'induire la mort cellulaire de celles-ci (les NR4A étant importants pour le contrôle cellulaire via l'apoptose)<sup>128,304</sup>. Ainsi, il serait intéressant de vérifier si le traitement avec le DHE permettrait de restaurer l'immunocompétence des MZp dans le contexte du VIH, ou permettrait de les éliminer par apoptose. Des études sur ce point sont menées en ce moment.

Finalement, nos résultats suggèrent une capacité d'APRIL à moduler la fonction Breg des MZp en augmentant l'expression des NR4A et d'IL-10. Une administration d'APRIL couplée à l'un des traitements décrits ci-haut pourrait permettre de restaurer l'immunocompétence des MZp des PVVIH tout en éliminant les populations plus indésirables, quoique celle-ci n'a jamais été réalisée auparavant.

## Chapitre 8 – Conclusion

En conclusion, nous avons démontré que, dans le contexte du VIH, il y a un excès de BAFF sanguin qui s'établit dès la primo-infection et qui perdure même après 15 ans de thérapie ART et que cet excès pourrait être relié au développement prématuré des MCV chez les PVVIH. Nous avons aussi démontré que, dans le contexte du VIH, les MZp voient une altération de leur profil Breg, par la perte d'expression de leurs molécules régulatrices comme NR4A1, NR4A3, CD39, CD73 et CD83 et par la perte de leur fonction Breg. De façon importante, nous avons démontré que l'excès de BAFF semble directement impliqué dans cette perte de potentiel Breg. Nous avons démontré également que cette altération de leur profil Breg n'est pas restaurée par la thérapie ART et pourrait contribuer davantage au développement des MCV chez les PVVIH à cause de la perte de la capacité de surveillance immunologique des MZ et MZp.

De plus, nous démontrons que bien que BAFF soit en excès dans le sang des PVVIH, APRIL ne l'est pas après plusieurs années de thérapie, créant un déséquilibre entre les niveaux sanguins de ces deux facteurs chez des individus traités. Nous avons démontré qu'APRIL corrèle avec des facteurs athéroprotecteurs, à l'encontre de BAFF, qui corrèle avec des facteurs athérogènes. De plus, nous avons démontré que le ratio BAFF/APRIL corrèle avec des facteurs de risque pour le développement de l'athérosclérose. Finalement, nous avons démontré que APRIL est capable de moduler le potentiel Breg des MZp *in vitro* alors que BAFF est capable d'aller à l'encontre de cette modulation. Ainsi, nos résultats permettent de faire un lien entre le déséquilibre entre BAFF et APRIL et le développement prématuré des MCV chez les PVVIH, créant ainsi une ouverture vers des stratégies thérapeutiques visant la modulation de ces facteurs et/ou la restauration du potentiel Breg des MZp.

## Références Bibliographiques

- 1 UNIAIDS. *Fact sheet - Latest global and regional statistics on the status of the AIDS epidemic.*,  
<[https://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/UNAIDS\\_FactSheet\\_en.pdf](https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_en.pdf)>  
(2021).
- 2 German Advisory Committee Blood, S. A. o. P. T. b. B. Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfus Med Hemother* **43**, 203-222, doi:10.1159/000445852 (2016).
- 3 Hughes, S. H. Reverse Transcription of Retroviruses and LTR Retrotransposons. *Microbiol Spectr* **3**, MDNA3-2014, doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0027-2014 (2015).
- 4 Sodroski, J. *et al.* Trans-acting transcriptional regulation of human T-cell leukemia virus type III long terminal repeat. *Science* **227**, 171-173, doi:10.1126/science.2981427 (1985).
- 5 Kao, S. Y., Calman, A. F., Luciw, P. A. & Peterlin, B. M. Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature* **330**, 489-493, doi:10.1038/330489a0 (1987).
- 6 Blissenbach, M., Grewe, B., Hoffmann, B., Brandt, S. & Überla, K. Nuclear RNA Export and Packaging Functions of HIV-1 Rev Revisited. *Journal of Virology* **84**, 6598, doi:10.1128/JVI.02264-09 (2010).
- 7 Rose, K. M., Marin, M., Kozak, S. L. & Kabat, D. The viral infectivity factor (Vif) of HIV-1 unveiled. *Trends Mol Med* **10**, 291-297, doi:10.1016/j.molmed.2004.04.008 (2004).
- 8 Colomer-Lluch, M., Ruiz, A., Moris, A. & Prado, J. G. Restriction Factors: From Intrinsic Viral Restriction to Shaping Cellular Immunity Against HIV-1. *Frontiers in immunology* **9**, 2876-2876, doi:10.3389/fimmu.2018.02876 (2018).
- 9 Laguette, N. *et al.* Evolutionary and functional analyses of the interaction between the myeloid restriction factor SAMHD1 and the lentiviral Vpx protein. *Cell host & microbe* **11**, 205-217, doi:10.1016/j.chom.2012.01.007 (2012).
- 10 Kogan, M. & Rappaport, J. HIV-1 Accessory Protein Vpr: Relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention. *Retrovirology* **8**, 25, doi:10.1186/1742-4690-8-25 (2011).
- 11 Basmaciogullari, S. & Pizzato, M. The activity of Nef on HIV-1 infectivity. *Front Microbiol* **5**, 232-232, doi:10.3389/fmicb.2014.00232 (2014).
- 12 Scully, E. & Alter, G. NK Cells in HIV Disease. *Curr HIV/AIDS Rep* **13**, 85-94, doi:10.1007/s11904-016-0310-3 (2016).
- 13 Rasaiyaah, J. *et al.* HIV-1 evades innate immune recognition through specific cofactor recruitment. *Nature* **503**, 402-405, doi:10.1038/nature12769 (2013).
- 14 Hu, W.-S. & Hughes, S. H. HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006882, doi:10.1101/cshperspect.a006882 (2012).
- 15 Popov, S. *et al.* Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *The EMBO journal* **17**, 909-917, doi:10.1093/emboj/17.4.909 (1998).
- 16 Sabo, Y. *et al.* HIV-1 Induces the Formation of Stable Microtubules to Enhance Early Infection. *Cell Host & Microbe* **14**, 535-546, doi:<https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.10.012> (2013).

- 17 Achuthan, V., Perreira, J. M., Ahn, J. J., Brass, A. L. & Engelman, A. N. Capsid-CPSF6 interaction: Master regulator of nuclear HIV-1 positioning and integration. *J Life Sci (Westlake Village)* **1**, 39-45, doi:10.36069/jols/20190604 (2019).
- 18 Sowd, G. A. *et al.* A critical role for alternative polyadenylation factor CPSF6 in targeting HIV-1 integration to transcriptionally active chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E1054-1063, doi:10.1073/pnas.1524213113 (2016).
- 19 Sloan, R. D. & Wainberg, M. A. The role of unintegrated DNA in HIV infection. *Retrovirology* **8**, 52, doi:10.1186/1742-4690-8-52 (2011).
- 20 Sundquist, W. I. & Kräusslich, H.-G. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006924-a006924, doi:10.1101/cshperspect.a006924 (2012).
- 21 Zhu, T. *et al.* An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* **391**, 594-597, doi:10.1038/35400 (1998).
- 22 Mdofo, R., Kim, A. A. & De Cock, K. M. in *Infectious Diseases (Fourth Edition)* (eds Jonathan Cohen, William G. Powderly, & Steven M. Opal) 812-823.e812 (Elsevier, 2017).
- 23 Simon, F. *et al.* Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* **4**, 1032-1037, doi:10.1038/2017 (1998).
- 24 Vallari, A. *et al.* Confirmation of Putative HIV-1 Group P in Cameroon. *Journal of Virology* **85**, 1403-1407, doi:doi:10.1128/JVI.02005-10 (2011).
- 25 Plantier, J.-C. *et al.* A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature Medicine* **15**, 871-872, doi:10.1038/nm.2016 (2009).
- 26 Vallari, A. *et al.* Four New HIV-1 Group N Isolates from Cameroon: Prevalence Continues to Be Low. *AIDS Research and Human Retroviruses* **26**, 109-115, doi:10.1089/aid.2009.0178 (2010).
- 27 Taylor, B. S., Sobieszczyk, M. E., McCutchan, F. E. & Hammer, S. M. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med* **358**, 1590-1602, doi:10.1056/NEJMra0706737 (2008).
- 28 Deeks, S. G., Overbaugh, J., Phillips, A. & Buchbinder, S. HIV infection. *Nat Rev Dis Primers* **1**, 15035, doi:10.1038/nrdp.2015.35 (2015).
- 29 Kassutto, S. & Rosenberg, E. S. Primary HIV Type 1 Infection. *Clinical Infectious Diseases* **38**, 1447-1453, doi:10.1086/420745 (2004).
- 30 Brenchley, J. M. *et al.* Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood* **112**, 2826-2835, doi:10.1182/blood-2008-05-159301 (2008).
- 31 Brenchley, J. M. *et al.* CD4+ T Cell Depletion during all Stages of HIV Disease Occurs Predominantly in the Gastrointestinal Tract. *Journal of Experimental Medicine* **200**, 749-759, doi:10.1084/jem.20040874 (2004).
- 32 Cecchinato, V. *et al.* Altered balance between Th17 and Th1 cells at mucosal sites predicts AIDS progression in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *Mucosal Immunol* **1**, 279-288, doi:10.1038/mi.2008.14 (2008).
- 33 Brenchley, J. M. *et al.* Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature Medicine* **12**, 1365-1371, doi:10.1038/nm1511 (2006).
- 34 Schneider, E. *et al.* Revised Surveillance Case Definitions for HIV Infection Among Adults, Adolescents, and Children Aged <18 Months and for HIV Infection and AIDS Among Children Aged 18 Months to <13 Years — United States, 2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report: Recommendations and Reports* **57**, 1-12 (2008).

- 35 Weinroth, S. E., Parenti, D. M. & Simon, G. L. Wasting syndrome in AIDS: pathophysiologic mechanisms and therapeutic approaches. *Infect Agents Dis* **4**, 76-94 (1995).
- 36 Mellors, J. W. *et al.* Prognosis in HIV-1 Infection Predicted by the Quantity of Virus in Plasma. *Science* **272**, 1167, doi:10.1126/science.272.5265.1167 (1996).
- 37 Pantaleo, G. & Fauci, A. S. IMMUNOPATHOGENESIS OF HIV INFECTION. *Annual Review of Microbiology* **50**, 825-854, doi:10.1146/annurev.micro.50.1.825 (1996).
- 38 Olson, A. D. *et al.* Evaluation of Rapid Progressors in HIV Infection as an Extreme Phenotype. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **67** (2014).
- 39 Deeks, S. G. & Walker, B. D. Human Immunodeficiency Virus Controllers: Mechanisms of Durable Virus Control in the Absence of Antiretroviral Therapy. *Immunity* **27**, 406-416, doi:<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.08.010> (2007).
- 40 Deacon, N. J. *et al.* Genomic Structure of an Attenuated Quasi Species of HIV-1 from a Blood Transfusion Donor and Recipients. *Science* **270**, 988, doi:10.1126/science.270.5238.988 (1995).
- 41 Kirchhoff, F., Greenough, T. C., Brettler, D. B., Sullivan, J. L. & Desrosiers, R. C. Absence of Intact nef Sequences in a Long-Term Survivor with Nonprogressive HIV-1 Infection. *New England Journal of Medicine* **332**, 228-232, doi:10.1056/nejm199501263320405 (1995).
- 42 Mologni, D. *et al.* Vpr and HIV-1 disease progression: R77Q mutation is associated with long-term control of HIV-1 infection in different groups of patients. *AIDS* **20** (2006).
- 43 Cruz, N. V. G., Amorim, R., Oliveira, F. E., Speranza, F. A. C. & Costa, L. J. Mutations in the nef and vif genes associated with progression to AIDS in elite controller and slow-progressor Patients. *Journal of Medical Virology* **85**, 563-574, doi:<https://doi.org/10.1002/jmv.23512> (2013).
- 44 Margolis, L. & Shattock, R. Selective transmission of CCR5-utilizing HIV-1: the 'gatekeeper' problem resolved? *Nature Reviews Microbiology* **4**, 312-317, doi:10.1038/nrmicro1387 (2006).
- 45 Wilen, C. B., Tilton, J. C. & Doms, R. W. HIV: cell binding and entry. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, doi:10.1101/cshperspect.a006866 (2012).
- 46 Raymond, S. *et al.* CXCR4-using viruses in plasma and peripheral blood mononuclear cells during primary HIV-1 infection and impact on disease progression. *AIDS* **24** (2010).
- 47 Shepherd, J. *et al.* Emergence and Persistence of CXCR4-Tropic HIV-1 in a Population of Men from the Multicenter AIDS Cohort Study. *The Journal of Infectious Diseases* **198**, 1104-1112, doi:10.1086/591623 (2008).
- 48 Bader, J. *et al.* Correlating HIV tropism with immunological response under combination antiretroviral therapy. *HIV Medicine* **17**, 615-622, doi:<https://doi.org/10.1111/hiv.12365> (2016).
- 49 Liu, R. *et al.* Homozygous Defect in HIV-1 Coreceptor Accounts for Resistance of Some Multiply-Exposed Individuals to HIV-1 Infection. *Cell* **86**, 367-377, doi:[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80110-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80110-5) (1996).
- 50 Stewart, G. J. *et al.* Increased frequency of CCR-5 delta 32 heterozygotes among long-term non-progressors with HIV-1 infection. The Australian Long-Term Non-Progressor Study Group. *Aids* **11**, 1833-1838, doi:10.1097/00002030-199715000-00007 (1997).
- 51 Lopalco, L. CCR5: From Natural Resistance to a New Anti-HIV Strategy. *Viruses* **2**, 574-600, doi:10.3390/v2020574 (2010).

- 52 Platt, E. J., Wehrly, K., Kuhmann, S. E., Chesebro, B. & Kabat, D. Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **72**, 2855-2864, doi:10.1128/jvi.72.4.2855-2864.1998 (1998).
- 53 Reynes, J. *et al.* CD4+ T cell surface CCR5 density as a determining factor of virus load in persons infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* **181**, 927-932, doi:10.1086/315315 (2000).
- 54 Meijerink, H. *et al.* The number of CCR5 expressing CD4+ T lymphocytes is lower in HIV-infected long-term non-progressors with viral control compared to normal progressors: a cross-sectional study. *BMC Infectious Diseases* **14**, 683, doi:10.1186/s12879-014-0683-0 (2014).
- 55 Alkhatib, G. The biology of CCR5 and CXCR4. *Curr Opin HIV AIDS* **4**, 96-103, doi:10.1097/COH.0b013e328324bbec (2009).
- 56 Lajoie, J. *et al.* Chemokine Expression Patterns in the Systemic and Genital Tract Compartments are Associated with HIV-1 Infection in Women from Benin. *Journal of Clinical Immunology* **30**, 90-98, doi:10.1007/s10875-009-9343-3 (2010).
- 57 Gonzalez, E. *et al.* The Influence of CCL3L1 Gene-Containing Segmental Duplications on HIV-1/AIDS Susceptibility. *Science* **307**, 1434, doi:10.1126/science.1101160 (2005).
- 58 Buhler, S. & Sanchez-Mazas, A. HLA DNA sequence variation among human populations: molecular signatures of demographic and selective events. *PloS one* **6**, e14643-e14643, doi:10.1371/journal.pone.0014643 (2011).
- 59 Carrington, M. & O'Brien, S. J. The Influence of HLA Genotype on AIDS. *Annual Review of Medicine* **54**, 535-551, doi:10.1146/annurev.med.54.101601.152346 (2003).
- 60 Poudrier, J., Thibodeau, V. & Roger, M. Natural Immunity to HIV: A Delicate Balance between Strength and Control. *Clinical and Developmental Immunology* **2012**, 875821, doi:10.1155/2012/875821 (2012).
- 61 Fourcade, L., Poudrier, J. & Roger, M. Natural Immunity to HIV: A Template for Vaccine Strategies. *Viruses* **10**, 215 (2018).
- 62 Blondin-Ladrie, L., Aranguren, M., Doyon-Laliberté, K., Poudrier, J. & Roger, M. The Importance of Regulation in Natural Immunity to HIV. *Vaccines (Basel)* **9**, 271, doi:10.3390/vaccines9030271 (2021).
- 63 Finzi, D. *et al.* Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nature Medicine* **5**, 512-517, doi:10.1038/8394 (1999).
- 64 Hütter, G. *et al.* Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine* **360**, 692-698, doi:10.1056/NEJMoa0802905 (2009).
- 65 Gupta, R. K. *et al.* Evidence for HIV-1 cure after CCR5delta32 allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation 30 months post analytical treatment interruption: a case report. *The Lancet HIV* **7**, e340-e347, doi:10.1016/S2352-3018(20)30069-2 (2020).
- 66 Jensen, B. *et al.* Proceedings of the Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). (2019).

- 67 Kordelas, L., Verheyen, J. & Esser, S. Shift of HIV Tropism in Stem-Cell Transplantation with CCR5 Delta32 Mutation. *New England Journal of Medicine* **371**, 880-882, doi:10.1056/NEJMc1405805 (2014).
- 68 Timothy J. Henrich, E. H., Francisco M. Marty, et al. Antiretroviral-Free HIV-1 Remission and Viral Rebound After Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Annals of Internal Medicine* **161**, 319-327, doi:10.7326/m14-1027 %m 25047577 (2014).
- 69 Cummins, N. W. *et al.* Extensive virologic and immunologic characterization in an HIV-infected individual following allogeneic stem cell transplant and analytic cessation of antiretroviral therapy: A case study. *PLOS Medicine* **14**, e1002461, doi:10.1371/journal.pmed.1002461 (2017).
- 70 Siliciano, J. D. *et al.* Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nature Medicine* **9**, 727-728, doi:10.1038/nm880 (2003).
- 71 Fischl, M. A. *et al.* The Efficacy of Azidothymidine (AZT) in the Treatment of Patients with AIDS and AIDS-Related Complex. *New England Journal of Medicine* **317**, 185-191, doi:10.1056/nejm198707233170401 (1987).
- 72 Richman, D. D. *et al.* The Toxicity of Azidothymidine (AZT) in the Treatment of Patients with AIDS and AIDS-Related Complex. *New England Journal of Medicine* **317**, 192-197, doi:10.1056/nejm198707233170402 (1987).
- 73 Larder, B. & Kemp, S. Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). *Science* **246**, 1155-1158, doi:10.1126/science.2479983 (1989).
- 74 Arts, E. J. & Hazuda, D. J. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a007161-a007161, doi:10.1101/cshperspect.a007161 (2012).
- 75 Hoffman, W., Lakkis, F. G. & Chalasani, G. B Cells, Antibodies, and More. *Clin J Am Soc Nephrol* **11**, 137-154, doi:10.2215/CJN.09430915 (2016).
- 76 Montecino-Rodriguez, E. & Dorshkind, K. B-1 B Cell Development in the Fetus and Adult. *Immunity* **36**, 13-21, doi:<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.11.017> (2012).
- 77 Nishana, M. & Raghavan, S. C. Role of recombination activating genes in the generation of antigen receptor diversity and beyond. *Immunology* **137**, 271-281, doi:10.1111/imm.12009 (2012).
- 78 Pillai, S. & Cariappa, A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nature Reviews Immunology* **9**, 767, doi:10.1038/nri2656 (2009).
- 79 Cariappa, A., Liou, H. C., Horwitz, B. H. & Pillai, S. Nuclear factor kappa B is required for the development of marginal zone B lymphocytes. *J Exp Med* **192**, 1175-1182, doi:10.1084/jem.192.8.1175 (2000).
- 80 Lechner, M. *et al.* Notch2-mediated plasticity between marginal zone and follicular B cells. *Nature Communications* **12**, 1111, doi:10.1038/s41467-021-21359-1 (2021).
- 81 Saito, T. *et al.* Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity* **18**, 675-685, doi:10.1016/s1074-7613(03)00111-0 (2003).
- 82 Hampel, F. *et al.* CD19-independent instruction of murine marginal zone B-cell development by constitutive Notch2 signaling. *Blood* **118**, 6321-6331, doi:10.1182/blood-2010-12-325944 (2011).



- 83 Hammad, H. *et al.* Transitional B cells commit to marginal zone B cell fate by Taok3-mediated surface expression of ADAM10. *Nat Immunol* **18**, 313-320, doi:10.1038/ni.3657 (2017).
- 84 Heesters, B. A., Myers, R. C. & Carroll, M. C. Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. *Nature Reviews Immunology* **14**, 495-504, doi:10.1038/nri3689 (2014).
- 85 Biram, A., Davidzohn, N. & Shulman, Z. T cell interactions with B cells during germinal center formation, a three-step model. *Immunological Reviews* **288**, 37-48, doi:<https://doi.org/10.1111/imr.12737> (2019).
- 86 Kuraoka, M., McWilliams, L. & Kelsoe, G. AID expression during B-cell development: searching for answers. *Immunologic Research* **49**, 3-13, doi:10.1007/s12026-010-8185-7 (2011).
- 87 Cerutti, A., Cols, M. & Puga, I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol* **13**, 118-132, doi:10.1038/nri3383 (2013).
- 88 Fagarasan, S. & Honjo, T. T-Independent Immune Response: New Aspects of B Cell Biology. *Science* **290**, 89-92, doi:10.1126/science.290.5489.89 (2000).
- 89 Mond, J. J., Lees, A. & Snapper, C. M. T Cell-Independent Antigens Type 2. *Annual Review of Immunology* **13**, 655-692, doi:10.1146/annurev.iy.13.040195.003255 (1995).
- 90 Vincent, F. B., Morand, E. F., Schneider, P. & Mackay, F. The BAFF/APRIL system in SLE pathogenesis. *Nature Reviews Rheumatology* **10**, 365-373, doi:10.1038/nrrheum.2014.33 (2014).
- 91 Mackay, F. & Schneider, P. Cracking the BAFF code. *Nature Reviews Immunology* **9**, 491-502, doi:10.1038/nri2572 (2009).
- 92 Varfolomeev, E. *et al.* APRIL-Deficient Mice Have Normal Immune System Development. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 997-1006, doi:doi:10.1128/MCB.24.3.997-1006.2004 (2004).
- 93 Castigli, E. *et al.* Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 3903, doi:10.1073/pnas.0307348101 (2004).
- 94 Moisini, I. & Davidson, A. BAFF: a local and systemic target in autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol* **158**, 155-163, doi:10.1111/j.1365-2249.2009.04007.x (2009).
- 95 Liu, Y. *et al.* Ligand-receptor binding revealed by the TNF family member TALL-1. *Nature* **423**, 49-56, doi:10.1038/nature01543 (2003).
- 96 Dillon, S. R., Gross, J. A., Ansell, S. M. & Novak, A. J. An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery* **5**, 235-246, doi:10.1038/nrd1982 (2006).
- 97 Woodland, R. T. *et al.* Multiple signaling pathways promote B lymphocyte stimulator dependent B-cell growth and survival. *Blood* **111**, 750-760, doi:10.1182/blood-2007-03-077222 (2008).
- 98 Roschke, V. *et al.* BLYS and APRIL Form Biologically Active Heterotrimers That Are Expressed in Patients with Systemic Immune-Based Rheumatic Diseases. *The Journal of Immunology* **169**, 4314-4321, doi:10.4049/jimmunol.169.8.4314 (2002).
- 99 Palm, A.-K. E. & Kleinau, S. Marginal zone B cells: From housekeeping function to autoimmunity? *Journal of Autoimmunity* **119**, 102627, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2021.102627> (2021).

- 100 Weill, J.-C., Weller, S. & Reynaud, C.-A. Human Marginal Zone B Cells. *Annual Review of Immunology* **27**, 267-285, doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132607 (2009).
- 101 Berkowska, M. A. *et al.* Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *Blood* **118**, 2150-2158, doi:10.1182/blood-2011-04-345579 (2011).
- 102 Weller, S. *et al.* Human blood IgM “memory” B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* **104**, 3647-3654, doi:<https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0346> (2004).
- 103 Puga, I. *et al.* B cell–helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol* **13**, 170-180, doi:10.1038/ni.2194 (2012).
- 104 He, B. *et al.* The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. *Nat Immunol* **11**, 836-845, doi:10.1038/ni.1914 (2010).
- 105 Brennan, P. J., Brigl, M. & Brenner, M. B. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nature Reviews Immunology* **13**, 101-117, doi:10.1038/nri3369 (2013).
- 106 Oleinika, K. *et al.* CD1d-dependent immune suppression mediated by regulatory B cells through modulations of iNKT cells. *Nature Communications* **9**, 684, doi:10.1038/s41467-018-02911-y (2018).
- 107 Leadbetter, E. A. *et al.* NK T cells provide lipid antigen-specific cognate help for B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 8339, doi:10.1073/pnas.0801375105 (2008).
- 108 Zouali, M. & Richard, Y. Marginal zone B-cells, a gatekeeper of innate immunity. *Frontiers in immunology* **2**, 63-63, doi:10.3389/fimmu.2011.00063 (2011).
- 109 Mauri, C. Novel Frontiers in Regulatory B cells. *Immunol Rev* **299**, 5-9, doi:10.1111/imr.12964 (2021).
- 110 Cinamon, G., Zachariah, M. A., Lam, O. M., Foss, F. W. & Cyster, J. G. Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nat Immunol* **9**, 54-62, doi:10.1038/ni1542 (2008).
- 111 Lu, T. T. & Cyster, J. G. Integrin-mediated long-term B cell retention in the splenic marginal zone. *Science* **297**, 409-412, doi:10.1126/science.1071632 (2002).
- 112 Arnon, T. I., Horton, R. M., Grigorova, I. L. & Cyster, J. G. Visualization of splenic marginal zone B-cell shuttling and follicular B-cell egress. *Nature* **493**, 684-688, doi:10.1038/nature11738 (2013).
- 113 Scheeren, F. A. *et al.* T cell-independent development and induction of somatic hypermutation in human IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> B cells. *J Exp Med* **205**, 2033-2042, doi:10.1084/jem.20070447 (2008).
- 114 Weller, S. *et al.* CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1166-1170, doi:10.1073/pnas.98.3.1166 (2001).
- 115 Litinskiy, M. B. *et al.* DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BlyS and APRIL. *Nat Immunol* **3**, 822-829, doi:10.1038/ni829 (2002).

- 116 Castigli, E. *et al.* TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *The Journal of experimental medicine* **201**, 35-39, doi:10.1084/jem.20032000 (2005).
- 117 Tierens, A., Delabie, J., Michiels, L., Vandenberghe, P. & De Wolf-Peeters, C. Marginal-zone B cells in the human lymph node and spleen show somatic hypermutations and display clonal expansion. *Blood* **93**, 226-234 (1999).
- 118 Mauri, C. & Menon, M. Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. *The Journal of clinical investigation* **127**, 772-779, doi:10.1172/JCI85113 (2017).
- 119 Mauri, C. & Menon, M. The expanding family of regulatory B cells. *International immunology* **27**, 479-486, doi:10.1093/intimm/dxv038 (2015).
- 120 Fontaine, J., Chagnon-Choquet, J., Valcke, H. S., 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* **117**, 145-155, doi:10.1182/blood-2010-08-301887 (2011).
- 121 Sabourin-Poirier, C. *et al.* Blood B Lymphocyte Stimulator (BLyS)/BAFF levels may reflect natural immunity to HIV in highly exposed uninfected Beninese Commercial Sex Workers. *Scientific reports* **6**, 32318-32318, doi:10.1038/srep32318 (2016).
- 122 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* **9**, e101949-e101949, doi:10.1371/journal.pone.0101949 (2014).
- 123 Doyon-Laliberté, K. *et al.* NR4A Expression by Human Marginal Zone B-Cells. *Antibodies (Basel)* **8**, 50, doi:10.3390/antib8040050 (2019).
- 124 Shen, P. *et al.* IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* **507**, 366-370, doi:10.1038/nature12979 (2014).
- 125 Hess, N. J., Jiang, S., Li, X., Guan, Y. & Tapping, R. I. TLR10 Is a B Cell Intrinsic Suppressor of Adaptive Immune Responses. *J Immunol* **198**, 699-707, doi:10.4049/jimmunol.1601335 (2017).
- 126 Amodio, G., Sales de Albuquerque, R. & Gregori, S. New insights into HLA-G mediated tolerance. *Tissue Antigens* **84**, 255-263, doi:10.1111/tan.12427 (2014).
- 127 Wang, Z. *et al.* Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* **423**, 555-560, doi:10.1038/nature01645 (2003).
- 128 Zhao, Y. & Bruemmer, D. NR4A orphan nuclear receptors: transcriptional regulators of gene expression in metabolism and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 1535-1541, doi:10.1161/ATVBAHA.109.191163 (2010).
- 129 Odagiu, L., May, J., Boulet, S., Baldwin, T. A. & Labrecque, N. Role of the Orphan Nuclear Receptor NR4A Family in T-Cell Biology. *Frontiers in Endocrinology* **11**, 1107 (2021).
- 130 Sekiya, T. *et al.* Nr4a receptors are essential for thymic regulatory T cell development and immune homeostasis. *Nat Immunol* **14**, 230-237, doi:10.1038/ni.2520 (2013).
- 131 Iizuka-Koga, M. *et al.* Induction and maintenance of regulatory T cells by transcription factors and epigenetic modifications. *J Autoimmun* **83**, 113-121, doi:10.1016/j.jaut.2017.07.002 (2017).
- 132 Sekiya, T. *et al.* The nuclear orphan receptor Nr4a2 induces Foxp3 and regulates differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Commun* **2**, 269, doi:10.1038/ncomms1272 (2011).

- 133 Hiwa, R., Nielsen, H. V., Mueller, J. L., Mandla, R. & Zikherman, J. NR4A family members regulate T cell tolerance to preserve immune homeostasis and suppress autoimmunity. *JCI Insight* **6**, doi:10.1172/jci.insight.151005 (2021).
- 134 Jennings, E. *et al.* Nr4a1 and Nr4a3 Reporter Mice Are Differentially Sensitive to T Cell Receptor Signal Strength and Duration. *Cell Rep* **33**, 108328, doi:10.1016/j.celrep.2020.108328 (2020).
- 135 Cheng, L. E., Chan, F. K., Cado, D. & Winoto, A. Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *Embo j* **16**, 1865-1875, doi:10.1093/emboj/16.8.1865 (1997).
- 136 Zhou, T. *et al.* Inhibition of Nur77/Nurr1 leads to inefficient clonal deletion of self-reactive T cells. *J Exp Med* **183**, 1879-1892, doi:10.1084/jem.183.4.1879 (1996).
- 137 Boulet, S. *et al.* The orphan nuclear receptor NR4A3 controls the differentiation of monocyte-derived dendritic cells following microbial stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**, 15150, doi:10.1073/pnas.1821296116 (2019).
- 138 Hanna, R. N. *et al.* The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C<sup>-</sup> monocytes. *Nat Immunol* **12**, 778-785, doi:10.1038/ni.2063 (2011).
- 139 Liu, X. *et al.* Genome-wide analysis identifies NR4A1 as a key mediator of T cell dysfunction. *Nature* **567**, 525-529, doi:10.1038/s41586-019-0979-8 (2019).
- 140 Seo, H. *et al.* TOX and TOX2 transcription factors cooperate with NR4A transcription factors to impose CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**, 12410-12415, doi:10.1073/pnas.1905675116 (2019).
- 141 Scott-Browne, J. P. *et al.* Dynamic Changes in Chromatin Accessibility Occur in CD8<sup>+</sup> T Cells Responding to Viral Infection. *Immunity* **45**, 1327-1340, doi:<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.028> (2016).
- 142 Chen, J. *et al.* NR4A transcription factors limit CAR T cell function in solid tumours. *Nature* **567**, 530-534, doi:10.1038/s41586-019-0985-x (2019).
- 143 Tan, C. *et al.* NR4A nuclear receptors restrain B cell responses to antigen when second signals are absent or limiting. *Nat Immunol* **21**, 1267-1279, doi:10.1038/s41590-020-0765-7 (2020).
- 144 Tan, C. *et al.* Nur77 Links Chronic Antigen Stimulation to B Cell Tolerance by Restricting the Survival of Self-Reactive B Cells in the Periphery. *J Immunol* **202**, 2907-2923, doi:10.4049/jimmunol.1801565 (2019).
- 145 Duren, R. P., Boudreaux, S. P. & Conneely, O. M. Genome Wide Mapping of NR4A Binding Reveals Cooperativity with ETS Factors to Promote Epigenetic Activation of Distal Enhancers in Acute Myeloid Leukemia Cells. *PLOS ONE* **11**, e0150450, doi:10.1371/journal.pone.0150450 (2016).
- 146 Li, Z. *et al.* CD83: Activation Marker for Antigen Presenting Cells and Its Therapeutic Potential. *Frontiers in Immunology* **10**, 1312 (2019).
- 147 Lin, H. *et al.* Soluble CD83 inhibits human monocyte differentiation into dendritic cells in vitro. *Cell Immunol* **292**, 25-31, doi:10.1016/j.cellimm.2014.08.003 (2014).
- 148 Bates, J. M. *et al.* Dendritic cell CD83 homotypic interactions regulate inflammation and promote mucosal homeostasis. *Mucosal Immunol* **8**, 414-428, doi:10.1038/mi.2014.79 (2015).

- 149 S n chal, B., Boruchov, A. M., Reagan, J. L., Hart, D. N. & Young, J. W. Infection of mature monocyte-derived dendritic cells with human cytomegalovirus inhibits stimulation of T-cell proliferation via the release of soluble CD83. *Blood* **103**, 4207-4215, doi:10.1182/blood-2003-12-4350 (2004).
- 150 Wild, A. B. *et al.* CD83 orchestrates immunity toward self and non-self in dendritic cells. *JCI Insight* **4**, doi:10.1172/jci.insight.126246 (2019).
- 151 Ge, W. *et al.* Immunosuppression involving soluble CD83 induces tolerogenic dendritic cells that prevent cardiac allograft rejection. *Transplantation* **90**, 1145-1156, doi:10.1097/TP.0b013e3181f95718 (2010).
- 152 Lan, Z. *et al.* Induction of kidney allograft tolerance by soluble CD83 associated with prevalence of tolerogenic dendritic cells and indoleamine 2,3-dioxygenase. *Transplantation* **90**, 1286-1293, doi:10.1097/TP.0b013e3182007bbf (2010).
- 153 Bock, F. *et al.* Topical application of soluble CD83 inducesIDO-mediated immune modulation, increases Foxp3+ T cells, and prolongs allogeneic corneal graft survival. *J Immunol* **191**, 1965-1975, doi:10.4049/jimmunol.1201531 (2013).
- 154 Doebbeler, M. *et al.* CD83 expression is essential for Treg cell differentiation and stability. *JCI Insight* **3**, doi:10.1172/jci.insight.99712 (2018).
- 155 Eckhardt, J. *et al.* Soluble CD83 ameliorates experimental colitis in mice. *Mucosal Immunol* **7**, 1006-1018, doi:10.1038/mi.2013.119 (2014).
- 156 Starke, C., Steinkasserer, A., Voll, R. E. & Zinser, E. Soluble human CD83 ameliorates lupus in NZB/W F1 mice. *Immunobiology* **218**, 1411-1415, doi:10.1016/j.imbio.2013.06.002 (2013).
- 157 Zinser, E., Lechmann, M., Golka, A., Lutz, M. B. & Steinkasserer, A. Prevention and treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by soluble CD83. *The Journal of experimental medicine* **200**, 345-351, doi:10.1084/jem.20030973 (2004).
- 158 Hock, B. D. *et al.* Levels of the soluble forms of CD80, CD86, and CD83 are elevated in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients. *Tissue Antigens* **67**, 57-60, doi:10.1111/j.1399-0039.2005.00524.x (2006).
- 159 Kristensen, A. M. *et al.* Expression of soluble CD83 in plasma from early-stage rheumatoid arthritis patients is not modified by anti-TNF- $\alpha$  therapy. *Cytokine* **96**, 1-7, doi:10.1016/j.cyto.2017.02.017 (2017).
- 160 Karampoor, S., Zahednasab, H., Etemadifar, M. & Keyvani, H. The levels of soluble forms of CD21 and CD83 in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **320**, 11-14, doi:10.1016/j.jneuroim.2018.04.005 (2018).
- 161 Allard, B., Allard, D., Buisseret, L. & Stagg, J. The adenosine pathway in immuno-oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology* **17**, 611-629, doi:10.1038/s41571-020-0382-2 (2020).
- 162 Saze, Z. *et al.* Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. *Blood* **122**, 9-18, doi:10.1182/blood-2013-02-482406 (2013).
- 163 Hasan, M. M. *et al.* Implication of TIGIT+ human memory B cells in immune regulation. *Nature Communications* **12**, 1534, doi:10.1038/s41467-021-21413-y (2021).
- 164 Silva-Vilches, C. *et al.* Production of Extracellular Adenosine by CD73+ Dendritic Cells Is Crucial for Induction of Tolerance in Contact Hypersensitivity Reactions. *Journal of Investigative Dermatology* **139**, 541-551, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.10.016> (2019).

- 165 Ohta, A. & Sitkovsky, M. Extracellular adenosine-mediated modulation of regulatory T cells. *Frontiers in immunology* **5**, 304-304, doi:10.3389/fimmu.2014.00304 (2014).
- 166 Sintès, J. *et al.* mTOR intersects antibody-inducing signals from TACI in marginal zone B cells. *Nature Communications* **8**, 1462, doi:10.1038/s41467-017-01602-4 (2017).
- 167 Minguet, S. *et al.* Adenosine and cAMP are potent inhibitors of the NF-kappa B pathway downstream of immunoreceptors. *Eur J Immunol* **35**, 31-41, doi:10.1002/eji.200425524 (2005).
- 168 Crean, D. *et al.* Adenosine Modulates NR4A Orphan Nuclear Receptors To Attenuate Hyperinflammatory Responses in Monocytic Cells. *J Immunol* **195**, 1436-1448, doi:10.4049/jimmunol.1402039 (2015).
- 169 Ohta, A. *et al.* The development and immunosuppressive functions of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells are under influence of the adenosine-A2A adenosine receptor pathway. *Front Immunol* **3**, 190, doi:10.3389/fimmu.2012.00190 (2012).
- 170 Deaglio, S. *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* **204**, 1257-1265, doi:10.1084/jem.20062512 (2007).
- 171 Moir, S. & Fauci, A. S. B cells in HIV infection and disease. *Nature Reviews Immunology* **9**, 235-245, doi:10.1038/nri2524 (2009).
- 172 Lane, H. C. *et al.* Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* **309**, 453-458, doi:10.1056/nejm198308253090803 (1983).
- 173 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* **104**, 115-122, doi:10.1006/clim.2002.5238 (2002).
- 174 Steri, M. *et al.* Overexpression of the Cytokine BAFF and Autoimmunity Risk. *New England Journal of Medicine* **376**, 1615-1626, doi:10.1056/NEJMoa1610528 (2017).
- 175 Pers, J. O. *et al.* BAFF overexpression is associated with autoantibody production in autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* **1050**, 34-39, doi:10.1196/annals.1313.004 (2005).
- 176 Chagnon-Choquet, J. *et al.* HIV Nef Promotes Expression of B-Lymphocyte Stimulator by Blood Dendritic Cells During HIV Infection in Humans. *The Journal of Infectious Diseases* **211**, 1229-1240, doi:10.1093/infdis/jiu611 (2014).
- 177 Rodriguez, B. *et al.* Plasma levels of B-lymphocyte stimulator increase with HIV disease progression. *Aids* **17**, 1983-1985, doi:10.1097/00002030-200309050-00018 (2003).
- 178 Fourcade, L. *et al.* Natural Immunity to HIV is associated with Low BLYS/BAFF levels and low frequencies of innate marginal zone like CD1c+ B-cells in the genital tract. *PLOS Pathogens* **15**, e1007840, doi:10.1371/journal.ppat.1007840 (2019).
- 179 Chaoul, N. *et al.* Default in plasma and intestinal IgA responses during acute infection by simian immunodeficiency virus. *Retrovirology* **9**, 43, doi:10.1186/1742-4690-9-43 (2012).
- 180 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* **10**, e0131513, doi:10.1371/journal.pone.0131513 (2015).
- 181 Mackay, F. *et al.* Mice Transgenic for Baff Develop Lymphocytic Disorders along with Autoimmune Manifestations. *Journal of Experimental Medicine* **190**, 1697-1710, doi:10.1084/jem.190.11.1697 (1999).

- 182 Khare, S. D. *et al.* Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 3370, doi:10.1073/pnas.97.7.3370 (2000).
- 183 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. *The Journal of Immunology* **176**, 3931, doi:10.4049/jimmunol.176.7.3931 (2006).
- 184 Gomez, A. M., Ouellet, M. & Tremblay, M. J. HIV-1–Triggered Release of Type I IFN by Plasmacytoid Dendritic Cells Induces BAFF Production in Monocytes. *The Journal of Immunology* **194**, 2300, doi:10.4049/jimmunol.1402147 (2015).
- 185 Chu, V. T., Enghard, P., Riemekasten, G. & Berek, C. In Vitro and In Vivo Activation Induces BAFF and APRIL Expression in B Cells. *The Journal of Immunology* **179**, 5947, doi:10.4049/jimmunol.179.9.5947 (2007).
- 186 Yu, H. *et al.* TLR7 regulates dendritic cell-dependent B-cell responses through BlyS in immune thrombocytopenic purpura. *European Journal of Haematology* **86**, 67-74, doi:<https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2010.01534.x> (2011).
- 187 Thien, M. *et al.* Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity* **20**, 785-798, doi:10.1016/j.immuni.2004.05.010 (2004).
- 188 Lesley, R. *et al.* Reduced Competitiveness of Autoantigen-Engaged B Cells due to Increased Dependence on BAFF. *Immunity* **20**, 441-453, doi:[https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(04\)00079-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(04)00079-2) (2004).
- 189 Kern, C. *et al.* Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood* **103**, 679-688, doi:10.1182/blood-2003-02-0540 (2004).
- 190 Chu, V. T. *et al.* Systemic activation of the immune system induces aberrant BAFF and APRIL expression in B cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **60**, 2083-2093, doi:10.1002/art.24628 (2009).
- 191 Jacobs, H. M. *et al.* Cutting Edge: BAFF Promotes Autoantibody Production via TACI-Dependent Activation of Transitional B Cells. *J Immunol* **196**, 3525-3531, doi:10.4049/jimmunol.1600017 (2016).
- 192 Dong, X. *et al.* BAFF inhibits autophagy promoting cell proliferation and survival by activating Ca<sup>2+</sup>-CaMKII-dependent Akt/mTOR signaling pathway in normal and neoplastic B-lymphoid cells. *Cellular Signalling* **53**, 68-79, doi:<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.09.012> (2019).
- 193 Moir, S. *et al.* HIV-1 induces phenotypic and functional perturbations of B cells in chronically infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10362-10367, doi:10.1073/pnas.181347898 (2001).
- 194 De Milito, A., Mörch, C., Sönnernborg, A. & Chiodi, F. Loss of memory (CD27) B lymphocytes in HIV-1 infection. *AIDS* **15**, 957-964 (2001).
- 195 Nagase, H. *et al.* Mechanism of Hypergammaglobulinemia by HIV Infection: Circulating Memory B-Cell Reduction with Plasmacytosis. *Clinical Immunology* **100**, 250-259, doi:<https://doi.org/10.1006/clim.2001.5054> (2001).
- 196 Titanji, K. *et al.* Primary HIV-1 infection sets the stage for important B lymphocyte dysfunctions. *AIDS* **19** (2005).

- 197 Amu, S., Ruffin, N., Rethi, B. & Chiodi, F. Impairment of B-cell functions during HIV-1 infection. *AIDS* **27** (2013).
- 198 Cagigi, A., Nilsson, A., Pensiero, S. & Chiodi, F. Dysfunctional B-cell responses during HIV-1 infection: implication for influenza vaccination and highly active antiretroviral therapy. *The Lancet Infectious Diseases* **10**, 499-503, doi:[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70117-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70117-1) (2010).
- 199 Moir, S. *et al.* Decreased Survival of B Cells of HIV-viremic Patients Mediated by Altered Expression of Receptors of the TNF Superfamily. *Journal of Experimental Medicine* **200**, 587-600, doi:10.1084/jem.20032236 (2004).
- 200 Darce, J. R., Arendt, B. K., Wu, X. & Jelinek, D. F. Regulated Expression of BAFF-Binding Receptors during Human B Cell Differentiation. *The Journal of Immunology* **179**, 7276, doi:10.4049/jimmunol.179.11.7276 (2007).
- 201 van Grevenynghe, J. *et al.* Loss of memory B cells during chronic HIV infection is driven by Foxo3a- and TRAIL-mediated apoptosis. *The Journal of Clinical Investigation* **121**, 3877-3888, doi:10.1172/JCI59211 (2011).
- 202 Levesque, M. C. *et al.* Polyclonal B cell differentiation and loss of gastrointestinal tract germinal centers in the earliest stages of HIV-1 infection. *PLoS Med* **6**, e1000107, doi:10.1371/journal.pmed.1000107 (2009).
- 203 Vanham, G. *et al.* Decreased CD40 ligand induction in CD4 T cells and dysregulated IL-12 production during HIV infection. *Clin Exp Immunol* **117**, 335-342, doi:10.1046/j.1365-2249.1999.00987.x (1999).
- 204 Rácz, P. *et al.* Spectrum of morphologic changes of lymph nodes from patients with AIDS or AIDS-related complexes. *Prog Allergy* **37**, 81-181, doi:10.1159/000318442 (1986).
- 205 Tenner-Rácz, K. *et al.* Ultrastructural analysis of germinal centers in lymph nodes of patients with HIV-1-induced persistent generalized lymphadenopathy: evidence for persistence of infection. *Prog AIDS Pathol* **1**, 29-40 (1989).
- 206 Wood, G. S. The immunohistology of lymph nodes in HIV infection: a review. *Prog AIDS Pathol* **2**, 25-32 (1990).
- 207 Chong, Y. *et al.* Increased Frequency of CD27- (Naive) B Cells and Their Phenotypic Alteration in HIV Type 1-Infected Patients. *AIDS Research and Human Retroviruses* **20**, 621-629, doi:10.1089/0889222041217455 (2004).
- 208 Devergne, O. *et al.* Activation of cytotoxic cells in hyperplastic lymph nodes from HIV-infected patients. *Aids* **5**, 1071-1079, doi:10.1097/00002030-199109000-00002 (1991).
- 209 Haynes, B. F. *et al.* Analysis of the adult thymus in reconstitution of T lymphocytes in HIV-1 infection. *J Clin Invest* **103**, 453-460, doi:10.1172/jci5201 (1999).
- 210 Vora, K. A. *et al.* Cutting edge: germinal centers formed in the absence of B cell-activating factor belonging to the TNF family exhibit impaired maturation and function. *J Immunol* **171**, 547-551, doi:10.4049/jimmunol.171.2.547 (2003).
- 211 Rahman, Z. S., Rao, S. P., Kalled, S. L. & Manser, T. Normal induction but attenuated progression of germinal center responses in BAFF and BAFF-R signaling-deficient mice. *J Exp Med* **198**, 1157-1169, doi:10.1084/jem.20030495 (2003).
- 212 Buckner, C. M. *et al.* Characterization of plasmablasts in the blood of HIV-infected viremic individuals: evidence for nonspecific immune activation. *Journal of virology* **87**, 5800-5811, doi:10.1128/JVI.00094-13 (2013).



- 213 Vujkovic-Cvijin, I. *et al.* Dysbiosis of the Gut Microbiota Is Associated with HIV Disease Progression and Tryptophan Catabolism. *Science Translational Medicine* **5**, 193ra191-193ra191, doi:doi:10.1126/scitranslmed.3006438 (2013).
- 214 Macpherson, A. J., Yilmaz, B., Limenitakis, J. P. & Ganal-Vonarburg, S. C. IgA Function in Relation to the Intestinal Microbiota. *Annual Review of Immunology* **36**, 359-381, doi:10.1146/annurev-immunol-042617-053238 (2018).
- 215 Hanna, Z. *et al.* Transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1 in immune cells develop a severe AIDS-like disease. *Journal of virology* **72**, 121-132, doi:10.1128/JVI.72.1.121-132.1998 (1998).
- 216 Leonard, J. M. *et al.* Development of disease and virus recovery in transgenic mice containing HIV proviral DNA. *Science* **242**, 1665-1670, doi:10.1126/science.3201255 (1988).
- 217 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* **15**, 173-185, doi:[https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00177-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00177-7) (2001).
- 218 Hanna, Z. *et al.* Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice. *Cell* **95**, 163-175, doi:10.1016/s0092-8674(00)81748-1 (1998).
- 219 Lindh, E. *et al.* AIRE regulates T-cell-independent B-cell responses through BAFF. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 18466, doi:10.1073/pnas.0808205105 (2008).
- 220 Federico, M. *et al.* HIV-1 Nef activates STAT1 in human monocytes/macrophages through the release of soluble factors. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* **98**, 2752-2761 (2001).
- 221 Mangino, G. *et al.* In vitro treatment of human monocytes/macrophages with myristoylated recombinant Nef of human immunodeficiency virus type 1 leads to the activation of mitogen-activated protein kinases, I $\kappa$ B kinases, and interferon regulatory factor 3 and to the release of beta interferon. *Journal of virology* **81**, 2777-2791 (2007).
- 222 Percario, Z. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Nef activates STAT3 in primary human monocyte/macrophages through the release of soluble factors: involvement of Nef domains interacting with the cell endocytotic machinery. *Journal of leukocyte biology* **74**, 821-832 (2003).
- 223 Kim, K. S., Park, J. Y., Jou, I. & Park, S. M. Functional implication of BAFF synthesis and release in gangliosides-stimulated microglia. *Journal of leukocyte biology* **86**, 349-359 (2009).
- 224 Poudrier, J., Weng, X., Kay, D. G., Hanna, Z. & Jolicoeur, P. The AIDS-Like Disease of CD4C/Human Immunodeficiency Virus Transgenic Mice Is Associated with Accumulation of Immature CD11bHi Dendritic Cells. *Journal of Virology* **77**, 11733-11744, doi:doi:10.1128/JVI.77.21.11733-11744.2003 (2003).
- 225 Nilsson, J. *et al.* HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS. *Blood* **108**, 3808-3817, doi:10.1182/blood-2006-05-021576 (2006).

- 226 Andersson, J. *et al.* The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients. *J Immunol* **174**, 3143-3147, doi:10.4049/jimmunol.174.6.3143 (2005).
- 227 Favre, D. *et al.* Tryptophan Catabolism by Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 Alters the Balance of TH17 to Regulatory T Cells in HIV Disease. *Science Translational Medicine* **2**, 32ra36, doi:10.1126/scitranslmed.3000632 (2010).
- 228 Malaspina, A. *et al.* Appearance of immature/transitional B cells in HIV-infected individuals with advanced disease: Correlation with increased IL-7. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 2262-2267, doi:10.1073/pnas.0511094103 (2006).
- 229 Siewe, B. *et al.* Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV CD8<sup>+</sup> T cell function in vitro. *J Leukoc Biol* **93**, 811-818, doi:10.1189/jlb.0912436 (2013).
- 230 Srivastava, B., Quinn, W. J., III, Hazard, K., Erikson, J. & Allman, D. Characterization of marginal zone B cell precursors. *Journal of Experimental Medicine* **202**, 1225-1234, doi:10.1084/jem.20051038 (2005).
- 231 Gauvin, J. *et al.* Fluctuations in Blood Marginal Zone B-Cell Frequencies May Reflect Migratory Patterns Associated with HIV-1 Disease Progression Status. *PloS one* **11**, e0155868-e0155868, doi:10.1371/journal.pone.0155868 (2016).
- 232 Cagigi, A. *et al.* Altered expression of the receptor-ligand pair CXCR5/CXCL13 in B cells during chronic HIV-1 infection. *Blood* **112**, 4401-4410, doi:10.1182/blood-2008-02-140426 (2008).
- 233 Widney, D. P. *et al.* Serum levels of the homeostatic B cell chemokine, CXCL13, are elevated during HIV infection. *J Interferon Cytokine Res* **25**, 702-706, doi:10.1089/jir.2005.25.702 (2005).
- 234 Schutysse, E., Struyf, S. & Van Damme, J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**, 409-426, doi:10.1016/s1359-6101(03)00049-2 (2003).
- 235 Svensson, M. *et al.* CCL25 mediates the localization of recently activated CD8alpha(+) lymphocytes to the small-intestinal mucosa. *The Journal of clinical investigation* **110**, 1113-1121, doi:10.1172/JCI15988 (2002).
- 236 Rappocciolo, G. *et al.* DC-SIGN on B lymphocytes is required for transmission of HIV-1 to T lymphocytes. *PLoS Pathog* **2**, e70, doi:10.1371/journal.ppat.0020070 (2006).
- 237 Geijtenbeek, T. B. *et al.* DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**, 587-597, doi:10.1016/s0092-8674(00)80694-7 (2000).
- 238 Erlandson, K. M., Schrack, J. A., Jankowski, C. M., Brown, T. T. & Campbell, T. B. Functional impairment, disability, and frailty in adults aging with HIV-infection. *Curr HIV/AIDS Rep* **11**, 279-290, doi:10.1007/s11904-014-0215-y (2014).
- 239 Greene, M. *et al.* Geriatric Syndromes in Older HIV-Infected Adults. *J Acquir Immune Defic Syndr* **69**, 161-167, doi:10.1097/QAI.0000000000000556 (2015).
- 240 Deeks, S. G. Immune dysfunction, inflammation, and accelerated aging in patients on antiretroviral therapy. *Top HIV Med* **17**, 118-123 (2009).
- 241 Deeks, S. G. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annual review of medicine* **62**, 141-155, doi:10.1146/annurev-med-042909-093756 (2011).

- 242 Durand, M. *et al.* The Canadian HIV and aging cohort study - determinants of increased risk of cardio-vascular diseases in HIV-infected individuals: rationale and study protocol. *BMC infectious diseases* **17**, 611-611, doi:10.1186/s12879-017-2692-2 (2017).
- 243 Hansson, G. K. & Hermansson, A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol* **12**, 204-212, doi:10.1038/ni.2001 (2011).
- 244 Gisterå, A. & Hansson, G. K. The immunology of atherosclerosis. *Nature Reviews Nephrology* **13**, 368-380, doi:10.1038/nrneph.2017.51 (2017).
- 245 Virchow, R. *Gesammelte abhandlungen zur wissenschaftlichen medicin.* (Grote, 1862).
- 246 Libby, P. *et al.* Atherosclerosis. *Nature Reviews Disease Primers* **5**, 56, doi:10.1038/s41572-019-0106-z (2019).
- 247 Park, Y. M., Febbraio, M. & Silverstein, R. L. CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *J Clin Invest* **119**, 136-145, doi:10.1172/jci35535 (2009).
- 248 Feil, S. *et al.* Transdifferentiation of Vascular Smooth Muscle Cells to Macrophage-Like Cells During Atherogenesis. *Circ Res* **115**, 662-667, doi:doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.304634 (2014).
- 249 Shankman, L. S. *et al.* KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nature Medicine* **21**, 628-637, doi:10.1038/nm.3866 (2015).
- 250 Rong, J. X., Shapiro, M., Trogan, E. & Fisher, E. A. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 13531, doi:10.1073/pnas.1735526100 (2003).
- 251 Seimon, T. A. *et al.* Atherogenic lipids and lipoproteins trigger CD36-TLR2-dependent apoptosis in macrophages undergoing endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab* **12**, 467-482, doi:10.1016/j.cmet.2010.09.010 (2010).
- 252 Duewell, P. *et al.* NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* **464**, 1357-1361, doi:10.1038/nature08938 (2010).
- 253 Rajamäki, K. *et al.* Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS One* **5**, e11765, doi:10.1371/journal.pone.0011765 (2010).
- 254 Saigusa, R., Winkels, H. & Ley, K. T cell subsets and functions in atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology* **17**, 387-401, doi:10.1038/s41569-020-0352-5 (2020).
- 255 Alexopoulos, N. & Raggi, P. Calcification in atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology* **6**, 681-688, doi:10.1038/nrcardio.2009.165 (2009).
- 256 Winkels, H. *et al.* Atlas of the Immune Cell Repertoire in Mouse Atherosclerosis Defined by Single-Cell RNA-Sequencing and Mass Cytometry. *Circ Res* **122**, 1675-1688, doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.312513 (2018).
- 257 Srikakulapu, P. *et al.* Artery Tertiary Lymphoid Organs Control Multilayered Territorialized Atherosclerosis B-Cell Responses in Aged ApoE<sup>-/-</sup> Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **36**, 1174-1185, doi:10.1161/atvbaha.115.306983 (2016).
- 258 Sage, A. P., Tsiantoulas, D., Binder, C. J. & Mallat, Z. The role of B cells in atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology* **16**, 180-196, doi:10.1038/s41569-018-0106-9 (2019).
- 259 Ait-Oufella, H. *et al.* B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice. *J Exp Med* **207**, 1579-1587, doi:10.1084/jem.20100155 (2010).

- 260 Kyaw, T. *et al.* Conventional B2 B Cell Depletion Ameliorates whereas Its Adoptive Transfer Aggravates Atherosclerosis. *The Journal of Immunology* **185**, 4410, doi:10.4049/jimmunol.1000033 (2010).
- 261 Huan, T. *et al.* A systems biology framework identifies molecular underpinnings of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**, 1427-1434, doi:10.1161/atvbaha.112.300112 (2013).
- 262 Prasad, A. *et al.* Relationship of Autoantibodies to MDA-LDL and ApoB-Immune Complexes to Sex, Ethnicity, Subclinical Atherosclerosis, and Cardiovascular Events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **37**, 1213-1221, doi:10.1161/atvbaha.117.309101 (2017).
- 263 Tay, C. *et al.* Follicular B Cells Promote Atherosclerosis via T Cell-Mediated Differentiation Into Plasma Cells and Secreting Pathogenic Immunoglobulin G. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **38**, e71-e84, doi:10.1161/atvbaha.117.310678 (2018).
- 264 Nus, M. *et al.* Marginal zone B cells control the response of follicular helper T cells to a high-cholesterol diet. *Nat Med* **23**, 601-610, doi:10.1038/nm.4315 (2017).
- 265 Meeuwse, J. A. L. *et al.* High Levels of (Un)Switched Memory B Cells Are Associated With Better Outcome in Patients With Advanced Atherosclerotic Disease. *J Am Heart Assoc* **6**, doi:10.1161/jaha.117.005747 (2017).
- 266 Strom, A. C. *et al.* B regulatory cells are increased in hypercholesterolaemic mice and protect from lesion development via IL-10. *Thromb Haemost* **114**, 835-847, doi:10.1160/th14-12-1084 (2015).
- 267 Nus, M. *et al.* NR4A1 Deletion in Marginal Zone B Cells Exacerbates Atherosclerosis in Mice-Brief Report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **40**, 2598-2604, doi:10.1161/atvbaha.120.314607 (2020).
- 268 Tsiantoulas, D. *et al.* B Cell-Activating Factor Neutralization Aggravates Atherosclerosis. *Circulation* **138**, 2263-2273, doi:10.1161/circulationaha.117.032790 (2018).
- 269 Jackson, S. W. *et al.* Cutting Edge: BAFF Overexpression Reduces Atherosclerosis via TACI-Dependent B Cell Activation. *The Journal of Immunology* **197**, 4529, doi:10.4049/jimmunol.1601198 (2016).
- 270 Theodorou, E. *et al.* B-cell activating factor and related genetic variants in lupus related atherosclerosis. *J Autoimmun* **92**, 87-92, doi:10.1016/j.jaut.2018.05.002 (2018).
- 271 Yong, W. C., Sanguankeo, A. & Upala, S. Association between primary Sjogren's syndrome, arterial stiffness, and subclinical atherosclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Rheumatology* **38**, 447-455, doi:10.1007/s10067-018-4265-1 (2019).
- 272 Kim, Y.-H., Choi, B.-H., Cheon, H.-G. & Do, M.-S. B cell activation factor (BAFF) is a novel adipokine that links obesity and inflammation. *Exp Mol Med* **41**, 208-216, doi:10.3858/emm.2009.41.3.024 (2009).
- 273 Kim, D.-H. & Do, M.-S. BAFF knockout improves systemic inflammation via regulating adipose tissue distribution in high-fat diet-induced obesity. *Exp Mol Med* **47**, e129-e129, doi:10.1038/emm.2014.98 (2015).
- 274 Tsiantoulas, D. *et al.* APRIL limits atherosclerosis by binding to heparan sulfate proteoglycans. *Nature* **597**, 92-96, doi:10.1038/s41586-021-03818-3 (2021).
- 275 Hua, C. *et al.* A proliferation inducing ligand (APRIL) promotes IL-10 production and regulatory functions of human B cells. *J Autoimmun* **73**, 64-72, doi:10.1016/j.jaut.2016.06.002 (2016).

- 276 Fehres, C. M. *et al.* APRIL Induces a Novel Subset of IgA(+) Regulatory B Cells That Suppress Inflammation via Expression of IL-10 and PD-L1. *Frontiers in immunology* **10**, 1368-1368, doi:10.3389/fimmu.2019.01368 (2019).
- 277 Sandler, N. G. & Sereti, I. Can early therapy reduce inflammation? *Curr Opin HIV AIDS* **9**, 72-79, doi:10.1097/COH.000000000000020 (2014).
- 278 Jia, W. *et al.* BAFF promotes heightened BCR responsiveness and manifestations of chronic GVHD after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* **137**, 2544-2557, doi:10.1182/blood.2020008040 (2021).
- 279 Moir, S. *et al.* Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *The Journal of experimental medicine* **205**, 1797-1805, doi:10.1084/jem.20072683 (2008).
- 280 Ma, S., Wang, C., Mao, X. & Hao, Y. B Cell Dysfunction Associated With Aging and Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology* **10**, doi:10.3389/fimmu.2019.00318 (2019).
- 281 Scharer, C. D. *et al.* Epigenetic programming underpins B cell dysfunction in human SLE. *Nat Immunol* **20**, 1071-1082, doi:10.1038/s41590-019-0419-9 (2019).
- 282 Woodruff, M. C. *et al.* Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. *Nat Immunol* **21**, 1506-1516, doi:10.1038/s41590-020-00814-z (2020).
- 283 Wherry, E. J. *et al.* Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* **27**, 670-684, doi:10.1016/j.immuni.2007.09.006 (2007).
- 284 Austin, J. W. *et al.* Overexpression of T-bet in HIV infection is associated with accumulation of B cells outside germinal centers and poor affinity maturation. *Sci Transl Med* **11**, doi:10.1126/scitranslmed.aax0904 (2019).
- 285 Wen, A. Y., Sakamoto, K. M. & Miller, L. S. The role of the transcription factor CREB in immune function. *J Immunol* **185**, 6413-6419, doi:10.4049/jimmunol.1001829 (2010).
- 286 Bridi, M. S., Hawk, J. D., Chatterjee, S., Safe, S. & Abel, T. Pharmacological Activators of the NR4A Nuclear Receptors Enhance LTP in a CREB/CBP-Dependent Manner. *Neuropsychopharmacology* **42**, 1243-1253, doi:10.1038/npp.2016.253 (2017).
- 287 Volakakis, N. *et al.* NR4A orphan nuclear receptors as mediators of CREB-dependent neuroprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 12317, doi:10.1073/pnas.1007088107 (2010).
- 288 Mambetsariev, N. *et al.* Nuclear TRAF3 is a negative regulator of CREB in B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, 1032, doi:10.1073/pnas.1514586113 (2016).
- 289 Yi, Z., Lin, W. W., Stunz, L. L. & Bishop, G. A. Roles for TNF-receptor associated factor 3 (TRAF3) in lymphocyte functions. *Cytokine & growth factor reviews* **25**, 147-156, doi:10.1016/j.cytogfr.2013.12.002 (2014).
- 290 Rothan, C. *et al.* Antiretroviral therapy-treated HIV-infected adults with coronary artery disease are characterized by a distinctive regulatory T-cell signature. *Aids* **35**, 1003-1014, doi:10.1097/qad.0000000000002842 (2021).
- 291 Chang, W.-X. *et al.* Skewed CD39/CD73/adenosine pathway in B cells is associated with innate immune hyperactivation in chronic HIV-1 infection. *Translational Medicine Communications* **4**, 4, doi:10.1186/s41231-019-0033-8 (2019).

- 292 Kim, E. S. *et al.* Down-regulation of CD73 on B cells of patients with viremic HIV correlates with B cell activation and disease progression. *J Leukoc Biol* **101**, 1263-1271, doi:10.1189/jlb.5A0816-346R (2017).
- 293 Todorović, M. M. & Zvrko, E. Z. Immunoregulatory cytokines and chronic tonsillitis. *Bosn J Basic Med Sci* **13**, 230-236, doi:10.17305/bjbms.2013.2330 (2013).
- 294 Teixeira, V. & Tam, L.-S. Novel Insights in Systemic Lupus Erythematosus and Atherosclerosis. *Frontiers in Medicine* **4**, doi:10.3389/fmed.2017.00262 (2018).
- 295 Saidoune, F. *et al.* Effects of BAFF Neutralization on Atherosclerosis Associated With Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol* **73**, 255-264, doi:10.1002/art.41485 (2021).
- 296 Malvestutto, C. D. & Aberg, J. A. Management of dyslipidemia in HIV-infected patients. *Clin Lipidol* **6**, 447-462, doi:10.2217/clp.11.25 (2011).
- 297 D'Agostino, R. B., Sr. *et al.* General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation* **117**, 743-753, doi:10.1161/circulationaha.107.699579 (2008).
- 298 Powell-Wiley, T. M. *et al.* Obesity and Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* **143**, e984-e1010, doi:10.1161/CIR.0000000000000973 (2021).
- 299 Liu, Y. *et al.* High APRIL Levels Are Associated With Slow Disease Progression and Low Immune Activation in Chronic HIV-1-Infected Patients. *Frontiers in Medicine* **7**, doi:10.3389/fmed.2020.00299 (2020).
- 300 Koupenova, M., Johnston-Cox, H. & Ravid, K. Regulation of atherosclerosis and associated risk factors by adenosine and adenosine receptors. *Curr Atheroscler Rep* **14**, 460-468, doi:10.1007/s11883-012-0263-y (2012).
- 301 Hock, B. D. *et al.* The soluble form of CD83 is present at elevated levels in a number of hematological malignancies. *Leuk Res* **28**, 237-241, doi:10.1016/s0145-2126(03)00255-8 (2004).
- 302 Hock, B. *et al.* Release and clinical significance of soluble CD83 in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia research* **33**, 1089-1095 (2009).
- 303 Kowalczyk-Quintas, C. *et al.* Inhibition of Membrane-Bound BAFF by the Anti-BAFF Antibody Belimumab. *Frontiers in Immunology* **9**, doi:10.3389/fimmu.2018.02698 (2018).
- 304 Boudreaux, S. P. *et al.* Drug targeting of NR4A nuclear receptors for treatment of acute myeloid leukemia. *Leukemia* **33**, 52-63, doi:10.1038/s41375-018-0174-1 (2019).

## **Annexe 1 – NR4A Expression by Human Marginal Zone B-Cells**

Kim Doyon-Laliberté, Josiane Chagnon-Choquet, Michelle Byrns, Matheus Aranguren, Meriam Memmi, Pavel Chrobak, John Stagg, Johanne Poudrier, Michel Roger

**Statut** : Article publié dans le journal *Antibodies* (2019)

### **Contribution des co-auteurs :**

Kim Doyon-Laliberté et Michelle Byrns ont réalisé les analyses *in vitro* sur les amygdales humaines et ont analysé les résultats. Kim Doyon-Laliberté et Matheus Aranguren ont réalisé les essais fonctionnels. Meriam Memmi a réalisé les expériences de cytométrie en flux humaine et murine et a analysé les résultats conjointement avec Kim Doyon-Laliberté et Pavel Chrobak. Josiane Chagnon-Choquet a préparé les PBMC humains pour le tri cellulaire des MZ et MZp humains, et a fait l'extraction de l'ARN. Pavel Chrobak et John Stagg ont fourni et analysé les échantillons murins, ainsi que du guide technique et scientifique. Johanne Poudrier et Michel Roger ont participé au design du projet, l'élaboration des expériences, l'analyse des données et ont contribué à l'écriture du manuscrit. Tous les auteurs ont révisé la dernière version du manuscrit.

# NR4A expression by Human Marginal Zone B-cells

Kim Doyon-Laliberté<sup>1,2</sup> Josiane Chagnon-Choquet<sup>1,2</sup> Michelle Byrns<sup>1,2</sup> Matheus Aranguren<sup>1,2</sup>  
Meriam Memmi<sup>1,2</sup> Pavel Chrobak<sup>1,3,4</sup> John Stagg<sup>1,3,4</sup> Johanne Poudrier<sup>1,2,\*</sup> and Michel Roger<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Tour Viger  
900 rue St-Denis, Montréal, QC H2X 0A9, Canada; ; <sup>2</sup>Département de Microbiologie, Infectiologie  
et Immunologie de l'Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada ; <sup>3</sup>Faculte de  
Pharmacie, Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada; <sup>4</sup>Institut du Cancer de  
Montréal CRCHUM, Montreal, QC H2X 0A9, Canada

\*Co-seniors

Word Count in text: 3525

Word Count in abstract: 229

Short Title: NR4A expression by Marginal Zone B-cells

Number of Figures and Tables: Figures 6, Supplemental Figures 3

Reference Count: 25



## 1 – Abstract

We have previously characterized a human blood CD19<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD21<sup>lo</sup>CD10<sup>+</sup> innate-like B-cell population, which presents features shared by both transitional immature and marginal zone (MZ) B-cells, named herein “precursor-like” MZ B-cells. B-cells with similar attributes have been associated with regulatory potential (Breg). In order to clarify this issue and better characterize this population, we have proceeded to RNA-Seq transcriptome profiling of mature MZ and precursor-like MZ B-cells taken from the blood of healthy donors. We report that *ex vivo* mature MZ and precursor-like MZ B-cells express transcripts for the immunoregulatory marker CD83 and nuclear receptors NR4A1, 2, and 3, known to be associated with T-cell regulatory (Treg) maintenance and function. Breg associated markers such as CD39 and CD73 were also expressed by both populations. We also show that human blood and tonsillar precursor-like MZ B-cells were the main B-cell population to express elevated levels of CD83 and NR4A1-3 proteins *ex vivo* and without stimulation. Sorted tonsillar precursor-like MZ B-cells exerted regulatory activity on autologous activated CD4<sup>+</sup> T-cells, and this was affected by a CD83 blocking reagent. We believe these observations shed light on the Breg potential of MZ populations, and identify NR4A1-3 as potential Breg markers, which as for Tregs, may be involved in stabilization of a regulatory status. Since expression and activity of these molecules can be modulated therapeutically, our findings may be useful in strategies aiming at modulation of Breg responses.

**Keywords:** NR4A, human marginal zone B-cells, B regulatory cells

## 2 – Introduction

We have previously reported a relatively small population (1%–2%) of B-cells expressing the surface markers CD19+CD1c+IgM+CD27+CD21<sup>lo</sup>CD10+ that is present in the blood of healthy human individuals [1,2,3]. These B-cells harbored markers of transitional immature and of innate marginal zone (MZ) B-cells and were named “precursor-like” MZ B-cells. We previously showed that CD19+CD1c+IgM+CD27+CD21<sup>hi</sup>CD10<sup>-</sup> mature MZ and precursor-like MZ B-cells expressed IL-10 *ex vivo*; precursor-like more so than mature MZ B-cells [2]. Furthermore, frequencies of IL-10 expressing precursor-like MZ B-cells were increased in the context of excess B-cell activating factor (BAFF) [2]. B-cells sharing some attributes with these precursor-like MZ B-cells have been recognized for B regulatory “Breg” activity [4]. Although the hallmark of Breg activity is IL-10 production, other regulatory factors have been depicted such as expression of PD-L1, production of TGF- $\beta$ , IL-35, and adenosine via the ectonucleotidases CD39 and CD73 [4]. However, until now no precise marker can allow the identification of Bregs, as it is the case with the marker Forkhead box 3 (FoxP3) for Tregs [5].

NR4A nuclear receptors are important regulators of the inflammatory response and can be transiently up-regulated following stimulation via the TCR or BCR [6]. However, expressions of NR4As are highly enriched in Tregs when compared to other T-cell subsets [5]. NR4As have been shown to directly promote the expression of the FoxP3 transcription factor, associated with the generation, differentiation and maintenance of Tregs [7,8]. Knockout mice in which all NR4A1-3 genes were specifically deleted in Tregs showed global reduction of FoxP3, and developed systemic autoimmune diseases, suggesting that NR4As are required for Treg cell maintenance and function [5].

We now report gene expression of nuclear receptors NR4A1, 2, and 3 as well as the immunoregulatory surface molecule CD83 [9,10], which NR4As can directly regulate [11], by both mature MZ and precursor-like MZ B-cell populations from *ex vivo* human blood. Moreover, we found that in human blood and tonsils precursor-like MZ B-cells are the main population to co-express NR4A1-3 and CD83 proteins at high levels without stimulation. Furthermore, we report that sorted tonsillar precursor-like MZ B-cells exert regulatory activity on autologous activated

CD4<sup>+</sup> T-cells, and this is affected by a CD83 blocking reagent. We also report that the Breg associated CD39 and CD73 enzymes [12,13] are co-expressed by both populations in human blood and tonsils. Total CD39<sup>+</sup> B-cells from blood and tonsils also expressed NR4A1 and CD83, albeit to a lesser extent than precursor-like MZ B-cells. We believe these observations shed light on the Breg potential of MZ populations, and identify NR4A1-3 as potential Breg markers, which as for Tregs, may be involved in stabilization of a regulatory status.

### **3 – Materials and Methods**

#### **3.1 – Ethics Statement**

Written informed consent was obtained from all subjects who participated in the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The methods reported in this paper were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations and all experimental protocols were approved by the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) Research Ethics Committees.

#### **3.2 – Cell Sorting of Human Blood MZ and Precursor-Like MZ B-Cells, RNA Isolation and Sequencing**

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors were isolated on Ficoll gradient, re-suspended in heat-inactivated fetal bovine serum (hi-FBS) (Wisent Inc., Montreal, QC, Canada) containing 10% dimethyl sulfoxide and stored in liquid nitrogen until use. Cells were thawed, washed in IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Gibco Life Technologies, New York, NY, USA), and processed for cell sorting with a FACSAriaIII apparatus. Live/dead exclusion was performed using LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead cell Stain (Invitrogen Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, USA). Non-specific binding sites were blocked using fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer (1× PBS, 2% hi-FBS) supplemented with 20% hi-FBS and 10 µg mouse IgG (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). Cells were stained using the following conjugated mouse anti-human monoclonal antibodies: PacificBlue-anti-CD19, APC-Cy7-anti-CD10 (BioLegend, San Diego, CA, USA), AlexaFluor700-anti-CD27, FITC-anti-IgM, PE-anti-CD21 (BD-Biosciences), PerCP-eFluor710-anti-CD1c (eBioscience, San Diego, CA, USA). Live

CD19+CD1c+IgM+CD27+CD21hiCD10<sup>-</sup> mature and CD19+CD1c+IgM+CD27+CD21loCD10<sup>+</sup> precursor-like sorted MZ B-cells were >95% pure. Total RNA was extracted using RNeasy Micro Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. RNA integrity was validated using a RNA Pico Chip on the Agilent BioAnalyzer 2100, and RNA was sent to IRIC's Genomics Core Facility for RNAseq transcriptomic profiling and analysis. Libraries were prepared using Clontech Ultra Low RNA SMARTer v4 (Takara) and sequenced on a HiSeq2000. Genes with false discovery rate (FDR) values <0.05 were considered to be differentially expressed. Gene expression levels were compared using raw read counts and the negative binomial distribution model implemented in DESeq2 [14], a differential expression analysis package developed for R, which adjusts for sample variations with the assumption that the vast majority of genes should have correlating expression levels. More specifically, the regularized log transformation (rlog) implemented in DESeq2 was used to transform raw data into log<sub>2</sub> (readcount) for analysis and visualization.

### **3.3 – Validation of the Cross-Reactivity of the PE-Conjugated Human Anti-Mouse Nurr77 (NR4A1) Monoclonal Antibody (mAb)**

The human REA clone anti-mouse Nurr77 (NR4A1) IgG1 antibody cross-reacts with human NR4A1 as specified by MACS Miltenyi Biotec. This was verified on total spleen cells from 8–10 weeks old female C57BL/6 mice (not shown), and on total human PBMCs (Figure S1). Cells were cultured for 3 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, at a concentration of 10<sup>6</sup> cells/ml in IMDM supplemented with 10<sup>-4</sup> β-2-mercaptomethanol (Sigma-Aldrich), 10% hi-FBS and penicillin/streptomycin (Gibco Life technologies) in presence or absence of PMA/ionomycin (eBioscience Cell Stimulation Cocktail 500x, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific). Cells were then harvested, washed with IMDM followed by 1× PBS and processed for flow-cytometry. Live/dead exclusion was performed using Aqua-LIVE/DEAD Fixable Stain (Invitrogen Life technologies, Eugene, OR, USA). Non-specific binding sites were blocked using FACS buffer (1× PBS, 2% hi-FBS, and 0.1% sodium azide) supplemented with 20% hi-FBS, 10 μg mouse IgG (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) and/or 5 μg Human BD FcBlock (BD Biosciences). For human PBMCs, the following conjugated mouse anti-human monoclonal antibodies were used to detect extracellular markers: APC-mouse Anti-Human CD19 and PerCP-eFluor 710 Anti-Human CD1c (eBioscience, San Diego, CA, USA). Intra-nuclear labelling to detect NR4A1 was performed using the FoxP3/Transcription Factor Staining

Buffer Set (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, CA, USA). Non-specific binding sites were blocked using 20% hi-FBS and 5 µg Human BD FCBlock (BD Biosciences). The PE-conjugated human REA clone anti-mouse NR4A1 was used and compared to the use of PE-conjugated human REA isotype control (MACS, Miltenyi Biotec). Cells were kept at 4 °C in 1.25% paraformaldehyde for 18 h prior to analysis. Data acquisition of 105 events per sample was performed with LSRIIB (BD-Biosciences), and analysis was done with FlowJo7.6.3 software (TreeStar, Ashland, OR, USA) and GraphPad Prism. All stainings were compared to that of fluorescence minus one (FMO) values and isotype controls. Anti-mouse Ig(κ) Compbeads and CS&T Beads (BD-Biosciences) were used to optimize fluorescence compensation settings and calibrate the LSRIIB, respectively.

### **3.4 –Flow-Cytometry Characterization of NR4A1, NR4A3, CD83, CD39, and CD73 Expression by Human Tonsillar B-Cells**

PBMCs were thawed, washed with IMDM followed by 1× PBS and processed for flow-cytometry. Live/dead exclusion was performed using Aqua-LIVE/DEAD Fixable Stain (Invitrogen Life technologies, Eugene, OR, USA). Non-specific binding sites were blocked using FACS buffer (1x PBS, 2% hi-FBS, and 0.1% sodium azide) supplemented with 20% hi-FBS, 10 µg mouse IgG (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) and 5 µg Human BD FCBlock (BD Biosciences). The following conjugated mouse anti-human monoclonal antibodies were used to detect extracellular markers: APC-mouse Anti-Human CD19, BB515-mouse Anti-Human IgM, BV421-mouse Anti-Human CD10, BUV395-mouse Anti-Human CD73, BV786-mouse Anti-Human CD39, PE-Cy7-mouse Anti-Human CD83 (BD Biosciences) and PerCP-eFluor 710 Anti-Human CD1c (eBioscience, San Diego, CA, USA ). Intra-nuclear labelling was performed using the FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Set. Non-specific binding sites were blocked using 20% hi-FBS and 5 µg Human BD FCBlock. The PE-conjugated human REA clone anti-mouse NR4A1 was used and compared to the use of PE-conjugated human REA isotype control. The PE-conjugated mouse anti-human NR4A3 was from Santa Cruz Biotechnology. Cells were kept at 4 °C in 1.25% paraformaldehyde for 18 h prior to analysis. Data acquisition of 105 events per sample was performed with LSRIIB, and analysis was done with FlowJo7.6.3 software and GraphPad Prism. All stainings were compared to that of FMO values and isotype controls. Anti-mouse Ig(κ) Compbeads and CS&T Beads were used to optimize fluorescence compensation settings and calibrate the LSRIIB, respectively.

### **3.5 – Flow-Cytometry Characterization of NR4A1, NR4A3, CD83, CD39, and CD73 Expression by Human Tonsillar B-Cells**

Human tonsillar samples from healthy individuals who underwent surgical tonsillectomy were mechanically processed and cells were frozen in liquid nitrogen until use. Cells were thawed, washed in IMDM and B-cells were negatively enriched >95% by an immunomagnetic based technology (Dynabeads Untouched Invitrogen Life technologies). Total B-cells were subsequently cultured at a concentration of  $10^6$  cells/ml in IMDM supplemented with  $10^{-4}$   $\beta$ -2-mercaptomethanol, 10% hi-FBS and penicillin/streptomycin, in absence or presence of stimulus (PMA/ionomycin) for 18 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Cells were recovered and processed for flow-cytometry as stated above.

### **3.6 – Functional Assays**

Autologous precursor-like marginal zone (MZ) B-cells, total CD1c- B-cells and CD4+ T-cells were sorted from human tonsils of healthy donors. T-cells were cultured alone or co-cultured with either of the B-cell populations at a ratio of 3:1 for 36 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> on anti-CD3 (2  $\mu$ g/mL) (ULTRA-LEAF Biolegend) coated flat bottomed 96 well plates with soluble anti-CD28 (2  $\mu$ g/mL) (ULTRA-LEAF Biolegend), in presence or absence of an anti-CD83 blocking antibody (2  $\mu$ g/mL) (HB15 cat No CBMAB-C1765-CQ Creative Biolabs). T-cell activation was assessed by flow-cytometry analyses of intra-nuclear Ki67 (eBioscience) expression following the protocol described above.

### **3.7 – Statistical Analysis**

Statistical significance of differences between groups was assessed with a unpaired Student's T test for comparison between two groups or with an ANOVA with post-hoc Tukey test for multiple comparisons. Analyses were performed using GraphPad PRISM5.0/Windows. Results were considered significant when  $p < 0.05$ .

## 4 – Results and Discussion

Live CD19+CD1c+IgM+CD27+CD21hiCD10– mature MZ and CD19+CD1c+IgM+CD27+CD21loCD10+ precursor-like MZ B-cells from the blood of human healthy donors were FACS sorted. RNA-Seq transcriptomic analyses allowed us to demonstrate gene transcripts for NR4A1, 2 and 3 (Figure 1A–C), as well as for the immunoregulatory molecule CD83 in both populations (Figure 1D). Note that values obtained for the B-cell marker CD19 stand between 10 and 15 on the same log<sub>2</sub> (readcount) scale. Gene transcripts for NR4A1 and NR4A2 were slightly more elevated than NR4A3, and those for CD83 were relatively high.

For means of NR4A1 protein detection by flow-cytometry and because of experimental suitability, we have used the PE-conjugated human REA clonal antibody directed against murine NR4A1, which cross-reacts with human NR4A1. This was first verified on PBMCs (Figure S1). We found that stimulation with PMA/ionomycin for 3 h [6] allowed us to measure increased expression of NR4A1 by total human B-cells, of which 50% were positive for the innate glycolipid binding molecule CD1c [15] (Figure S1). Subsequently, flow-cytometry analyses of NR4A1 and CD83 protein expression on unstimulated *ex vivo* samples revealed that co-expression of NR4A1 and CD83 was mainly found within CD1c+ B-cells, which were heterogeneous and included IgM+CD27+ MZ and IgM+CD27+CD10+ precursor-like MZ B-cells (Figure 2A). Similar observations were found for NR4A3 and CD83 co-expression (not shown). As for the CD1c-negative B-cells which co-expressed NR4A1 and CD83, all expressed CD10 and were negative for IgM and low for CD27, reminiscent of post-germinal center B-cells, but nature of which has yet to be determined.

Although precursor-like MZ B-cells are less frequent in blood than MZ B-cells (Figure 2A), the analyses of frequencies of NR4A1+CD83+ (Figure 2B) and NR4A3+CD83+ (Figure 2C) B-cells from five different donors show that there are more co-expressing cells within the precursor-like MZ population when compared to that of MZ and total B-cells (Figure 2B, C). Levels of expression of NR4A1, NR4A3, and CD83 were also significantly higher in precursor-like MZ B-cells when compared to MZ and total B-cells (Figure 2D–F). Albeit there is discrepancy that exists between the RNA-Seq transcript data in Figure 1 and the GeoMFI data for NR4A1, NR4A3, and CD83 in Figure 2D–F, it is important to understand that there are different major post-transcriptional

mechanisms, not fully elucidated, that might interfere with a straight association between mRNA and protein levels. Furthermore, this can change from gene to gene.

The hydrolysis of extracellular ATP by membrane-bound ectonucleotidases CD39 and CD73 confer Breg potential [13,16] by allowing production of immunosuppressive adenosine. Signaling via the adenosine receptor has been shown to regulate NR4A expression [17]. As such, RNA-Seq (Figure 1E, F) analyses of blood mature MZ and precursor-like MZ B-cells revealed expression of both CD39 and CD73 by these populations. Flow-cytometry analyses of CD1c+ B-cells co-expressing NR4A1 and CD83, which include MZ populations, revealed the majority expressed CD39 and a substantial fraction were also CD73+ (Figure 2A). On the other hand, flow-cytometry analyses starting from blood MZ populations revealed that not all of these cells expressed CD39 and CD73 proteins, and not all that are CD39+CD73+ co-expressed NR4A1 and CD83. However, those that did co-express NR4A1 and CD83 were in majority CD39+CD73+ (Figure S3C).

RNA-Seq analyses also showed that MZ and precursor-like MZ B-cells express other Breg associated molecules [18] (Figure S2). Moreover, MZ and precursor-like MZ B-cells express molecules often associated with regulatory functions such as HLA-G [19] and TLR10 [20,21] (Figure 3). Of note, both populations did not express transcripts for TLR9, and rather expressed TLR7 (Figure 3). RNA-Seq detected CD1d transcripts in both populations (Figure 3), the latter which is expressed by most Bregs in mice and in humans [18], and which has recently been shown to be important for induction of iNKT cell suppressive functions, identifying another way by which Bregs may exert regulatory functions [22]. Interestingly, we found CD1a and IL-21R gene transcripts mainly in precursor-like MZ B-cells (Figure 3), and IL-21 has been shown to modulate B-cell suppressive functions [23]. Although appealing, a role for IL-21 in modulating Breg activity of precursor-like MZ B-cells remains to be established.

RNA-Seq demonstrated relatively high levels of gene transcripts for TGF- $\beta$ 1 and IL-10R in both B-cell populations (Figure 4). IL-35 and IL-10 gene transcripts were lower, which could be consistent with the capacity to produce these cytokines upon stimulation [18]. We also found several molecules associated with Breg activity, such as Indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 (IDO1)



and granzyme B (GZMB) [18] that were not expressed neither by blood mature MZ nor precursor-like MZ B-cells *ex vivo* (Figure 4).

In contrast to what was found in blood, precursor-like MZ B-cells were more abundant than MZ in human tonsils (Figure S3A). Reminiscent of our observations in blood, we found that when unstimulated, precursor-like MZ B-cells were the main population co-expressing the NR4A1 and CD83 proteins (Figure 5A, E), and levels of expression of NR4A1 and CD83 were significantly higher in precursor-like MZ B-cells when compared to total, total CD39+ or MZ B-cells (Figure 5C, D). Similar preliminary observations were found for NR4A3+CD83+ B-cells (Figure S3B). Unstimulated live B-cells which co-expressed CD39 and CD73 were mostly CD1c+ B-cells, which included IgM+CD27+CD10- MZ and CD10+ precursor-like MZ B-cells (Figure 5B). Flow-cytometry analyses of precursor-like MZ B-cells revealed that not all these cells expressed CD39 and CD73, but it is within the latter that we found the highest proportion of NR4A1+CD83+ cells (Figure S3A). Following stimulation with PMA/ionomycin, NR4A1 and CD83 expression levels were significantly upregulated in total B-cells (Figure 5F, G left panels) and there was a strong trend for increased expression by total CD39+ B-cells (Figure 5F, G right panels), but levels of expression by MZ populations were less significantly affected (Figure 5F, G middle panels) presumably in relation to their already elevated expression levels *ex vivo*.

Finally, we have assessed the capacity of tonsillar precursor-like MZ B-cells to regulate T-cell activation *in vitro*. We show that percentages of activated T-cells expressing Ki-67 (Figure 6) are reduced (approximately 15%) following co-culture at a 3:1 ratio with precursor-like MZ B-cells, but not in presence of CD1c- B-cells. These findings are similar to what has been reported for Breg activity at similar T:B ratios [24]. Furthermore, this regulatory function was affected in presence of an anti-CD83 blocking antibody (Figure 6). Given the low yield of precursor-like MZ B-cells, studies with an isotype control have been performed with CD1c- B-cells co-cultured with autologous T-cells on anti-CD3 + anti-CD28. Both anti-CD83 and the isotype control had no effect on T-cell Ki-67 expression.

Altogether, our data show that human blood MZ and precursor-like MZ B-cells express NR4A1, 2 and 3 as well as high levels of CD83 gene transcripts. They also express CD39 and CD73

gene transcripts. However, we found that not all blood MZ and precursor-like MZ B-cells express proteins for these markers. Co-expression of NR4A1 or NR4A3 and CD83 proteins is heterogeneous, and the majority of B-cells co-expressing these markers are CD1c+ and express CD39, of which a proportion is also CD73+. Strikingly, elevated frequencies of cells co-expressing NR4A and CD83 are found within the precursor-like MZ B-cell population. Moreover, it is within the latter that we found significantly elevated expression levels of these proteins. As for blood, we found that in tonsils the main population to co-express NR4A and CD83 are precursor-like MZ B-cells, which bear the highest levels of expression for these markers. We found that cells co-expressing NR4A1 and CD83 are mostly CD39+CD73+ but not all CD39+CD73+ cells express NR4A1 and CD83. We found that sorted total precursor-like MZ B cells exerted regulatory activity on activated autologous tonsil CD4+ T-cells, and this activity was reduced by an anti-CD83 blocking antibody.

Breg potential within precursor-like MZ B cells might be found within an NR4A and CD83 co-expressing sub-population or differentiation stage. However, further experimentation would be required to ascertain this point, and we feel it is beyond the scope of this manuscript.

MZ populations are known for their polyreactive BCR and its autoreactive potential [24,25]. It is therefore possible that NR4A1-3 expression in these cells be maintained similarly to that observed for Tregs, where NR4A1-3 expression is likely maintained through a tonic autoreactive TCR signal [5]. Despite the requirement for further experimentation, our data suggest that maintenance of NR4As expression allows for high CD83 expression, which regulatory properties could be important to Breg function. Given that activated tonsillar T-cells expressed CD83, we propose that homotypic interactions with high CD83 on precursor-like MZ B-cells might have delivered regulatory signals, as has been described for dendritic cells whereby CD83 interactions via cell-to-cell contact mediated inhibition of pro-inflammatory signaling by inhibiting p38 $\alpha$  phosphorylation [26]. This however will require further experimentation.

## **5 – Conclusion**

We believe these observations shed light on the Breg potential of MZ populations, mainly within the precursor-like fraction and identify potential Breg markers NR4A1-3 and CD83, which

as for Tregs, may be involved in stabilization of a regulatory status. Our findings may be useful to therapeutic strategies aiming at modulation of Breg responses.

### **Acknowledgments**

We are grateful to Lyvia Fourcade for help with lab management. Raphaële Lambert, Jennifer Huber and Patrick Gendron (IRIC Genomic and Bioinformatics core facilities) for RNASeq transcriptomic and data analyses, respectively. We are grateful to Bertrand Allard (CRCHUM) for helpful discussions. We are grateful to Daniel Kaufmann and Nathalie Brassard (CRCHUM) for providing human tonsil samples and the Réseau Sida FRQS for providing human blood samples. We are grateful to Dre Dominique Gauchat and the CRCHUM flow-cytometry core facility.

### **Supplementary Materials**

The following are available online at <https://www.mdpi.com/2073-4468/8/4/50/s1>, Figure S1: NR4A1 expression by human blood B-cells following 3 h incubation in absence or presence of PMA/ionomycin. Figure S2: RNA-Seq analyses of expression of Breg associated molecules by *ex vivo* human blood marginal zone (MZ) and precursor-like MZ B-cells. Figure S3: Flow-cytometry analyses of blood and tonsil marginal zone (MZ) B-cells.

### **Author Contributions**

K.D.-L. and M.B. performed the human tonsil *in vitro* cellular experiments and analyzed the data. K.D.-L. and M.A. performed the functional studies. M.M. performed the murine and human PBMC flow-cytometry experiments and analyzed the data along with K.D.-L. and P.C., J.C.-C. prepared human PBMCs for cell sorting of human blood MZ and precursor-like MZ B-cells, and performed RNA isolation. P.C. and J.S. provided and processed murine samples as well as technical and scientific guidance. J.P. and M.R. designed the experiments, analyzed the data and wrote the article. All authors revised the last version of the manuscript. J.P. and M.R. are senior co-authors.

**Funding**

This work was supported by grant # PJT-148529 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and by the Réseau Sida from the Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS).

**Conflicts of Interest**

The authors declare no conflict of interest.

## 6 – References

1. Fontaine J., Chagnon-Choquet J., Valcke H.S., 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;117:145–155. doi: 10.1182/blood-2010-08-301887.
2. Chagnon-Choquet J., Fontaine J., Poudrier J., Roger M. 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:e101949. doi: 10.1371/journal.pone.0101949.
3. Sabourin-Poirier C., Fourcade L., Chagnon-Choquet J., Labbé A.-C., Alary M., Guédou F., Poudrier J., Roger M. Blood B Lymphocyte Stimulator (BLyS)/BAFF levels may reflect natural immunity to HIV in highly exposed uninfected Beninese Commercial Sex Workers. *Sci. Rep.* 2016;6:32318. doi: 10.1038/srep32318.
4. Mauri C., Bosma A. Immune regulatory function of B Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2012;30:221–241. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074934
5. Iizuka-Koga M., Nakatsukasa H., Ito M., Akanuma T., Lu Q., Yoshimura A. Induction and maintenance of regulatory T cells by transcription factors and epigenetic modifications. *J. Autoimmun.* 2017;83:113–121. doi: 10.1016/j.jaut.2017.07.002.
6. Ashouri J.F., Weiss A. Endogenous Nur77 is a specific indicator of antigen receptor signaling in human T and B cells. *J. Immunol.* 2016;198:657–668. doi: 10.4049/jimmunol.1601301.
7. Sekiya T., Kashiwagi I., Yoshida R., Fukaya T., Morita R., Kimura A., Ichinose H., Metzger D., Chambon P., Yoshimura A. Nr4a receptors are essential for thymic regulatory T cell development and immune homeostasis. *Nat. Immunol.* 2013;14:230–237. doi: 10.1038/ni.2520.
8. Bandukwala H.S., Rao A. ‘Nurr’ishing Treg cells: Nr4a transcription factors control Foxp3 expression. *Nat. Immunol.* 2013;14:201–203. doi: 10.1038/ni.2546
9. Breloer M., Kretschmer B., Lüthje K., Ehrlich S., Ritter U., Bickert T., Steeg C., Fillatreau S., Hoehlig K., Lampropoulou V., et al. CD83 is a regular of murine B cell function in vivo. *Eur. J. Immunol.* 2007;37:634–648. doi: 10.1002/eji.200636852.

10. Breloer M., Fleischer B. CD83 regulates lymphocyte maturation, activation and homeostasis. *Trends Immunol.* 2008;29:186–194. doi: 10.1016/j.it.2008.01.009
11. Duren R.P., Boudreaux S.P., Conneely O.M. Genome wide mapping of NR4A binding reveals cooperativity with ETS factors to promote epigenetic activation of distal enhancers in acute myeloid leukemia cells. *PLoS ONE.* 2016;11:e0150450. doi: 10.1371/journal.pone.0150450.
12. Figueiró F., Muller L., Funk S., Jackson E.K., Battastini A.M.O., Whiteside T.L. Phenotypic and functional characteristics of CD39<sup>high</sup> human regulatory B cells (Breg) *Oncoimmunology.* 2016;5 doi: 10.1080/2162402X.2015.1082703.
13. Hong C.-S., Whiteside T.L., Schuler P.J., Saze Z., Cheng D., Jackson E.K. Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. *Blood.* 2013;122:9–18.
14. Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15:550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
15. van Rhijn I., Godfrey D.I., Rossjohn J., Moody D.B. Lipid and small-molecule display by CD1 and MR1. *Nat. Rev. Immunol.* 2015;15:643–654. doi: 10.1038/nri3889.
16. Allard B., Longhi M.S., Robson S.C., Stagg J. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol. Rev.* 2017;276:121–144. doi: 10.1111/imr.12528.
17. Bahar B., Crean D., McMorrow J.P., Cummins E.P., Mohan H., Murphy E.P. Adenosine modulates NR4A orphan nuclear receptors to attenuate hyperinflammatory responses in monocytic cells. *J. Immunol.* 2015;195:1436–1448.
18. Mauri C., Menon M. Human regulatory B cells in health and disease: Therapeutic potential. *J. Clin. Investig.* 2017;127:772–779. doi: 10.1172/JCI85113.
19. Amodio G., de Albuquerque R.S., Gregori S. New insights into HLA-G mediated tolerance. *Tissue Antigens.* 2014;84:255–263. doi: 10.1111/tan.12427.
20. Abdollahi-Roodsaz S., Dinarello C.A., O'Neill L., Netea M.G., Joosten L.A.B. Toll-like receptors and chronic inflammation in rheumatic diseases: New developments. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2016;12:344–357. doi: 10.1038/nrrheum.2016.61.

21. Guan Y., Hess N.J., Tapping R.I., Jiang S., Li X. TLR10 is a B cell intrinsic suppressor of adaptive immune responses. *J. Immunol.* 2016;198:699–707.
22. Oleinika K., Rosser E.C., Matei D.E., Nistala K., Bosma A., Drozdov I., Mauri C. CD1d-dependent immune suppression mediated by regulatory B cells through modulations of iNKT cells. *Nat. Commun.* 2018;9 doi: 10.1038/s41467-018-02911-y.
23. Yoshizaki A., Miyagaki T., Dilillo D.J., Matsushita T., Horikawa M., Kountikov E.I., Spolski R., Poe J.C., Leonard W.J., Tedder T.F. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature.* 2012;491:264–268. doi: 10.1038/nature11501.
24. Blair P.A., Norena L.Y., Flores-Borja F., Rawlings D.J., Isenberg D.A., Ehrenstein M.R., Mauri C. CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic lupus erythematosus patients. *Immunity.* 2009 doi: 10.1016/j.immuni.2009.11.009.
25. Cerutti A., Cols M., Puga I. Marginal zone B cells: Virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* 2013;13:118–132. doi: 10.1038/nri3383.
26. Bates J.M., Flanagan K., Mo L., Ota N., Ding J., Ho S., Liu S., Roose-Girma M., Warming S., Diehl L. Dendritic cell CD83 homotypic interactions regulate inflammation and promote mucosal homeostasis. *Mucosal Immunol.* 2015;8:414–428. doi: 10.1038/mi.2014.79.

## Figure Legends

### Figure 1

RNA-Seq analyses of (A) NR4A1, (B) NR4A3, (C) NR4A2, and (D) CD83, as well as (E) CD39 and (F) CD73 expression by *ex vivo* human blood marginal zone (MZ) and precursor-like MZ B-cells. Data are presented as the mean value of samples from 3 healthy donors  $\pm$  SD.

### Figure 2

Flow-cytometry analyses of NR4A1, NR4A3, CD83, CD39, and CD73 expression by live *ex vivo* unstimulated human blood B-cells. (A) Gating strategy: Singlet Live CD19<sup>+</sup> B-cells were analyzed for NR4A1 or NR4A3 and CD83 co-expression. NR4A1<sup>+</sup> or NR4A3<sup>+</sup> (not shown) CD83<sup>+</sup> B-cells were then analyzed for CD1c expression, and subsequently for IgM and CD27 expression, for CD10 expression, and for CD39 and CD73 expression. (B) Relative frequencies of NR4A1 and CD83 and (C) NR4A3 and CD83 co-expressing marginal zone (MZ), precursor-like MZ and total B-cells were compared with an ANOVA with post-hoc Tukey test. (A–C) Data are representative of 5 healthy donors. (D) Levels of expression as determined by geometric mean fluorescence intensity (GeoMFI) of NR4A1, (E) NR4A3, and (F) CD83 for MZ, precursor-like MZ and total B-cells were compared with an ANOVA with post-hoc Tukey test. (D–F) Data are representative of four healthy donors. Significance levels are shown as \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ), \*\*\* ( $p < 0.001$ ).

### Figure 3

RNA-Seq analyses of HLA-G, TLR7, 9, 10, and CD1a, c, d, and IL-21R expression by *ex vivo* human blood marginal zone (MZ) and precursor-like MZ B-cells. Data are presented as the mean value of samples from 3 healthy donors  $\pm$  SD.

### Figure 4

RNA-Seq analyses of Indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 (IDO1), TGF $\beta$ 1, IL-35, granzyme B, PD-L1, IL-10, and IL-10R expression by *ex vivo* human blood marginal zone (MZ) and precursor-like MZ B-cells. Data are presented as the mean value of samples from 3 healthy donors  $\pm$  SD.



## Figure 5

Flow-cytometry analyses of live unstimulated human tonsillar B-cells. (A) B-cells which co-expressed NR4A1 and CD83 were further analyzed for CD1c+ expression, the latter were then analyzed for IgM and CD27 expression, and IgM+CD27+ cells were analyzed for CD10 expression. (B) B-cells which co-expressed CD39 and CD73 were analyzed for CD1c+ expression, the latter were then analyzed for IgM and CD27 expression, and IgM+CD27+ cells were analyzed for CD10 expression. (C) Levels of expression of NR4A1, (D) CD83 for total, MZ, precursor-like MZ and total CD39+ B-cells, and (E) Frequencies of NR4A1 and CD83 co-expressing total, MZ, precursor-like MZ and total CD39+ B-cells were compared with an ANOVA with post-hoc Tukey test. (F) NR4A1 and (G) CD83 expression levels for total, MZ, precursor-like MZ and total CD39+ B-cells following stimulation or not with PMA/ionomycin were compared with an unpaired Student's t test. Data are representative of at least 3 different donors (A,B). Data are presented as mean value of 3 independent experiments for the same donor  $\pm$  SD (C–G), and was repeated for at least 3 healthy donors. Geometric Mean fluorescence Intensity (GeoMFI), Medium Alone (MA). Significance levels are shown as \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ), \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ).

## Figure 6

Reduced CD4+ T-cell proliferation following co-culture with precursor-like MZ B-cells. Sorted tonsillar precursor-like MZ or total CD1c- B-cells were co-cultured for 36 h with anti-CD3 + anti-CD28, with autologous sorted tonsillar CD4+ T-cells, at a ratio of 3:1 T:B cells, in presence or absence of an anti-CD83 blocking antibody. Note that because of limited tonsillar samples, we could not assess ratios above 3:1. Data are presented as percentages (%) of Ki67 (cell cycle) expressing T-cells and % between groups were compared with an ANOVA with post-hoc Tukey test. The data are presented as mean values of triplicates  $\pm$  SEM for one donor and are representative of two independent donors. Anti-CD83 blocking was done once. Significance levels are shown as \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ).

## Supplemental Figure S1.

NR4A1 expression by human blood B-cells following 3 h incubation in absence or presence of PMA/ionomycin. The REA human IgG1 clone directed against mouse NR4A1 (Nurr77)

crossreacts with human, as specified by Miltenyi Biotec. (B) This has been verified by flow-cytometry on *ex vivo* human peripheral blood mononuclear cells. Data are representative of at least 3 independent experiments. Medium alone (MA).

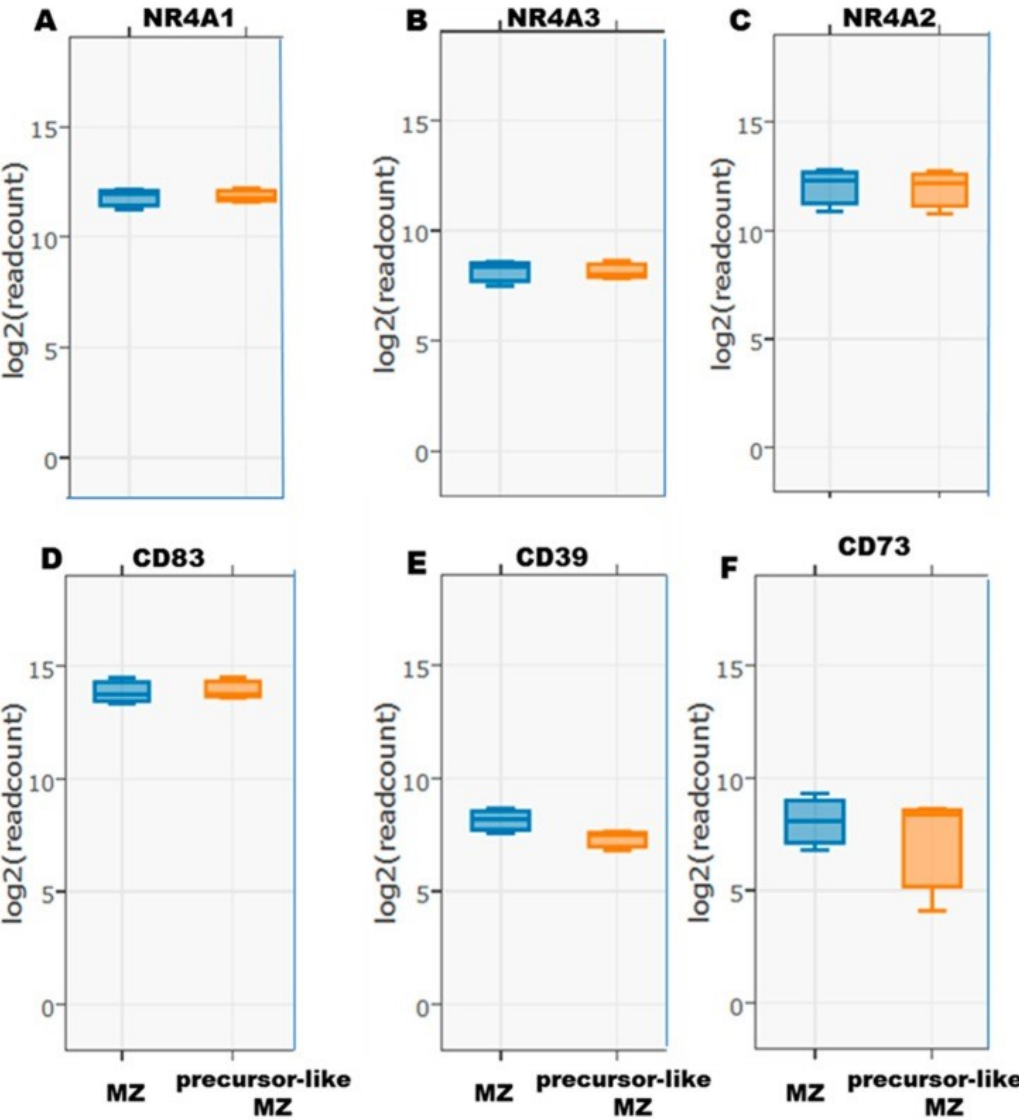
### **Supplementary Figure S2.**

RNA-Seq analyses of expression of Breg associated molecules by *ex vivo* human blood marginal zone (MZ) and precursor-like MZ B-cells. Data are presented as mean value for 3 healthy donors  $\pm$  SD.

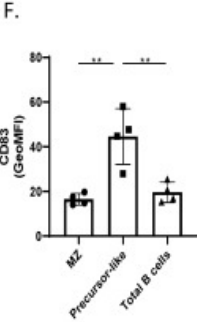
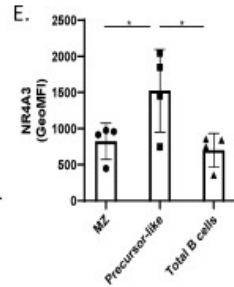
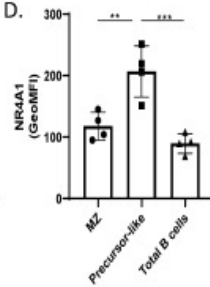
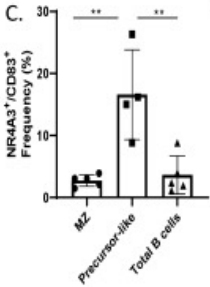
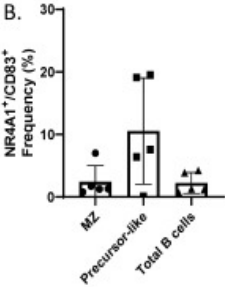
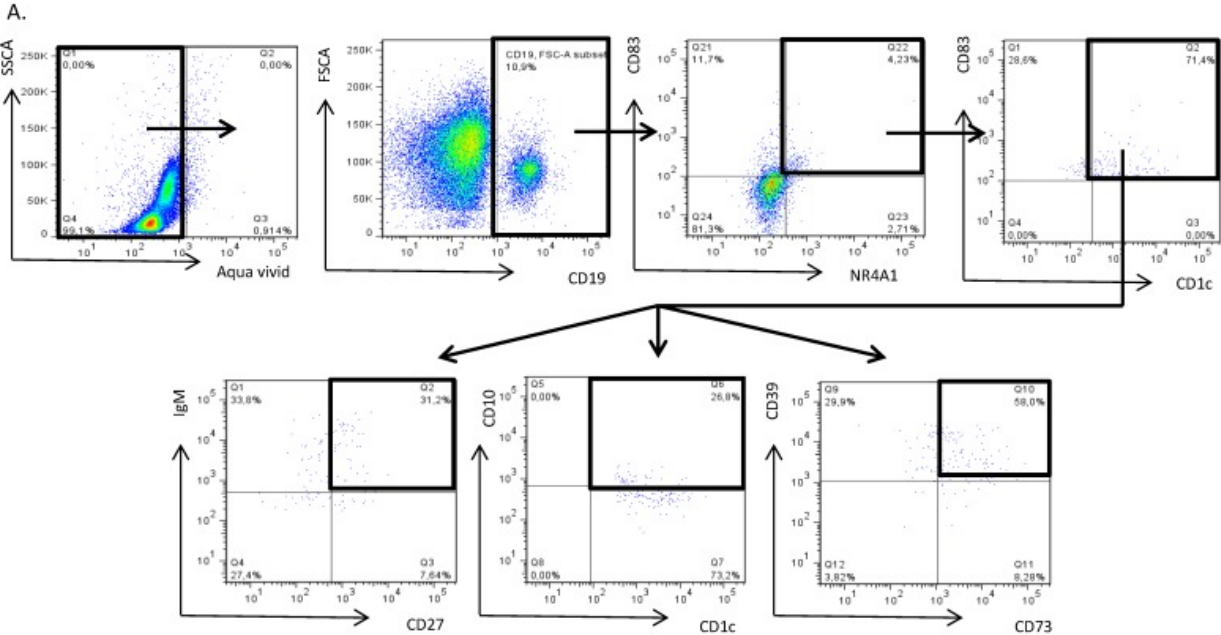
### **Supplementary Figure S3.**

Flow-cytometry analyses of blood and tonsil marginal zone (MZ) B-cells. (A) Tonsil *ex vivo* unstimulated precursor-like MZ B-cells were analyzed for expression of NR4A1 and CD83, and cells co-expressing NR4A1 and CD83 were analyzed for their expression of CD39 and CD73 (top panels). On the other hand, precursor-like MZ B-cells were analyzed for expression of CD39 and CD73, and double positive cells were assessed for NR4A1 and CD83 co-expression (lower panels). Data are representative of 3 healthy donors. (B) Flow-cytometry analysis of NR4A3 and CD83 co-expression by tonsil *ex vivo* unstimulated MZ, precursor-like and total B-cells. Data is preliminary and representative of one healthy donor. (C) Blood *ex vivo* unstimulated MZ and precursor-like MZ B-cells were analyzed for expression of NR4A1 and CD83, and cells co-expressing NR4A1 and CD83 were analyzed for their expression of CD39 and CD73 (top panels). On the other hand, MZ and precursor-like MZ B-cells were analyzed for expression of CD39 and CD73, and double positive cells were assessed for NR4A1 and CD83 co-expression (lower panels). Data are representative of 5 healthy donors.

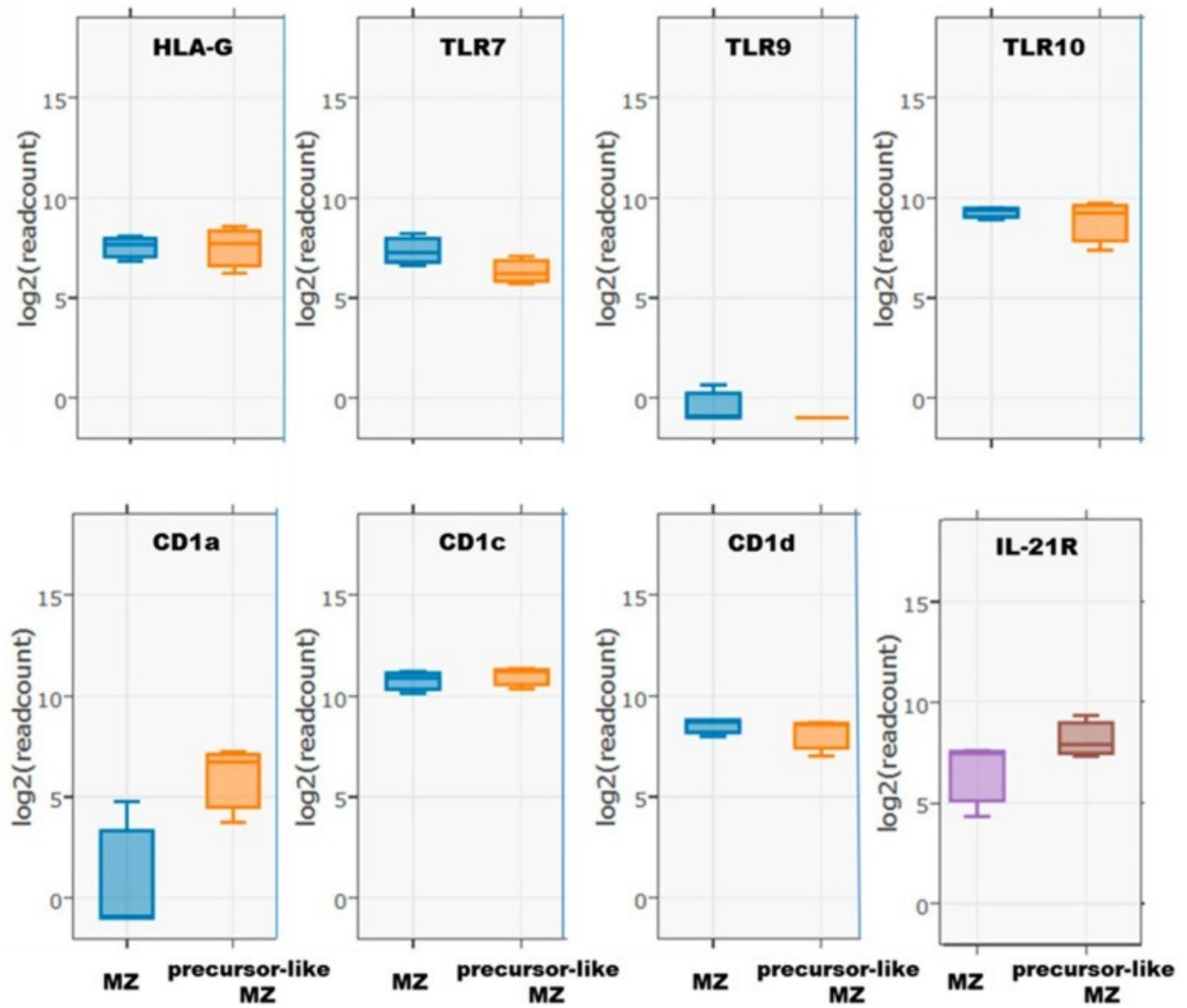
Annexe 1 – Figure 1



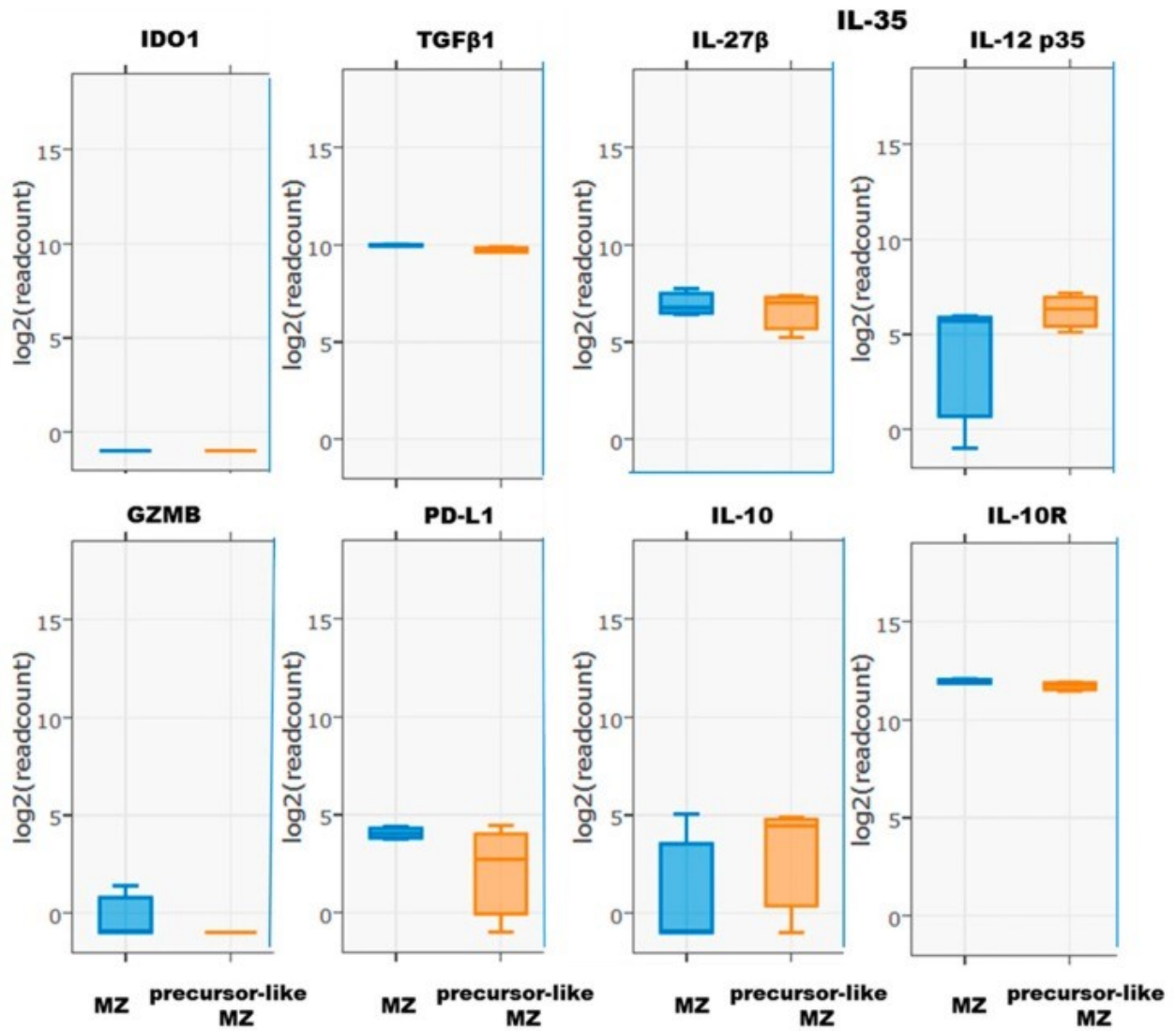
# Annexe 1 – Figure 2



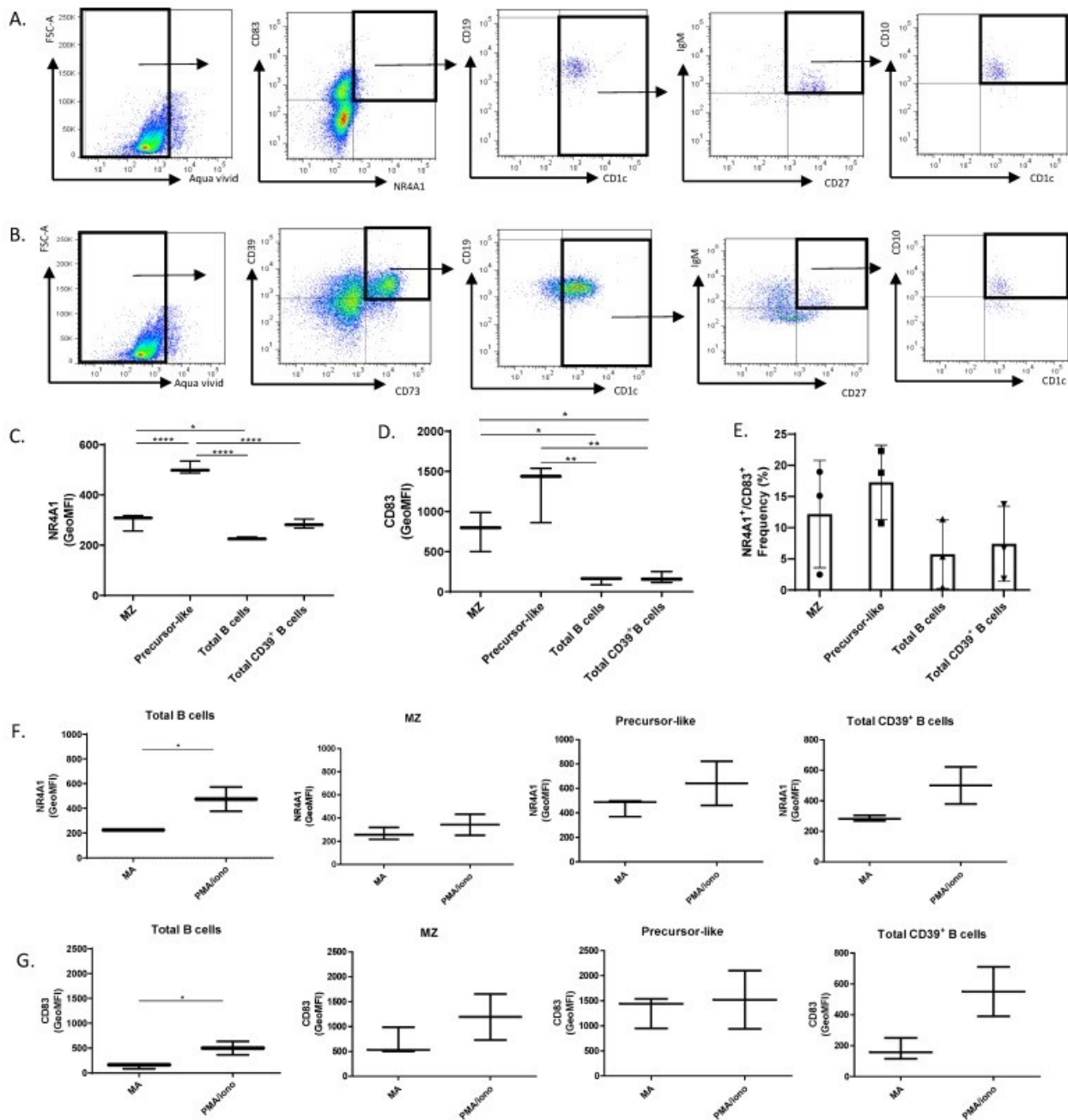
Annexe 1 – Figure 3



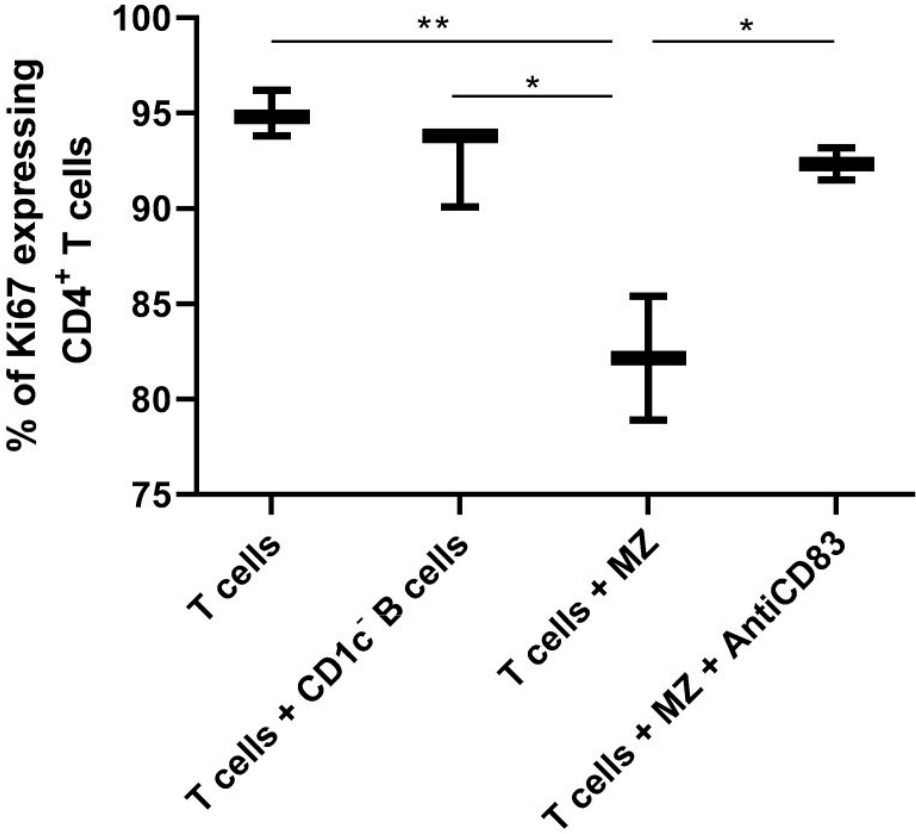
Annexe 1 – Figure 4



# Annexe 1 – Figure 5

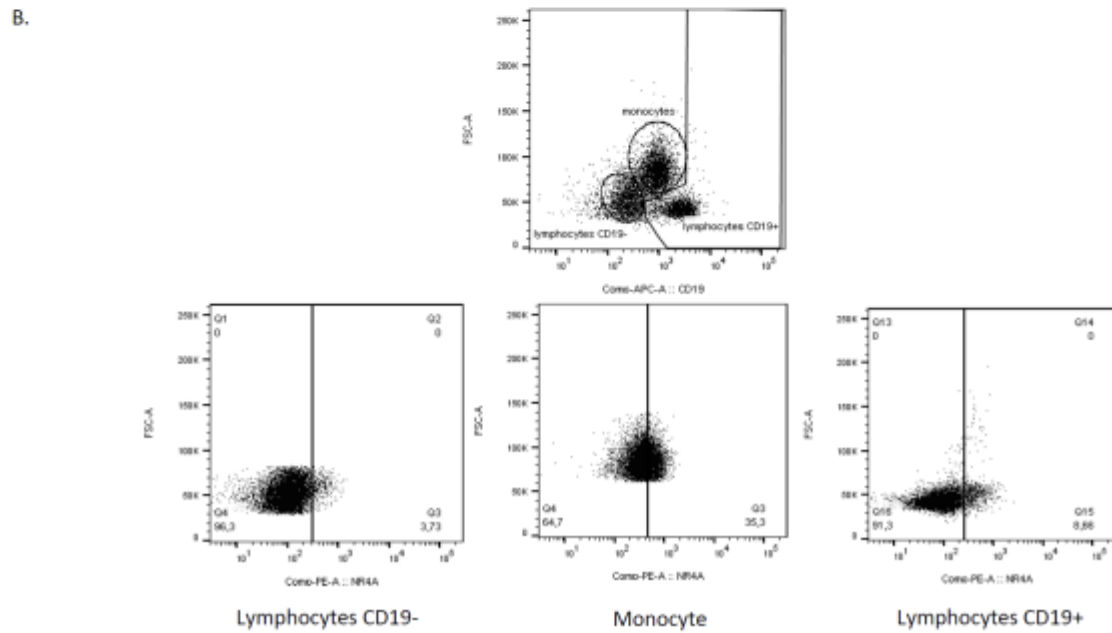
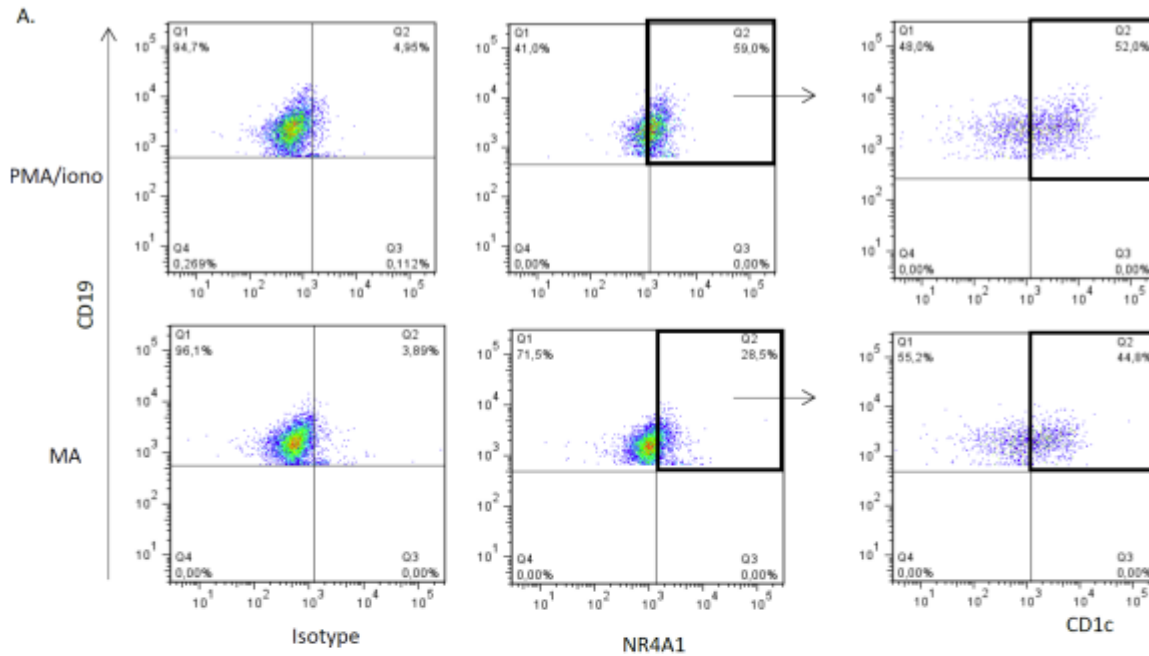


Annexe 1 – Figure 6

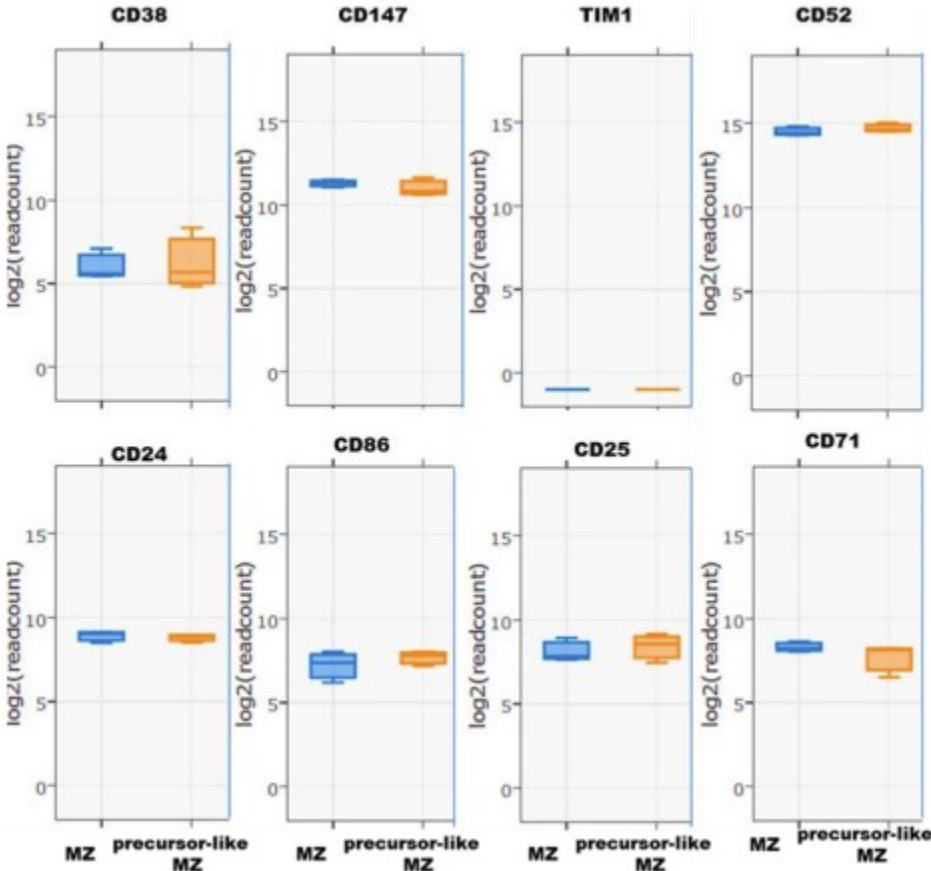




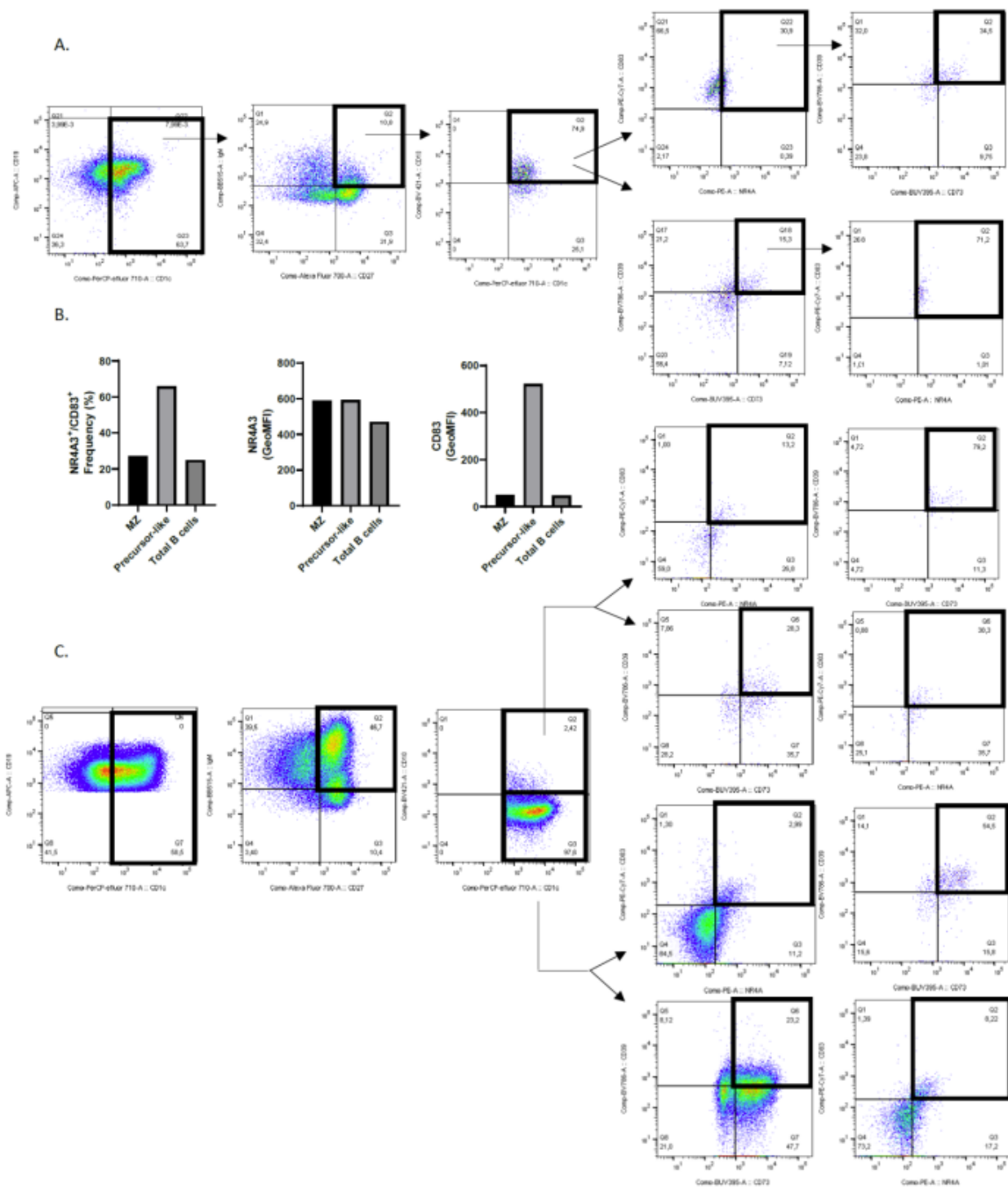
# Annexe 1 – Figure Supplémentaire 1



Annexe 1 – Figure Supplémentaire 2



# Annexe 1 – Figure Supplémentaire 3



# **Annexe 2 – Marginal Zone B-Cell Populations and Their Regulatory Potential in the Context of HIV and Other Chronic Inflammatory Conditions**

Kim Doyon-Laliberté, Matheus Aranguren, Johanne Poudrier, Michel Roger

**Statut** : Publié dans le journal *International Journal of Molecular Sciences* (2022)

**Contribution des coauteurs** : Kim Doyon-Laliberté et Matheus Aranguren ont écrit en collaboration toutes les sections. Johanne Poudrier a contribué à l'écriture du manuscrit. Johanne Poudrier et Michel Roger ont élaboré, supervisé et coordonné le travail. Tous les auteurs ont lu et ont accepté la version publiée du manuscrit.

# Marginal Zone B-Cell Populations and Their Regulatory Potential in the Context of HIV and Other Chronic Inflammatory Conditions

Kim Doyon-Laliberté<sup>1,2\*</sup>, Matheus Aranguren<sup>1,2\*</sup>, Johanne Poudrier<sup>1,2\*\*</sup>, Michel Roger<sup>1,2\*\*</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Qc, Canada. <sup>2</sup>Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie de l'Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada.

\*Co-first authors

\*\*Co-seniors

*Running Title:* MZ B-cells in HIV context

*Word count in abstract:* 289

*Word count in text:* 7508

*Number of Figures and Tables:* 2 Figures, 2 Tables

*Reference count:* 203

## Abstract

Inflammation in the context of Human Immunodeficiency Virus (HIV) establishes early and persists beyond antiretroviral therapy (ART). As such, we have shown excess B-cell activating factor (BAFF) in the blood of HIV-infected progressors, as soon as in the acute phase, and despite successful ART. Excess BAFF was associated with deregulation of the B-cell compartment; notably, with increased frequencies of a population sharing features of both transitional immature (TI) and marginal zone (MZ) B-cells, we termed Marginal Zone precursor-like (MZp). We have reported similar observations with HIV-transgenic mice, Simian Immunodeficiency Virus (SIV)-infected macaques, and more recently, with HIV-infected Beninese commercial sex workers, which suggests that excess BAFF and increased frequencies of MZp B-cells are reliable markers of inflammation in the context of HIV. Importantly, we have recently shown that in healthy individuals, MZps present an important regulatory B-cell (Breg) profile and function. Herein, we wish to review our current knowledge on MZ B-cell populations, especially their Breg status, and that of other B-cell populations sharing similar features. BAFF and its analog A Proliferation-Inducing Ligand (APRIL) are important in shaping the MZ B-cell pool; moreover, the impact that excess BAFF—encountered in the context of HIV and several chronic inflammatory conditions—may exert on MZ B-cell populations, Breg and antibody producing capacities is a threat to the self-integrity of their antibody responses and immune surveillance functions. As such, deregulations of MZ B-cell populations contribute to autoimmune manifestations and the development of MZ lymphomas (MZLs) in the context of HIV and other inflammatory diseases. Therefore, further comprehending the mechanisms regulating MZ B-cell populations and their functions could be beneficial to innovative therapeutic avenues that could be deployed to restore MZ B-cell immune competence in the context of chronic inflammation involving excess BAFF.

# **Annexe 3 – Monocytes' Gene and Molecular Expression Profiles Demonstrate Distinct Effector and Regulatory Functions in Beninese HIV Highly Exposed Seronegative Female Commercial Sex Workers**

Laurence Blondin-Ladrie, Lyvia Fourcade, Alessandro Modica, Matheus Aranguren, Nicolas de Montigny, Annie-Claude Labbé, Michel Alary, Fernand Guédou, Johanne Poudrier, and Michel Roger.

**Statut** : Publié dans le journal *Viruses* (2022)

## **Contribution des coauteurs :**

Laurence Blondin-Ladrie a fait le choix des participantes de la cohorte, a réalisé les expériences en cytométrie en flux, a analysé le data et a écrit l'article. Laurence Blondin-Ladrie et Lyvia Fourcade ont préparé les échantillons pour le tri des monocytes et le séquençage de leur transcriptome (IRIC). Alessandro Modica et Matheus Aranguren ont aidé avec les expériences en cytométrie en flux. Nicolas de Montigny a réalisé les analyses statistiques et les graphiques. Annie-Claude Labbé, Michel Alary, Fernand Guédou et Michel Roger ont établi la cohorte béninoise. Johanne Poudrier et Michel Roger ont contribué au design du projet, à l'analyse des données et à l'écriture de l'article. Tous les auteurs ont révisé la dernière version de l'article.

# **Monocytes' Gene and Molecular Expression Profiles Demonstrate Distinct Effector and Regulatory Functions in Beninese HIV Highly Exposed Seronegative Female Commercial Sex Workers**

Laurence Blondin-Ladrie<sup>1,2</sup>, Lyvia Fourcade<sup>1, 2</sup>, Alessandro Modica<sup>1, 2</sup><sup>¶</sup>, Matheus Aranguren<sup>1, 2</sup><sup>¶</sup>, Nicolas de Montigny<sup>3</sup>, Annie-Claude Labbé<sup>2, 4</sup>, Michel Alary<sup>5, 6, 7</sup>, Fernand Guédou<sup>8</sup>, Johanne Poudrier<sup>1, 2\*</sup>, and Michel Roger<sup>1, 2\*</sup>.

<sup>1</sup>Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Qc, Canada. <sup>2</sup>Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie de l'Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada. <sup>3</sup>Département de Sciences de l'informatique, Université du Québec à Montréal, Montréal, Qc, Canada. <sup>4</sup>Département de Microbiologie Médicale et Infectiologie, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Qc, Canada. <sup>5</sup>Centre de recherche du CHU de Québec-Université Laval, Québec, Qc, Canada. <sup>6</sup>Département de Médecine Sociale et Préventive, Université Laval, Québec, Qc, Canada. <sup>7</sup>Institut National de Santé Publique du Québec, Qc, Canada. <sup>8</sup>Dispensaire IST, Cotonou, Bénin.

<sup>¶</sup> contributed equally to this study

\*Co-seniors.

***Running Title:*** HIV highly exposed seronegative Beninese women present blood monocytes bearing distinct effector and regulatory profiles.

***Word count in abstract:*** 274

***Word count in text:*** 5107

***Number of Figures and Tables:*** 7 Figures, 1 Table, 3 Supplemental Figures, 1 Supplemental Table

***Reference count:*** 67



## Abstract

We have previously reported that the female genital tract (FGT) of Beninese HIV highly-exposed seronegative (HESN) commercial sex workers (CSWs), presented elevated frequencies of a myeloid HLA-DR+CD14+CD11c+ population exhibiting a profile reminiscent of “tolerogenic” monocyte derived dendritic cells (MoDC). In order to assess whether a differential profile of monocytes may be involved in the generation of these genital MoDCs, we have herein characterized the blood monocyte compartment of Beninese HESNs (HIV-uninfected  $\geq 10$  years CSWs) and relevant controls (HIV-uninfected 2.5-5 years CSWs herein termed “early HESNs”), HIV-infected CSWs, low-risk HIV-uninfected women from the general population). Transcriptomic analyses by RNASeq of total sorted blood monocytes demonstrate that in comparison to the control groups, HESNs present increased expression levels of FCGR2C, FCAR, ITGAX, ITGAM, CR2, CD68 and CD163 genes, associated with effector functions. Moreover, we found increased expression levels of genes associated with protection/control against SHIV/HIV such as CCL3, CCL4, CCL5, BHLHE40 and TNFSF13, as well as with immune regulation such as IL-10, Ahr, CD83 and the orphan nuclear receptor (NR)4A1, NR4A2 and NR4A3. Through multicolour flow-cytometry analyses, we noticed that frequencies of intermediate and non-classical monocyte populations tended to be elevated in the blood of HESNs, and exhibited increased expression levels of effector CD16, CD11c, CD11b as well as regulatory HLA-G, IL-10, IFN- $\alpha$  markers when compared to HIV-uninfected women from the general population and/or HIV-infected CSWs. Linear regression analyses show that expression levels of these markers are modulated in time for early HESN and HESNs. This profile is compatible with that of tolerogenic MoDC previously reported in the FGT of HESNs, and likely confers an enormous advantage to HESNs in their resistance to HIV infection.

**Keywords:** HIV, resistance, highly exposed seronegative (HESN), Commercial sex workers, monocytes, effector functions, regulatory functions

# **Annexe 4 – The importance of regulation in natural immunity to HIV**

Laurence Blondin-Ladrie, Matheus Aranguren, Kim Doyon-Laliberté, Johanne Poudrier et Michel Roger

**Statut** : Article publié dans *Vaccines* (2021)

## **Contribution des co-auteurs :**

Laurence Blondin-Ladrie a écrit la section sur le tractus génital féminin, le tractus génital féminin et le VIH et la section sur le microbiote, ainsi que la confection de la Figure 1. Matheus Aranguren a écrit la section sur les NK. Kim Doyon-Laliberté a écrit la section sur les lymphocytes B innés et la section sur les NR4A. Johanne Poudrier a coordonné le manuscrit et a écrit l'introduction, la section sur l'immunité naturelle et la section sur la régulation. Johanne Poudrier et Michel Roger ont élaboré, supervisé et coordonné le travail. Tous les auteurs ont lu et ont accepté la version publiée du manuscrit.

# The Importance of Regulation in Natural Immunity to HIV

Laurence Blondin-Ladrie<sup>1,2</sup>, Matheus Aranguren<sup>1,2</sup>, Kim Doyon-Laliberté<sup>1,2</sup>, Johanne Poudrier<sup>1,2,\*</sup>  
and Michel Roger<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Axe Immunopathologie, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, QC H2X0A9, Canada ;<sup>2</sup> Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie de l'Université de Montréal, Montréal, QC H3C3J7, Canada ;<sup>3</sup>Institut National de Santé Publique du Québec, Montréal, QC H2P1E2, Canada ; \*Authors to whom correspondence should be addressed.

Word Count in text: 7413

Number of Figures and Tables: Figures 1

Reference Count: 197

## **Abstract**

Worldwide, most Human Immunodeficiency Virus (HIV) infections are acquired through heterosexual intercourse, and in sub-Saharan Africa, 59% of new HIV infections affect women. Vaccines and microbicides hold promise for preventing the acquisition of HIV. To this end, the study of HIV highly exposed seronegative (HESN) female commercial sex workers (CSWs), who constitute a model of natural immunity to HIV, provides an exceptional opportunity to determine important clues for the development of preventive strategies. Studies using both female genital tract (FGT) and peripheral blood samples of HESN CSWs, have allowed identifying distinct features, notably low-inflammatory patterns associated with resistance to infection. How this seemingly regulated response is achieved at the initial site of HIV infection remains unknown. One hypothesis is that populations presenting regulatory profiles contribute to the orchestration of potent anti-viral and low-inflammatory responses at the initial site of HIV transmission. Here, we view to update our knowledge regarding this issue.

**Keywords:** HIV; highly exposed seronegative (HESN); natural immunity; regulatory cells.