

Université de Montréal

Dissection du rôle de la costimulation CD28 dans la modulation des fonctions effectrices des lymphocytes T durant l'infection par le VIH à l'aide d'un système artificiel de présentation d'antigène

Par

Tayma Shaaban Kabakibo

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

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

microbiologie et immunologie

Août 2023

© Tayma Shaaban Kabakibo, 2023

Université de Montréal

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

Dissection du rôle de la costimulation CD28 dans la modulation des fonctions effectrices des lymphocytes T durant l'infection par le VIH à l'aide d'un système artificiel de présentation d'antigène

Présenté par

Tayma Shaaban Kabakibo

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

Dr. Nathalie Labrecque
Présidente-rapportice

Dr. Daniel E. Kaufmann
Directeur de recherche

Dr. Naglaa Shoukry
Codirectrice

Dr. Heather Melichar
Membre du jury

Résumé

La dysfonction immunitaire des cellules T est une caractéristique de l'infection chronique par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Pour évaluer la dysfonction des cellules T non spécifiques au VIH, il est nécessaire d'utiliser une méthode impliquant une activation à la fois générique et médiée par le récepteur des cellules T (TCR). Nous avons créé un système de cellules présentatrices d'antigène artificielles (CPAa) modulable. Ce système se compose d'une bicouche lipidique sur des microbilles de silice (5 µm) compatibles avec la cytométrie en flux. Lorsque seul l'anti-CD3 est incorporé, l'activation des cellules T est limitée. L'introduction d'agoniste anti-CD28 a considérablement augmenté l'expression des cytokines et la régulation des marqueurs induits par l'activation. La costimulation CD28 modifie le profil de réponse, favorisant préférentiellement l'expression d'IL-2 par rapport à d'autres cytokines. Le besoin de la costimulation CD28 diffère également entre les populations mémoires de cellules T, les cellules mémoires plus différenciées bénéficiant davantage du CD28.

Les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ stimulées par les CPAa chez les gens infectés par le VIH (GIV) non traités présentent des fonctions effectrices altérées et une dépendance réduite au CD28. Ces fonctions sont enrichies en TNFα, IFNγ et CD107a, avec une réduction d'IL-2. La thérapie antirétrovirale normalise partiellement ce profil déformé dans les cellules T CD4⁺ mais pas dans les cellules T CD8⁺. Nos résultats montrent des biais intrinsèques aux cellules T qui pourraient contribuer à la dysfonction persistante des cellules T systémiques associée à la pathogenèse du VIH.

Mots-clés : cellules T, costimulation CD28, systèmes artificiels d'activation de cellules T, VIH, activation immunitaire chronique, dysfonction des cellules T.

Abstract

T-cell immune dysfunction is a hallmark of chronic human immunodeficiency virus (HIV) infection. To evaluate generalized dysfunction in T cells non-specific for HIV, a method involving both a generic activation and T-cell receptor (TCR) stimulation is necessary. We created a tunable artificial antigen-presenting cell (aAPC) system. This system consists of lipid bilayers on cytometry-compatible silica microbeads (5 μm). When only anti-CD3 is incorporated, T-cell activation is limited. Introducing anti-CD28 agonists significantly elevated cytokine expression and upregulation of activation-induced markers. CD28 co-stimulation modulates the response profile, preferentially promoting IL-2 expression relative to other cytokines. The requirement for CD28 co-stimulation also differed between T cell subsets as more differentiated memory cells benefited more from CD28.

aAPCs-stimulated CD4⁺ and CD8⁺ T cells from untreated HIV-infected individuals exhibit altered effector functions and diminished CD28 dependence. These functions are skewed towards TNF α , IFN γ , and CD107a, with reduced IL-2. Antiretroviral therapy partially normalizes this distorted profile in CD4⁺ T cells but not in CD8⁺ T cells. Our findings show T-cell intrinsic biases that may contribute to persistent systemic T-cell dysfunction associated with HIV pathogenesis.

Keywords : T cells, CD28 co-stimulation, artificial antigen presenting system, HIV, chronic immune activation, T-cells dysfunction.

Table des matières

Résumé	3
Abstract.....	4
Table des matières.....	5
Liste des tableaux	8
Liste des figures	9
Liste des sigles et abréviations.....	10
Remerciements.....	14
Chapitre 1 — Introduction	16
Le système immunitaire.....	16
Les cellules dendritiques : lien entre l'immunité innée et adaptative.....	16
Les lymphocytes T.....	17
L'activation des lymphocytes T.....	17
La signalisation du TCR.....	18
Molécules de costimulation.....	19
La molécule de costimulation positive CD28	20
Les molécules de costimulation positives induites par l'activation	22
Les molécules de costimulation négatives (coinhibitrices).....	22
La réponse des cellules T lors d'une infection virale.....	23
Méthodes d'activation des lymphocytes T <i>ex vivo</i>	25
Les superantigènes	26
Les anticorps agonistes	27
Les agonistes solubles.....	27

Les billes rigides	27
Les bicouches lipidiques sur des surfaces solides	28
L'infection chronique par le VIH	28
Le virus	29
Le cycle de réplication.....	29
Les réservoirs	30
La pathogenèse	31
La phase aiguë.....	31
La phase chronique	32
Sida.....	32
La réponse immunitaire contre le VIH	33
La réponse innée.....	33
La réponse adaptative des lymphocytes T spécifiques au VIH.....	33
L'activation immunitaire chronique.....	34
Les causes de l'hyperactivation chronique	34
La réplication du VIH et les protéines virales.....	34
Les coinfections.....	35
La translocation microbienne	35
Le paradoxe de la déficience immunitaire et l'hyperactivation.....	36
La dysfonction des lymphocytes T spécifiques au VIH.....	36
La dysfonction globale du système immunitaire	38
Développement de maladies non associées au sida.....	38
Chapitre 2 — Hypothèses et objectifs	40

Chapitre 3 — Article: An artificial antigen- presenting cell system reveals CD28 co-stimulation’s role in modulating T cell effector functions during HIV infection.....	42
SUMMARY.....	45
INTRODUCTION.....	46
RESULTS	48
DISCUSSION	60
ACKNOWLEDGMENTS.....	65
METHODS.....	67
REFERENCES.....	74
FIGURES	87
Chapitre 4 — Discussion générale et perspectives.....	120
Discussion des résultats	120
Perspectives.....	124
Limites.....	127
Références bibliographiques	129

Liste des tableaux

Tableau 1. – Les sous-populations des cellules T_{aux}	25
---	----

Liste des figures

Figure 1. –	Activation des cellules T par une CPA : le modèle de deux signaux.....	18
Figure 2. –	Les voies de signalisation du TCR et CD28	21
Figure 3. –	Mécanisme d'action du superantigène.....	26
Figure 4. –	Cycle de réplication du VIH.	30
Figure 5. –	L'évolution de l'infection par le VIH.....	33

Liste des sigles et abréviations

aCD28: l'anticorps anti-CD28

aCD3: l'anticorps anti-CD3

ADN : l'acide désoxyribonucléique

ARN: l'acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ART: traitement antirétroviral

Bcl-X_L: B-cell lymphoma-extra large

CD: cluster of differentiation

CD14s: CD14 soluble

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

CPAa : cellule présentatrice d'antigène artificielle

CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4

DC : cellule dendritique

GIV: gens infectés par le VIH

GNI : gens non-infectés

Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2

I-FABP : protéine de liaison aux acides gras intestinaux (*Intestinal Fatty Acid Binding Protein*)

ICOS. : le costimulateur inductible

IL : interleukine

ITAMS: immunoreceptor tyrosine-based activation motif

LBP: LPS binding protein

Lck : lymphocyte-specific protein tyrosine kinase

LCMV : virus de la chorioméningite lymphocytaire

MAPK : protéine kinase activée par les mitogènes

mTOR: mammalian target of rapamycin

NF- κ B: nuclear factor-kappa B

NFAT: nuclear factor of activated T cells

NK: natural killer (cellule tueuse naturelle)

PAMPs: pathogen-associated molecular patterns

PCC: l'antigène du cytochrome c de pigeon

PD-1: programmed cell death protein 1

PI3K: phosphoinositide 3-kinases

PLC- γ : phospholipase C- γ

PRR: pathogen recognition receptor

SEB: l'entérotoxine B staphylococcique

SI : synapse immunologique

Sida : syndrome d'immunodéficience acquise

T_{aux} : cellule T auxiliaire

T_C : cellules T cytotoxique

TCR : T-cell receptor

Tfh : cellules T folliculaires (*T follicular helper cells*)

TNF : le facteur de nécrose tumorale

TRAF : les facteurs associés au récepteur TNF

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VIS : virus de l'immunodéficience simienne

ZAP-70 : Zeta-chain-associated protein kinase 70

À ma grand-mère, tėti Rajaa

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier chaleureusement mon directeur de recherche Dr Daniel Kaufmann de m'avoir accueilli dans son laboratoire pour mon premier stage de recherche et de m'avoir permis de poursuivre ma maîtrise sous sa direction. Merci pour ton grand soutien, ta confiance en moi et pour les nombreux conseils que tu m'as donnés tout au long de ma maîtrise. Travailler sous ta direction a été tout un plaisir. Je remercie également ma codirectrice Dre Naglaa Shoukry pour sa contribution scientifique précieuse dans ma deuxième année de maîtrise. Merci de m'avoir accueilli chaleureusement dans ton lab et d'avoir toujours ta porte ouverte.

Je tiens à remercier Dr Mathieu Dubé de m'avoir supervisé de près depuis mon stage. Merci de m'avoir initié à la recherche et inspiré pour continuer en maîtrise. Tu m'as beaucoup appris (incluant de nouvelles expressions québécoises ! 😊) et je n'aurai pu espérer avoir une meilleure formation. Merci à toi et Daniel de m'avoir fourni tout le bagage nécessaire pour mon prochain parcours au doctorat !

Un grand merci également à tous les membres du laboratoire présents et passés pour leur accueil chaleureux et leur grand esprit d'équipe. Audrée, Alex, Manon, Gérémy, Elsa, Gloria, Rose Mélanie, Alina, Michael et Mélina, j'ai grandement apprécié le bon temps passé avec chacun de vous. Votre présence et soutien m'ont permis de surpasser les moments difficiles durant ma maîtrise. Merci également pour vos conseils et aide pour mon projet ! Je tiens aussi à remercier la meilleure voisine de bureau Sana pour tous les rires et moments inoubliables.

J'aimerais aussi remercier ma deuxième famille ici, mes amis « *El fari2* » : Catherine, Mirey, Marc, Marten, Nayer, Anna et Nassem. Ces deux dernières années auraient été très ennuyeuses sans vous et sans nos vendredis soir. Merci d'avoir toujours été là dans les pires moments comme dans les meilleurs. Des remerciements particuliers vont aussi à vos chiens (Zizo, Douby et Sésame) pour les meilleures séances de zoothérapie...

Mes remerciements les plus importants vont à ma famille, mes très chers parents et ma sœur Dounia pour leur soutien et amour inconditionnel. Merci d'avoir toujours cru en moi et m'avoir

poussé à travailler fort et aller plus loin. Ce travail n'aurait jamais pu être réalisé sans vous à mes côtés. Ce mémoire n'est pas seulement le fruit de mon travail, mais le fruit du vôtre également.

Chapitre 1 — Introduction

Le système immunitaire

On regroupe les moyens de défense du corps contre les pathogènes ou le développement des cancers en deux grandes catégories : l'immunité innée et l'immunité adaptative (1). L'immunité innée, présente dès la naissance, assure une protection rapide et non-spécifique contre un large éventail de microorganismes (1). En plus des barrières physiques, l'immunité innée comprend diverses cellules, notamment les cellules tueuses naturelles (Natural Killer cells, NK) et les cellules phagocytaires. Ces dernières reconnaissent des motifs moléculaires associés aux pathogènes (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) via leurs récepteurs (pathogen recognition receptor, PRR) (1, 2). L'immunité adaptative, quant à elle, requiert plus de temps pour se développer, mais mène une réaction spécifique contre le pathogène et forme un mémoire immunologique afin de monter une réponse plus rapide et efficace lors d'une seconde infection (1). Les lymphocytes T et B sont les composants principaux de l'immunité adaptative.

Les cellules dendritiques : lien entre l'immunité innée et adaptative

Les cellules dendritiques (DC) sont une classe de cellules phagocytaires qui jouent un rôle clé dans l'activation de l'immunité adaptative (3). Les DC capturent et détruisent les microorganismes par phagocytose. Toutefois, leur rôle ne se limite pas à simplement éliminer le pathogène, mais de l'ingérer et présenter ces antigènes aux cellules du système immunitaire adaptatif (3). De ce fait, les DC sont considérées les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) les plus efficaces. Les DC peuvent exister sous deux formes fonctionnelles : matures et immatures (4). La reconnaissance des PAMPs par les PRR des DC immatures déclenche leur activation et maturation (5). Celles-ci migrent ensuite dans l'organe lymphoïde le plus proche et présentent les antigènes aux lymphocytes T qui s'y trouvent. Durant leur maturation, les DC perdent leur capacité de phagocytose et augmentent l'expression de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et des ligands de molécules de costimulation, notamment B7-1 et B7-2 (deux

ligands de la molécule de costimulation CD28), ainsi que la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (3, 4). Ce sont tous des changements essentiels pour l'activation des cellules T.

Les lymphocytes T

Les lymphocytes T sont des composants majeurs du système immunitaire adaptatif qui, lors des infections, jouent un rôle primordial dans l'orchestration d'une réponse immunitaire spécifique menant à l'élimination de l'agent pathogène. Ils se développent dans le thymus et expriment à leur surface un récepteur appelé « T-cell receptor TCR ». Selon les chaînes qui composent le TCR, il existe deux groupes des lymphocytes T : ceux exprimant TCR $\gamma\delta$ ou ceux exprimant TCR $\alpha\beta$ (6). Les lymphocytes T TCR $\alpha\beta$ (nommé désormais simplement lymphocytes T) composent la grande majorité des cellules T en circulation et sont générés constamment au cours de la vie. Ce groupe comprend deux populations principales: les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires (T_{aux}) et les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (T_C) (1). Les T_{aux} reconnaissent les antigènes du non-soi associés aux molécules de CMH de classe II, leur fonction constitue à réguler les réponses humorales et cytotoxiques via la production des cytokines (1). Les T_C , quant à eux, sont capables de détruire des cellules cibles portant des antigènes du soi altérés ou du non-soi en association avec une molécule de CMH de classe I (1).

L'activation des lymphocytes T

Lorsque les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ quittent le thymus et entrent dans la circulation, ils sont dits naïfs, car ils n'ont pas encore rencontré leur antigène. Ils patrouillent l'organisme en circulant à travers le sang, la lymphe et les organes lymphoïdes secondaires à la recherche d'une CPA portant leur antigène spécifique dans un contexte de CMH de classe II ou I. L'activation des cellules T requiert deux signaux fournis lors de leur interaction avec une CPA (hypothèse de deux signaux) (7) (Figure 1). Le signal 1 est déclenché par l'engagement du TCR et le signal 2 par l'engagement des molécules de costimulation comme le CD28 (8). Ensemble, les deux signaux mènent à la production de cytokines (souvent considérés comme un troisième signal) qui permettent la prolifération et la différenciation des lymphocytes T.

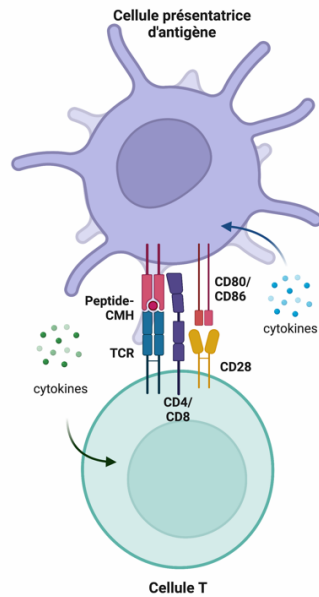


Figure 1. – Activation des cellules T par une CPA : le modèle de deux signaux

Figure créée par BioRender.com.

La signalisation du TCR

Le TCR $\alpha\beta$ joue un rôle essentiel dans la reconnaissance spécifique d'un antigène. Toutefois, le TCR seul ne possède pas de domaines de signalisation. Il est plutôt couplé par des liaisons non covalentes au complexe CD3 formé de 3 dimères de polypeptides invariables : les hétérodimères CD3 $\epsilon\gamma$ et CD3 $\epsilon\delta$ et l'homodimère CD3 $\zeta\zeta$ (9). Ensemble, ceux-ci forment le complexe TCR-CD3 (9). Le signal principal d'activation est fourni lorsque le TCR reconnaît un peptide présenté par une molécule de CMH de classe II ou de classe I sur une CPA. Les corécepteurs CD4 et CD8 se lient aux molécules CMH de classe II et I respectivement via leur domaine extracellulaire alors qu'ils se lient à la tyrosine kinase (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase, Lck) via leur domaine intracellulaire. Ainsi, l'interaction du corécepteur avec le complexe CMH : peptide, qui à son tour se lie au TCR, favoriserait le recrutement de la Lck au TCR engagé, ce qui mène à une phosphorylation plus efficace des (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAMs) dans les queues cytoplasmiques des chaînes CD3 associées aux TCR (10) (Figure 2). Cela fournit un site

de liaison pour la kinase ZAP-70 (*Zeta-chain-associated protein kinase 70*) qui sera activé par Lck. La kinase ZAP-70 activée phosphoryle les protéines d'échafaudage LAT (linker for activated T cells) et SLP-76 (10). LAT et SLP-76 forment ensuite une plateforme de recrutement avec Gads ; ce complexe à trois protéines favorise l'activité métabolique, l'activation de Vav qui induit le remodelage du cytosquelette cellulaire et l'activation de la phospholipase C- γ (PLC- γ) (10). La PLC- γ activée clive son substrat PIP2 en seconds messagers : IP3 et DAG. L'IP3 stimule le relâchement de calcium du réticulum endoplasmique (RE) menant à l'activation du facteur de transcription (nuclear factor of activated T cells, NFAT) (10). Le DAG à son tour stimule la voie de la protéine kinase C — θ (PKC- θ) et la voie de Ras permettant la transcription de facteurs clés dans l'activation, la prolifération, et la différenciation des lymphocytes T (10) (Figure 2).

Molécules de costimulation

Les premières preuves de la nécessité d'un second signal de costimulation pour l'activation optimale des lymphocytes T ont été rapportées en 1987 par Helen Quill et Ron Schwartz (11, 12). Ils ont démontré qu'en absence de CPA, des interactions TCR-CMH fortes aboutissent à un état de non-réponse des cellules T appelé anergie. Dans leur première expérience qui a démontré l'importance de la costimulation, ils ont mis en culture des clones de cellules T restreints au CMH-I-Ek et spécifiques à l'antigène du cytochrome c de pigeon (PCC) avec des CPA fixées qui présentent le PCC. Les CPA fixées perdent leur capacité de stimulation (12). Toutefois, l'ajout des CPA non fixées ayant un CMH différent (H-2d) a permis la stimulation des cellules T, suggérant que le complexe CMH-peptide n'est pas détruit avec la fixation et que les CPA H-2d fournissent un deuxième signal nécessaire à la stimulation. La deuxième expérience consistait à stimuler des cellules T PCC/Ek avec des CPA H-2K fixées pendant 7 jours, ensuite faire une deuxième stimulation avec des CPA H-2K non fixées + PCC. Il n'y a pas de stimulation qui a été observée, indiquant que les cellules T ont acquis un état d'anergie après le premier signal fourni par le complexe CMH-peptide (12). Il est maintenant reconnu que le signal 2 provient de l'interaction entre une molécule de costimulation à la surface des lymphocytes T avec son ligand exprimé par les CPA. Selon si les molécules de costimulation augmentent ou inhibent la signalisation du TCR, elles sont dites des molécules de costimulation positives ou négatives respectivement. Ci-

dessous, les différents aspects de l'expression et fonction des différentes molécules de costimulation seront présentés.

La molécule de costimulation positive CD28

Le CD28 est la molécule de costimulation la plus citée et la première à avoir été identifiée. Il est exprimé par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ humains et murins. À la suite de l'interaction avec l'un de ses ligands CD80 (B7-1) ou CD86 (B7-2) présent sur une CPA professionnelle, le CD28 devient phosphorylé dans sa queue cytoplasmique par Lck (13). Le CD28 phosphorylé joue un rôle d'amplification du signal TCR, mais possède aussi des voies de signalisation spécifique à lui. Il soutient la signalisation du TCR en favorisant le recrutement de PLC- γ (14) et l'activation de la réponse de calcium (15) grâce à sa capacité de remodelage du cytosquelette d'actine (16, 17). Le CD28 peut aussi délivrer des signaux uniques et indépendants du TCR. Par exemple, la signalisation dépendante de la phosphoinositide 3-kinases (PI3K) est connue pour être une voie majeure initiée par le CD28 (18-20). Le PI3K mène à l'activation de NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) qui induit la transcription du facteur de survie Bcl-X_L et de la cytokine interleukine 2 (IL-2) (21). Le CD28 recrute aussi le facteur d'échange de nucléotide guanine Vav via la protéine adaptatrice (Growth factor receptor-bound protein 2, Grb2) (22, 23). Vav initie le réarrangement du cytosquelette et active la voie de *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) (22, 24) (Figure 2).

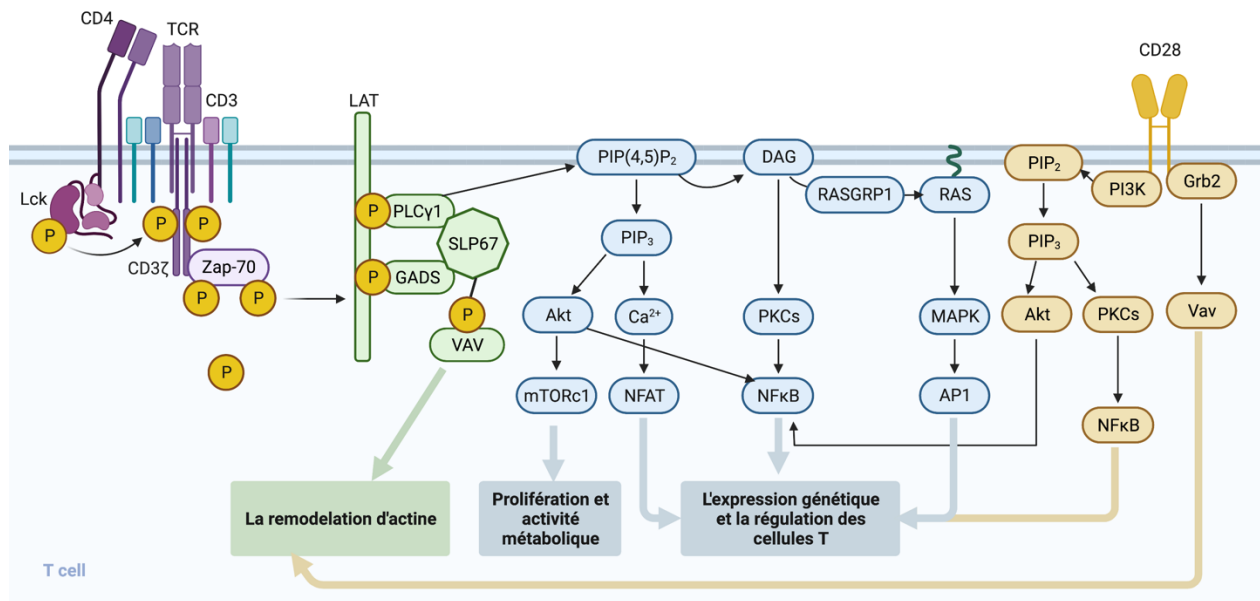


Figure 2. – Les voies de signalisation du TCR et CD28

La transduction du signal est déclenchée par la liaison du TCR à des complexes peptide-CMH exprimés sur les CPA. La kinase LCK se lie aux corécepteur CD4/CD8 et est recrutée au TCR par la co-liaison de CD8 ou CD4 aux CMH. LCK phosphoryle les des chaînes CD3, ce qui permet le recrutement de la ZAP70. ZAP70 phosphoryle LAT conduisant à la formation du signalosome LAT. L'activation des molécules effectrices associées à LAT entraîne la propagation du signal via trois principales voies de signalisation : les voies de signalisation Ca²⁺-calcineurine, protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK) et facteur nucléaire-κB (NF-κB). La signalisation Ca²⁺-calcineurine entraîne la translocation nucléaire du facteur nucléaire des lymphocytes T activés (NFAT) ; la signalisation NF-κB entraîne la translocation nucléaire des facteur de transcription NF-κB ; et la signalisation MAPK entraîne l'activation de la protéine activatrice 1 (AP-1). Les voies typiquement associées à l'activation du CD28 sont la voie (PI3K) et Grb2. La voie PI3K permet l'activation de Akt alors que Grb2 permet le recrutement et activation de Vav. Figure créée par BioRender.com.

Au niveau fonctionnel, le rôle clé de la costimulation CD28 est l'augmentation de la survie, la prolifération des lymphocytes T et de la production des cytokines. En effet, le CD28 augmente l'expression des cyclines D qui permettent la progression dans le cycle cellulaire (25). De plus, durant la transition G0-G1 du cycle cellulaire, le CD28 augmente la biosynthèse des macromolécules et le métabolisme énergétique via l'activation du *mammalian target of rapamycin* (mTOR) (26, 27). La prolifération optimale des cellules T dépend de l'interaction de l'IL2 avec son récepteur (IL2R) (28). Les signaux de CD28 augmentent notamment la transcription de l'IL2 et stabilisent son ARN messenger (ARNm) (29-31). D'autres modifications post-transcriptionnelles régulées par CD28 incluent des changements majeurs dans l'épissage alternatif de multitudes de gènes (32). Le CD28 contrôle aussi l'expression génétique en induisant des modifications épigénétiques, notamment en activant l'enzyme de modification de chromatine Ezh2 nécessaire pour le maintien des cellules T régulatrices (33). En résumé, le CD28 ne se limite pas à l'amplification des signaux TCR, mais induit aussi des changements qualitatifs

uniques durant l'activation des cellules T. D'ailleurs, il faut noter que la costimulation est requise afin d'éviter l'anergie des cellules T. Le nécessité de la costimulation afin d'activer complètement les cellules T diminue la probabilité qu'une cellule T auto-réactive qui aurait quitté le thymus soit activée et engendre une réponse auto-immune dangereuse.

Les molécules de costimulation positives induites par l'activation

Contrairement au CD28 constitutivement exprimé à la surface de la plupart des populations de lymphocytes T, d'autres molécules de costimulation sont induites lors de l'activation et fournissent une seconde vague de costimulation. Parmi celles-ci on retrouve CD40L, OX40, 4-1BB et le costimulateur inductible (ICOS). Homologue au CD28, ICOS active aussi la voie de signalisation PI3K (34), mais contrairement au CD28, il n'induit pas la production de l'IL-2 (35). ICOS régule la production de l'IL-10 (connu pour être un facteur de différenciation des cellules B) (35) et semble jouer un rôle critique dans les réponses humorales T-dépendantes (36). Des membres de la famille des récepteurs de facteur de nécrose tumorale (TNF) (comme CD40L, OX40, 4-1BB) délivrent aussi des signaux de costimulation. Celles-ci semblent toutes fonctionner en activant la voie non canonique de NF κ B via TRAF (*TNF receptor-associated factors*) (37, 38). Les molécules de cette famille induisent des signaux de survie et maintiennent l'activation à des stades plus tardifs de la réponse T (39-42).

Les molécules de costimulation négatives (coinhibitrices)

Bien que la compréhension de leurs fonctions spécifiques soit encore incomplète, les récepteurs d'inhibition (IRs) jouent un rôle important dans 1) le maintien de la tolérance périphérique des cellules T et 2) la réduction de l'inflammation après l'élimination d'un pathogène ou durant une infection chronique. Elles peuvent contrôler la réponse immunitaire par différents mécanismes (43). Premièrement, les IRs peuvent compétitionner pour les ligands des molécules de costimulation positives. Ceci est le cas du CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*) qui compétitionne avec CD28 pour lier ses deux ligands B7-1 et B7-2 (44). Le deuxième mécanisme consiste à atténuer les signaux intracellulaires positifs via le recrutement des phosphatases qui enlèvent le groupe phosphate à une multitude de molécules impliquées dans la cascade de signalisation initiée par TCR ou d'autres molécules de costimulation (45). Par exemple, lorsque le

PD-1 (*Programmed cell death protein 1*) interagit avec son ligand PD-L1, il mène à la déphosphorylation de la queue cytoplasmique de CD28 (46). Enfin, les IRs peuvent activer des gènes reliés à la dysfonction qui inhibent les fonctions immunitaires. Par exemple, la voie de signalisation de PD-1 induit l'expression du facteur de transcription BATF qui est responsable de la réduction de la prolifération et de la sécrétion d'IL-2 (47).

L'expression des IRs est transitoire durant les infections aiguës et ils sont rapidement régulés à la baisse après l'élimination de l'agent infectieux (48, 49). Cependant, leur expression est maintenue dans un contexte d'exposition continue aux antigènes, ce qui est le cas durant les infections chroniques ou cancers. L'expression élevée et persistante des IRs durant les infections chroniques est associée à l'épuisement des cellules T, un état où les cellules perdent graduellement leurs fonctions à force d'être exposées aux antigènes (concept discuté en détails plus tard). PD-1 était parmi les premiers IRs à être impliqué dans l'épuisement des cellules T (48). Notamment, les fonctions des cellules CD8⁺ T épuisées ont été partiellement restaurées après le blocage *in vivo* de la voie PD-1/PD-L durant l'infection chronique par le virus chorioméningite lymphocytaire (LCMV) chez les souris (48).

Ainsi, le modèle des deux signaux proposé originellement pourrait être une « simplification » de ce qui arrive *in vivo*. L'activation des cellules T résulte plutôt d'une combinaison complexe de signaux activateurs et inhibiteurs hautement régulés et qui ne se limitent pas à ceux mentionnés ci-haut. D'ailleurs, l'interaction efficace entre une cellule T et une CPA mène à l'organisation des différentes molécules de signalisation dans une ultrastructure stable appelée synapse immunologique (SI) (50). Le centre du SI est enrichi avec les complexes TCR-CMH et CD28-B7, alors que les molécules d'adhésion convergent en périphérie, ce qui favorise le maintien des signaux générés (50).

La réponse des cellules T lors d'une infection virale

La cinétique de la réponse immunitaire adaptative diffère d'un virus à l'autre, mais globalement, les réponses immunitaires adaptatives se développent quelques jours après l'infection et atteignent leur pic après une à deux semaines (51, 52). Les lymphocytes T passent par trois phases distinctes lors d'une infection virale primaire : Expansion, contraction et maintien

(53). Après l'infection par le virus, une cellule dendritique capture les antigènes viraux et les transporte au ganglion lymphatique où elle présente ces antigènes en association avec le CMH-I ou CMH-II aux cellules T CD8⁺ ou CD4⁺ respectivement. L'activation des cellules dendritiques mène aussi à l'expression des molécules B7 à leur surface, ce qui permet de fournir le deuxième signal de costimulation en interagissant avec CD28. Les cellules T entrent ensuite en **phase d'expansion** où elles prolifèrent et se différencient en cellules effectrices. Cette différenciation implique la perte d'expression des molécules de résidence aux ganglions lymphatiques, soit CCR7 et CD62L, ce qui leur permet de se diriger vers le site d'infection (54). Arrivées au site d'inflammation, les cellules T CD8⁺ reconnaissent les cellules infectées et les tuent en sécrétant des granules contenant des granzymes et perforines. D'autre part, les cellules T CD4⁺ produisent des cytokines qui orchestrent la réponse des autres cellules immunitaires. En fonction des signaux qu'elles auront reçus, les cellules T CD4⁺ naïves peuvent se polariser en sous-populations distinctes de T_{aux} avec des fonctions immunologiques spécifiques (55). Chaque sous-population est caractérisée par son programme transcriptionnel régulé par un facteur de transcription qui contrôle les propriétés fonctionnelles et phénotypiques (55). Le tableau 1.1 résume les facteurs de transcription régulateurs et les fonctions des différentes polarisations. Il faut toutefois noter que les cellules T_{aux} ont une grande plasticité et peuvent avoir des profils qui combinent les fonctions associées à une population ou une autre. Après l'élimination du virus, les lymphocytes T entrent en **phase de contraction**, où 90 à 95 % des clones élargis sont éliminés par apoptose. Les lymphocytes T survivants persistent sous forme de cellules mémoires pendant la **phase de maintenance**. Cette population quiescente à autorégénération rapide est capable d'être rapidement réactivée pour accomplir des fonctions effectrices lors de la reconnaissance du même antigène. Les lymphocytes T mémoires sont traditionnellement divisées en deux sous-populations principales : les lymphocytes T mémoires centraux (T_{CM}) expriment les marqueurs de circulation lymphoïde CCR7 et CD62L, et les lymphocytes T mémoires effecteurs (T_{EM}) qui sont CCR7⁻CD62L⁻, mais expriment des molécules qui favorisent la migration vers les tissus périphériques (56, 57). Certains lymphocytes T mémoires (lymphocytes T mémoires effecteurs différenciés de manière terminale T_{EMRA}) réexpriment le marqueur de surface des lymphocytes T naïfs CD45RA, tout en régulant à la baisse l'expression de CCR7, CD62L et CD28, et représentent un stade terminal de

différenciation des effecteurs (58, 59). Il convient également de noter que 98 % des lymphocytes T ne se trouvent pas dans le sang, mais plutôt dans les tissus ; certains lymphocytes T effecteurs qui migrent vers les tissus y restent en tant que lymphocytes T mémoires résidents tissulaires. Ils constituent la première ligne de défense contre les agents pathogènes envahissant les tissus (60).

Tableau 1. – Les sous-populations des cellules T_{aux}

	Facteurs de transcription	Récepteurs de chimiokines	Cytokines effectrices	Fonctions
Th1	Tbet	CXCR3, CCR5	IL-2, IFN γ	– Protège contre les infections intracellulaires – Favorise l'activation des T _C
Th2	GATA3, STAT5	CCR3	IL-4, IL-5, IL-13	– Protège contre les infections extracellulaires – Impliqué dans les allergies
Th17	ROR γ t	CCR4, CCR6	IL-17, IL-22	– Contribue à l'inflammation – Protège contre certaines infections fongiques et bactériennes
Tfh	Bcl-6	CXCR5	IL-4, IL-21	– Aide aux cellules B
Treg	FoxP3		IL-10	– Immunosuppression et tolérance

Tableau adapté de (61)

Méthodes d'activation des lymphocytes T *ex vivo*

Afin d'étudier les réponses des cellules T et les différentes voies de signalisation, il existe plusieurs méthodes de stimulation *in vitro*. Il est possible d'utiliser des CPA naturelles, mais ceci est associé à plusieurs facteurs confondants. Premièrement, l'utilisation de CPA naturelles implique le chargement d'un antigène sur la molécule de CMH ; ainsi, seulement les cellules T spécifiques à cet antigène seront activées, et la réponse observée sera spécifique à l'antigène. D'autres facteurs confondants incluent la multitude des signaux activateurs et inhibiteurs transmis par la CPA, et les CPA elles-mêmes sujettes à la dysfonction (62, 63). Étant donné l'isolation fastidieuse et

délicate des CPA naturelles (64, 65) et le manque de contrôle sur les signaux qu'elles transmettent, empêchant ainsi l'étude d'un seul récepteur ou ligand, plusieurs systèmes acellulaires d'activation des lymphocytes T ont été développés. Ci-dessous, les méthodes artificielles d'activation des cellules T les plus utilisées sont présentées.

Les superantigènes

Les superantigènes sont des protéines virales ou bactériennes qui se lient aux régions V_{β} spécifiques des TCR et les molécules CMH de classe II présentes sur une CPA, indépendamment de la spécificité antigénique de la cellule T (Figure 3) (66, 67). Un des superantigènes les plus utilisés pour activer les cellules T est l'entérotoxine B staphylococcique (SEB) produite par *Staphylococcus aureus* (68). Malgré sa capacité à induire une forte activation des cellules T, le SEB contourne la signalisation TCR physiologique Lck-dépendante, donc ne reflète pas la signalisation *in vivo* (69).

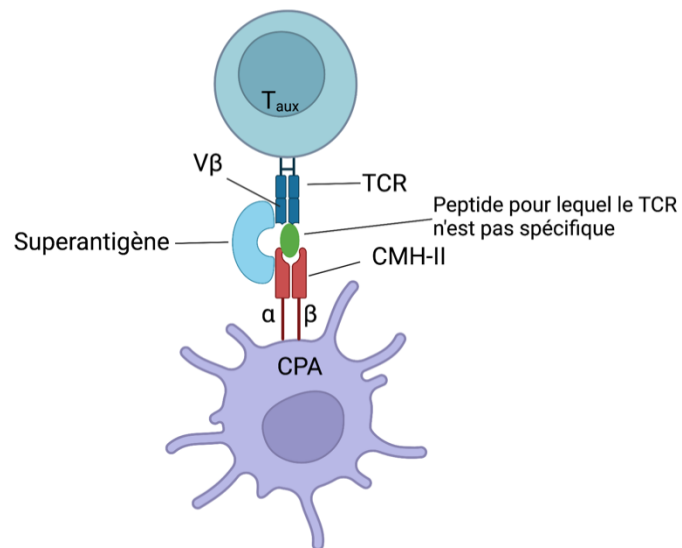


Figure 3. – Mécanisme d'action du superantigène.

Le superantigène se lie à tous les TCR ayant une séquence V_{β} spécifique peu importe leur spécificité pour un antigène donné. Cette figure a été créée par BioRender.com. et adaptée de (70).

Les anticorps agonistes

La signalisation via CD3 (signal 1) et CD28 (signal 2) peut être initiée par des anticorps agonistes anti-CD3 (aCD3) and anti-CD28 (aCD28) respectivement qui fournissent un signal TCR-dépendant, mais non spécifique à un antigène donné. Des agonistes ciblant d'autres molécules de costimulation comme OX40 et 4-1BB existent aussi et sont utilisés dans l'immunothérapie du cancer (71). Différentes plateformes qui utilisent ces agonistes sont présentées ci-dessous.

Les agonistes solubles

Une des méthodes les plus couramment utilisées employant des agonistes est de mettre les anticorps aCD3 et aCD28 en solution avec les cellules T (72, 73). Toutefois, afin que la stimulation avec cette méthode soit plus efficace, au moins un des anticorps doit être réticulé (*crosslinked*). Ceci implique l'immobilisation de l'anticorps aCD3, sur une plaque et d'ajouter le aCD28 en solution (72, 74-76). Il est aussi possible de réticuler les aCD3 et aCD28 solubles avec un anti-IgG polyclonal (77, 78). Bien que cette stimulation soit TCR-dépendante, elle diffère de celle médiée par les CPA naturelles par différents aspects dont la forme, la taille et la présence d'une membrane cytoplasmique permettant l'agglomération des récepteurs à la surface.

Les billes rigides

Le développement des billes sphériques dispersées auxquelles les protéines et anticorps pouvaient être liées de manière non spécifique a marqué le début d'une nouvelle ère dans la technologie des cellules présentatrices d'antigènes artificielles (CPAa) (79). Ces billes sont rendues disponibles commercialement sous forme de billes magnétiques de 5-6µm de diamètre (la taille d'une CPA naturelle) enrobées d'un mélange optimal de aCD3 et aCD28. Elles sont souvent utilisées pour l'expansion des cellules T (80, 81). En plus de mimer la CPA naturelle par la taille et le signal TCR-dépendant, ce système est accessible, facile à utiliser et hautement reproductible.

Les bicouches lipidiques sur des surfaces solides

Bien que les billes magnétiques puissent stimuler les cellules T efficacement, la membrane d'une CPA naturelle est bien plus dynamique que la surface rigide des billes. En fait, l'importance de la mobilité des molécules à la surface des cellules T et CPA lors de l'activation a été reconnue comme un élément essentiel pour une signalisation efficace des TCR (82, 83). Ainsi, l'incorporation des agonistes sur des préparations lipidiques pourrait représenter un moyen pour mieux mimer un système naturel. Des systèmes planaires 2D constitués de bicouches lipidiques déposées sur une surface plane (souvent une lame de verre) ont servi largement à l'élucidation de la structure, fonction et mécanismes de la formation de la SI (84-86). En plus de leur fragilité et courte durée de vie (87), ces systèmes planaires n'imitent pas la forme d'une CPA et ne permettent pas le contrôle des ratios des CPA artificielles par rapport aux cellules. D'autres systèmes 3D qui combinent la fluidité de la membrane et la stabilité des supports solides ont été développés. Ceux-ci comprennent des bicouches lipidiques déposées sur des bases souvent composées d'hydrogel ou de silice (88-92) sous forme sphérique (91, 93) ou non-sphérique tel que des tiges (89, 94). Afin de maximiser l'expansion des cellules T, certains de ces complexes sont chargés avec des cytokines solubles, permettant ainsi la transmission des signaux paracrines aux lymphocytes T (89, 94).

Le domaine de la présentation artificielle des antigènes se développe rapidement et son application dépassant l'étude de la fonctionnalité des cellules T pour s'étendre à des applications en immunothérapie (95, 96). Ainsi, les systèmes présentés ci-haut ne couvrent pas toutes les méthodes développées pour reproduire la présentation antigénique par les CPA naturelles.

L'infection chronique par le VIH

Le virus de l'Immunodéficience humaine (VIH) est l'agent infectieux responsable du syndrome d'Immunodéficience acquise (sida) et demeure une préoccupation mondiale en raison du manque de vaccins efficaces et de stratégies curatives. On estimait à 39,0 millions [33,1 à 45,7 millions] le nombre de personnes vivant avec le VIH en 2022, dont environ 66% dans la région africaine de l'organisation mondiale de santé (97). Les traitements antirétroviraux (ART)

disponibles actuellement augmentent grandement l'espérance de vie des personnes atteintes du VIH (98), mais ne permettent toujours pas l'éradication du virus, et donc la guérison (99).

Le virus

Le VIH est un lentivirus appartenant à la famille des Retroviridae. Il existe deux principales souches ou types de VIH : le VIH-1 et le VIH-2. Le VIH-1, plus répandu et pathogène que le VIH-2, est responsable de la grande majorité de la pandémie mondiale. Dans le présent travail, nous traitons le VIH-1.

Le cycle de réplication

Le VIH est un rétrovirus et est donc capable d'intégrer son ADN dans le génome de l'hôte ; ce qui rend le virus extrêmement difficile à éradiquer avec les traitements actuels. Le virus se lie à son récepteur CD4 exprimé principalement à la surface des T_{aux}, monocytes et macrophages (100). Cependant, cette interaction seule n'est pas suffisante pour permettre l'entrée virale. L'attachement aux corécepteurs CCR5 ou CXCR4 selon le tropisme est aussi requis. Une fois à l'intérieur de la cellule, le génome ARN du virus est libéré et transcrit en ADN par la transcriptase inverse, une copie de cet ADN s'intègre ensuite dans le génome de l'hôte (100). Le provirus intégré est transcrit, et les divers ARN messagers viraux sont épissés et traduits en protéines qui, avec une nouvelle copie complète du génome ARN, sont utilisées pour former de nouvelles particules virales (Figure 4) (100). Cependant, le VIH-1 peut également devenir latent, ou rester non exprimé, pendant de longues périodes dans une fraction des cellules infectées. Chaque étape du cycle de vie du virus constitue une cible pour les traitements antiviraux. Ceci inclut des inhibiteurs de l'attachement et fusion de la particule virale avec la cellule, des inhibiteurs de la transcriptase inverse, de l'intégrase et de la protéase virales (100).

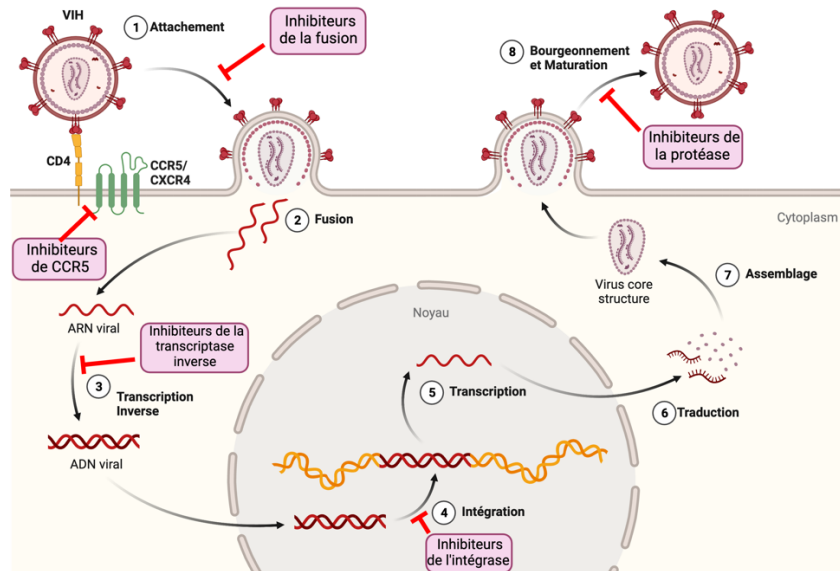


Figure 4. – Cycle de réplication du VIH.

Les glycoprotéines de la particule virale interagissent avec leur récepteur CD4 et corécepteur (CCR5 ou CXCR4) (étape 1) permettant la fusion des membranes virales et cellulaires (étape 2). L'ARN viral est ensuite libéré dans le cytoplasme et transcrit en ADN viral (étape 3), qui s'intègre ensuite dans l'ADN de l'hôte (étape 4). En utilisant les enzymes de l'hôte, les gènes viraux sont transcrits (étape 5), et les ARNm sont traduits en protéines (étape 6). Les composants viraux s'assemblent pour former la particule virale (étape 7) qui bourgeonne à la surface de la cellule (étape 8). Les traitements antirétroviraux ciblant les différentes étapes du cycle virale sont indiqués dans les carrés rouges. Figure adaptée de (100) et créée par BioRender.com.

Les réservoirs

Comme mentionné ci-haut, l'ADN viral intégré (provirus) peut entrer dans une phase de silence transcriptionnelle appelée latence. Les antigènes du VIH ne sont pas exprimés dans les cellules infectées latentes, donc ces cellules peuvent échapper au système immunitaire et persister pendant des années. L'ensemble des cellules infectées latentes forme ce que l'on appelle le réservoir du HIV. Ce réservoir est maintenu par la prolifération homéostatique, la survie des cellules T et la réplication virale résiduelle qui peut mener à l'infection de novo des cellules T mémoires CD4⁺ (101, 102). Les antirétroviraux peuvent empêcher l'infection de nouvelles cellules, mais ne peuvent pas éliminer le virus une fois que son ADN est intégré dans le génome

de la cellule hôte. Ainsi, la taille du réservoir est très stable durant ART (103), mais la suspension de la thérapie est suivie d'un rebondissement rapide de la charge virale à des niveaux élevés, similaires à ceux avant le traitement (104).

La pathogenèse

L'évolution de l'infection par le VIH chez l'adulte peut être divisée en trois phases cliniques : la phase aiguë, la phase chronique et la phase du sida (Figure 5).

La phase aiguë

Le VIH peut se transmettre par l'échange des liquides corporels provenant de personnes vivant avec le VIH comme le sang, le lait maternel, le sperme et les sécrétions vaginales. L'infection débute la plupart du temps par un virus ayant un tropisme pour le corécepteur CCR5. Le virus infecte premièrement les cellules cibles CD4⁺ dans les tissus du site d'infection (souvent les muqueuses). Les cellules infectées transmettent ensuite le VIH vers les tissus lymphoïdes menant la dissémination systémique du virus. Durant cette période appelée phase d'éclipse et qui dure environ 10 jours, l'ARN viral reste indétectable dans le plasma (105). C'est dans cette phase aussi que les premiers réservoirs sont établis (106). Après la phase d'éclipse, la réplication du VIH augmente rapidement et entraîne une augmentation de la charge virale accompagnée par une chute des cellules CD4⁺. Les cellules T mémoires activées CD4⁺ CCR5⁺ enrichies dans le tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT) sont particulièrement déplétées durant la phase aiguë (107). La virémie continue à augmenter pour atteindre un pic de plusieurs millions de copies ARN/mL 21-28 jours après l'infection. À ce moment, 30-60% des cellules T CD4⁺ mémoires sont infectées et la majorité de ces cellules sont mortes dans les jours qui suivent par l'effet cytopathique de la réplication du virus ou par apoptose (108, 109). Le système immunitaire monte une réponse cytotoxique qui va partiellement contrôler la virémie et restaurer les comptes des cellules T CD4 (110, 111).

La phase chronique

Cette phase est asymptomatique et peut durer de 3 à 15 ans selon le développement de la maladie (112). Cette période se caractérise par une charge virale relativement stable dû à l'équilibre entre la réplication virale et la réponse immunitaire. La charge virale à ce stade corrèle avec l'évolution clinique de la maladie : les gens ayant des charges virales élevées progressent plus rapidement vers le sida que ceux avec des charges plus faibles (113). Toutefois, une déplétion graduelle des cellules CD4+ continue de se produire jusqu'à moins de 350 cellules/uL, ce qui mène à une immunodéficience progressive pendant les années de la maladie.

Sida

La phase finale du VIH est le stade du sida. Durant cette phase, le compte des lymphocytes T tombe au-dessous de 200 cellules/uL. Ce nombre est normalement associé à une baisse importante de l'efficacité du système immunitaire et donc au développement des infections opportunistes. Celles-ci peuvent inclure les infections par *Candida albicans*, le cytomégalovirus, la tuberculose et la toxoplasmose cérébrale (114-117). Il faut noter qu'une minorité des gens infectés par le VIH "elite controleurs (EC)" parviennent à supprimer leur charge virale à des niveaux indétectables tout en maintenant des taux élevés de lymphocytes T CD4 et ce, en absence de traitement antirétroviral (118).

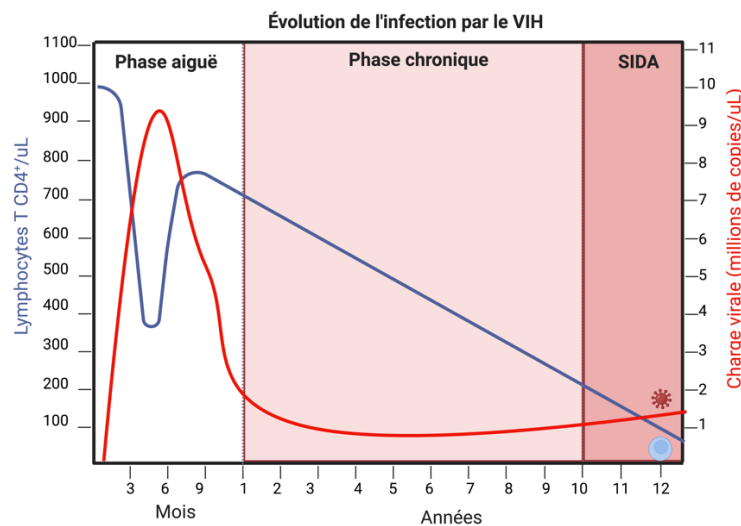


Figure 5. – L'évolution de l'infection par le VIH.

Figure créée par BioRender.com.

La réponse immunitaire contre le VIH

La réponse innée

Le système immunitaire inné est activé lorsque les PAMPs du VIH sont reconnus par des PRR, incluant des TLRs et des récepteurs de type RIG-I-like (RLRs) (119). Cela mène à la production des facteurs cellulaires et solubles, y compris les interférons de type I et de type III (IFN), ainsi que des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines qui recrutent et activent les cellules immunitaires innées, telles que les macrophages, les cellules NK et les cellules dendritiques (119). La signalisation via les PRR induit aussi l'activation des gènes de restriction antiviraux tels que POBEC3, TRIM5a, SAMHD1 et tetherine qui peuvent inhiber différentes étapes du cycle viral du HIV (119). Ensemble, ces mécanismes permettent de contrôler la propagation du virus et moduler la réponse immunitaire adaptative. Malgré son effet bénéfique, une réponse pro inflammatoire soutenue pendant l'infection chronique par le VIH peut avoir des effets néfastes sur les réponses immunitaires innées et adaptatives. Par exemple, des niveaux élevés d'interférons de type I peuvent entraver le développement des cellules dendritiques, limiter la prolifération des cellules T CD4⁺ et favoriser l'apoptose des cellules T CD4⁺ non infectées (120).

La réponse adaptative des lymphocytes T spécifiques au VIH

La réponse des cellules T exerce un certain niveau de contrôle viral durant l'infection par le VIH. Ceci explique notamment la forte diminution de la charge virale après le pic de l'infection aiguë. En effet, la déplétion des cellules T CD4⁺ (121) ou des cellules T CD8⁺ (122) avant l'infection primaire par le virus d'immunodéficience simienne (VIS) abolit la diminution post-pic de la charge virale chez les primates non humains. Durant la phase aiguë, une fraction des lymphocytes T CD4⁺ activés peut produire des cytokines inflammatoires, dont l'IFN- γ et IL-2 (123, 124). Toutefois, l'activation des lymphocytes T CD4⁺ combinée à l'expression de CCR5 les rend plus susceptibles à l'infection par le VIH et seront donc déplétés plus tard au cours de l'infection (123, 125).

Les cellules T CD8⁺ sont aussi essentielles pour contrôler la réplication virale et éliminer les cellules infectées par le virus. Leur capacité à contrôler la virémie est médiée par la sécrétion de facteurs solubles (CAF, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES) ainsi que par la libération de perforine et des granzymes A et B, qui favorisent la lyse directe des cellules infectées (126-128). Des niveaux plus élevés de cytotoxicité, prolifération et polyfonctionnalité des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VIH sont associés à une progression plus lente de la maladie (129).

L'activation immunitaire chronique

L'activation immunitaire chronique et systémique est une caractéristique de l'infection par le VIH-1 et joue un rôle important dans la progression de la maladie (130). Cette activation se manifeste par des niveaux élevés des marqueurs d'activation (HLA-DR, CD38) et prolifération (Ki-67) sur les cellules T CD4⁺ and CD8⁺ ainsi (131-134).

Les causes de l'hyperactivation chronique

Bien que la contribution directe de la réplication du VIH à l'activation immunitaire chronique soit bien reconnue, ceci n'est pas suffisant pour induire des niveaux pathologiques d'activation immunitaire. Premièrement, la fréquence de cellules activées dépasse celle des cellules infectées par le VIH ou spécifiques au VIH (135, 136). Des études ont montré que le degré d'hyperactivation pourrait même constituer un meilleur indice de progression de la maladie que la charge virale (137-139). En plus, les marqueurs d'activation immunitaire restent élevés malgré les niveaux indétectables de la charge virale suite aux traitements antirétroviraux (140, 141). Ainsi, les causes de l'inflammation chronique et de l'activation immunitaire sont probablement multifactorielles par nature, impliquant à la fois des stimuli directs et indirects. Ci-dessous une liste non exhaustive des mécanismes qui causent l'activation chronique.

La réplication du VIH et les protéines virales

La cause la plus évidente de l'activation immunitaire est la stimulation antigénique directe par le virus et ses produits, tels que Nef et gp120, qui stimulent les lymphocytes et macrophages entraînant la sécrétion des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (142-146). Certaines

protéines du VIH ciblent la signalisation du récepteur du TNF, provoquant une réplication persistante du VIH dans les cellules infectées et l'apoptose des lymphocytes T non infectés environnants (147).

Les coinfections

Les virus latents, tels que le cytomégalovirus (CMV) et le virus Epstein-Barr (EBV), se réactivent plus fréquemment pendant l'infection par le VIH-1 en raison de la déplétion des cellules T CD4⁺ qui contrôlent la réplication virale (135, 148). Cette réactivation contribue à la stimulation continue du système immunitaire. Chez les patients sous ART avec suppression virologique soutenue, la réponse immunitaire induite par le CMV est associée à une activation immunitaire chronique et la virémie de CMV prédit une augmentation de la mortalité (149, 150). De plus, des études ont démontré que le médicament antiviral contre le CMV, le valganciclovir, réduit le niveau des cellules T CD8⁺ activées chez des sous ART (151). D'autres virus tels que les virus de l'hépatite B ou C (VHB ou VHC) peuvent également contribuer à l'activation immunitaire. En fait, plusieurs études ont montré que les patients co-infectés par le VIH/VHC ou le VIH/VHB présentent des niveaux plus élevés d'inflammation plasmatique que les patients mono-infectés par le VIH-1, et ces marqueurs corrélaient positivement avec les indices de lésions hépatiques (152-154).

La translocation microbienne

La translocation intestinale des micro-organismes est définie comme le passage de la microflore gastro-intestinale à travers la barrière épithéliale intestinale vers la circulation systémique. Chez des individus non infectés, les produits microbiens qui se transloquent sont phagocytés au sein de la lamina propria et des ganglions lymphatiques mésentériques (155). Cependant, le système immunitaire muqueux dysfonctionnel pendant l'infection par le VIH et le VIS ne parvient pas à empêcher la translocation microbienne systémique. La déplétion préférentielle des cellules T Th17 exprimant le CCR6 et le corécepteur du VIH CCR5 dans le tractus gastro-intestinal participe grandement à la translocation bactérienne. Les Th17 favorisent le recrutement des neutrophiles

et produisent des peptides antimicrobiens pour contrôler les bactéries extracellulaires. En plus de l'IL17, les Th17 produisent aussi l'IL-22 qui promeut la régénération de l'épithélium. En outre, les protéines du VIH et l'environnement inflammatoire induisent l'apoptose des entérocytes et la perturbation des jonctions serrées entre les cellules, ce qui augmente la perméabilité de l'épithélium intestinal (156-158). Les produits microbiens transloqués peuvent inclure le peptidoglycane (159), les liposaccharides (LPS) (160), la flagelline (161), et l'ADN ribosomal 16S (162). En stimulant les récepteurs TLR, ces produits mènent à la production des cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-1 β , IL-6, TNF- α , et les interférons de type I (163-165). Il faut noter que la translocation microbienne se produit lors de l'infection par le VIH-1 et le VIS pathogène, mais pas lors de l'infection par le VIS chez les hôtes naturels (160). Ceci suggère que la translocation microbienne peut jouer un rôle dans l'infection virale et la progression de la maladie. D'ailleurs, l'administration intraveineuse de LPS chez les espèces hôtes naturelles infectées par le VIS induit une activation immunitaire systémique, augmente la réplication du VIS et accélère la déplétion des cellules T CD4+ (166). Il est important de noter que les traitements n'entraînent pas une normalisation de l'état inflammatoire et de ses effets chez tous les GIV (167). Par conséquent, l'activation immunitaire chronique est généralement associée à un mauvais pronostic pour les personnes infectées par le VIH.

Le paradoxe de la déficience immunitaire et l'hyperactivation

L'activation immunitaire, qui indique généralement la mise en place d'une réponse antivirale, peut être considérée comme une observation normale et positive dans le cas d'une infection par un pathogène. Cependant, dans le cas des infections chroniques comme le VIH, l'activation soutenue des cellules a plutôt un effet néfaste sur le système immunitaire et est prédictive d'un pronostic défavorable pour les patients infectés.

La dysfonction des lymphocytes T spécifiques au VIH

À force d'être exposés aux antigènes du VIH, les lymphocytes T CD4+ et CD8+ perdent l'efficacité de leurs réponses, et entrent progressivement dans un état de dysfonction appelé épuisement cellulaire. Les cellules épuisées se caractérisent par une perte graduelle de leurs fonctions et

l'expression élevée des IRs. Dans le cas des lymphocytes T CD8⁺, la perte hiérarchique des fonctions commence par une diminution de la sécrétion de l'IL-2, la polyfonctionnalité et la capacité de prolifération. Il en suit une réduction dans les fonctions cytotoxiques ainsi que la sécrétion de TNF α , suivi par un défaut dans la production de l'IFN γ (168, 169). Ces cellules épuisées garderaient quand même des fonctions résiduelles qui leur permettent de partiellement contrôler la virémie. La déplétion des lymphocytes T CD8⁺ durant l'infection chronique par le SIV est associée avec une exacerbation de la charge virale et du développement du sida (170). En plus des altérations fonctionnelles, l'épuisement des cellules T CD8⁺ est associé à des changements épigénétiques. Notamment, l'infection chronique par le VIH favorise la déméthylation du locus codant pour le PD-1 dans les cellules T CD8⁺ épuisées spécifiques au virus (171). Cette déméthylation persiste malgré les traitements antiviraux. Des résultats similaires étaient aussi obtenus avec le modèle murin d'infection chronique par le LCMV (172).

Les lymphocytes T CD4⁺ montrent aussi des signes d'épuisement cellulaire. Cela inclut une réduction dans la prolifération et la production d'IL2 et TNF α (173-176). Toutefois, la dysfonction des cellules T CD4⁺ est plus complexe qu'une simple perte de fonctions. Plusieurs modèles d'infections chroniques, incluant le VIH, suggèrent que la perte des fonctions antivirales associées à la polarisation Th1 serait accompagnée par un *changement* de polarisation des cellules T CD4⁺ spécifiques au virus vers un phénotype d'aide aux cellules B, soit les cellules T folliculaires (Tfh) (177-179). En plus, notre groupe a récemment démontré que les réponses des cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH dans le sang des GIV présentent également une différenciation préférentielle vers une signature de cellules Tfh (180). Cette signature n'était pas restreinte aux cellules CXCR5⁺ (un marqueur utilisé pour définir la population de Tfh), mais des cellules CXCR5⁻ présentaient aussi un profil Tfh caractérisé par la production de CXCL13 et IL-21 (180).

Comme mentionné, l'expression exacerbée des IRs est une caractéristique des cellules T épuisées spécifiques au VIH. Parmi ces récepteurs, PD-1 est considéré d'être le marqueur principal d'épuisement qui corrèle avec le développement de la maladie. Des études ont démontré que l'expression de PD-1 corrélait avec la déficience fonctionnelle des cellules T, la charge virale et la baisse dans le compte des cellules T CD4⁺ (181-184). Alors que l'expression de PD-1 est commune aux cellules T CD4⁺ et CD8⁺, l'expression de CTLA-4 est plus spécifique aux cellules T CD4⁺ et

corrèle aussi avec la progression de l'infection (173). D'autres IRs comme le 2B4 et CD160 sont plus caractéristiques de l'épuisement de cellules T CD8⁺ (185).

La dysfonction globale du système immunitaire

Les conséquences de l'activation immunitaire durant l'infection par le VIH peuvent aller bien au-delà de la simple perte/dysfonction des cellules T spécifiques au virus, mais s'étendent à un état global de dysfonction immunitaire. D'ailleurs, l'activation immunitaire générale lors de l'infection précoce provoque une augmentation exacerbée du taux de prolifération des cellules T effectrices qui vont rapidement mourir après par AICD (*activation-induced cell death*) (186).

Des signes de dysfonction sont également observés dans la population totale des cellules T. Par exemple, les cellules T des GIV ont démontré une capacité réduite de prolifération en répondant à différents stimuli tels que les allo antigènes HLA (187), le mitogène PHA (187), et des anticorps agonistes aCD3 et aCD28 (188-190). En plus, plusieurs études ont démontré des changements dans le profil cytokinique des cellules T et les ont associés à la progression de la maladie (191-193). Notamment, la déficience de production de l'IL-2 était un des premiers défauts immunitaires à être reporté chez les GIV (194-197). D'autre part, des résultats contradictoires indiquant une augmentation (198) ou une diminution (192) de la production d'IFN γ ont également été observés (199).

Développement de maladies non associées au sida

Depuis l'introduction d'ART, la mortalité chez les personnes séropositives au VIH a considérablement diminué et les modèles suggèrent que l'espérance de vie de celles diagnostiquées peu de temps après l'infection et ayant débuté un traitement approche celle de la population générale (200). La diminution des décès par le sida et le vieillissement dans la cohorte ont fait des comorbidités non liées au sida les principales causes de décès chez les personnes vivant avec le VIH, en particulier parmi les individus sous ART (201, 202). L'infection par le VIH accélère le développement de comorbidités liées à l'âge, avec des recherches montrant que la présence de deux conditions ou plus, telles que le diabète, l'hypertension, les maladies

cardiovasculaires, les maladies rénales et les fractures osseuses, peut survenir environ une décennie plus tôt chez les personnes vivant avec le VIH par rapport aux individus sans le VIH (203). Ces comorbidités peuvent être prédites par plusieurs biomarqueurs d'inflammation et de coagulation, mettant en évidence le rôle critique de l'inflammation chronique malgré le traitement antirétroviral (204-206). D'ailleurs, des comptes plus élevés de lymphocytes T CD4⁺ au moment de l'initiation d'ART sont associés à une plus grande reconstitution immunitaire et à une prévalence moindre d'événements indésirables non liés au sida (207-209). Malgré que le début précoce d'ART (dans les premières semaines suivant l'infection) normalise les biomarqueurs de la coagulation aux niveaux observés chez les témoins non infectés, cela ne parvient pas à normaliser les marqueurs de l'activation des monocytes et la dysfonction endothéliale (210). Ainsi, alors que ART diminue significativement le développement de sida, l'inflammation persistante non éradiquée demeure l'un des problèmes critiques du VIH.

Chapitre 2 — Hypothèses et objectifs

L'activation des cellules T est une étape cruciale de la réponse immunitaire contre un pathogène. En réponse à un antigène spécifique et une combinaison complexe des signaux délivrés par les CPA, les cellules T vont adopter un profil transcriptionnel et fonctionnel distinct, leur permettant de monter une réponse immunitaire efficace. Toutefois, la contribution de chaque signal dans la détermination de ce profil ou état est encore peu connue. La costimulation par CD28 est notamment parmi les signaux les plus importants que les cellules T reçoivent durant leur activation. Le rôle de CD28 ne se limite pas à l'amplification du TCR, mais s'étend sur des changements transcriptionnels et épigénétiques (32, 33, 211). D'autres études ont aussi montré l'influence de CD28 sur les fonctions effectrices des cellules T, mais elles étaient effectuées principalement chez les souris (212-216) ou dans des lignées cellulaires (14, 211). Les effets quantitatifs et qualitatifs du CD28 dans des cellules T primaires chez l'humain sont encore peu étudiés. Les fonctions versatiles et complexes de CD28 suggèrent sa contribution à façonner les réponses des cellules T. Ainsi notre **première hypothèse** stipulait que la dépendance à la molécule de costimulation CD28 définit les fonctions effectrices. Le CD28 causerait des altérations à la fois qualitatives et quantitatives de l'expression des cytokines.

L'infection chronique par le VIH se caractérise par une activation systémique persistante. Cette activation mène à un état de dysfonction des cellules T qui ne se limite pas aux cellules T spécifiques au VIH, mais s'étend sur la population totale des cellules T. On ignore toutefois si la dysfonction globale est liée à la stimulation du TCR et CD28. Notre **deuxième hypothèse** stipulait que la costimulation par CD28 module le profil des fonctions effectrices des cellules T chez les gens chroniquement infectés par le VIH, et que ce profil sera différent de celui observé chez les gens non infectés.

La vérification de ces deux hypothèses requiert une activation à la fois générique et médiée par le TCR. Pour ce faire, nous avons développé un système de CPA artificielles (CPAa) constitué des billes de silice enrobées d'une bicouche lipidique et sur laquelle des anticorps anti-

CD3 et anti-CD28 peuvent se déplacer, permettant l'étude mécanistique des fonctions des cellules T.

Objectifs :

- 1- Développer et valider le système de CPAa
- 2- Évaluer comment la costimulation par CD28 module le profil fonctionnel des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ chez les gens non infectés (GNI) :
 - a. Comparer le besoin relatif de CD28 entre chaque cytokine testé (IL-2, IFN γ , TNF α , CD107a, IL17a)
 - b. Comparer le besoin relatif de CD28 entre les cellules T naïves et différentes populations mémoires
 - c. Évaluer l'effet de la stimulation par CD28 sur l'expression des molécules induites de costimulation (CD40L, OX40, 4-1BB, ICOS)
- 3- Comparer le profil des cytokines des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ après l'activation du TCR et CD28 chez des gens infectés par le VIH (GIV) à celui des gens non infectés (GNI).
- 4- Évaluer comment les traitements antirétroviraux influence le profil des cytokines des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ par rapport aux gens infectés par le VIH non traités.

Chapitre 3 — Article: An artificial antigen- presenting cell system reveals CD28 co-stimulation's role in modulating T cell effector functions during HIV infection

Statut : cet article est soumis dans le journal de *iScience*

Contribution des auteurs :

Conceptualisation et design de l'étude : T.S.K, M.D. et D.E.K

Optimisation du système de CPAa : K.P., E.A. et T.S.K

Expériences de collecte de données : T.S.K

Analyse des données : T.S.K

Analyses non supervisées : A.L., M.D. et T.S.K

Interprétation des données : T.S., M.D., D.E.K et N.S.

Rédaction du premier brouillon d'article : T.S.K, M.D. et D.E.K.

Révision d'article : M.D., D.E.K et N.S.

Supervision : M.D., D.E.K. et N.S.

Auteurs: Tayma Shaaban Kabakibo^{1,2}, Edwige Arnold^{1,2}, Kartika Padhan¹, Aurée Lemieux^{1,2},

Gloria Gabrielle Ortega-Delgado¹, Jean-Pierre Routy^{5,6}, Naglaa Shoukry^{1,2,3}, Mathieu Dubé¹,

Daniel E. Kaufmann^{1,2,3,4}

Affiliations :

¹ Research Centre of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM)

² Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

³ Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, QC H2X 0A9, Canada

⁴ Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, University Hospital of Lausanne and University of Lausanne, Lausanne, Switzerland

⁵ Chronic Viral Illnesses Service and Division of Hematology, McGill University Health Centre, Montreal, QC H4A 3J1, Canada

⁶ Infectious Diseases and Immunity in Global Health Program, Research Institute, McGill University Health Centre, Montreal, QC, Canada

An artificial antigen- presenting cell system reveals CD28 co-stimulation's role in modulating T cell effector functions during HIV infection

Tayma Shaaban Kabakibo^{1,2,3}, Edwige Arnold^{1,2}, Kartika Padhan^{1,8}, Aurée Lemieux^{1,2,3},

Gloria Gabrielle Ortega-Delgado¹, Jean-Pierre Routy^{5,6}, Naglaa Shoukry^{1,2,4}, Mathieu Dubé^{1#},

Daniel E. Kaufmann^{1,2, 4,7#}

¹ Research Centre of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM)

² Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

³ Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, QC H2X 0A9, Canada

⁴ Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC H2X 0A9, Canada

⁵ Chronic Viral Illnesses Service and Division of Hematology, McGill University Health Centre, Montreal, QC H4A 3J1, Canada

⁶ Infectious Diseases and Immunity in Global Health Program, Research Institute, McGill University Health Centre, Montreal, QC, Canada

⁷ Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Lausanne University Hospital (CHUV) and University of Lausanne, Lausanne, Switzerland

⁸ Current address: Center for Advanced Tissue Imaging, National Institute of Allergy and Infectious Disease, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

Corresponding authors' e-mails:

mathieu.dube.chum@ssss.gouv.qc.ca and daniel.kaufmann@chuv.ch

SUMMARY

T-cell immune dysfunction is a prominent feature of chronic HIV infection. To evaluate non-specific dysfunction, a method involving both generic activation and T cell receptor (TCR) stimulation is necessary. We created a tunable artificial antigen-presenting cell (aAPC) system. This system consists of lipid bilayers on cytometry-compatible silica microbeads (5 μm). When only anti-CD3 is incorporated, T-cell activation is limited. Introducing anti-CD28 agonists significantly elevate cytokine expression and upregulation of activation-induced markers. CD28 co-stimulation modulates the response profile, preferentially promoting IL-2 expression relative to other cytokines.

aAPCs-stimulated CD4⁺ and CD8⁺ T cells from untreated HIV-infected individuals exhibit altered effector functions and diminished CD28 dependence. These functions are skewed towards TNF α , IFN γ and CD107a, with reduced IL-2. Antiretroviral therapy partially normalizes this distorted profile in CD4⁺ T cells, but not in CD8⁺ T cells. Our findings show T-cell intrinsic biases that may contribute to persistent systemic T-cell dysfunction associated with HIV pathogenesis.

INTRODUCTION

Optimal T cell activation requires two signals delivered during the interaction between T cells and antigen-presenting cells (APCs). Signal 1 occurs when the T cell receptor (TCR) binds to its cognate antigen presented on a major histocompatibility complex (MHC) class I or class II molecule. Signal 2 is provided by co-stimulatory molecules on T cells, which are engaged by their APC-expressed ligands.^{1,2} The CD28-B7 axis is the most extensively studied co-stimulatory pathway (reviewed in ^{3,4}). The combined effects of signals 1 and 2 activate transcriptional factors governing various “differentiation programs”, each defining a set of functions, such as T cell proliferation and survival, cytokine production, or differentiation.⁵⁻⁸ It is now evident that the role of CD28 extends beyond enhancing TCR signaling, as it induces distinct transcriptional and epigenetic changes.⁹⁻¹¹

Systemic chronic activation is a hallmark of progressive HIV infection.^{12,13} Prolonged exposure to HIV peptides leads to dysregulation of HIV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells, altering T cell polarization and effector functions.¹⁴⁻²² These dysfunctional responses fail to completely control viral replication.^{22,23} T cell exhaustion is associated with persisting expression of immune checkpoint inhibitory receptors (IR), which exert negative feedback control on the TCR signal.²³⁻²⁵ Modulation of CD28 activity plays a pivotal role in this negative feedback loop, as PD-1-associated SHP-2 preferentially dephosphorylates the cytosolic domain of CD28.²⁶ A broader state of T cell dysfunction also exists in non-HIV-specific cells, attributed to systemic activation,^{27,28} co-infection by other pathogens,²⁹⁻³¹ and microbial translocation caused by compromised mucosal barrier integrity.³² This

generic dysfunction may contribute to co-morbidities and reduced life expectancy in people with HIV (PWH).³³ It remains uncertain whether this overall dysfunction is associated with modified responsiveness to TCR and CD28 stimulation.

Stimulation with cognate antigenic peptides loaded onto natural APCs is commonly used to study TCR-mediated T cell functions. This approach provides insights into T cells sharing a defined specificity, but it does not provide information about the overall state of T cells. Furthermore, as natural APCs express an array of other co-stimulatory and inhibitory receptors, simplified model systems are needed to accurately analyze TCR- and CD28-mediated activation. Agonistic anti-CD3 (aCD3) and anti-CD28 (aCD28) antibodies are commonly used to non-selectively activate purified T cells, mimicking TCR and co-stimulation signals, respectively. Commercially available activation systems include crosslinked soluble aCD3 and aCD28 or immobilization of at least one of the antibodies on either plate-, planar-, or bead-based solid supports.³⁴⁻³⁹ Previous studies indicated that having cell-sized constructs (4.5-5 μm)^{40,41} and a fluid surface allowing dynamic rearrangement of T cell ligands on the artificial APC (aAPC)^{42,43} leads to enhanced T cell activation. Current embedded agonists on supported lipid membranes were effective for expanding T cells, but required days of stimulation, which complicates phenotyping.⁴⁴⁻⁴⁸

In this study, we developed a customizable artificial antigen-presenting cells (aAPCs) system composed of a fluid lipid bilayer coated onto cytometry-compatible silica microbeads (5 μm) and embedded with agonistic antibodies directed against CD3 and CD28. This system enables optimal T cell activation within 15 hours. We employed these aAPCs to elucidate the role of CD28 co-stimulation in shaping the CD4⁺ and CD8⁺ T cell

effector functional profile in uninfected donors. We investigated how this profile changes in PWH, both before and after antiretroviral treatment (ART).

RESULTS

Artificial antigen-presenting cells (aAPCs) induce robust cytokine production in CD4⁺ and CD8⁺ T cells. We developed a T cell activation system consisting of silica beads coated with a membrane bilayer to mimic the physiological TCR-mediated T cell activation. This design imitates key features of natural APCs including a similar size (5 μ m diameter), a tridimensional structure, and a fluid lipid bilayer that facilitates the clustering of activating ligands. The preparation of aAPCs (Figure 1A) involved generating unilamellar liposomes containing biotin acceptor sites through thin film hydration. Subsequently, bilayered liposomes were formed by extrusion and used to coat the silica beads. Biotin-conjugated anti-CD3 and/or anti-CD28 agonistic antibodies were added via streptavidin-biotin ligation.

We assessed the potency of aAPCs in stimulating CD4⁺ and CD8⁺ T cells isolated from PBMCs of uninfected donors (UD, Table S1). Following purification, T cells were stimulated for 15h with aAPCs coated with aCD3 and aCD28 antibodies at a 4:1 bead-to-cell ratio. Subsequently, an intracellular cytokine staining assay (ICS) was conducted to detect IL-2, IFN γ , TNF α , as well as less readily detectable molecules such as CD107a and IL-17A. The aAPCs were co-analyzed alongside the T cells (Figure S1A). The successful coating with aCD3 and aCD28 antibodies was verified through anti-IgG

staining (Figure S1B). Upon stimulation with aAPCs, a considerable upregulation of cytokines was observed in both CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Figure 1B). IL-17A was not detectable in CD8⁺ T cells and was consequently excluded from subsequent analyses (Figure 1B). The extent of activation achieved through aAPCs was close to the level attained through the superantigen staphylococcal enterotoxin B (SEB) (Figure S1C). However, SEB-mediated activation necessitated the presence of PBMCs to adequately cross-link MHC-II and TCR molecules, in contrast to aAPC-mediated activation.

We assessed the frequencies of CD4⁺ and CD8⁺ T cells expressing at least one cytokine using an ORgate Boolean combination gating. This approach prevents counting multiple times cells that simultaneously exhibit multiple effector functions, as would be the case with summation (Figure 1C). Employing this strategy, we determined that a median of 45.8% of CD4⁺ and 22.9% of CD8⁺ T cells exerted effector functions upon activation by aAPCs (Figure 1D). The embedding of antibodies into the lipid-bilayered silica bead was important, given that equivalent concentrations of aCD3 and aCD28 in solution only yielded modest activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Figures S1D,E). Notably, the activation induced by aAPCs did not alter the levels of surface CD4 and CD8 expression (Figure S1F). However, the targeted molecules CD3 and CD28 were partially downregulated in both CD4⁺ and CD8⁺ T cells, indicative of strong stimulation cues.

These data show that our devised aAPC system, utilizing silica bead-coated bilayers to emulate physiological TCR-mediated activation, robustly induces cytokine expression in both CD4⁺ and CD8⁺ T cells.

CD28 co-stimulation differentially enhances individual effector functions in CD4⁺ and CD8⁺ T cells. We employed aAPCs to analyze the quantitative contributions of aCD3 and aCD28 to T cell activation. Initially, we conducted dose-response experiments to establish the optimal aCD3/aCD28 ratio. The augmentation of aCD28 levels on aAPCs did not offset the absence of aCD3 (Figures S2A, S2B). Similarly, increasing aCD3 concentration had little effect in the absence of aCD28. Increasing the aCD3 concentration at the expense of aCD28 proved deleterious. The optimal activation occurred at a 1-to-4 aCD3-to-aCD28 molecular ratio. This ratio was selected for subsequent experiments, unless otherwise specified.

To evaluate the importance of CD28 co-stimulation for distinct effector functions, we generated 5 sets of aAPCs: 1) negative control lipobeads loaded with non-activating isotype control IgG, and aAPCs containing agonistic antibodies targeting 2) CD3 only, 3) CD28 only, 4) CD3 and CD28 at equivalent but suboptimal molarity, and 5) CD3 and CD28 at the optimal 1-to-4 molecular ratio. Isotype IgG was supplemented onto suboptimal aAPCs to reach an overall antibody density equivalent to that of the optimal 1-to-4 condition. Purified T cells from 12 uninfected donors were stimulated with these sets of aAPCs, and total frequencies of cytokine-producing cells were quantified using OR Boolean combination gating (Figures S2C,D). Net total responses were calculated after subtracting background signals (Figures 2A-D).

In CD4⁺ T cells, activation with aCD3 alone or aCD28 alone resulted in net responses of low magnitude (Figure 2A), which were still significant compared to negative IgG bead controls (Figure S2C). The signal modestly increased at the suboptimal aCD3:aCD28 ratio, and briskly augmented at the optimal 1:4 (aCD3:aCD28) ratio,

reaching a 69.1-fold rise compared to aCD3 alone. Compared to CD4⁺ T cells, aCD3 alone was slightly more effective in activating CD8⁺ T cells. The benefit of co-stimulation was apparent only at the 1:4 molar ratio, with a median-fold increase of 9.6 when compared to aCD3 alone. Positive impacts of CD28 co-stimulation were observed for each examined cytokine in both CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Figures 2B,D). However, the relative increases differed. To better illustrate this hierarchy, we calculated the residual signal in the absence of CD28 co-stimulation ($[\text{cytokine}^+ \text{ cells activated by aCD3 alone}] / [\text{cytokine}^+ \text{ cells activated by 1:4 (aCD3:aCD28)}]$) (Figures 2E, F). Here, a lower residual signal indicates a stronger reliance on CD28 co-stimulation. In CD4⁺ T cells, the expression of IL-2, IFN γ , and TNF α was markedly reduced without CD28. In contrast, IL-17A and CD107a were less affected by the lack of CD28 co-stimulation (Figure 2E). CD28 co-stimulation dependency was more heterogeneous in CD8⁺ T cells. Although a similar hierarchy existed, CD8⁺ T cells depended less on CD28 co-stimulation than CD4⁺ T cells for all effector functions, except CD107a (Figure S2E).

CD28 co-stimulation also heightened cytokine expression at the single-cell level. Median fluorescence intensities of IL-2, IFN γ , TNF α , and IL-17A all increased in the 1:4 (aCD3:aCD28) condition compared to aCD3 alone (Figures 2G,H, S2F,G). Notably, only the expression of CD107a remained unchanged in CD4⁺ and CD8⁺ T cells. These data show the critical importance of CD28 to fully express cytokines.

Effector functions elicited in CD4⁺ and CD8⁺ T cells can vary with memory differentiation.^{49,50} We therefore investigated whether this variability could lead to differing dependence on CD28 co-stimulation. Memory subsets were categorized as follows: naïve T cells (T_N, CCR7⁺CD45RA⁺), central memory (T_{CM}, CCR7⁻CD45RA⁻), transitional

memory (T_{TM} , CCR7⁻CD45RA⁻CD27⁺), effector memory (T_{EM} , CCR7⁻CD45RA⁻CD27⁻), and terminally differentiated memory (T_{EMRA} , CCR7⁻CD45RA⁺) (Figure 2I). There were no disparities in memory subset proportions after stimulation with aCD3+aCD28 aAPCs (Figure S2H). We evaluated total cytokine⁺ cells in each subset using OR Boolean combination gating, then calculated the residual signal in the absence of CD28 co-stimulation, as in Figures 2E and 2F (Figures 2J-K). In CD4⁺ T cells, T_N exhibited the greatest reliance on CD28 co-stimulation. Across memory subsets, we observed a hierarchy for dependence on CD28, wherein the need for co-stimulation diminished as subsets became more differentiated: $T_{CM} > T_{TM} > T_{EM} > T_{EMRA}$ (Figure 2J). CD8⁺ T cell subsets displayed a similar hierarchy to CD4⁺ T cells but required less co-stimulation overall (Figures 2K, S2J).

These results demonstrate the substantial impact of CD28 co-stimulation on the enhancement of T cell effector functions across CD4⁺ and CD8⁺ subsets, underscoring the differential dependence on CD28 co-stimulation across varying memory differentiation stages.

The heightened responsiveness of IL-2 to CD28 co-stimulation shapes the overall effector profile. Given the asymmetric impact of CD28 co-stimulation on cytokine expression, we investigated whether CD28 could act as a determinant in shaping the overall effector profile. To avoid predefined marker combinations, we conducted unsupervised analyses utilizing the high-dimensional flow cytometric phenotyping data (Figure 3). We examined cells activated with different aCD3:aCD28 ratios (1:0 vs 1:4). We employed the uniform manifold approximation and projection (UMAP) algorithm⁵¹ to

visualize the distribution of clustered pooled CD4⁺ and CD8⁺ T populations. Clustering was performed using Phenograph.⁵² We identified 17 clusters (Figure 3A). The classification of clusters was based on distinct cytokine profiles indicated by fluorescent intensity (Figures 3B, S3A). Further qualification of the identified clusters was based on the percentage of cells expressing the different cytokines (Figure 3C).

This analysis revealed six clusters primarily composed of monofunctional cells (C4, C6, C8, C14, C15, C16), while the remaining clusters displayed varying degrees of polyfunctionality. Although the main impact of CD28 co-stimulation was quantitative (Figures S3B,C), its relative influence varied among clusters, resulting in three distinct behaviors in CD4⁺ T cells (Figure 3D): i) clusters experiencing relative decline compared to the total response after co-stimulation. These clusters exhibited minimal or no IL-2 expression; ii) status quo, with clusters maintaining consistent proportions with or without CD28 co-stimulation; and iii) clusters enriched after co-stimulation with CD28. These clusters expressed IL-2 and TNF α , or IL-2 alone. Overall, similar observations were made on CD8⁺ T cells, with minor cluster-specific differences (Figures 3E, S3C).

Principal component analyses (PCA) of T cell responses based on the proportions of these clusters in CD4⁺ (Figure S3D) and CD8⁺ (Figure S3E) T cells, illustrated the substantial effect of CD28 co-stimulation on the effector function profile. Therefore, CD28 serves a dual role by enhancing the potency of CD3-mediated TCR activation and fine-tuning the nature of the elicited effector functions.

CD28 co-stimulation enhances expression of second wave co-stimulatory molecules. In addition to CD28, a repertoire of other T cell co-stimulatory molecules exists, including CD69, CD40L, OX40, 4-1BB and ICOS. In contrast to the constitutive expression of CD28, these molecules typically undergo upregulation upon activation.⁵³⁻⁵⁷ Our investigation aimed to assess the role of CD28 in their upregulation. T cells from uninfected control donors were stimulated with aAPCs for 15h, followed by surface marker staining and subsequent analysis by flow cytometry.

CD69 is a widely employed surface marker to monitor T cell activation due to its rapid and robust upregulation after T cell activation.^{58,59} Notably, around one-third of CD4⁺ T cells already expressed low levels of CD69 before stimulation (Figure 4A). This proportion increased to 73% upon exposure to aAPCs conjugated solely with aCD3, with further increase in positivity with the optimal 1:4 (aCD3:aCD28) aAPCs, reaching >95% of CD4⁺ (Figure 4A) and CD8⁺ (Figure S4A) T cells. To increase the accuracy of activated cell detection following aAPC stimulation, we analyzed CD69 in conjunction with other activation markers using an AND/OR Boolean strategy, an approach validated in previous studies.^{60,61} Consequently, co-expression of CD40L, OX40, 4-1BB, and ICOS with CD69 was quantified in CD4⁺ and CD8⁺ cells. Each activation marker was upregulated after aAPC stimulation, albeit to varying degrees (Figures 4B, S4B). Background signal was negligible (Figures S4C,D). We detected only minimal or no induction of T cell activation markers after stimulation with aAPCs incorporating solely aCD3 or aCD28 (Figures 4C-F). Equimolar addition of CD28 (1:1 ratio of aCD3 to aCD28) marginally increased the signal (Figures 4C,E). In contrast, activation sharply increased at the optimal 1:4

(aCD3:aCD28) ratio, reaching a median of 62.6% in CD4⁺ (Figure 4C) and 41.1% in CD8⁺ (Figure 4E), and was observed for all tested activation markers (Figures 4D,F).

As for the ICS assay, we calculated the residual signal in absence of aCD28. In CD4⁺ T cells, CD40L exhibited the highest dependency on CD28 co-stimulation followed by OX40, and ICOS. 4-1BB displayed relatively greater independence from CD28 (Figure 4G). CD69 showed a higher degree of independence from CD28. A comparable hierarchy was observed in CD8⁺ T cells (Figure 4H). CD8⁺ T cells exhibited less reliance on CD28 co-stimulation than in CD4⁺ T cells across all markers with the exception of CD40L, which was poorly expressed on CD8⁺ T cells (Figure S4E). On a per-cell basis, CD28 co-stimulation also increased the expression levels of CD40L, OX40, ICOS, and CD69, but not 4-1BB (Figures S4F,G).

In summary, these results reveal that activation markers have varying levels of dependency on CD28 co-stimulation, from stringent (OX40, CD40L, ICOS), to moderate (4-1BB), and low (CD69).

During viremic HIV infection, the reliance on CD28 co-stimulation is heightened for IL-2, but diminished for IFN γ and TNF α . Inefficient CD28 co-stimulation has been reported during chronic viral infections.^{26,62} Therefore, we sought to determine whether the dependence on CD28 co-stimulation was altered in the context of chronic HIV infection. We examined a cohort of 13 people with chronic HIV who had not yet initiated antiretroviral therapy (UNT) (Figure S5A); clinical characteristics are provided in Table S1.

Stimulation with aCD3 aAPCs showed a tendency for stronger activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in UNT individuals compared to uninfected control donors (UD) (Figures 5A, S5B,C). In contrast, PWH's activation levels with CD28 co-stimulation remained lower than those observed in uninfected people (Figures S5B,C). Consequently, these trends translated to a lower dependence for CD28 co-stimulation in UNT PWH compared to untreated people (Figures 5C,D, S5B,C). Notably, these findings were cytokine-dependent; while IFN γ and TNF α were significantly less reliant on CD28 co-stimulation in UNT donors, IL-2 demonstrated an opposing pattern, being more dependent on CD28 co-stimulation in PWH than in the control cohort (Figures 5E,F).

We examined whether alterations in CD28 dependence were linked to changes in memory differentiation subsets. We identified no major differences in memory subsets between the two cohorts, except for an increased proportion of T_{EM} and T_{EMRA} CD8⁺ T cells in UNT participants (Figures S5D,E). The heightened dependence on CD28 co-stimulation for IL-2 was observed in all memory subsets. In contrast, the reduced dependence of IFN γ and TNF α on co-stimulation was specifically observed in the T_{EM} and T_{EMRA} subsets (Figures S5F,G).

These results reveal altered patterns of CD28 co-stimulation dependence in the context of chronic HIV infection, with cytokine-specific variations and memory subset influences.

CD4⁺ and CD8⁺ T cells from untreated PWH exhibit effector functions skewed towards TNF α , IFN γ , and CD107a, and diminished IL-2 production. We employed an

unsupervised approach to ascertain how the altered dependence on CD28 co-stimulation influenced the overall functional profile of CD4⁺ and CD8⁺ T cell during viremic HIV infection. Cytokine⁺ CD4⁺ and CD8⁺ T cells from UNT PWH were overlaid onto the UMAP analyses from [Figure 2](#) ([Figures 6A,B](#)). We next compared the proportions of the 17 cytokine clusters revealed upon aAPCs 1:4 (aCD3:aCD28) stimulation between UD and UNT participants. These clusters displayed three distinct patterns ([Figure 6C](#)): i) clusters enriched in untreated PWH compared to UD. These clusters expressed IFN γ , TNF α and/or CD107A, but not IL-2; ii) clusters similarly represented in both cohorts; iii) clusters enriched in UD. These clusters were all characterized by IL-2 expression. CD8⁺ T cell clusters exhibited overall similar results, with minor cluster-specific differences ([Figure 6D](#)).

To further examine the alterations in functional profile during HIV infection, we integrated the proportions of CD4⁺ and CD8⁺ T cell clusters from untreated PWH and UD controls in a principal component analysis (PCA) ([Figures 6 E,F](#)). For both CD4⁺ and CD8⁺ T cells, we observed a clear and statistically significant separation along the PC1 axis between the two cohorts. To identify the cytokines driving this segregation, we correlated PC1 with the univariate percentage of each cytokine⁺ T cell response ([Figures 6G,H, S6A,B](#)). CD107a, IL-17A, IFN γ , and TNF α all positively correlated with PC1 (or showed a trend in the case of TNF α in CD4⁺), showing that the heightened expression of these cytokines in untreated PWH drove the observed separation ([Figures 6G,H](#)). Conversely, IL-2 correlated negatively with PC1, indicating that diminished expression of this cytokine is a distinctive feature of UNT PWH ([Figures 6G,H](#)). These findings were corroborated by univariate analyses, as we noted a lower proportion of IL-2⁺ CD4⁺ ([Figure S6C](#)) and CD8⁺

(Figure S6D) T cells within the activated cell populations. Conversely, the proportion of IFN γ ⁺, TNF α ⁺ and CD107a⁺ CD4⁺ and CD8⁺ T cells was higher in UNT PWH than uninfected people.

In summary, unsupervised integration of cytokine-positive T cell responses reveals distinct patterns enriched in untreated PWH. Principal component analysis highlights significant divergence between PWH and controls, driven by elevated IFN γ , TNF α , and CD107a alongside reduced IL-2 expression.

Initiation of ART in PWH partially normalizes cytokine profiles in CD4⁺ T cells, with a limited impact on CD8⁺ T cells. Next, we investigated whether ART could rectify the skewed functional profile observed during viremic HIV infection. We performed pairwise comparisons for participants with longitudinal follow-up and available pre- and post-ART leukaphereses samples (Table S1 and Figures S7A-C). The pairwise comparisons did not reveal statistically significant changes in global CD4⁺ and CD8⁺ cytokine T cell responses after ART, either with aCD3 alone or with CD28 co-stimulation (Figures 7A,B). Consequently, the residual cytokine response without CD28 was globally comparable to the signal observed before and after treatment (Figures 7C,D). This also held true for each individual cytokine assessed (Figures 7E,F).

We subsequently investigated whether the skewed effector function profile could be rectified by ART using our unsupervised analysis method (Figures 7G-I). Following ART, some modest yet significant alterations were observed in the proportions of CD4⁺ T cell clusters (Figure 7H). These combined alterations reflected a partial yet significant

normalization of the CD4⁺ T cell effector functions, as indicated by PCA analysis (Figure 7J). Changes in the proportions of CD8⁺ T clusters were more subtle (Figure 7K) but were sufficient to differentiate between pre-ART and post-ART samples. However, this separation occurred along the PC2 axis, rather than along the PC1 axis, which differentiated both UNT and ART-suppressed PWH from UD controls.

These unsupervised analyses reveal that post-ART, global cytokine responses remain consistent, with treatment partially restoring CD4⁺ T cell cytokine profiles, while CD8⁺ T cell responses display limited changes.

DISCUSSION

In this study, we developed a versatile and convenient aAPC system compatible with flow cytometry, brief stimulation periods, fluid interfacing surfaces, and adjustable ligand selection and embedding densities, as well as choice of the aAPC:cell ratio. This reduced model enabled us to characterize in-depth the role of CD28 co-stimulation in primary CD4⁺ and CD8⁺ T cells isolated from blood samples, elucidating the varying levels of dependence of individual effector functions and secondary-wave activation molecules on this essential secondary signal. In control donors, our system highlights CD28's preferential enhancement of IL-2 expression and how this modulation shapes the elicited response profile, favouring it over other cytokines. Additionally, our analyses revealed that CD4⁺ and CD8⁺ T cells from viremic PWH prior to ART initiation exhibited a skewed orientation towards TNF α , IFN γ and CD107a expression, while diverging from IL-2 production. Expression of TNF α and IFN γ upon sole CD3 stimulation was relatively better preserved in viremic PWH compared to controls, in contrast to a more pronounced dependence on CD28 co-stimulation for IL-2 production. Importantly, this functional imbalance was only partially rectified by ART in CD4⁺ but not CD8⁺ T cells.

Our aAPC system induced robust T cell activation, with over 90% CD4⁺ and CD8⁺ T cells expressing CD69 within a mere 15h of stimulation. The ratio of aCD3 to aCD28 antibodies embedded on aAPCs played a pivotal role in optimal cytokine expression. While the agonistic effect of aCD3 was fundamental, it reached a plateau swiftly in the absence of CD28 co-stimulation. In humans, inherited T cell CD28 deficiency leads to

severe cutaneous lesions due to human papillomaviruses and moderate impairment of humoral responses, yet appear otherwise usually healthy.⁶³ This underscores the redundant nature of the co-stimulation process *in vivo*. For instance, murine studies in mice showed that CD27/CD70 signaling can substitute for CD28/B7 in LCMV-specific CD8⁺ T cell expansion,⁶⁴ while another study showed that 4-1BBL could replace anti-CD28 as a co-stimulator.⁶⁵

Our data indicate that co-stimulation is necessary to optimally activate memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells. This is consistent with murine studies that have demonstrated the essential role of CD28 in the recall responses of CD4⁺ and CD8⁺ T cells and subsequent viral clearance.^{66,67} However, the extent of CD28 co-stimulation required depends on the differentiation state of the cell and was particularly important for naïve and central memory cells. These less differentiated cells may require stronger co-activation signal to counter their relative quiescence, whereas effector memory and terminally differentiated cells are likely already poised for reactivation.

Co-stimulation is often understood as a mechanism for TCR signal amplification. Nevertheless, apart from globally increasing the expression of cytokines and activation markers, our data show that CD28 co-stimulation exerts a nuanced influence on the ensuing functions. Specifically, IL-2, IFN γ , TNF α , CD40L, OX40, and ICOS are preferentially promoted by CD28 compared to CD107a, IL-17A, 4-1BB, and CD69. We observed that CD28 co-stimulation enriches certain T cell subpopulations that share IL-2

expression as a common feature. CD28 has been shown to enhance the transcription of IL-2^{68,69} and stabilize its mRNA.⁷⁰ Additionally, CD28 has been found to induce DEC1, a transcription factor controlling IL-2 and IFN γ production.⁷¹ Taken together with our findings, these studies suggest that CD28 co-stimulation can selectively promote the transcription of defined effector molecules. Alternatively, CD28 may more broadly impact cells committed to transcriptional programs that include certain functions, such as IL-2 and CD40L expression. The higher dependence on CD28 in the CD4⁺ T cell lineage and in less differentiated cells is consistent with this interpretation.

Compared to uninfected individuals, CD4⁺ and CD8⁺ T cells from PWH exhibited a greater overall responsiveness to the first signal given by aCD3, which could be attributed to the higher production of IFN γ and TNF α in response to aCD3. Conversely, we observed a heightened dependency on CD28 for IL-2 in PWH. These altered dependencies on CD28 co-stimulation, seen in both naïve and memory subsets, result in a distorted effector function profile characterized by increased frequencies of IFN γ and TNF α -expressing CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets, at the expense of IL-2-expressing subpopulations. The decreased IL-2 expression during HIV infection aligns with earlier reports on mitogen-stimulated PBMCs (such as phytohaemagglutinin PHA or PMA) from PWH.⁷²⁻⁷⁵ Mitogen stimulation circumvents the TCR, which suggests that the altered effector profiles observed may stem from TCR-independent downstream signaling or mechanistic alterations that remain to be identified.

The precise molecular mechanisms underpinning the skewing of non-specific T cell effector functions during HIV infection remain incompletely understood. HIV variably affects CD4⁺ T cell lineages and anatomic compartments, such as the preferential depletion of Th17 cells in the gut mucosa. This may lead to a preferential representation of other subsets in PWH.⁷⁶ Conversely, some populations are better restored during ART.^{77,78} During HIV infection, the upregulation of immune checkpoints such as PD-1, CTLA-4, and Tim-3^{23,79,80} is not restricted to HIV-specific responses, but is broadly present on T cells subsets, which may contribute to dysfunction *in vivo*. Our engineered aAPCs bypass these pathways, as in contrast to natural APCs, they do not contain the corresponding ligands and interact with purified T cells. Therefore, while our data suggest T cell-intrinsic mechanisms, we cannot exclude the possibility that such signals triggered *in vivo* may have downstream effects in our assays. Consistent with this interpretation would be the epigenetic scars emerging from the persistent engagement of the PD1/PDL1 axis.^{81,82} Other possible mechanisms include the persistent exposure to microbial products leaking from compromised intestinal barrier,³² co-infection by cytomegalovirus (CMV) and Epstein-Barr virus (EBV),⁸³ and residual expression of HIV products,⁸⁴ which all contribute to a higher pro-inflammatory environment during ART. This may favor the expansion and maintenance of specific T cell subsets.⁸⁵

Our data clarify the role of CD28 co-stimulation as a mechanism modulating both the magnitude and nature of effector functions triggered upon TCR-mediated activation in primary human blood cells. We observed distinct CD4⁺ and CD8⁺ T effector profiles during chronic HIV infection. Notably, these alterations were not specific to a specific pathogen.

This skewing may undermine T cell responses against diverse antigens, thereby potentially contributing to HIV-associated co-morbidities.^{86,87} Indeed, this non-specific skewing may introduce another layer of dysfunction whose impact, combined with HIV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell impairment, could partially account for the well-documented residual immune dysfunction that persists despite ART (reviewed in ⁸⁸). Deciphering how these defects intertwine will be key to better understand immune dysfunction during HIV infection.

Limitations of Study

Our experiments do not explore the contribution of other molecules that could compensate for suboptimal CD28 co-stimulation. Through the interaction of other agonistic antibodies or recombinant ligands, our aAPC system can be customized to specifically assess the involvement of other co-stimulatory or co-inhibitory molecules that modulate TCR signaling. Since many non-Th1 cytokine proteins are challenging to detect by flow cytometry, alternative read-out approaches should be considered. Further studies should define alterations in the expression of other cytokines and chemokines not measured here, such as those preferentially produced by follicular helper T cells.¹⁷ Immune recovery during ART is variable, with a subpopulation of PWH presenting suboptimal CD4 T cell recovery, expansion of the CD8 compartment, and/or heightened inflammation despite optimal viral suppression. The aAPC system presented here could be used to compare immunological responders and non-responders in larger cohorts to identify features of persistent immune dysfunction on ART.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the study participants. We thank Gaël Dulude, Philippe St-Onge, and the CRCHUM Flow Cytometry Platform; Olfa Debbeche and the CRCHUM BSL3 platform for technical assistance. We thank Olivier Tastet for his input on unsupervised analyses. This study was supported by the Canadian Institutes for Health Research (CIHR grant #168901 to D.E.K), the US National Institutes of Health (NIH grant HL092565 to D.E.K) and the Réseau Fonds de la recherche Québec-Santé (FRQ-S) SIDA & Maladies infectieuses and thérapies cellulaires. The Symphony flow cytometer was funded by a John R. Evans Leaders Fund from the Canada Foundation for Innovation (#37521 to D.E.K) and the Fondation Sclérodémie Québec. T.S.K and A.L. are supported by a scholarship from Canada Graduate Scholarships – Master’s (CGS M) program, as well as the FRQS for A.L. T.S.K and E.A was supported by a PREMIER scholarship from Department of Medicine at University of Montreal. J.-P.R. is the holder of the Louis Lowenstein Chair at McGill University. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author contributions

T.S.K, M.D., and D.E.K. designed the study; K.P. and E.A. optimized the aAPC system; G.O.D provided assistance with assay protocols; T.S.K. and E.A. performed the experiments; T.S. and A.L. analyzed the data; A.L performed the unsupervised analysis; T.S.K., M.D., N.S. and D.E.K. interpreted the data; T.S.K., M.D., and D.E.K. wrote the

initial draft of the manuscript; all co-authors reviewed and edited the manuscript; N.S., M.D. and D.E.K. provided supervision.

Declaration of interests

The authors declare no competing interests.

METHODS

Resource Availability

Lead Contact: For further information and requests related to resources and reagents, please contact Daniel E. Kaufmann at daniel.kaufmann@chuv.ch.

Materials Availability: This study did not produce any new unique reagents.

Data and Code Availability:

- The published article includes all datasets generated and analyzed for this study. For additional information and requests related to resources and reagents, please contact the Lead Contact Author (daniel.kaufmann@chuv.ch).
- All original code has been deposited at https://github.com/alemi055/scripts-and-data/blob/master/ShaabanKabakiboetal_2023.R and is publicly available as of the publication date. DOIs are listed in the key resources table.
- Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the lead contact upon request.

Experimental Model and Study Participant Details

Ethics statement

All work was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki regarding informed consent and approval by an appropriate institutional board. Leukaphereses were obtained from study participants at the Montreal General Hospital, Montreal, Canada and at the

Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) in Montreal, Canada. The study was approved by the respective Institutional Review Boards (IRB CHUM: 17.335) and participants gave written informed consent prior to enrollment. Samples were collected between 2013 and 2019 as part of a multicentric study (MP-37-2018-4029).

Study participants

Subject characteristics are summarized in [supplementary table S1](#). Uninfected donors (UD) are free of HIV-1 infection. Untreated HIV participants had plasma viral loads of at least 5000 copies/ml (except for one at 2700 copies/mL), had been documented by blood testing to live with HIV for at least three months, and were either untreated or off ART for at least 3 months at the time of collection of the “Pre-ART” sample. Longitudinal “Post-ART” samples were collected in these same subjects after at least 6 months on ART and achieving controlled viremia (<50 vRNA copies/mL). PBMCs were isolated from blood samples by Ficoll density gradient centrifugation and cryopreserved in liquid nitrogen until use.

Method Details

Liposomes preparation

DOPC, Cap biotin PE and Ni-NTA DOGS lipids were purchased from Avanti Polar Lipids at stock concentrations of 25 mg/mL (DOPC) or 10 mg/mL (biotin-PE and Ni-NTA DOGS)

in chloroform layered in argon and stored at -20°C upon receipt (Cat #850375C, #870273C, and #790404C respectively). All lipid solutions were always stored under argon to avoid oxidation. Chloroform solutions of lipids were mixed to obtain a final 4 mM DOPC solution after hydration with DOPC (98%), Cap biotin PE (2%) and Ni-NTA (6.25%) (molar ratios). Lipids were first dried under nitrogen stream and left to completely dry for 2h. The dry lipid film was rehydrated in nitrogen-purged Tris-saline for 30 min at room temperature until the solution became homogenous. The unilamellar liposomes were passed 10 times through a polycarbonate membrane ($0.1\ \mu\text{m}$) in an extruder (Avanti Polar Lipids, Cat #610000) to produce bilayered liposomes (LUVs). The liposome solution was then diluted 10 times to obtain the working stock solution.

Artificial APCs preparation

aAPCs were freshly prepared on the day of stimulation. All centrifuging was done at 600g for 2 min at room temperature. Lipid bilayered aAPCs were obtained by washing $5\text{-}\mu\text{m}$ silica beads (Bangs laboratories, Cat #SS06N) twice with water, then vigorous vortexing with liposome bilayer suspension ($2\ \mu\text{L}$ of 1X liposomes solution per $1\ \mu\text{L}$ ($1\text{M}/\mu\text{L}$) of beads) during four sequences of 10 seconds each. Ligands addition and quantities were adapted to experiment requirements and cells number required for flow cytometry each time. Briefly, the lipid-coated beads were washed once with filtered HBS-BSA buffer and incubated with $4\ \mu\text{g}/\text{mL}$ streptavidin (Jackson Immunoresearch, Cat #016-000-084) for 30 min at room temperature, then washed again with HBS-BSA buffer. Streptavidin coated beads were incubated 30 min at room temperature with anti-CD3-biotin ($0.585\ \mu\text{g}/\text{mL}$) and anti-CD28-biotin ($2.344\ \mu\text{g}/\text{mL}$) in HBS-BSA 1% buffer for a aCD3:aCD28 ratio 1:4.

Concentrations of aCD3 and aCD28 were adapted for different ratios, and the corresponding Isotype IgG concentration was complemented on suboptimal aAPCs to reach an overall antibody concentration equivalent to that of the aCD3:1CD28 1:4 ratio condition. Beads were finally washed with HBS-BSA buffer and resuspended in the proper amount of HBS-BSA.

PBMCs thawing, purification, and stimulation

Frozen PBMCs were thawed in Fetal Bovine Serum (FBS) before total T cells isolation by negative magnetic bead selection (EasySep™ Human T Cell Isolation Kit). Purified T cells were resuspended at 8×10^6 /mL in RPMI (GIBCO by Life Technologies) supplemented with penicillin/streptomycin (GIBCO by Life Technologies) and 10% of FBS, and rested for 2 hours. Two million purified T cells were stimulated with aAPCs at a cell:bead ratio of 1:4. As a positive control, 2 million PBMCs were stimulated by 0.5 μ L of 1 μ g/mL SEB. PBMCs were used for SEB activation instead of purified T cells because SEB activity requires MHC on natural antigen-presenting cells.

Intracellular cytokine staining (ICS)

Cell stimulation was carried out for 15h in the presence of mouse anti-human CD107a and anti-human CCR7 at 37°C and 5% CO₂. Brefeldin A and monensin (BD Biosciences, San Jose, CA) were added 1h after stimulation. Cells were stained for a viability dye (Aquavidin, Thermo Fisher scientific, Waltham, MA) for 20 min at room temperature followed by surface markers (CD3, CD4, CD45RA, CD27, CD57, CD8, CD19, CD14) for

30 min at 4°C. This was followed by intracellular detection of cytokines (IL-2, IFN γ , TNF α , CD107a, IL-17A) using the IC Fixation/Permeabilization kit (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA), according to the manufacturer's protocol. Cells were acquired on a Symphony flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo v10.8.1 software. Antibodies used are listed in [Table S2](#). To calculate the degree of dependence on CD28, we used this formula: *Residual signal without CD28 co-stimulation = [cytokine⁺ activated by aCD3 alone] / [cytokine⁺ cells activated by 1:4 (aCD3:aCD28)]*

Activation-induced marker (AIM) assay

The AIM assay was performed as previously reported.⁸⁹ Cells were stimulated for 15h at 37°C and 5% CO₂ in the presence of anti-human CCR7. Cells were stained for a viability dye (Aquavidin, Thermofisher, 20min, RT), surface markers (CD3, CD4, CD45RA, CD27, CD57, CD14, CD19, CD8, CD28, PD-1, CD69, TIGIT, 4-1BB, ICOS, OX40, CD40L) for 30 min at 4°C, and fixed using 2% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, 15min, RT) before acquisition on a Symphony flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo v10.8.1 software. For total PBMCs conditions, a CD40 blocking antibody (Miltenyi) was added in culture to prevent the interaction of CD40L with CD40 and its subsequent downregulation. Antibodies used are listed in [Table S3](#).

Unsupervised Clustering

Unsupervised analyses were performed on CD4⁺ and CD8⁺ T cells from UD, UNT, and ART donors that were activated by the aCD3:aCD28:IgG ratios of 1:0:4, 1:1:3, and 1:4:0.

These data were first downsampled to a comparable number of events (1,000 cells), and FCS files were loaded through the flowCore package (v2.10.0).⁹⁰ Scaling and logicle transformation of the flow cytometry data was applied using FlowSOM (v2.6.0),⁹¹ as done previously.⁹² The uniform manifold approximation and projection (UMAP) algorithm was performed using the R package M3C (v1.20.0),⁹³ while the clustering was achieved using Phenograph (v0.99.1)⁵² with the k parameter (number of nearest-neighbors) set to 400. We obtained 17 clusters. Heatmaps were also generated in R (v4.2.2) using the packages ggplot2 (v3.4.0)⁹⁴ and pheatmap (v1.0.12).⁹⁵ The R code scripted for this paper is available at https://github.com/alemi055/scripts-and-data/blob/master/Shaabankabakiboetal_2023.R

Quantification and Statistical Analysis

Statistical analyses

Symbols represent biologically independent samples from UD, UNT and ART donors. Lines connect data from the same donor. Differences in responses for the same patient before and after ART treatment or from different activation conditions were assessed using Wilcoxon matched-pair tests. Differences in responses between UD and UNT were measured by Mann-Whitney tests. Wilcoxon and Mann-Whitney tests were generated using GraphPad Prism (version 9.2.0). p values < 0.05 were considered significant. p values are indicated for each comparison assessed. For graphical representation on a log

scale (but not for statistical tests), null values were arbitrarily set at the minimal values for each assay.

Declaration of generative AI and AI-assisted technologies in the writing process

During the preparation of this work, the authors used GPT 4 from OpenAI in order to improve language and readability, as they are not native English speakers. After using this tool, the authors reviewed and edited the content as needed and take full responsibility for the content of the publication.

REFERENCES

1. Bretscher, P., and Cohn, M. (1970). A theory of self-nonsel self discrimination. *Science* 169, 1042-1049. 10.1126/science.169.3950.1042.
2. Garcia, K.C., Degano, M., Pease, L.R., Huang, M., Peterson, P.A., Teyton, L., and Wilson, I.A. (1998). Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen. *Science* 279, 1166-1172. 10.1126/science.279.5354.1166.
3. Coyle, A.J., and Gutierrez-Ramos, J.C. (2001). The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat Immunol* 2, 203-209. 10.1038/85251.
4. Linterman, M.A., Denton, A.E., Divekar, D.P., Zvetkova, I., Kane, L., Ferreira, C., Veldhoen, M., Clare, S., Dougan, G., Espéli, M., and Smith, K.G. (2014). CD28 expression is required after T cell priming for helper T cell responses and protective immunity to infection. *Elife* 3. 10.7554/eLife.03180.
5. Rodríguez-Palmero, M., Hara, T., Thumbs, A., and Hünig, T. (1999). Triggering of T cell proliferation through CD28 induces GATA-3 and promotes T helper type 2 differentiation in vitro and in vivo. *Eur J Immunol* 29, 3914-3924. 10.1002/(sici)1521-4141(199912)29:12<3914::Aid-immu3914>3.0.Co;2-#.
6. Frauwirth, K.A., Riley, J.L., Harris, M.H., Parry, R.V., Rathmell, J.C., Plas, D.R., Elstrom, R.L., June, C.H., and Thompson, C.B. (2002). The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity* 16, 769-777. 10.1016/s1074-7613(02)00323-0.
7. Martin, P.J., Ledbetter, J.A., Morishita, Y., June, C.H., Beatty, P.G., and Hansen, J.A. (1986). A 44 kilodalton cell surface homodimer regulates interleukin 2 production by activated human T lymphocytes. *J Immunol* 136, 3282-3287.

8. Boise, L.H., Minn, A.J., Noel, P.J., June, C.H., Accavitti, M.A., Lindsten, T., and Thompson, C.B. (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 3, 87-98. 10.1016/1074-7613(95)90161-2.
9. Thomas, R.M., Gao, L., and Wells, A.D. (2005). Signals from CD28 induce stable epigenetic modification of the IL-2 promoter. *J Immunol* 174, 4639-4646. 10.4049/jimmunol.174.8.4639.
10. Butte, M.J., Lee, S.J., Jesneck, J., Keir, M.E., Haining, W.N., and Sharpe, A.H. (2012). CD28 costimulation regulates genome-wide effects on alternative splicing. *PLoS One* 7, e40032. 10.1371/journal.pone.0040032.
11. DuPage, M., Chopra, G., Quiros, J., Rosenthal, W.L., Morar, M.M., Holohan, D., Zhang, R., Turka, L., Marson, A., and Bluestone, J.A. (2015). The chromatin-modifying enzyme Ezh2 is critical for the maintenance of regulatory T cell identity after activation. *Immunity* 42, 227-238. 10.1016/j.immuni.2015.01.007.
12. Wada, N.I., Jacobson, L.P., Margolick, J.B., Breen, E.C., Macatangay, B., Penugonda, S., Martínez-Maza, O., and Bream, J.H. (2015). The effect of HAART-induced HIV suppression on circulating markers of inflammation and immune activation. *Aids* 29, 463-471. 10.1097/qad.0000000000000545.
13. French, M.A., King, M.S., Tschampa, J.M., da Silva, B.A., and Landay, A.L. (2009). Serum immune activation markers are persistently increased in patients with HIV infection after 6 years of antiretroviral therapy despite suppression of viral replication and reconstitution of CD4+ T cells. *J Infect Dis* 200, 1212-1215. 10.1086/605890.
14. Lindqvist, M., van Lunzen, J., Soghoian, D.Z., Kuhl, B.D., Ranasinghe, S., Kranias, G., Flanders, M.D., Cutler, S., Yudanin, N., Muller, M.I., et al. (2012). Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. *J Clin Invest* 122, 3271-3280. 10.1172/jci64314.

15. Champagne, P., Ogg, G.S., King, A.S., Knabenhans, C., Ellefsen, K., Nobile, M., Appay, V., Rizzardi, G.P., Fleury, S., Lipp, M., et al. (2001). Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* *410*, 106-111. 10.1038/35065118.
16. Niessl, J., Baxter, A.E., Morou, A., Brunet-Ratnasingham, E., Sannier, G., Gendron-Lepage, G., Richard, J., Delgado, G.G., Brassard, N., Turcotte, I., et al. (2020). Persistent expansion and Th1-like skewing of HIV-specific circulating T follicular helper cells during antiretroviral therapy. *EBioMedicine* *54*, 102727. 10.1016/j.ebiom.2020.102727.
17. Morou, A., Brunet-Ratnasingham, E., Dubé, M., Charlebois, R., Mercier, E., Darko, S., Brassard, N., Nganou-Makamdop, K., Arumugam, S., Gendron-Lepage, G., et al. (2019). Altered differentiation is central to HIV-specific CD4(+) T cell dysfunction in progressive disease. *Nat Immunol* *20*, 1059-1070. 10.1038/s41590-019-0418-x.
18. Goepfert, P.A., Bansal, A., Edwards, B.H., Ritter, G.D., Jr., Tellez, I., McPherson, S.A., Sabbaj, S., and Mulligan, M.J. (2000). A significant number of human immunodeficiency virus epitope-specific cytotoxic T lymphocytes detected by tetramer binding do not produce gamma interferon. *J Virol* *74*, 10249-10255. 10.1128/jvi.74.21.10249-10255.2000.
19. Kostense, S., Vandenberghe, K., Joling, J., Van Baarle, D., Nanlohy, N., Manting, E., and Miedema, F. (2002). Persistent numbers of tetramer+ CD8(+) T cells, but loss of interferon-gamma+ HIV-specific T cells during progression to AIDS. *Blood* *99*, 2505-2511. 10.1182/blood.v99.7.2505.
20. Shankar, P., Russo, M., Harnisch, B., Patterson, M., Skolnik, P., and Lieberman, J. (2000). Impaired function of circulating HIV-specific CD8(+) T cells in chronic human immunodeficiency virus infection. *Blood* *96*, 3094-3101.
21. Appay, V., Nixon, D.F., Donahoe, S.M., Gillespie, G.M., Dong, T., King, A., Ogg, G.S., Spiegel, H.M., Conlon, C., Spina, C.A., et al. (2000). HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* *192*, 63-75. 10.1084/jem.192.1.63.

22. Lichtenfeld, M., Kaufmann, D.E., Yu, X.G., Mui, S.K., Addo, M.M., Johnston, M.N., Cohen, D., Robbins, G.K., Pae, E., Alter, G., et al. (2004). Loss of HIV-1-specific CD8+ T cell proliferation after acute HIV-1 infection and restoration by vaccine-induced HIV-1-specific CD4+ T cells. *J Exp Med* 200, 701-712. 10.1084/jem.20041270.
23. Day, C.L., Kaufmann, D.E., Kiepiela, P., Brown, J.A., Moodley, E.S., Reddy, S., Mackey, E.W., Miller, J.D., Leslie, A.J., DePierres, C., et al. (2006). PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443, 350-354. 10.1038/nature05115.
24. Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., and Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439, 682-687. 10.1038/nature04444.
25. Wherry, E.J., Ha, S.J., Kaech, S.M., Haining, W.N., Sarkar, S., Kalia, V., Subramaniam, S., Blattman, J.N., Barber, D.L., and Ahmed, R. (2007). Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* 27, 670-684. 10.1016/j.immuni.2007.09.006.
26. Hui, E., Cheung, J., Zhu, J., Su, X., Taylor, M.J., Wallweber, H.A., Sasmal, D.K., Huang, J., Kim, J.M., Mellman, I., and Vale, R.D. (2017). T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science* 355, 1428-1433. 10.1126/science.aaf1292.
27. Hazenberg, M.D., Stuart, J.W., Otto, S.A., Borleffs, J.C., Boucher, C.A., de Boer, R.J., Miedema, F., and Hamann, D. (2000). T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: a longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Blood* 95, 249-255.
28. Doisne, J.M., Urrutia, A., Lacabaratz-Porret, C., Goujard, C., Meyer, L., Chaix, M.L., Sinet, M., and Venet, A. (2004). CD8+ T cells specific for EBV, cytomegalovirus, and influenza virus are activated during primary HIV infection. *J Immunol* 173, 2410-2418. 10.4049/jimmunol.173.4.2410.

29. Copeland, N.K., Eller, M.A., Kim, D., Creegan, M., Esber, A., Eller, L.A., Semwogerere, M., Kibuuka, H., Kiweewa, F., Crowell, T.A., et al. (2021). Brief Report: Increased Inflammation and Liver Disease in HIV/HBV-Coinfected Individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr* *88*, 310-313. 10.1097/qai.0000000000002760.
30. Righetti, E., Ballon, G., Ometto, L., Cattelan, A.M., Menin, C., Zanchetta, M., Chieco-Bianchi, L., and De Rossi, A. (2002). Dynamics of Epstein-Barr virus in HIV-1-infected subjects on highly active antiretroviral therapy. *Aids* *16*, 63-73. 10.1097/00002030-200201040-00009.
31. Jabs, D.A., Enger, C., and Bartlett, J.G. (1989). Cytomegalovirus retinitis and acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Ophthalmol* *107*, 75-80. 10.1001/archopht.1989.01070010077031.
32. Brenchley, J.M., Price, D.A., Schacker, T.W., Asher, T.E., Silvestri, G., Rao, S., Kazzaz, Z., Bornstein, E., Lambotte, O., Altmann, D., et al. (2006). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* *12*, 1365-1371. 10.1038/nm1511.
33. Younas, M., Psomas, C., Reynes, C., Cezar, R., Kundura, L., Portales, P., Merle, C., Atoui, N., Fernandez, C., Le Moing, V., et al. (2019). Microbial Translocation Is Linked to a Specific Immune Activation Profile in HIV-1-Infected Adults With Suppressed Viremia. *Front Immunol* *10*, 2185. 10.3389/fimmu.2019.02185.
34. Kaizuka, Y., Douglass, A.D., Varma, R., Dustin, M.L., and Vale, R.D. (2007). Mechanisms for segregating T cell receptor and adhesion molecules during immunological synapse formation in Jurkat T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 20296-20301. 10.1073/pnas.0710258105.
35. Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* *285*, 221-227. 10.1126/science.285.5425.221.

36. Ilani, T., Vasiliver-Shamis, G., Vardhana, S., Bretscher, A., and Dustin, M.L. (2009). T cell antigen receptor signaling and immunological synapse stability require myosin IIA. *Nat Immunol* 10, 531-539. 10.1038/ni.1723.
37. Yokosuka, T., Kobayashi, W., Sakata-Sogawa, K., Takamatsu, M., Hashimoto-Tane, A., Dustin, M.L., Tokunaga, M., and Saito, T. (2008). Spatiotemporal regulation of T cell costimulation by TCR-CD28 microclusters and protein kinase C theta translocation. *Immunity* 29, 589-601. 10.1016/j.immuni.2008.08.011.
38. Bromley, S.K., Iaboni, A., Davis, S.J., Whitty, A., Green, J.M., Shaw, A.S., Weiss, A., and Dustin, M.L. (2001). The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. *Nat Immunol* 2, 1159-1166. 10.1038/ni737.
39. Dustin, M.L. (2010). Insights into function of the immunological synapse from studies with supported planar bilayers. *Curr Top Microbiol Immunol* 340, 1-24. 10.1007/978-3-642-03858-7_1.
40. Mescher, M.F. (1992). Surface contact requirements for activation of cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 149, 2402-2405.
41. Perica, K., Tu, A., Richter, A., Bieler, J.G., Edidin, M., and Schneck, J.P. (2014). Magnetic field-induced T cell receptor clustering by nanoparticles enhances T cell activation and stimulates antitumor activity. *ACS Nano* 8, 2252-2260. 10.1021/nn405520d.
42. Hsu, C.J., Hsieh, W.T., Waldman, A., Clarke, F., Huseby, E.S., Burkhardt, J.K., and Baumgart, T. (2012). Ligand mobility modulates immunological synapse formation and T cell activation. *PLoS One* 7, e32398. 10.1371/journal.pone.0032398.
43. Giannoni, F., Barnett, J., Bi, K., Samodal, R., Lanza, P., Marchese, P., Billetta, R., Vita, R., Klein, M.R., Prakken, B., et al. (2005). Clustering of T cell ligands on artificial APC membranes influences T cell activation and protein kinase C theta translocation to the T cell plasma membrane. *J Immunol* 174, 3204-3211. 10.4049/jimmunol.174.6.3204.
44. Olden, B.R., Perez, C.R., Wilson, A.L., Cardle, II, Lin, Y.S., Kaehr, B., Gustafson, J.A., Jensen, M.C., and Pun, S.H. (2019). Cell-Templated Silica Microparticles with Supported Lipid

- Bilayers as Artificial Antigen-Presenting Cells for T Cell Activation. *Adv Healthc Mater* **8**, e1801188. 10.1002/adhm.201801188.
45. Chen, J.Y., Agrawal, S., Yi, H.P., Vallejo, D., Agrawal, A., and Lee, A.P. (2023). Cell-Sized Lipid Vesicles as Artificial Antigen-Presenting Cells for Antigen-Specific T Cell Activation. *Adv Healthc Mater* **12**, e2203163. 10.1002/adhm.202203163.
 46. Goldstein, S.A., and Mescher, M.F. (1986). Cell-sized, supported artificial membranes (pseudocytes): response of precursor cytotoxic T lymphocytes to class I MHC proteins. *J Immunol* **137**, 3383-3392.
 47. Cheung, A.S., Zhang, D.K.Y., Koshy, S.T., and Mooney, D.J. (2018). Scaffolds that mimic antigen-presenting cells enable ex vivo expansion of primary T cells. *Nat Biotechnol* **36**, 160-169. 10.1038/nbt.4047.
 48. Kim, H.S., Ho, T.C., Willner, M.J., Becker, M.W., Kim, H.W., and Leong, K.W. (2023). Dendritic cell-mimicking scaffolds for ex vivo T cell expansion. *Bioact Mater* **21**, 241-252. 10.1016/j.bioactmat.2022.08.015.
 49. de Araújo-Souza, P.S., Hanschke, S.C.H., Nardy, A., Sécca, C., Oliveira-Vieira, B., Silva, K.L., Soares-Lima, S.C., and Viola, J.P.B. (2020). Differential interferon- γ production by naive and memory-like CD8 T cells. *J Leukoc Biol* **108**, 1329-1337. 10.1002/jlb.2ab0420-646r.
 50. Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708-712. 10.1038/44385.
 51. Becht, E., McInnes, L., Healy, J., Dutertre, C.A., Kwok, I.W.H., Ng, L.G., Ginhoux, F., and Newell, E.W. (2018). Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP. *Nat Biotechnol*. 10.1038/nbt.4314.
 52. Levine, J.H., Simonds, E.F., Bendall, S.C., Davis, K.L., Amir el, A.D., Tadmor, M.D., Litvin, O., Fienberg, H.G., Jager, A., Zunder, E.R., et al. (2015). Data-Driven Phenotypic Dissection of AML Reveals Progenitor-like Cells that Correlate with Prognosis. *Cell* **162**, 184-197. 10.1016/j.cell.2015.05.047.

53. Noelle, R.J., Roy, M., Shepherd, D.M., Stamenkovic, I., Ledbetter, J.A., and Aruffo, A. (1992). A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 6550-6554. [10.1073/pnas.89.14.6550](https://doi.org/10.1073/pnas.89.14.6550).
54. Kinnear, G., Wood, K.J., Fallah-Arani, F., and Jones, N.D. (2013). A diametric role for OX40 in the response of effector/memory CD4+ T cells and regulatory T cells to alloantigen. *J Immunol* *191*, 1465-1475. [10.4049/jimmunol.1300553](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300553).
55. Gramaglia, I., Weinberg, A.D., Lemon, M., and Croft, M. (1998). Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. *J Immunol* *161*, 6510-6517.
56. Pollok, K.E., Kim, Y.J., Zhou, Z., Hurtado, J., Kim, K.K., Pickard, R.T., and Kwon, B.S. (1993). Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function. *J Immunol* *150*, 771-781.
57. Hutloff, A., Dittrich, A.M., Beier, K.C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., and Kroczek, R.A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* *397*, 263-266. [10.1038/16717](https://doi.org/10.1038/16717).
58. Maino, V.C., Suni, M.A., and Ruitenberg, J.J. (1995). Rapid flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation. *Cytometry* *20*, 127-133. [10.1002/cyto.990200205](https://doi.org/10.1002/cyto.990200205).
59. Simms, P.E., and Ellis, T.M. (1996). Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation. *Clin Diagn Lab Immunol* *3*, 301-304. [10.1128/cdli.3.3.301-304.1996](https://doi.org/10.1128/cdli.3.3.301-304.1996).
60. Reiss, S., Baxter, A.E., Cirelli, K.M., Dan, J.M., Morou, A., Daigneault, A., Brassard, N., Silvestri, G., Routy, J.P., Havenar-Daughton, C., et al. (2017). Comparative analysis of activation induced marker (AIM) assays for sensitive identification of antigen-specific CD4 T cells. *PLoS One* *12*, e0186998. [10.1371/journal.pone.0186998](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186998).

61. Porichis, F., Hart, M.G., Zupkosky, J., Barblu, L., Kwon, D.S., McMullen, A., Brennan, T., Ahmed, R., Freeman, G.J., Kavanagh, D.G., and Kaufmann, D.E. (2014). Differential impact of PD-1 and/or interleukin-10 blockade on HIV-1-specific CD4 T cell and antigen-presenting cell functions. *J Virol* 88, 2508-2518. 10.1128/jvi.02034-13.
62. Kamphorst, A.O., Wieland, A., Nasti, T., Yang, S., Zhang, R., Barber, D.L., Konieczny, B.T., Daugherty, C.Z., Koenig, L., Yu, K., et al. (2017). Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent. *Science* 355, 1423-1427. 10.1126/science.aaf0683.
63. Béziat, V., Rapaport, F., Hu, J., Titeux, M., Bonnet des Claustres, M., Bourgey, M., Griffin, H., Bandet, É., Ma, C.S., Sherkat, R., et al. (2021). Humans with inherited T cell CD28 deficiency are susceptible to skin papillomaviruses but are otherwise healthy. *Cell* 184, 3812-3828.e3830. 10.1016/j.cell.2021.06.004.
64. Welten, S.P., Redeker, A., Franken, K.L., Oduro, J.D., Ossendorp, F., Čičin-Šain, L., Melief, C.J., Aichele, P., and Arens, R. (2015). The viral context instructs the redundancy of costimulatory pathways in driving CD8(+) T cell expansion. *Elife* 4. 10.7554/eLife.07486.
65. Saoulli, K., Lee, S.Y., Cannons, J.L., Yeh, W.C., Santana, A., Goldstein, M.D., Bangia, N., DeBenedette, M.A., Mak, T.W., Choi, Y., and Watts, T.H. (1998). CD28-independent, TRAF2-dependent costimulation of resting T cells by 4-1BB ligand. *J Exp Med* 187, 1849-1862. 10.1084/jem.187.11.1849.
66. Borowski, A.B., Boesteanu, A.C., Mueller, Y.M., Carafides, C., Topham, D.J., Altman, J.D., Jennings, S.R., and Katsikis, P.D. (2007). Memory CD8+ T cells require CD28 costimulation. *J Immunol* 179, 6494-6503. 10.4049/jimmunol.179.10.6494.
67. Ndejemi, M.P., Teijaro, J.R., Patke, D.S., Bingaman, A.W., Chandok, M.R., Azimzadeh, A., Nadler, S.G., and Farber, D.L. (2006). Control of memory CD4 T cell recall by the CD28/B7 costimulatory pathway. *J Immunol* 177, 7698-7706. 10.4049/jimmunol.177.11.7698.

68. Fraser, J.D., Irving, B.A., Crabtree, G.R., and Weiss, A. (1991). Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* *251*, 313-316. 10.1126/science.1846244.
69. Verweij, C.L., Geerts, M., and Aarden, L.A. (1991). Activation of interleukin-2 gene transcription via the T-cell surface molecule CD28 is mediated through an NF-kB-like response element. *J Biol Chem* *266*, 14179-14182.
70. Lindstein, T., June, C.H., Ledbetter, J.A., Stella, G., and Thompson, C.B. (1989). Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science* *244*, 339-343. 10.1126/science.2540528.
71. Martínez-Llordella, M., Esensten, J.H., Bailey-Bucktrout, S.L., Lipsky, R.H., Marini, A., Chen, J., Mughal, M., Mattson, M.P., Taub, D.D., and Bluestone, J.A. (2013). CD28-inducible transcription factor DEC1 is required for efficient autoreactive CD4+ T cell response. *J Exp Med* *210*, 1603-1619. 10.1084/jem.20122387.
72. Clerici, M., Hakim, F.T., Venzon, D.J., Blatt, S., Hendrix, C.W., Wynn, T.A., and Shearer, G.M. (1993). Changes in interleukin-2 and interleukin-4 production in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive individuals. *J Clin Invest* *91*, 759-765. 10.1172/jci116294.
73. Westby, M., Marriott, J.B., Guckian, M., Cookson, S., Hay, P., and Dalgleish, A.G. (1998). Abnormal intracellular IL-2 and interferon-gamma (IFN-gamma) production as HIV-1-associated markers of immune dysfunction. *Clin Exp Immunol* *111*, 257-263. 10.1046/j.1365-2249.1998.00505.x.
74. Clerici, M., and Shearer, G.M. (1993). A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today* *14*, 107-111. 10.1016/0167-5699(93)90208-3.
75. Klein, S.A., Dobmeyer, J.M., Dobmeyer, T.S., Pape, M., Ottmann, O.G., Helm, E.B., Hoelzer, D., and Rossol, R. (1997). Demonstration of the Th1 to Th2 cytokine shift during the course of HIV-1 infection using cytoplasmic cytokine detection on single cell level by flow cytometry. *Aids* *11*, 1111-1118. 10.1097/00002030-199709000-00005.

76. Le Hingrat, Q., Sereti, I., Landay, A.L., Pandrea, I., and Apetrei, C. (2021). The Hitchhiker Guide to CD4(+) T-Cell Depletion in Lentiviral Infection. A Critical Review of the Dynamics of the CD4(+) T Cells in SIV and HIV Infection. *Front Immunol* *12*, 695674. 10.3389/fimmu.2021.695674.
77. Lu, L., Li, X., Liu, X., Qiu, Z., Han, Y., Song, X., Li, Y., Li, X., Cao, W., Lv, W., et al. (2022). The pattern and magnitude of T cell subsets reconstitution during ten years of ART with viral suppression in HIV-infected patients. *Aging (Albany NY)* *14*, 9647-9667. 10.18632/aging.204416.
78. Renault, C., Veyrenche, N., Mennechet, F., Bedin, A.S., Routy, J.P., Van de Perre, P., Reynes, J., and Tuaille, E. (2022). Th17 CD4+ T-Cell as a Preferential Target for HIV Reservoirs. *Front Immunol* *13*, 822576. 10.3389/fimmu.2022.822576.
79. Kaufmann, D.E., Kavanagh, D.G., Pereyra, F., Zaunders, J.J., Mackey, E.W., Miura, T., Palmer, S., Brockman, M., Rathod, A., Piechocka-Trocha, A., et al. (2007). Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat Immunol* *8*, 1246-1254. 10.1038/ni1515.
80. Jones, R.B., Ndhlovu, L.C., Barbour, J.D., Sheth, P.M., Jha, A.R., Long, B.R., Wong, J.C., Satkunarajah, M., Schwenker, M., Chapman, J.M., et al. (2008). Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J Exp Med* *205*, 2763-2779. 10.1084/jem.20081398.
81. Youngblood, B., Noto, A., Porichis, F., Akondy, R.S., Ndhlovu, Z.M., Austin, J.W., Bordi, R., Procopio, F.A., Miura, T., Allen, T.M., et al. (2013). Cutting edge: Prolonged exposure to HIV reinforces a poised epigenetic program for PD-1 expression in virus-specific CD8 T cells. *J Immunol* *191*, 540-544. 10.4049/jimmunol.1203161.
82. Ahn, E., Youngblood, B., Lee, J., Lee, J., Sarkar, S., and Ahmed, R. (2016). Demethylation of the PD-1 Promoter Is Imprinted during the Effector Phase of CD8 T Cell Exhaustion. *J Virol* *90*, 8934-8946. 10.1128/jvi.00798-16.

83. Gianella, S., Moser, C., Vitomirov, A., McKhann, A., Layman, L., Scott, B., Caballero, G., Lada, S., Bosch, R.J., Hoenigl, M., et al. (2020). Presence of asymptomatic cytomegalovirus and Epstein–Barr virus DNA in blood of persons with HIV starting antiretroviral therapy is associated with non-AIDS clinical events. *Aids* 34, 849-857. 10.1097/qad.0000000000002484.
84. Sannier, G., Dubé, M., Dufour, C., Richard, C., Brassard, N., Delgado, G.G., Pagliuzza, A., Baxter, A.E., Niessl, J., Brunet-Ratnasingham, E., et al. (2021). Combined single-cell transcriptional, translational, and genomic profiling reveals HIV-1 reservoir diversity. *Cell Rep* 36, 109643. 10.1016/j.celrep.2021.109643.
85. Osuji, F.N., Onyenekwe, C.C., Ahaneku, J.E., and Ukibe, N.R. (2018). The effects of highly active antiretroviral therapy on the serum levels of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in HIV infected subjects. *J Biomed Sci* 25, 88. 10.1186/s12929-018-0490-9.
86. Babu, H., Ambikan, A.T., Gabriel, E.E., Svensson Akusjärvi, S., Palaniappan, A.N., Sundaraj, V., Mupanni, N.R., Sperk, M., Cheedarla, N., Sridhar, R., et al. (2019). Systemic Inflammation and the Increased Risk of Inflamm-Aging and Age-Associated Diseases in People Living With HIV on Long Term Suppressive Antiretroviral Therapy. *Front Immunol* 10, 1965. 10.3389/fimmu.2019.01965.
87. Lederman, M.M., Funderburg, N.T., Sekaly, R.P., Klatt, N.R., and Hunt, P.W. (2013). Residual immune dysregulation syndrome in treated HIV infection. *Adv Immunol* 119, 51-83. 10.1016/b978-0-12-407707-2.00002-3.
88. Cai, C.W., and Sereti, I. (2021). Residual immune dysfunction under antiretroviral therapy. *Semin Immunol* 51, 101471. 10.1016/j.smim.2021.101471.
89. Sannier, G., Nicolas, A., Dubé, M., Marchitto, L., Nayrac, M., Tastet, O., Chatterjee, D., Tauzin, A., Lima-Barbosa, R., Laporte, M., et al. (2023). A third SARS-CoV-2 mRNA vaccine dose in people receiving hemodialysis overcomes B cell defects but elicits a skewed CD4(+) T cell profile. *Cell Rep Med* 4, 100955. 10.1016/j.xcrm.2023.100955.

90. Hahne, F., LeMeur, N., Brinkman, R.R., Ellis, B., Haaland, P., Sarkar, D., Spidlen, J., Strain, E., and Gentleman, R. (2009). flowCore: a Bioconductor package for high throughput flow cytometry. *BMC Bioinformatics* 10, 106. 10.1186/1471-2105-10-106.
91. Quintelier, K., Couckuyt, A., Emmaneel, A., Aerts, J., Saeys, Y., and Van Gassen, S. (2021). Analyzing high-dimensional cytometry data using FlowSOM. *Nat Protoc* 16, 3775-3801. 10.1038/s41596-021-00550-0.
92. Nayrac, M., Dubé, M., Sannier, G., Nicolas, A., Marchitto, L., Tastet, O., Tauzin, A., Brassard, N., Lima-Barbosa, R., Beaudoin-Bussièrès, G., et al. (2022). Temporal associations of B and T cell immunity with robust vaccine responsiveness in a 16-week interval BNT162b2 regimen. *Cell Rep* 39, 111013. 10.1016/j.celrep.2022.111013.
93. John, C.R., Watson, D., Russ, D., Goldmann, K., Ehrenstein, M., Pitzalis, C., Lewis, M., and Barnes, M. (2020). M3C: Monte Carlo reference-based consensus clustering. *Sci Rep* 10, 1816. 10.1038/s41598-020-58766-1.
94. Wickham, H. (2016). *ggplot2 Elegant Graphics for Data Analysis* (Springer Cham).
95. Kolde, R. (2019). *pheatmap: Pretty Heatmaps*.

FIGURES

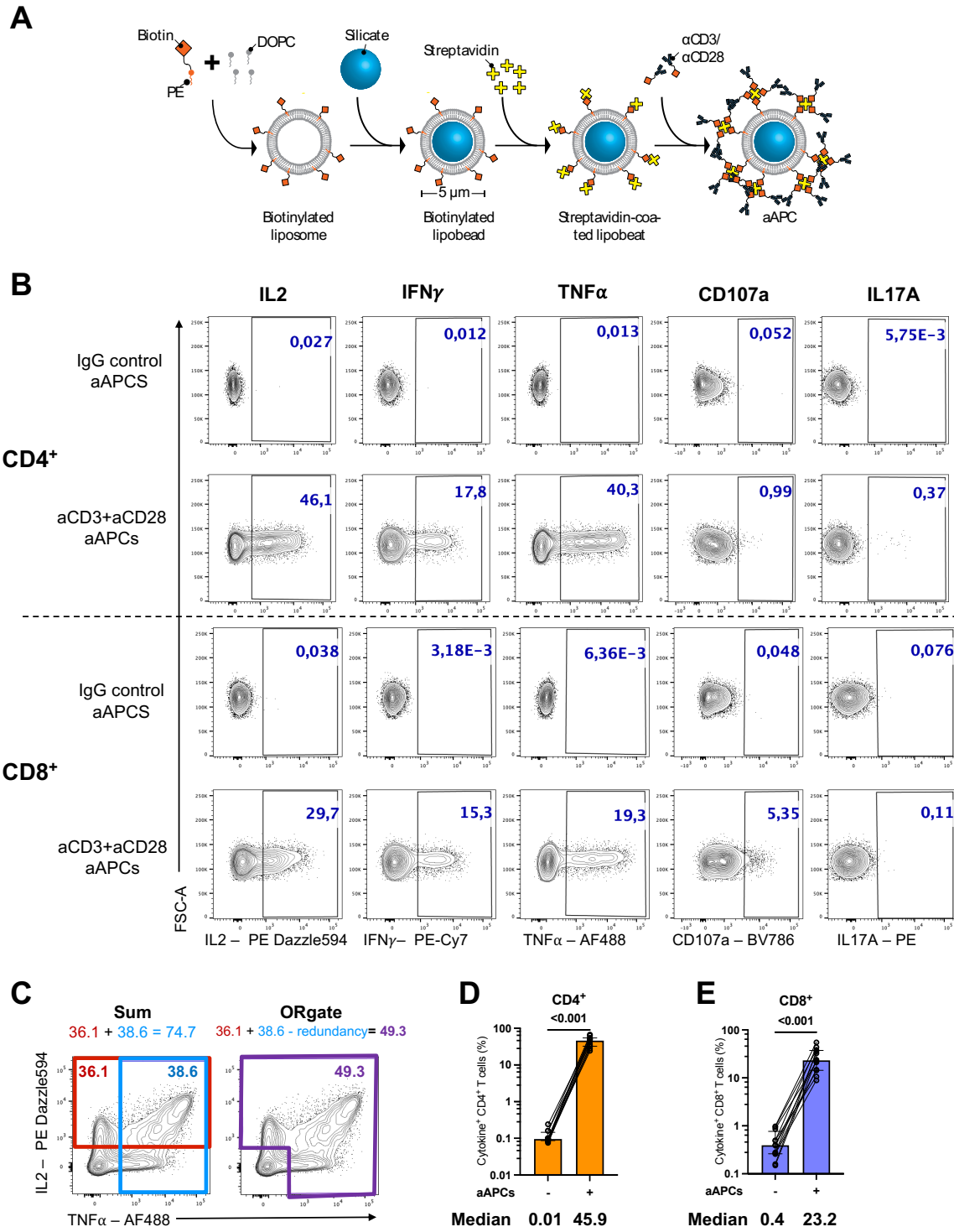


Figure 1

Figure 1. aAPCs induce a robust cytokine production in CD4⁺ and CD8⁺ T cells. (A) Schematic representation of aAPCs preparation. **(B)** Representative flow cytometry plots of cytokines expression in CD4⁺ and CD8⁺ T cells after 15h of aAPCs (aCD3:aCD28:IgG 1:4:0) stimulation of purified T cells from UD. The unstimulated condition represents T cells incubated with control IgG aAPCs (aCD3:aCD28:IgG 0:0:5). **(C)** Diagram explaining OR Boolean combination gating. For simplicity, only IL-2 and TNF α in CD4⁺ T cells are shown. **(D-E)** Total cytokine⁺ **(D)** CD4⁺ or **(E)** CD8⁺ T cells defined by ORgate in 12 uninfected donors. Wilcoxon test results are shown. Medians are indicated below the graphs. Error bars represent interquartile range.

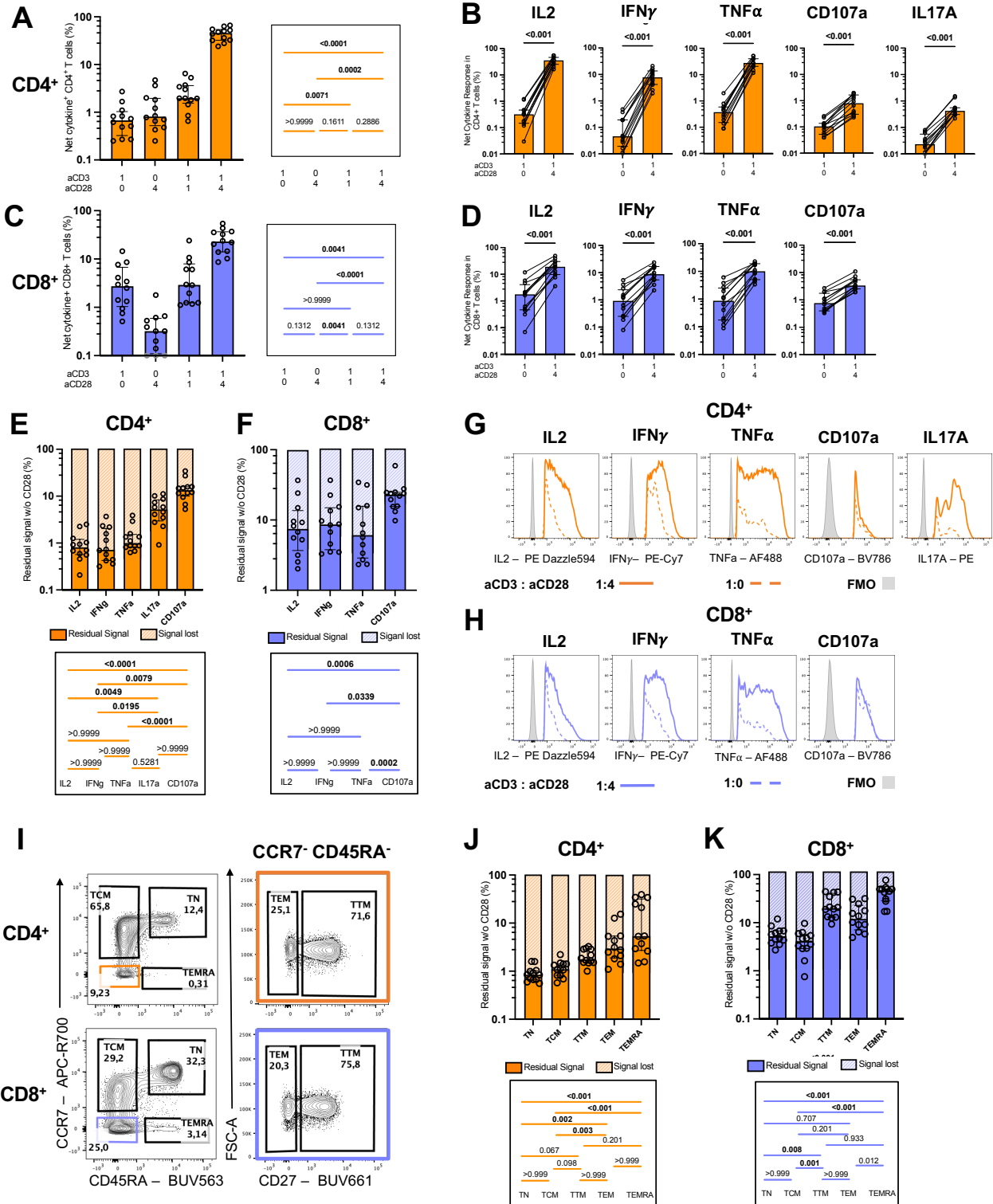


Figure 2

Figure 2. CD28 co-stimulation differentially enhances effector functions in T cells.

(A-D) Net cytokine⁺ responses after background subtraction. Net ORgate cytokine⁺ **(A)** CD4⁺ and **(C)** CD8⁺ T cells responses to aAPCs stimulation with different aCD3:aCD28 ratios in purified T cells. Individual net cytokine production in **(B)** CD4⁺ and **(D)** CD8⁺ T cells when stimulated with aCD3 aAPCs (aCD3:aCD28:IgG 1:0:4) compared to aCD3+aCD28 aAPCs (aCD3:aCD28:IgG 1:4:0). Wilcoxon test results are shown. **(E-F)** Percentage of residual cytokine⁺ signal when activating with aCD3 aAPCs compared to aCD3+aCD28 aAPCs in **(E)** CD4⁺ and **(F)** CD8⁺ T cells. **(G-H)** Median fluorescence intensity (MFI) of each cytokine expression in **(G)** CD4⁺ and **(H)** CD8⁺ T cells when stimulated with aCD3 aAPCs (aCD3:aCD28:IgG 1:0:4) compared to aCD3+aCD28 aAPCs (aCD3:aCD28:IgG 1:4:0). **(I)** Gating strategy to define memory subsets. The populations boxed in color were further analyzed for CD27 expression, on the right. **(J-K)** Percentage of residual ORgate cytokine⁺ signal in CD4⁺ and CD8⁺ memory subsets when activating with aCD3 aAPCs compared to aCD3+aCD28. In **(A-F, J-K)**, n=12. Friedman test was used in **(A, C, E, F, J, K)**. Error bars represent interquartile range.

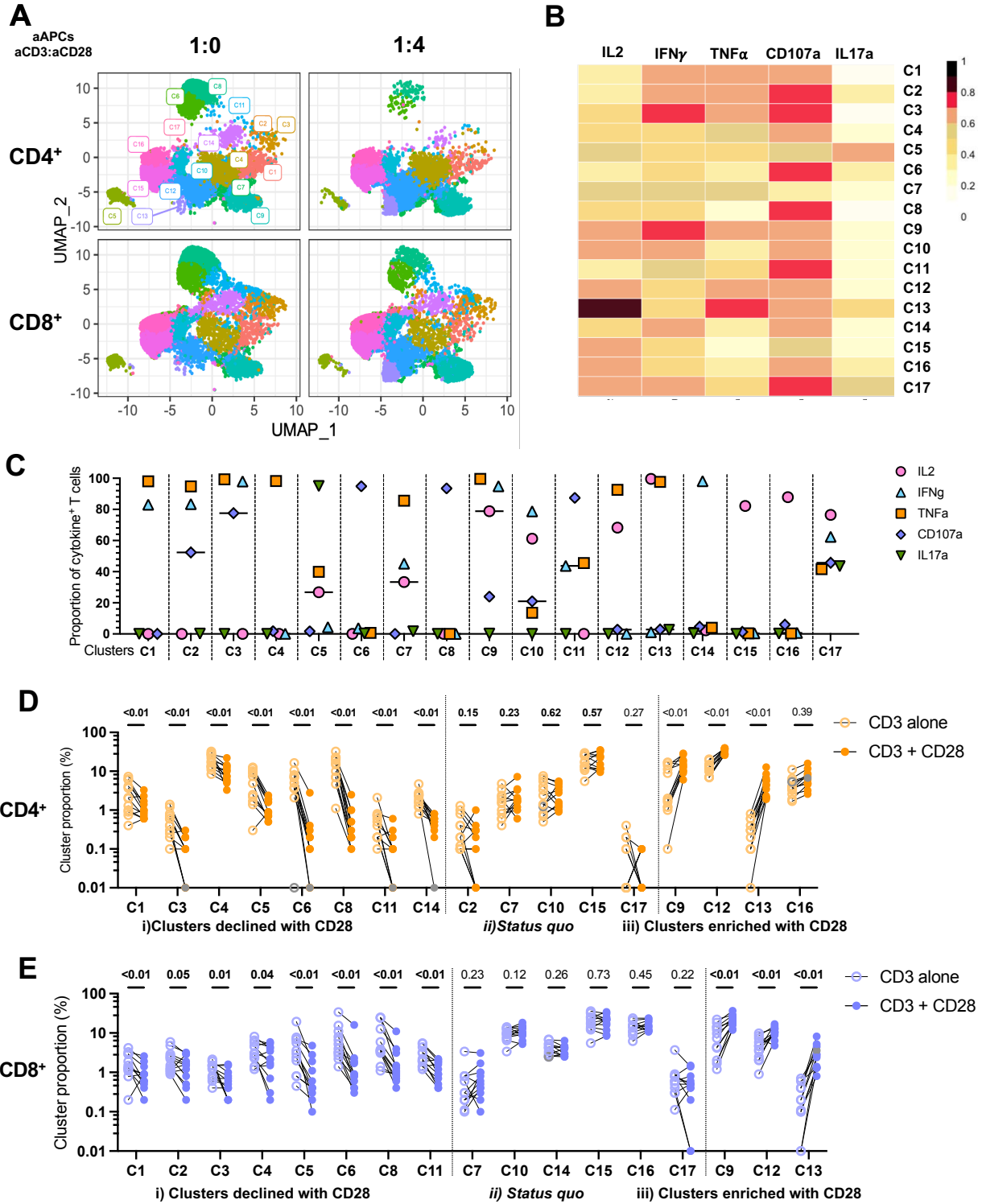


Figure 3

Figure 3. Responsiveness of IL-2 to CD28 co-stimulation shapes the effector profile.

(A) Multiparametric UMAP representation of cytokine⁺ CD4⁺ and CD8⁺ activated T cells from UD, based on IL-2, IFN γ , TNF α , CD107a and IL-17A expression at two stimulation conditions (aCD3:aCD28:IgG): 1:0:4 and 1:4:0. **(B)** Heat map summarizing the MFI of each parameter for each cluster. **(C)** Proportion of cytokine⁺ cells in each cluster. **(D-E)** Proportion of each cytokine⁺ cluster for CD4⁺ **(D)** and CD8⁺ **(E)** T cells in uninfected participants. Wilcoxon paired tests are shown. In **(A-E)**, n = 12.

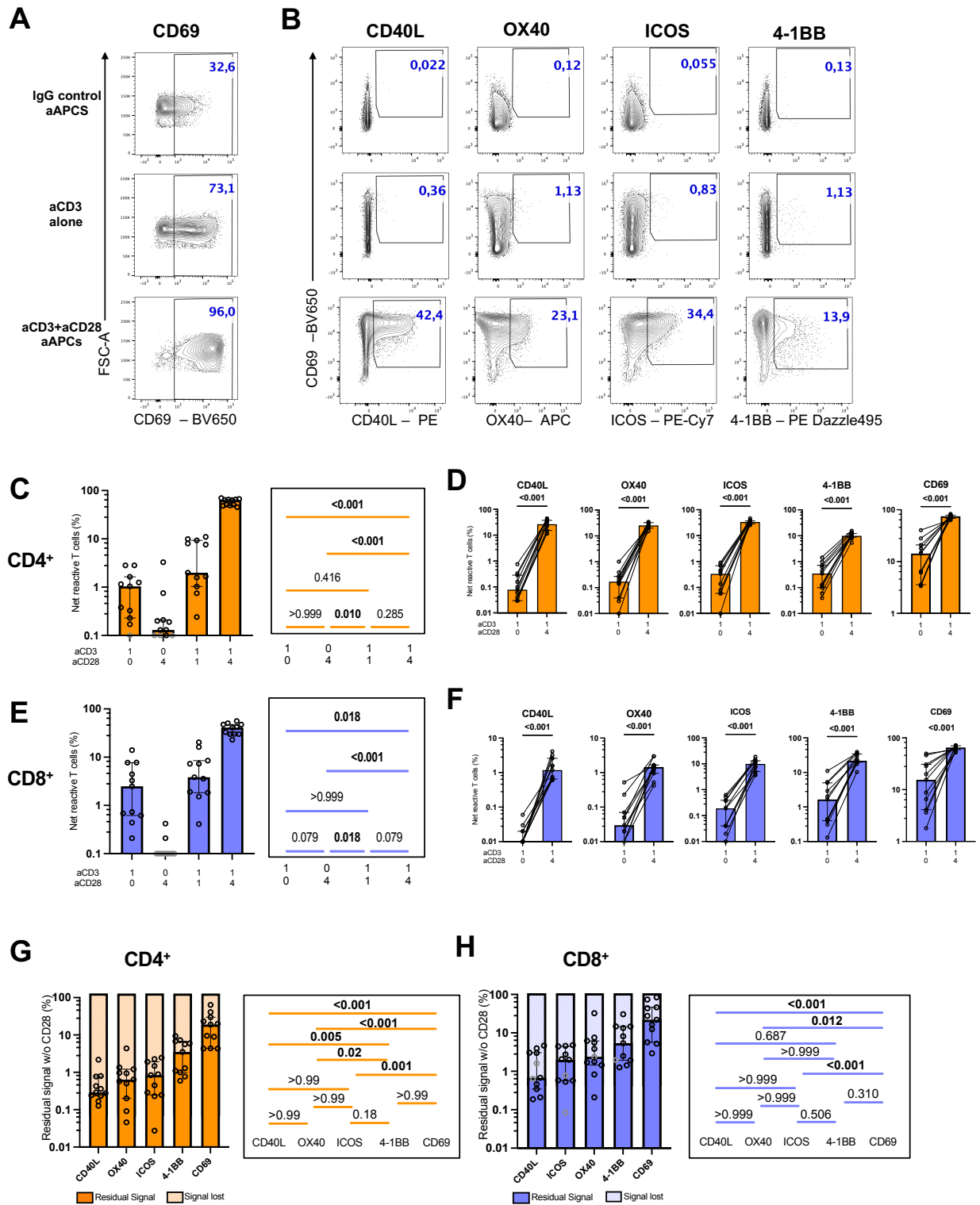


Figure 4

Figure 4. CD28 co-stimulation enhances expression of co-stimulatory molecules. (A-B) Representative flow cytometry plots of purified CD4⁺ T cells stimulated with indicated aAPCs for 15h. (A) CD69 expression. (B) Co-expression of CD69 and other activation molecules. (C-F) Net CD4 and CD8 T cell responses. Global responses for (C) CD4 and (E) CD8 responses are shown, then for each tested function for (D) CD4 and (F) CD8. (G-H) Percentage of residual activation molecule signal when activating without CD28 in CD4⁺ (G) and CD8⁺ (H) T cells. In (C-H), n=12. Friedman tests are shown on the right of the histograms in (C, E, G, H). Error bars represent interquartile range.

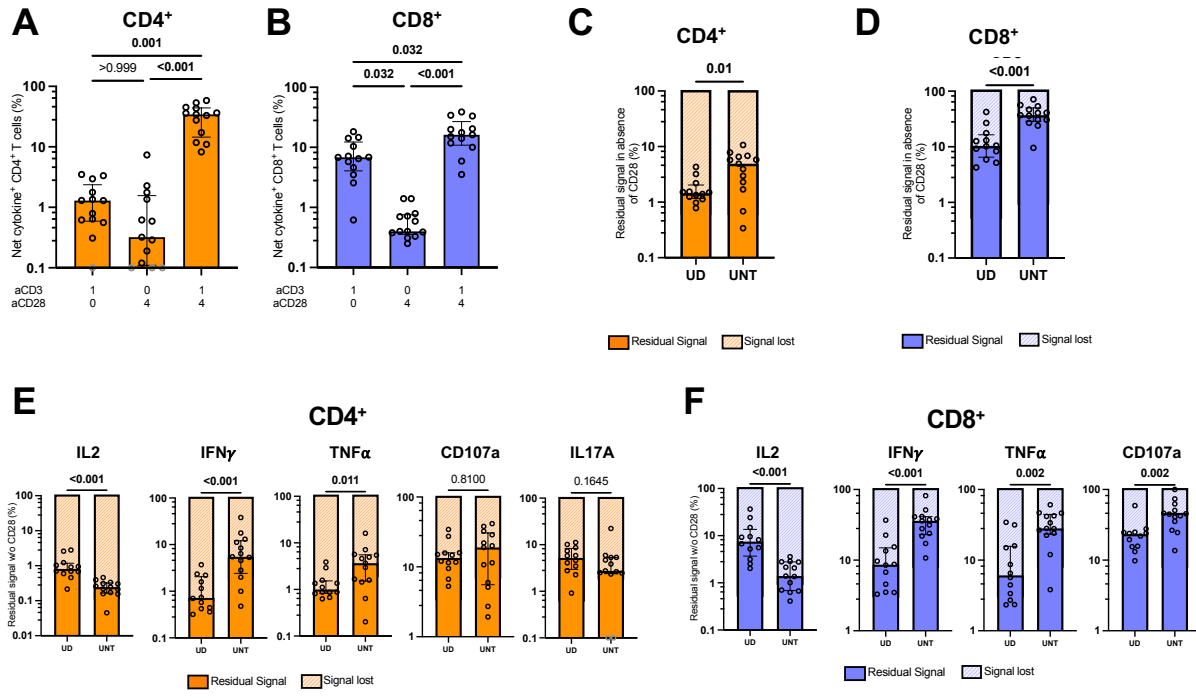


Figure 5

Figure 5. Cytokine-specific dependence on CD28 co-stimulation in untreated HIV infection. (A-B) Net CD4⁺ **(A)** and CD8⁺ **(B)** cytokine⁺ T cells from UNT PWH after aAPCs stimulation. Friedman test was used. **(C-D)** Comparison of residual signal in the absence of CD28 co-stimulation for cytokine⁺ CD4⁺ **(C)** or CD8⁺ **(D)** T cells. **(E-F)** Comparison of residual signal in the absence of CD28 co-stimulation in CD4⁺ **(E)** or CD8⁺ **(F)** T cells between UD and UNT for each individual cytokine. In **(C-F)**, Mann-Whitney test results are shown. In **(A-F)**, n=12. Error bars represent the interquartile range.

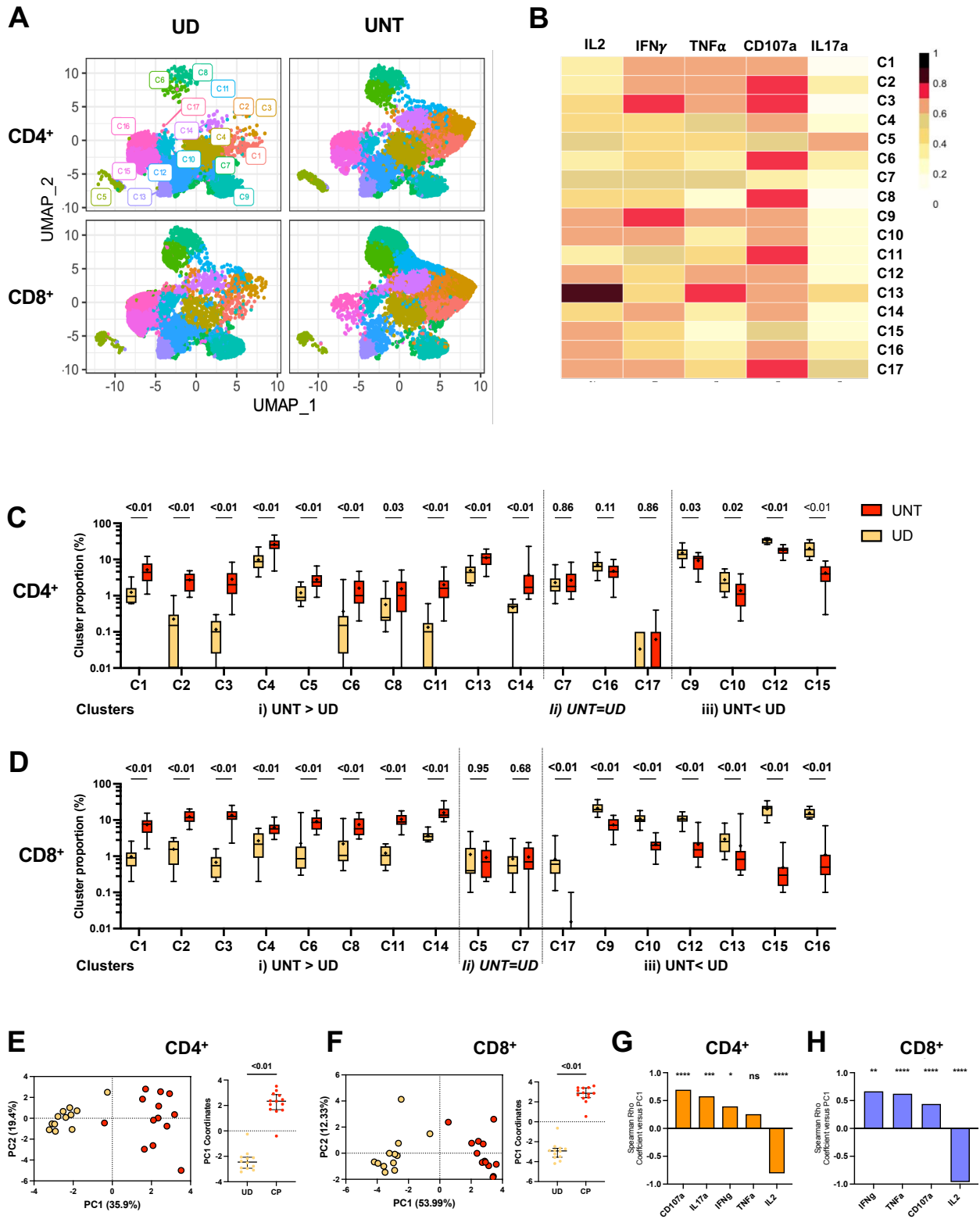


Figure 6

Figure 6. Untreated PWH's CD4⁺ and CD8⁺ T cells show skewed effector functions. **(A)** Multiparametric UMAP representation of cytokine⁺ CD4⁺ and CD8⁺ T cells from UD or UNT, based on IL-2, IFN γ , TNF α , CD107a and IL-17A expression after stimulation with aAPCs (aCD3:aCD28:IgG 1:4:0). The colors identify 17 populations clustered by unsupervised analysis. **(B)** Heat map summarizing the MFI of each parameter for each cluster. **(C-D)** Proportion of clusters among cytokine⁺ CD4⁺ **(C)** and CD8⁺ **(D)** T cells in UD vs UNT. **(E-F)** Global PCA analysis (on the left) done with the proportion of clusters in cytokine⁺ CD4⁺ **(E)** or CD8⁺ **(F)** activated T cells. The percentage on the x and y axes represents the variance attributed to PC1 and PC2, respectively. On the right, plots of the PC1 and PC2 between groups are shown. **(G-H)** Spearman correlations between each individual cytokine and PC1 (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001). In **(C-F)**, Mann-Whitney test results are shown. In **(A-H)**, UD n=12, UNT n=13. Error bars represent interquartile range.

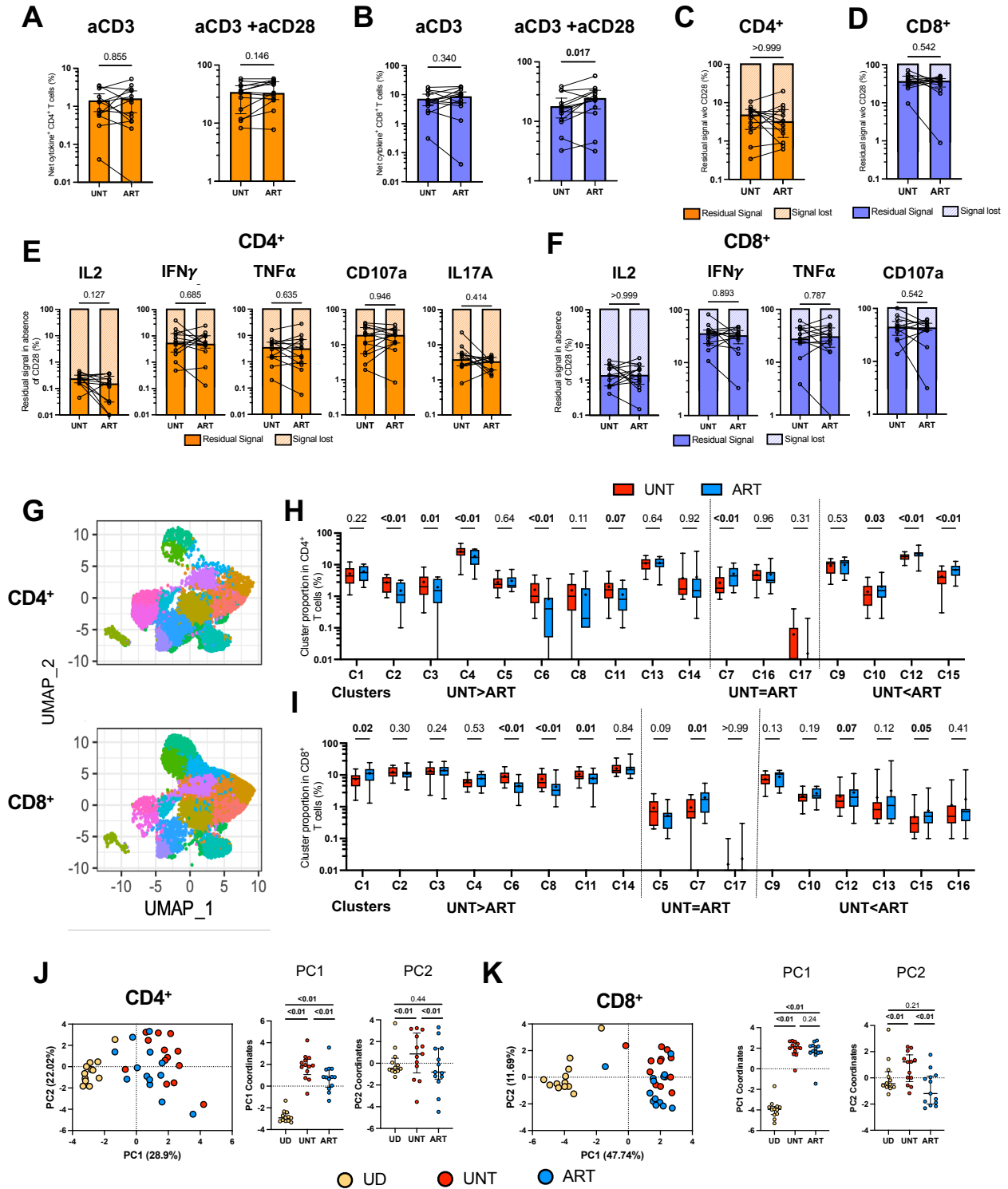


Figure 7

Figure 7. ART initiation in PWH partially normalizes cytokine profiles in CD4⁺ T cells, with limited impact on CD8⁺ T cells. (A-B) Comparison of cytokine⁺ CD4⁺ **(A)** or CD8⁺ **(B)** T cells from UNT and ART when activated by aAPCs. **(C-D)** Comparison of residual signal in the absence of CD28 co-stimulation of total cytokine⁺ CD4⁺ **(C)** or CD8⁺ **(D)** T cells between UNT and ART. **(E-F)** Comparison of residual signal in the absence of CD28 co-stimulation in CD4⁺ **(E)** or CD8⁺ **(F)** T cells between UNT and ART for each individual cytokine. **(G)** Multiparametric UMAP representation of cytokine⁺ CD4⁺ and CD8⁺ T cells from ART, based on IL-2, IFN γ , TNF α , CD107a, and IL-17A expression after stimulation with aAPCs (aCD3:aCD28:IgG 1:4:0). The colors identify 17 populations clustered by unsupervised analysis using Phenograph. **(H-I)** Proportions of clusters among cytokine⁺ CD4⁺ **(H)** and CD8⁺ **(I)** T cells in UNT vs ART. **(J-K)** Global PCA analysis (on the left) done with proportion of clusters in cytokine⁺ CD4⁺ **(J)** or CD8⁺ **(K)** activated T cells. The percentage on the x and y axes presents the variance attributed to PC1 and PC2, respectively. On the right, plots of the PC1 and PC2 between group are shown. In **(A-K)**, UNT n=13, ART n=13. Wilcoxon test was used for paired comparisons between UNT and ART.

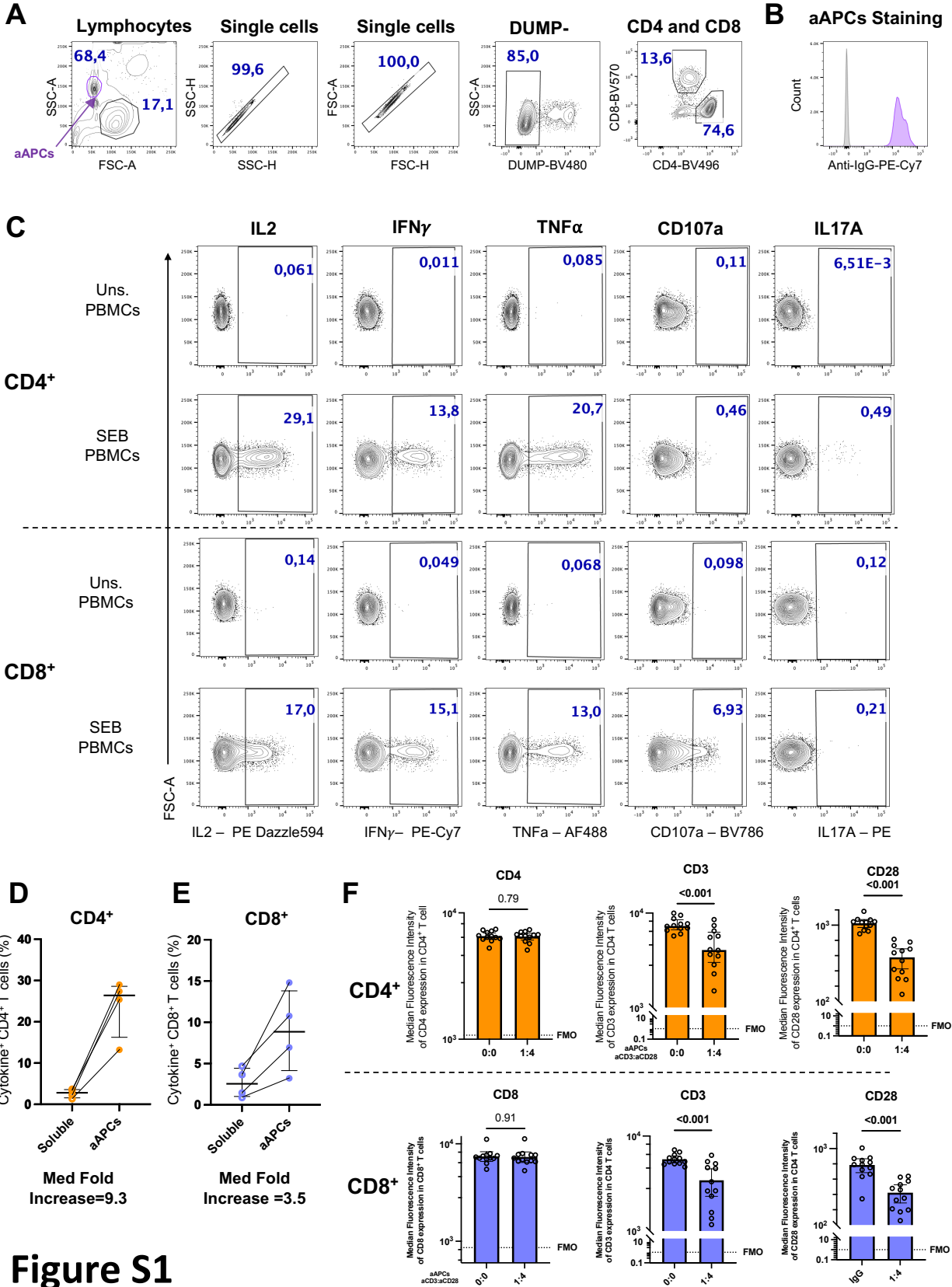


Figure S1. T cell activation by aAPCs. Related to Figure 1. (A) Gating strategy for identifying CD4⁺ and CD8⁺ T cells. DUMP channel is used to exclude dead cells (aquavidin), B cells (CD19) and monocytes (CD14). **(B)** Staining of aCD3 and aCD28 on aAPCs with anti-IgG. **(C)** Representative flow cytometry plots showing cytokine expression in CD4⁺ and CD8⁺ T cells following 15h of SEB stimulation in total PBMCs. **(D-E)** Net cytokine⁺ CD4⁺ **(D)** and CD8⁺ **(E)** T cells after activation with aAPCs aCD3:aCD28:IgG at a ratio of 1:4:0 or with equivalent amounts of soluble aCD3 and aCD28. N=4, Wilcoxon test is shown. **(F)** Median fluorescence intensity (MFI) of different surface markers' expression on CD4⁺ T cells (upper panel) or CD8⁺ T cells (lower panel) after stimulation with different conditions of aAPCs for 15h. N=12, Wilcoxon test results are shown.

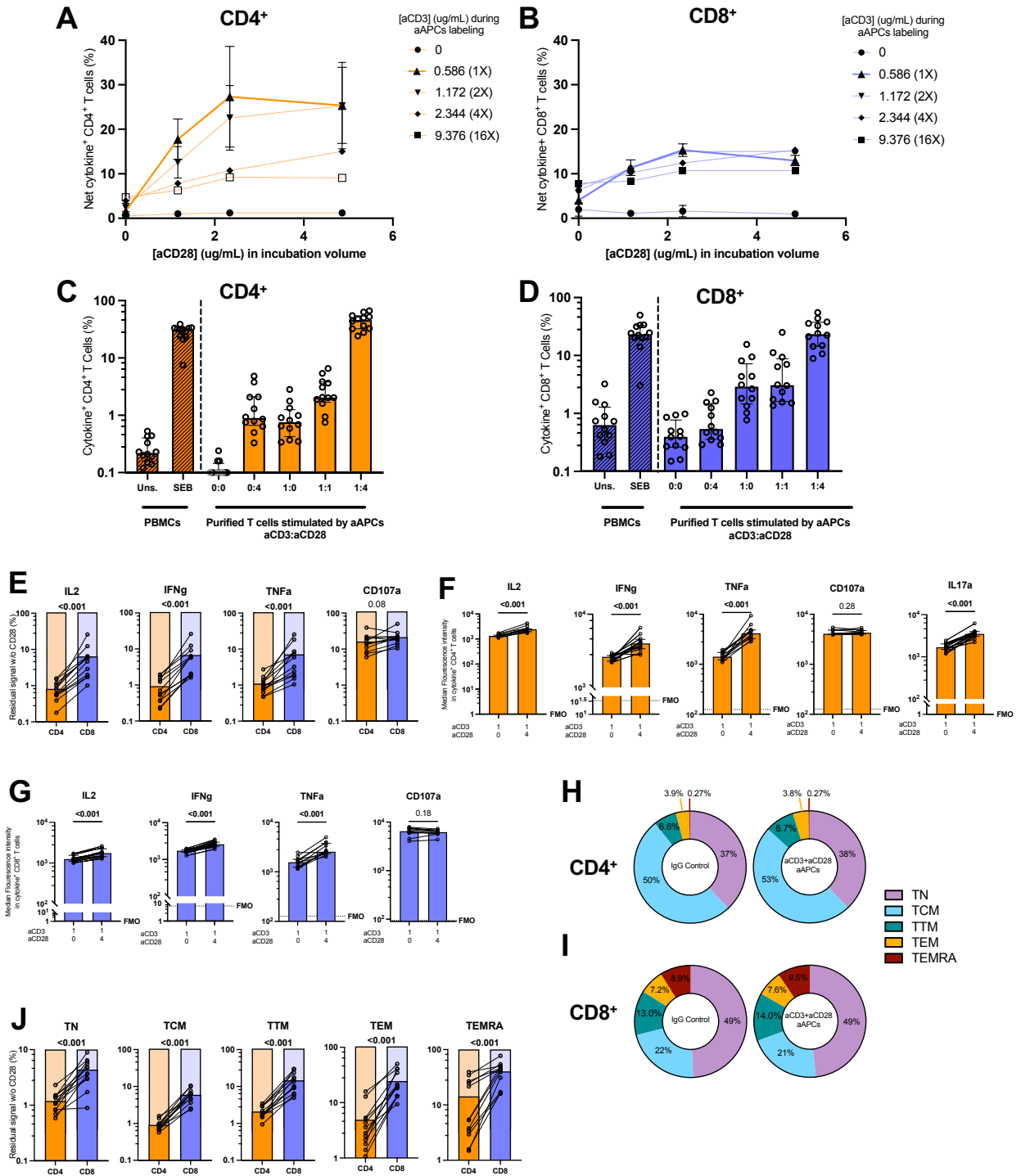


Figure S2

Figure S2. CD28 co-stimulation enhances effector functions in CD4⁺ and CD8⁺ T cells to varying degrees. Related to Figure 2. (A-B) Percentage of cytokine⁺ cells when stimulated with aAPCs at different aCD3:CD28 ratios for 6h in CD4⁺ **(A)** and CD8⁺ **(B)** T cells. N=2, except for [aCD3]=2.344 and 9.376 μg/mL, N=1. **(C-D)** Raw cytokine⁺ CD4⁺ **(C)** or CD8⁺ **(D)** T cell responses to SEB stimulation in total PBMCs (left) and to aAPCs stimulation with different aCD3:aCD28 ratios in purified T cells (right). **(E)** Percentage of residual cytokine⁺ signal when activating with aCD3 aAPCs compared to aCD3+aCD28 in CD4⁺ vs CD8⁺ T cells. **(F-G)** Median fluorescence intensity (MFI) of each gated cytokine⁺ in CD4⁺ **(F)** or CD8⁺ **(G)** T cells when stimulated with aCD3 aAPCs compared to aCD3+aCD28 aAPCs. **(H-I)** Median proportions of each memory subset in CD4⁺ **(H)** or CD8⁺ **(I)** T cells. **(J)** Percentage of residual cytokine⁺ signal when activating with aCD3 aAPCs compared to aCD3+aCD28 in different CD4⁺ vs CD8⁺ T cells memory subsets. **(C-J)** N=12. In **(E-J,H)**, Wilcoxon test was used for paired comparisons.

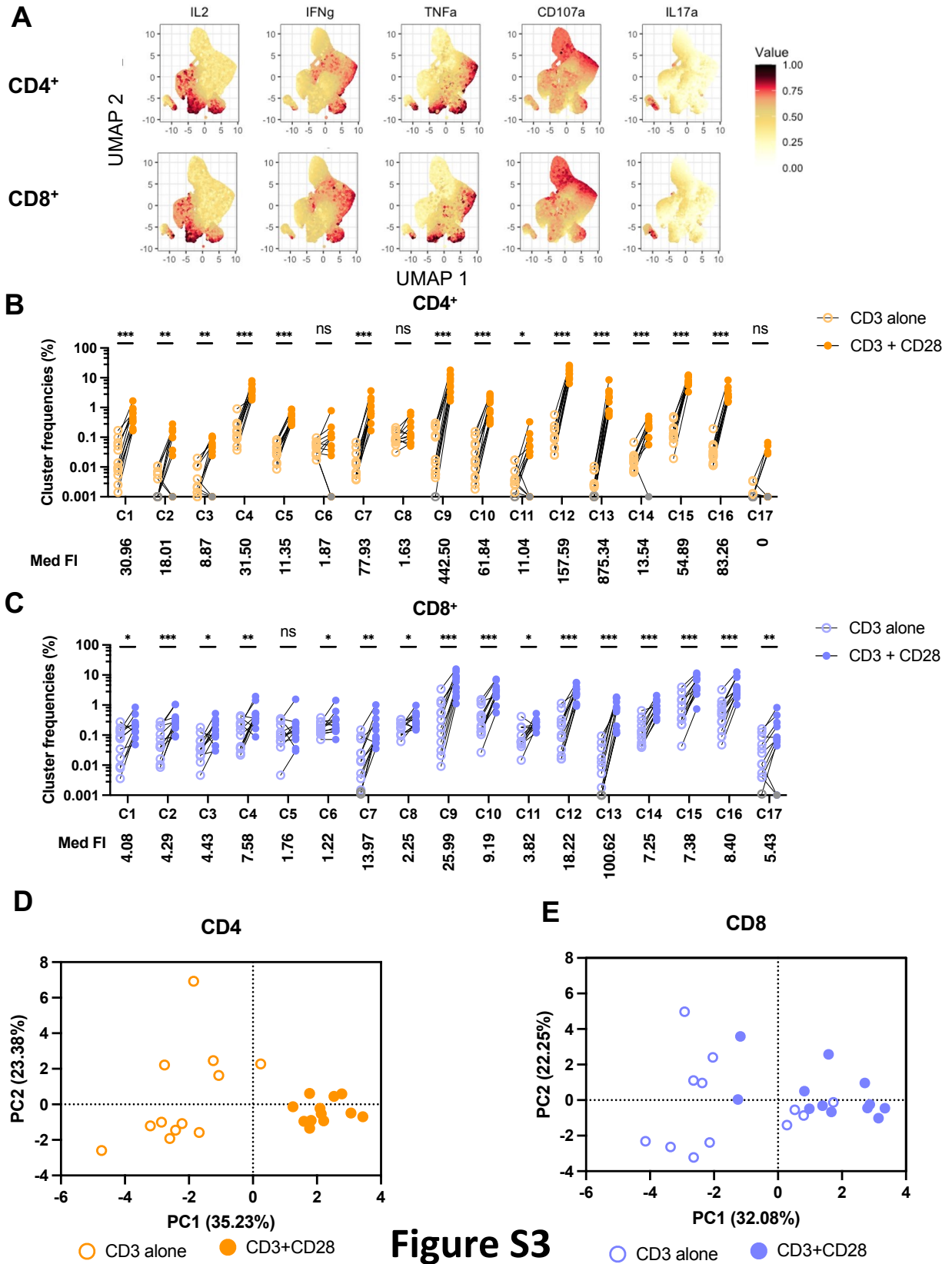


Figure S3

Figure S3. High responsiveness of IL-2 to CD28 co-stimulation shapes the effector profile. Related to Figure 3. (A) Heat map overlaid on the cytokine⁺ UMAP showing the gradient of expression for each cytokine. **(B-C)** Frequencies of cytokine⁺ clusters among cytokine⁺ CD4⁺ **(B)** and CD8⁺ **(C)** T cells in UD. (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001). **(D-E)** Global PCA analysis using the proportions of clusters in cytokine⁺ CD4⁺ **(D)** and CD8⁺ **(E)** activated T cells. The percentage on the x and y axes presents the variance attributed to PC1 and PC2, respectively.

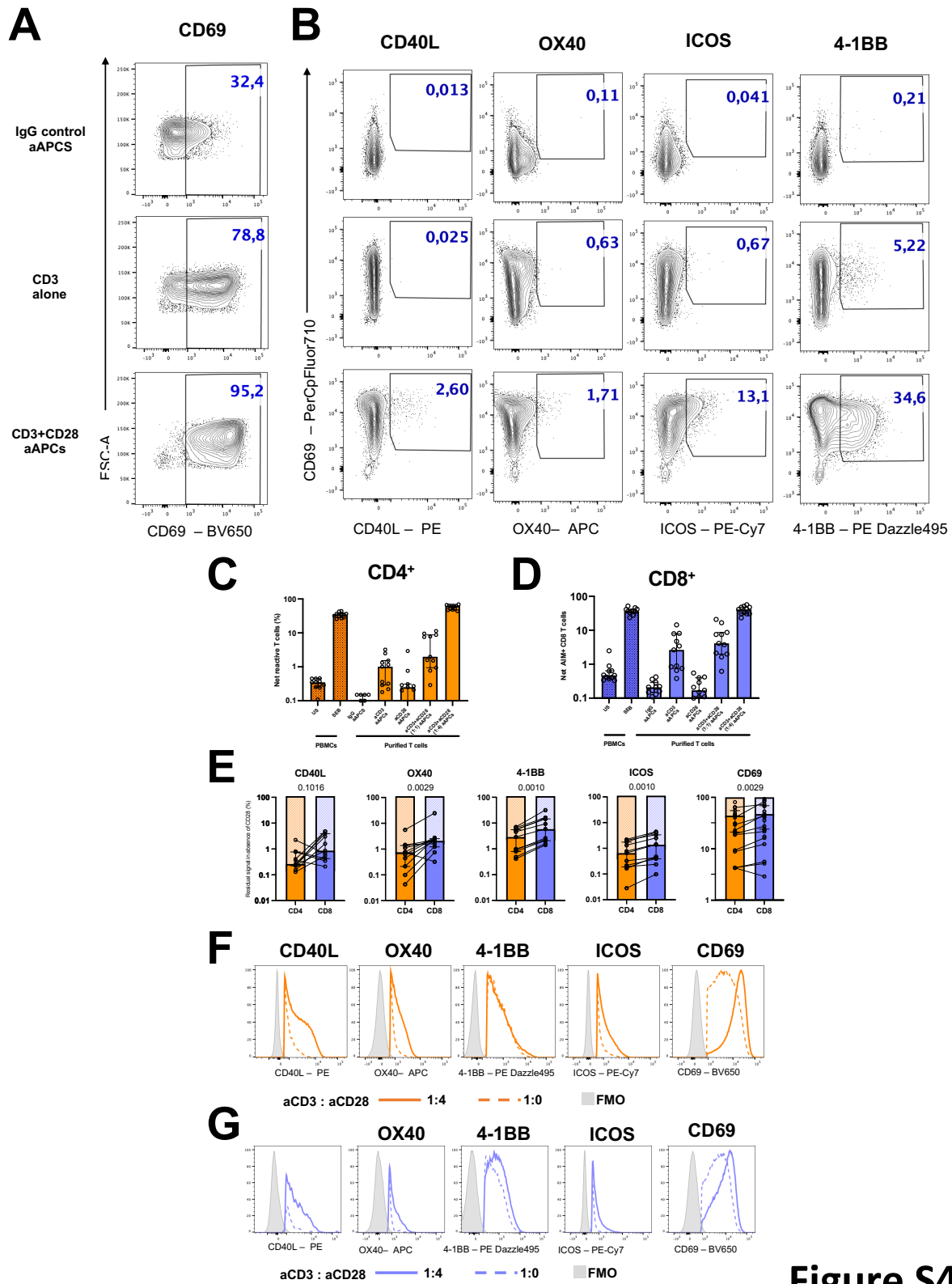


Figure S4

Figure S4. CD28 co-stimulation induces expression of other co-stimulatory molecules. Related to Figure 4. (A-B) Representative flow cytometry plots of CD69 **(A)** or co-stimulatory molecules **(B)** expression in CD8⁺ T cells following 15h aAPCs (aCD3:aCD28:IgG) stimulation of 1:0:4 or 1:4:0 in purified T cells. **(C-D)** Raw CD4⁺ **(C)** or CD8⁺ **(D)** T cells responses to SEB in total PBMCs and to aAPCs stimulation with different aCD3:aCD28 ratios in purified T cells. **(E)** Percentage of residual signal in absence of CD28 costimulation in CD4⁺ vs CD8⁺ T cells. Wilcoxon test result is shown. **(F-G)** Representative examples of median fluorescence intensity (MFI) of each cytokine expression in CD4⁺ and CD8⁺ T cells when stimulated with aCD3 aAPCs (aCD3:aCD28:IgG 1:0:4) compared to aCD3+aCD28 aAPCs (aCD3:aCD28:IgG 1:4:0). In **(C-G)**, n=12. In **(C-E)**, error bars represent interquartile range.

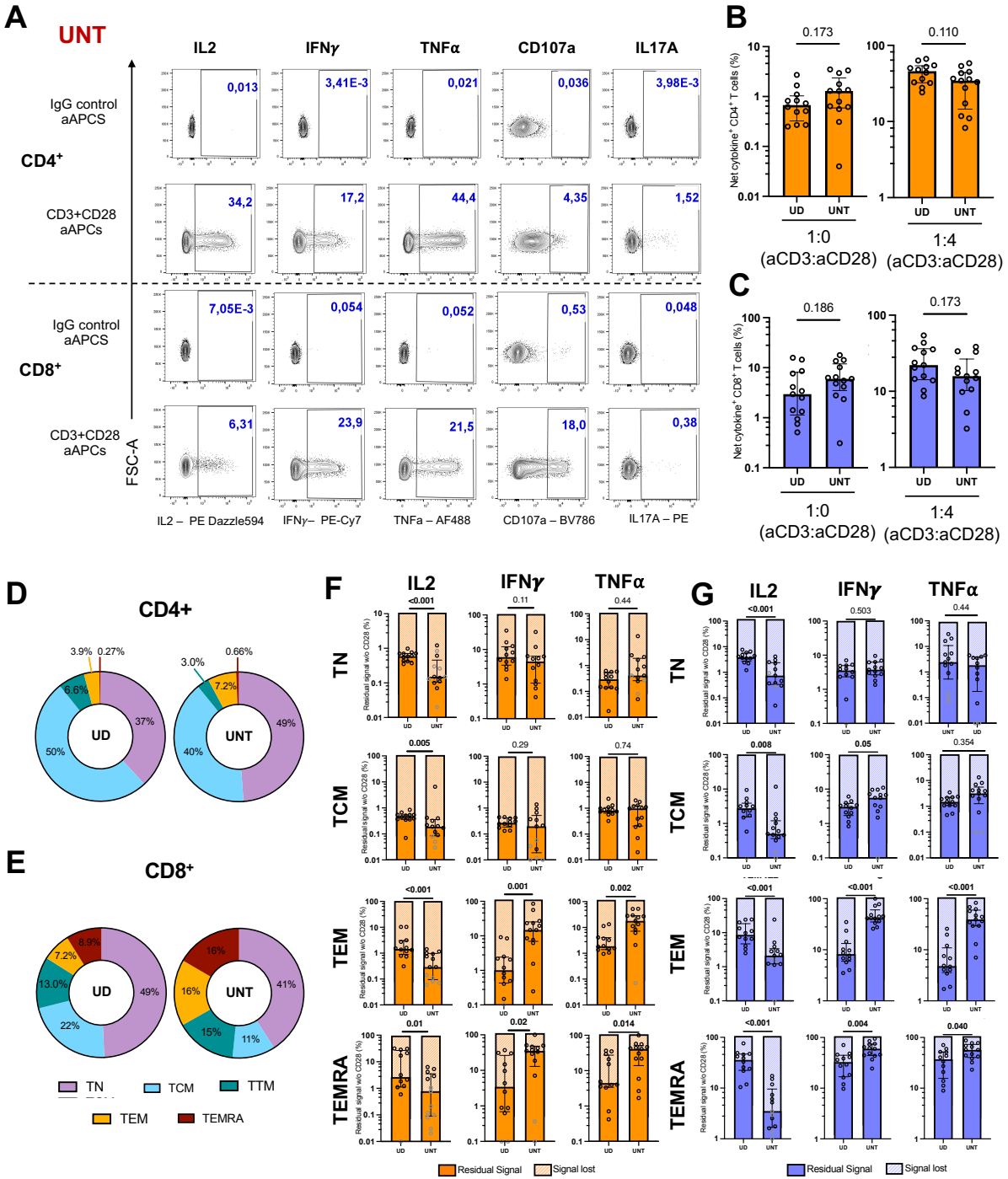


Figure S5

Figure S5. Altered Dependency of IL-2, IFN γ , and TNF α on CD28 co-stimulation in HIV infection. Related to Figure 6. (A) Representative flow cytometry plots of cytokine expression in CD4⁺ and CD8⁺ T cells following 15h aAPCs (aCD3:aCD28:IgG 1:4:0) stimulation in purified T cells from UNT PWH. Unstimulated conditions represent T cells incubated with control IgG aAPCs (aCD3:aCD28:IgG 0:0:5). **(B-C)** Net cytokine⁺ CD4⁺ **(B)** and CD8⁺ **(C)** T cells responses to aCD3 aAPCs (aCD3:aCD28:IgG 1:0:4) stimulation of purified T cells from UD vs UNT. **(D-E)** Net cytokine⁺ CD4⁺ **(D)** and CD8⁺ **(E)** T cells responses to aAPCs (aCD3:aCD28:IgG 1:4:0) stimulation of purified T cells from UD vs UNT. **(F-G)** Median proportion of memory subsets in CD4⁺ **(F)** or CD8⁺ **(G)** T cells from UD or UNT cohorts. **(H-I)** Comparison of residual signal in the absence of CD28 co-stimulation in each memory subset of CD4⁺ **(H)** or CD8⁺ **(I)** T cells between UD and UNT for each individual cytokine. In **(B-I)**, Mann-Whitney test results are shown. In **(B-I)**, N=12. In **(B,C,F,G)**, error bars represent interquartile range.

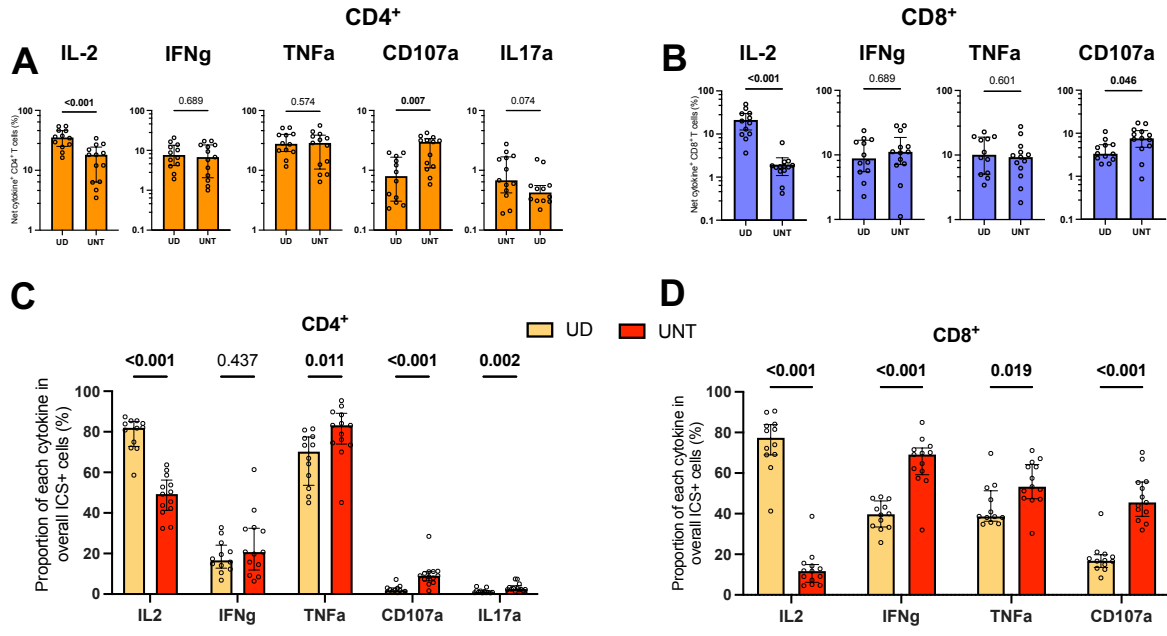


Figure S6

Figure S6. T cells from untreated PWH exhibit imbalanced effector functions favoring IFN γ , TNF α , and CD107a, with reduced IL-2 production. Related to Figure 6. (A-B) Net CD4⁺ (A) or CD8⁺ (B) T cell cytokine responses to aAPCs stimulation (aCD3:aCD28:IgG 1:4:0) of purified T cells. (C-D) Proportion of cytokine⁺ cells in activated CD4⁺ (C) or CD8⁺ (D) T cells. In (A-D), Mann-Whitney test results are shown, UD=12, UNT=13. In (A-D), error bars represent interquartile range.

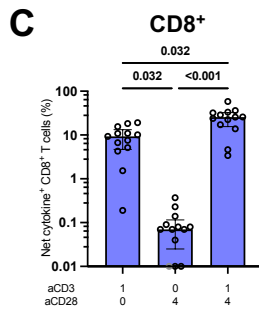
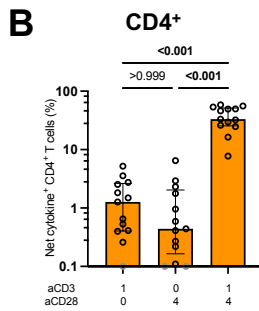
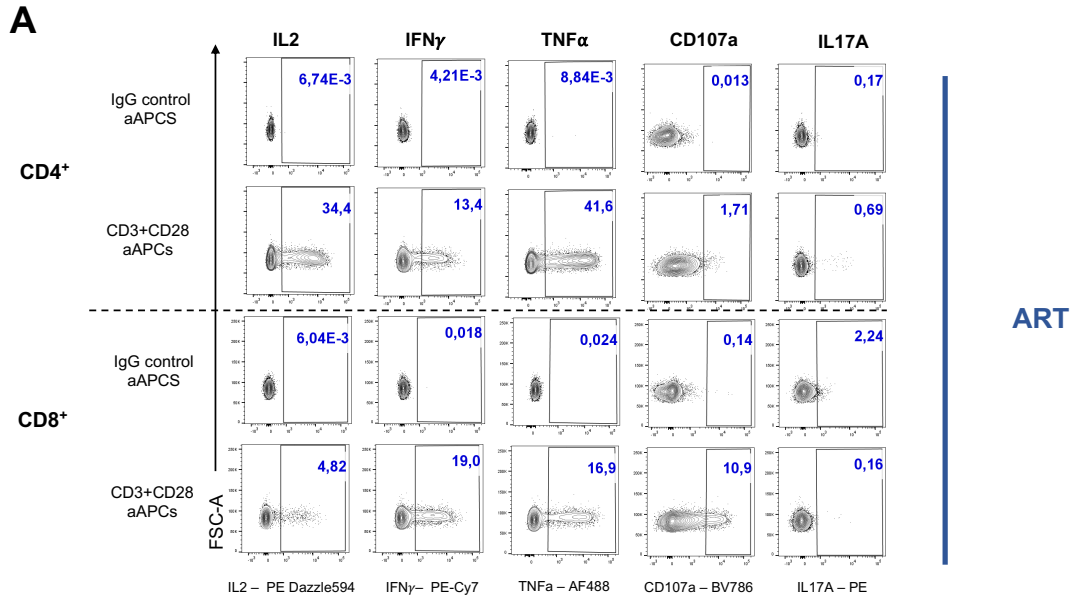


Figure S7

Figure S7. Partial normalization of cytokine profile in CD4⁺ T cells by ART, with limited effects on CD8⁺ T cells. Related to Figure 7. (A) Representative flow cytometry plots of cytokines expression in CD4⁺ and CD8⁺ T cells following 15h aAPCs (aCD3:aCD28:IgG 1:4:0) stimulation of purified T cells from ART PWH. Unstimulated conditions correspond to T cells incubated with control IgG aAPCs (aCD3:aCD28:IgG 0:0:5). **(B-C)** Net CD4⁺ **(B)** or CD8⁺ **(C)** T cells responses to aAPCs stimulation of purified T cells with different aCD3:aCD28 ratios. Friedman test was used. UNT=13, ART=13.

Supplementary Tables

Table S1. Clinical data for uninfected (UD), untreated (UNT), and treated (ART) participants

	Participant ID	Sex	Age (years)	CD4/CD8 Ratio	CD4 count (cells/uL)	Viral Load (copies/mL)	Time of infection (years)	Time on ART (years)	Time between pre-post ART timepoints (years)
UD	UD1	M	64	1.78	552	NA	NA	NA	NA
	UD2	M	59	2.40	530	NA	NA	NA	NA
	UD3	M	40	1.26	461	NA	NA	NA	NA
	UD4	F	41	3.93	1273	NA	NA	NA	NA
	UD5	F	45	2.31	632	NA	NA	NA	NA
	UD6	F	38	1.65	529	NA	NA	NA	NA
	UD7	M	63	3.50	675	NA	NA	NA	NA
	UD8	M	65	2.61	310	NA	NA	NA	NA
	UD9	F	39	2.05	667	NA	NA	NA	NA
	UD10	F	60	1.46	670	NA	NA	NA	NA
	UD11	M	57	1.95	726	NA	NA	NA	NA
	UD12	M	50	4.13	1758	NA	NA	NA	NA
	MEDIAN	NA	54	2.18	650	NA	NA	NA	NA
UNT	UNT1	M	40	0.75	571	6678	0.2	NA	NA
	UNT2	M	38	0.23	320	132886	0.4	NA	NA
	UNT3	M	51	0.12	216	96873	13.4	NA	NA
	UNT4	M	42	0.45	320	105130	23.8	NA	NA
	UNT5	M	34	0.07	300	1000000	1.1	NA	NA
	UNT6	F	37	0.59	321	36715	0.2	NA	NA
	UNT7	M	47	0.96	492	39489	8.5	NA	NA
	UNT8	M	22	0.31	597	35859	0.1	NA	NA
	UNT9	M	26	1.11	597	2700	5.6	NA	NA
	UNT10	M	38	1.63	962	7000	0.1	NA	NA
	UNT11	M	24	0.80	971	16316	0.1	NA	NA
	UNT12	M	48	0.35	416	15250	6.5	NA	NA
	UNT13	M	38	0.89	1036	5362	0.4	NA	NA
	MEDIAN	NA	38	0.59	492	35859	0.45	NA	NA
ART	ART1	M	42	1.8	602	< 20	2.7	2.2	2.45
	ART2	M	40	0.49	616	< 40	1.8	1.2	1.44
	ART3	M	52	0.30	361	< 20	14.5	1.1	1.17
	ART4	M	43	0.61	482	< 40	24.9	1.0	1.13
	ART5	M	37	0.29	662	< 40	4.2	2.6	3.10
	ART6	F	37	0.99	416	44	0.9	0.5	0.61
	ART7	M	48	1.72	640	< 40	9.8	0.7	1.27
	ART8	M	26	1.34	871	< 40	3.9	3.6	3.74
	ART9	M	28	1.19	694	< 40	7.4	1.1	1.82
	ART10	M	42	2.30	509	< 40	3.3	3.1	3.18
	ART11	M	26	1.65	862	< 40	1.8	1.3	1.67
	ART12	M	50	0.80	700	< 40	9.2	1.2	2.68
	ART13	M	42	1.34	876	< 40	4.7	3.5	4.23

		NA	42	1.19	640	NA	4.24	1.25	1.82
--	--	----	----	------	-----	----	------	------	------

NA : Not-Applicable

Table S2. Flow cytometry antibody staining panel for intracellular detection. Related to the STAR Methods section.

Marker	Fluorophore	Clone	Vendor	Catalogue #
CD3	BUV395	UCHT1	BD Bioscience	563546
CD4	BUV496	SK3	BD Bioscience	564651
CD45RA	BUV563	HI100	BD Bioscience	612926
CD27	BUV661	L128	BD Bioscience	750167
CD57	BV421	NK-1	BD Bioscience	563896
CD14	BV480	M5E2	BD Bioscience	746304
CD19	BV480	HIB19	BD Bioscience	746457
LIVE/DEAD Fixable dead cell	Aquavid	NA	Thermo Fisher Scientific	L34960
CD8	BV570	RPA-T8	Biolegend	301037
CD107a	BV786	H4A3	BD Bioscience	563869
TNF α	AF488	Mab11	Biolegend	502915
CD69	PerCPeF710	FN50	ebioscience	46-0699-42
IL17a	PE	REA1063	Miltenyi	130-120-551
IL-2	PE-Dazzle594	MQ1-17H12	Biolegend	500344
IFN γ	PE-Cy7	557643	BD Bioscience	557643
CCR7	APC-R700	2-L1-A	BD Bioscience	566767
CD40L	APC	TRAP1	BD Bioscience	555702

Table S3. Flow cytometry antibody staining panel for co-stimulatory molecules detection. Related to the STAR Methods section.

Marker	Fluorophore	Clone	Vendor	Catalogue #
CD3	BUV395	UCHT1	BD Bioscience	563546
CD4	BUV496	SK3	BD Bioscience	564651
CD45RA	BUV563	HI100	BD Bioscience	612926
CD27	BUV661	L128	BD Bioscience	750167
CD57	BV421	NK-1	BD Bioscience	563896
CD14	BV480	M5E2	BD Bioscience	746304
CD19	BV480	HIB19	BD Bioscience	746457
LIVE/DEAD Fixable dead cell	Aquavid	NA	Thermo Fisher Scientific	L34960
CD8	BV570	RPA-T8	Biolegend	301037
CD28	BUV737	CD28.2	BD Bioscience	564438
PD-1	BB515	EH12.1	BD Bioscience	564494
CD69	BV650	FN50	Biolegend	310934
TIGIT	PerCPeF710	MBSA43	ebioscience	46-9500-42
4-1BB	PE-Dazzle594	4B4-1	Biolegend	309826
ICOS	PE-Cy7	ISA-3	ebioscience	25-9948
CCR7	APC-R700	2-L1-A	BD Bioscience	566767
OX40	APC	ACT35	BD Bioscience	563473

CD40L	PE	TRAP	BD Bioscience	555700
-------	----	------	---------------	--------

Chapitre 4 — Discussion générale et perspectives

Discussion des résultats

Dans cette étude, nous avons développé un système de CPAa qui est hautement modulable, reproductible, compatible avec la cytométrie et qui permet l'activation des cellules T en moins de 15h. Ce système imite la CPA naturelle par la taille, la forme et la fluidité de la membrane lipidique. Nous avons trouvé que la costimulation par CD28 augmente l'expression de toutes les cytokines étudiées (IL-2, IFN γ , TNF α , CD107a et IL-17a) et des autres molécules de costimulation. Le CD28 jouait aussi un rôle qualitatif : il façonne le profil fonctionnel des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ en favorisant l'expression de l'IL-2 au détriment relatif des autres cytokines. Notre système a révélé que le profil fonctionnel des cellules T des GIV était enrichi en TNF α , IFN γ et CD107a et pauvre en IL-2. Ce biais phénotypique était partiellement normalisé par ART chez les cellules T CD4⁺ des GIV mais pas chez les cellules T CD8⁺.

L'utilisation de notre système de cellules présentatrices d'antigène artificielles (CPAa) permet d'induire le marqueur d'activation CD69 sur plus que 90% des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ dont environ un tiers exprime au moins l'un des cytokines testées (IL-2, IFN γ , TNF α , CD107a, IL17a). Afin d'obtenir ces réponses robustes et efficaces, plusieurs conditions telles que le ratio de billes : cellules (4 :1) ou le ratio de aCD3 : aCD28 (1 :4) sur la bille ont été optimisées. Utiliser un nombre supérieur de billes par rapport aux cellules (billes : cellules 4 :1) augmente grandement la probabilité qu'une cellule entre en contact avec la bille. En plus, des modèles suggèrent que la cellule T établit des contacts courts et séquentiels avant d'atteindre le seuil d'activation (217, 218), ce qui pourrait expliquer l'avantage d'un ratio élevé de billes : cellules. Le ratio des anticorps agonistes aCD3 : aCD28 sur les billes était également déterminant du niveau d'activation des cellules. Comme mentionné, des niveaux plus élevés d'aCD3 seul ne compensaient pas pour le manque d'aCD28, et un ratio aCD3 : aCD28 de 1 :4 a induit une stimulation optimale des cellules

T CD4⁺ et CD8⁺. Bien que ces ratios ne conforment pas nécessairement aux conditions *in vivo*, ils confirment la nécessité d'un deuxième signal même en présence d'un signal TCR fort.

Comme notre hypothèse stipulait, la costimulation par CD28 a induit des changements quantitatifs et qualitatifs aux fonctions effectrices. L'augmentation de l'expression de toutes les cytokines et molécules de costimulation induites appui le rôle de CD28 en tant qu'amplificateur du signal TCR. D'autre part, l'analyse non supervisée a montré que les populations qui ont bénéficié le plus du CD28 avaient en commun l'expression de l'IL-2, alors que celles qui ont moins bénéficié étaient majoritairement CD107a⁺. Les mécanismes bien documentés via lesquels le CD28 favorise l'expression des cytokines sont l'augmentation de la transcription (principalement l'IL-2) et la stabilisation de l'ARNm de certaines cytokines dont l'IL-2, IFN γ et TNF α (30, 219, 220). D'autre part, nos données avec le CD107a pourrait indiquer d'autres mécanismes post-transcriptionnels. Le CD107a, un marqueur de dégranulation, est exprimé sur les membranes des granules cytotoxiques des cellules T (221). Son expression à la surface dépend surtout de la relocalisation de CD107a déjà présent au cytoplasme vers la surface, plutôt que la synthèse de novo (222). Ceci peut expliquer le niveau plus élevé de CD107a exprimé en réponse à la stimulation par aCD3 seul et le bénéfice moins important de la costimulation CD28 comparé aux autres cytokines. Le besoin relatif de la costimulation dépend non seulement de la fonction, mais aussi de la cellule dans laquelle cette fonction est exprimée. Par exemple, les cellules T CD8⁺ dépendent moins de la costimulation que les cellules T CD4⁺. Il est intéressant de noter que ces observations s'alignent bien avec le rôle des cellules T CD8⁺ *in vivo*. Après l'activation par une CPA, le mode d'action des CD8⁺ pour éliminer le virus est rapide (223) et requiert l'interaction avec des antigènes présentés par une molécule de CMH-I sur des cellules infectées qui majoritairement n'expriment pas le CD28 (le CD28 est exprimé seulement par des CPA professionnelles (224)). La différence de dépendance au CD28 entre les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ peut être expliquée par deux modèles : soit les cellules T CD8⁺ ont un seuil d'activation plus faible ou elles accumulent les signaux d'activation plus rapidement que les cellules T CD4⁺ (225). Plus d'études sont nécessaires pour disséquer le mécanisme de costimulation dans des cellules ayant des programmes de transcription différents.

Chez les gens chroniquement infectés par le VIH, nous avons reporté une réponse plus élevée des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ face à la stimulation par aCD3 seul en comparaison avec les GNI. Ceci peut suggérer que les cellules T des gens infectés peuvent être déjà « sensibilisées / *primed* » à l'activation. Notamment, dans une étude menée par Schweneker et al., ils ont montré que la signalisation TCR était altérée dans les cellules T des GIV en comparaison avec les gens sous ART ou non-infectés (226). Cette altération était principalement due à un niveau de phosphorylation basale plus élevé des protéines de signalisation (plus particulièrement p-Lck et p-Erk1/2) chez les gens infectés. Cet état d'activation basale serait probablement relié à l'état d'inflammation chronique durant l'infection par le VIH (137).

Nous avons aussi observé que l'augmentation relative de la réponse cytokinique en réponse à la costimulation CD28 était moins importante chez les GIV comparé aux GNI. Toutefois, le changement dans la dépendance à CD28 était différent entre les cytokines : une diminution de la dépendance de TNF α et IFN γ à CD28 était observée chez les GIV accompagnés d'une dépendance exacerbée de l'IL-2 à la costimulation. Ces différences entre les deux cohortes étaient observées chez les cellules T naïves et mémoires, indiquant qu'elles ne sont pas dues à la différenciation altérée des cellules mémoires chez les GIV. Cette dépendance altérée à la costimulation induit chez les gens infectés une dérive du profile fonctionnel des cellules T vers TNF α , IFN γ et CD107a au détriment de l'IL-2 dont la production était particulièrement diminuée. Des études antérieures ont déjà rapporté une diminution dans la production l'IL-2 (227, 228). En effet, la perte graduelle de la sécrétion de l'IL-2 est un des signes précoces de l'épuisement des cellules T durant l'infection par le VIH (229). Le mécanisme de dérégulation de l'IL-2 durant le VIH n'a pas été examiné en profondeur, mais une étude récente suggère que l'expression du micro-ARN let-7i, un régulateur positif de l'expression de l'IL-2, diminue durant l'infection par le VIH (230). D'autre part, conformément à nos résultats, plusieurs études ont reporté une augmentation de l'IFN γ chez les GIV (197, 227, 228, 231). Contrairement à ces études qui focalisent sur une fonction spécifique, nous évaluons plusieurs cytokines en concomitance

permettant d'avoir une vue d'ensemble du profil fonctionnel des cellules T. Nos données sur le biais des fonctions effectrices indiquent que la dysfonction aspécifique des cellules T durant l'infection par le VIH n'est pas une simple perte des fonctions, mais plutôt une altération du profil : alors que certaines fonctions sont réduites (IL-2), d'autres telles que TNF α et IFN γ sont relativement augmentées. Ceci concorde avec une étude récente de notre équipe suggérant que la dysfonction des cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH se caractérise par un *changement* des fonctions effectrices vers un profil des cellules T folliculaires Tfh plutôt qu'une perte complète des fonctions (180). Il n'est pas encore connu si ces altérations s'appliquent à la population totale des cellules T aussi.

Étonnamment, la dérégulation dans le profil fonctionnel des cellules T non spécifiques au VIH n'était pas complètement corrigée chez les gens sous ART malgré le niveau indétectable de la charge virale et le compte restauré des lymphocytes T CD4⁺. Il faut noter toutefois que l'effet de ART était différent entre les populations des cellules T CD4⁺ et CD8⁺. Alors que le profil fonctionnel des cellules T CD4⁺ était partiellement normalisé par ART, ce n'était pas le cas pour les cellules T CD8⁺. Ceci est consistant avec des résultats obtenus par Kapogiannis et *al.* suggérant que le temps sous ART est associé avec une fréquence plus élevée de cellules CD4⁺ T antivirales productrices d'IL-2, alors que la fréquence des cellules T CD8⁺ IL-2⁺ reste inchangeable indifféremment du temps sous ART (232). Il est possible que la dysfonction des cellules T CD4⁺ soient principalement associée à la déplétion des cellules T CD4⁺ durant l'infection chronique. Ainsi la restauration du compte de cellules CD4 durant ART corrigerait partiellement la dysfonction établie durant l'infection chronique.

La persistance du profil fonctionnel biaisé des cellules T durant l'ART suggère l'implication des mécanismes autre que l'exposition directe aux antigènes. Un des mécanismes pourrait être relié à des changements épigénétiques établis lors de l'infection chronique et qui persistent durant les traitements. Un nombre croissant d'études identifient des altérations épigénétiques associées à l'épuisement des lymphocytes T dans des modèles d'infection chronique tels que le LCMV (172, 233, 234) chez les souris et le VHC (235) et VIH (171, 236, 237) chez l'humain. Dans le

contexte d'infection par le VIH, l'empreinte épigénétique d'épuisement a seulement été reportée dans les cellules T CD8⁺ spécifique au virus. Le facteur de transcription de la boîte HMG TOX a été identifié récemment en tant que régulateur majeur de l'épuisement des cellules T CD8⁺ car il induit et maintient la programmation transcriptionnelle et épigénétique des cellules épuisées (238). Si les changements épigénétiques s'étendent ou non à la population totale des cellules T est encore à vérifier. Il faut noter toutefois que l'augmentation d'expression des marqueurs d'épuisement tels que les IRs PD-1, Tim-3 et TIGIT sur la population totale des cellules T et non seulement sur celles spécifiques au VIH durant ART est bien documenté (181, 236, 239). Elle est également associée à la progression de la maladie de VIH (239, 240). Ainsi, il se peut que des reprogrammations épigénétiques soient présentes aussi chez la population totale des cellules T.

Perspectives

Un des facteurs qui pourraient contribuer à l'efficacité d'activation par notre système est la présence d'une membrane lipidique fluide permettant le mouvement des agonistes à la surface. En fait, plusieurs études ont démontré la nécessité du *clustering* des ligands sur une membrane fluide pour une activation efficace des cellules T (82, 83, 241). Il est possible d'évaluer l'effet de la fluidité de la membrane sur l'activation des cellules T en ajoutant le cholestérol à la composition des liposomes enrobant les billes. Le cholestérol est un composant naturel des membranes plasmiques des cellules animales et il joue un rôle important dans le contrôle de la fluidité membranaire. À des températures relativement élevées (par exemple, à 37°C, soit la température corporelle moyenne des humains), il réduit la fluidité de la membrane en restreignant les mouvements des phosphoglycérolipides (242-244). Ainsi, la rigidité de la membrane induit par le cholestérol pourrait limiter le mouvement des ligands sur les CPAa et influencer l'activation des cellules T.

Avec une taille, forme et surface qui imite la CPA naturelle, on peut penser que les CPAa permettraient la formation des structures semblables aux synapses immunologiques, d'où leur efficacité supérieure aux agonistes solubles (245). La méthode la plus adéquate pour visualiser les contacts entre les cellules et CPAa est par microscopie confocale (246, 247). Ceci impliquerait le marquage des CD3 et CD28 sur les cellules T ainsi que les aCD3 et aCD28 sur les CPAa par des anticorps. Deux enjeux doivent être pris en considération : 1 — les anticorps peuvent interférer avec l'interaction des récepteurs avec leurs agonistes. 2— les anticorps peuvent également induire le clustering de leurs cibles. Des alternatives incluent la transfection des cellules T avec des protéines de fusion CD3 ζ (248) et CD28 (249) ainsi que l'utilisation des anticorps agonistes recombinants fluorescents sur les CPAa. Il sera possible aussi d'évaluer l'effet de aCD3 seul ou combiné à aCD28 sur le nombre et forme des interactions à l'interface entre les cellules T et CPAa. Il faut noter que notre système de CPAa manque les récepteurs d'adhésion comme ICAM qui interagit avec LFA-1 sur la cellule T et permet de stabiliser la synapse immunologique (250). Ceci peut donc impacter la forme et durée de contacts entre les cellules T et les CPAa. Notre système contient toutefois des sites de nickel sur lesquels on peut ajouter différentes molécules conjuguées à l'histidine dont le ICAM.

Dans la présente étude, nous avons trouvé que le besoin de costimulation dépend du degré de différenciation des cellules T CD4⁺ et CD8⁺. Il serait intéressant d'examiner si la dépendance pour CD28 est aussi différente entre les différentes sous-populations des cellules Taux (Th1, Th2, Tfh, Th17). Est-ce que les sous-populations préférentiellement infectées par le VIH telle que Th17 seraient les plus dépendantes de CD28? Ceci peut être testé en ajoutant des marqueurs de surface et intracellulaires qui identifient chacune des sous-populations.

Un autre mécanisme (autre que l'empreinte épigénétique) qui peut expliquer la persistance de la dérégulation du profil cytokinique chez les GIV est l'environnement pro inflammatoire qui persiste durant ART (140, 251). Notre équipe mène actuellement un projet qui a pour but d'identifier le profil inflammatoire dans le plasma des différentes cohortes des gens chroniquement infectés par le VIH ou sous traitement ART, incluant les donneurs de ma présente étude. La détection des marqueurs d'inflammation est effectuée par la plateforme Olink, une technologie qui permet des tests immunologiques multiplex à haut débit d'un grand nombre de

protéines en utilisant des volumes minimes de fluide biologique (252). Ainsi, nous pourrions éventuellement vérifier de possibles corrélations entre le niveau d'inflammation dans le plasma d'un patient et le degré d'activation des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ activés par notre système de CPAa. Un autre mécanisme qui peut contribuer à cette dysfonction est l'exposition aux antigènes microbiens qui traversent la barrière intestinale endommagée durant l'infection par le VIH. Une étude a récemment montré que la translocation microbienne est associée à un profil d'activation immunologique spécifique dans le sang des gens infectés par le VIH sous ART (253). Des marqueurs d'activation des monocytes induite par le LPS, tels que le *LPS binding protein* (LBP) et le CD14 soluble (CD14s) sont des indicateurs de la translocation microbienne (254, 255). En plus, les individus infectés par le VIH, qu'ils aient reçu ART ou non, présentent des niveaux plasmatiques élevés de la protéine de liaison aux acides gras intestinaux (I-FABP), qui est produite par les entérocytes et libérée dans la circulation sanguine en cas de lyse d'entérocytes (256). Un projet en cours dans notre laboratoire vise à mesurer les niveaux de I-FABP par ELISA ainsi que le CD14s et LBP par Luminex dans le plasma des mêmes cohortes des gens chroniquement infectés ou sous traitement ART. Ainsi, il serait intéressant de vérifier une association potentielle entre le degré d'activation ou de dépendance sur CD28 des lymphocytes T et le niveau de translocation microbienne.

Un des mécanismes d'action par lequel le marqueur de dysfonction PD-1 peut moduler l'activation des cellules T est la déphosphorylation de la queue cytoplasmique du CD28 (46, 257). Il serait intéressant de vérifier si la voie inhibitrice PD1-PDL1 a un impact sur la dépendance des fonctions effectrices sur CD28 et si, par exemple, les fonctions les plus dépendantes à la costimulation seront préférentiellement dérégulées. Pour ce faire, il est possible d'ajouter à notre système CPAa la protéine recombinante PD-L1-His, le principal ligand de PD-1, qui occupera les sites Ni-NTA. L'activation de l'axe PD-1-PD-L1 peut être confirmée par l'usage d'un anticorps ciblant la forme phosphorylée de PD-1. Cette phosphorylation peut être ensuite corrélée avec le degré de phosphorylation des protéines associées au TCR (ex. Lck et Zap70) ou au CD28 (ex. Akt). Des études ultérieures des voies de signalisation peuvent être effectuées par phosFlow afin de comparer les effets quantitatifs et qualitatifs de CD28 sur la phosphorylation des protéines clés

du réseau de signalisation (ex. Zap70, Akt, Erk1/2 ,etc), et investiguer comment ces effets changent dans un contexte d'infection par le VIH.

En conclusion, nos données identifient la costimulation comme un mécanisme modulant à la fois l'ampleur et la nature des fonctions effectrices induites lors de l'activation médiée par le TCR. Nous avons observé des profils distincts de cellules T effectrices CD4⁺ et CD8⁺ au cours de l'infection chronique par le VIH. Il est raisonnable de penser que ce biais compromette les réponses des cellules T contre des agents pathogènes et déséquilibre l'environnement inflammatoire, contribuant ainsi aux comorbidités associées au VIH (258, 259). En effet, cette déformation non spécifique pourrait représenter une couche supplémentaire de dysfonctionnement dont l'effet, ajouté au dysfonctionnement spécifique des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ liées au VIH, pourrait expliquer au moins partiellement la dysfonction immunitaire résiduelle bien documentée qui persiste après le traitement (260). Aucune de ces dysfonctions, qu'elles soient spécifiques ou non spécifiques, ne semble être entièrement inversée par la thérapie antirétrovirale. Il reste à déterminer si ces couches de dysfonctionnement des cellules T sont partagées.

Limites

Dans la présente étude, nous avons évalué l'activation des cellules T en mesurant les cytokines. Toutefois, notre système ne permet pas de tester la fonctionnalité des cellules T activées par notre système de CPAa : on ne sait pas si les cellules T CD4⁺ activées peuvent aider les lymphocytes T cytotoxiques ou les lymphocytes B. De même, nous n'avons pas évalué la capacité des cellules T CD8⁺ activées à éliminer des cellules infectées.

Une limite de cette étude est la différence d'âge entre les cohortes à l'étude. Ici, nous avons observé des différences dans les profils fonctionnels entre les deux cohortes : GIV et GNI. Un facteur qui pourrait biaiser les différences observées est la différence du médian d'âge. Les GNI sont plus âgés (médian :54 ans) que les GIV (médian : 38 ans). En fait, malgré l'efficacité des

traitements antirétroviraux actuels, l'infection par le VIH est associée à un vieillissement prématuré du système immunitaire (261). Cette accélération du vieillissement est probablement dû à l'environnement inflammatoire durant l'infection par le VIH (261). Notamment, les GIV sous ART ont un risque élevé de développer des maladies associées à l'âge telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète et le cancer (262). Ainsi, les différences entre les deux populations peuvent être sous estimées à cause de la différence d'âge entre les deux cohortes.

Références bibliographiques

1. Clark R, Kupper T. Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol.* 2005;125(4):629-37.
2. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2001;1(2):135-45.
3. Mellman I. Dendritic cells: master regulators of the immune response. *Cancer Immunol Res.* 2013;1(3):145-9.
4. Leblanc-Hotte A, Audiger C, Chabot-Roy G, Lombard-Vadnais F, Delisle JS, Peter YA, et al. Immature and mature bone marrow-derived dendritic cells exhibit distinct intracellular mechanical properties. *Sci Rep.* 2023;13(1):1967.
5. Hemmi H, Akira S. TLR signalling and the function of dendritic cells. *Chem Immunol Allergy.* 2005;86:120-35.
6. McVay LD, Carding SR. Extrathymic origin of human gamma delta T cells during fetal development. *J Immunol.* 1996;157(7):2873-82.
7. Bretscher P, Cohn M. A theory of self-nonsel self discrimination. *Science.* 1970;169(3950):1042-9.
8. Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat Immunol.* 2001;2(3):203-9.
9. Wucherpennig KW, Gagnon E, Call MJ, Huseby ES, Call ME. Structural biology of the T-cell receptor: insights into receptor assembly, ligand recognition, and initiation of signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(4):a005140.
10. Gaud G, Lesourne R, Love PE. Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(8):485-97.
11. Quill H, Schwartz RH. Stimulation of normal inducer T cell clones with antigen presented by purified Ia molecules in planar lipid membranes: specific induction of a long-lived state of proliferative nonresponsiveness. *J Immunol.* 1987;138(11):3704-12.

12. Jenkins MK, Schwartz RH. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med*. 1987;165(2):302-19.
13. Dobbins J, Gagnon E, Godec J, Pyrdol J, Vignali DA, Sharpe AH, et al. Binding of the cytoplasmic domain of CD28 to the plasma membrane inhibits Lck recruitment and signaling. *Sci Signal*. 2016;9(438):ra75.
14. Michel F, Attal-Bonnefoy G, Mangino G, Mise-Omata S, Acuto O. CD28 as a molecular amplifier extending TCR ligation and signaling capabilities. *Immunity*. 2001;15(6):935-45.
15. Tuosto L, Acuto O. CD28 affects the earliest signaling events generated by TCR engagement. *Eur J Immunol*. 1998;28(7):2131-42.
16. Tan YX, Manz BN, Freedman TS, Zhang C, Shokat KM, Weiss A. Inhibition of the kinase Csk in thymocytes reveals a requirement for actin remodeling in the initiation of full TCR signaling. *Nat Immunol*. 2014;15(2):186-94.
17. Salazar-Fontana LI, Barr V, Samelson LE, Bierer BE. CD28 engagement promotes actin polymerization through the activation of the small Rho GTPase Cdc42 in human T cells. *J Immunol*. 2003;171(5):2225-32.
18. Prasad KV, Cai YC, Raab M, Duckworth B, Cantley L, Shoelson SE, et al. T-cell antigen CD28 interacts with the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase by a cytoplasmic Tyr(P)-Met-Xaa-Met motif. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(7):2834-8.
19. Stein PH, Fraser JD, Weiss A. The cytoplasmic domain of CD28 is both necessary and sufficient for costimulation of interleukin-2 secretion and association with phosphatidylinositol 3'-kinase. *Mol Cell Biol*. 1994;14(5):3392-402.
20. Cai YC, Cefai D, Schneider H, Raab M, Nabavi N, Rudd CE. Selective CD28pYMNMM mutations implicate phosphatidylinositol 3-kinase in CD86-CD28-mediated costimulation. *Immunity*. 1995;3(4):417-26.
21. Boomer JS, Green JM. An enigmatic tail of CD28 signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(8):a002436.
22. Nishida M, Nagata K, Hachimori Y, Horiuchi M, Ogura K, Mandiyan V, et al. Novel recognition mode between Vav and Grb2 SH3 domains. *Embo j*. 2001;20(12):2995-3007.

23. Ellis JH, Ashman C, Burden MN, Kilpatrick KE, Morse MA, Hamblin PA. GRID: a novel Grb-2-related adapter protein that interacts with the activated T cell costimulatory receptor CD28. *J Immunol*. 2000;164(11):5805-14.
24. Michel F, Acuto O. CD28 costimulation: a source of Vav-1 for TCR signaling with the help of SLP-76? *Sci STKE*. 2002;2002(144):pe35.
25. Boonen GJ, van Dijk AM, Verdonck LF, van Lier RA, Rijksen G, Medema RH. CD28 induces cell cycle progression by IL-2-independent down-regulation of p27kip1 expression in human peripheral T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1999;29(3):789-98.
26. Colombetti S, Basso V, Mueller DL, Mondino A. Prolonged TCR/CD28 engagement drives IL-2-independent T cell clonal expansion through signaling mediated by the mammalian target of rapamycin. *J Immunol*. 2006;176(5):2730-8.
27. Frauwirth KA, Riley JL, Harris MH, Parry RV, Rathmell JC, Plas DR, et al. The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity*. 2002;16(6):769-77.
28. Ross SH, Cantrell DA. Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 2018;36:411-33.
29. Fraser JD, Irving BA, Crabtree GR, Weiss A. Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science*. 1991;251(4991):313-6.
30. Lindstein T, June CH, Ledbetter JA, Stella G, Thompson CB. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science*. 1989;244(4902):339-43.
31. Verweij CL, Geerts M, Aarden LA. Activation of interleukin-2 gene transcription via the T-cell surface molecule CD28 is mediated through an NF- κ B-like response element. *J Biol Chem*. 1991;266(22):14179-82.
32. Butte MJ, Lee SJ, Jesneck J, Keir ME, Haining WN, Sharpe AH. CD28 costimulation regulates genome-wide effects on alternative splicing. *PLoS One*. 2012;7(6):e40032.
33. DuPage M, Chopra G, Quiros J, Rosenthal WL, Morar MM, Holohan D, et al. The chromatin-modifying enzyme Ezh2 is critical for the maintenance of regulatory T cell identity after activation. *Immunity*. 2015;42(2):227-38.

34. Parry RV, Rumbley CA, Vandenberghe LH, June CH, Riley JL. CD28 and inducible costimulatory protein Src homology 2 binding domains show distinct regulation of phosphatidylinositol 3-kinase, Bcl-xL, and IL-2 expression in primary human CD4 T lymphocytes. *J Immunol.* 2003;171(1):166-74.
35. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature.* 1999;397(6716):263-6.
36. Dong C, Temann UA, Flavell RA. Cutting edge: critical role of inducible costimulator in germinal center reactions. *J Immunol.* 2001;166(6):3659-62.
37. Ward-Kavanagh LK, Lin WW, Šedý JR, Ware CF. The TNF Receptor Superfamily in Co-stimulating and Co-inhibitory Responses. *Immunity.* 2016;44(5):1005-19.
38. Whitmire JK, Ahmed R. Costimulation in antiviral immunity: differential requirements for CD4(+) and CD8(+) T cell responses. *Curr Opin Immunol.* 2000;12(4):448-55.
39. Rogers PR, Song J, Gramaglia I, Killeen N, Croft M. OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity.* 2001;15(3):445-55.
40. Lee HW, Park SJ, Choi BK, Kim HH, Nam KO, Kwon BS. 4-1BB promotes the survival of CD8+ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. *J Immunol.* 2002;169(9):4882-8.
41. Watts TH. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:23-68.
42. Howland KC, Ausubel LJ, London CA, Abbas AK. The roles of CD28 and CD40 ligand in T cell activation and tolerance. *J Immunol.* 2000;164(9):4465-70.
43. Odorizzi PM, Wherry EJ. Inhibitory receptors on lymphocytes: insights from infections. *J Immunol.* 2012;188(7):2957-65.
44. Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med.* 1995;182(2):459-65.
45. Marasco M, Berteotti A, Weyershaeuser J, Thorausch N, Sikorska J, Krausze J, et al. Molecular mechanism of SHP2 activation by PD-1 stimulation. *Sci Adv.* 2020;6(5):eaay4458.
46. Hui E, Cheung J, Zhu J, Su X, Taylor MJ, Wallweber HA, et al. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science.* 2017;355(6332):1428-33.

47. Quigley M, Pereyra F, Nilsson B, Porichis F, Fonseca C, Eichbaum Q, et al. Transcriptional analysis of HIV-specific CD8⁺ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nat Med*. 2010;16(10):1147-51.
48. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 2006;439(7077):682-7.
49. Alegre ML, Noel PJ, Eisfelder BJ, Chuang E, Clark MR, Reiner SL, et al. Regulation of surface and intracellular expression of CTLA4 on mouse T cells. *J Immunol*. 1996;157(11):4762-70.
50. Huppa JB, Davis MM. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(12):973-83.
51. Miller JD, van der Most RG, Akondy RS, Glidewell JT, Albott S, Masopust D, et al. Human effector and memory CD8⁺ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. *Immunity*. 2008;28(5):710-22.
52. Ndhlovu ZM, Kanya P, Mewalal N, Kløverpris HN, Nkosi T, Pretorius K, et al. Magnitude and Kinetics of CD8⁺ T Cell Activation during Hyperacute HIV Infection Impact Viral Set Point. *Immunity*. 2015;43(3):591-604.
53. Adams NM, Grassmann S, Sun JC. Clonal expansion of innate and adaptive lymphocytes. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(11):694-707.
54. Wherry EJ, Ahmed R. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J Virol*. 2004;78(11):5535-45.
55. Becattini S, Latorre D, Mele F, Foglierini M, De Gregorio C, Cassotta A, et al. T cell immunity. Functional heterogeneity of human memory CD4⁺ T cell clones primed by pathogens or vaccines. *Science*. 2015;347(6220):400-6.
56. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:745-63.
57. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;401(6754):708-12.

58. Hamann D, Baars PA, Rep MH, Hooibrink B, Kerkhof-Garde SR, Klein MR, et al. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8⁺ T cells. *J Exp Med*. 1997;186(9):1407-18.
59. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol*. 2013;43(11):2797-809.
60. Thome JJ, Farber DL. Emerging concepts in tissue-resident T cells: lessons from humans. *Trends Immunol*. 2015;36(7):428-35.
61. Kara EE, Comerford I, Fenix KA, Bastow CR, Gregor CE, McKenzie DR, et al. Tailored immune responses: novel effector helper T cell subsets in protective immunity. *PLoS Pathog*. 2014;10(2):e1003905.
62. Pérez-Gómez A, Vitallé J, Gasca-Capote C, Gutierrez-Valencia A, Trujillo-Rodriguez M, Serna-Gallego A, et al. Dendritic cell deficiencies persist seven months after SARS-CoV-2 infection. *Cell Mol Immunol*. 2021;18(9):2128-39.
63. Huang J, Yang Y, Al-Mozaini M, Burke PS, Beamon J, Carrington MF, et al. Dendritic cell dysfunction during primary HIV-1 infection. *J Infect Dis*. 2011;204(10):1557-62.
64. Bender A, Sapp M, Schuler G, Steinman RM, Bhardwaj N. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods*. 1996;196(2):121-35.
65. Reddy A, Sapp M, Feldman M, Subklewe M, Bhardwaj N. A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. *Blood*. 1997;90(9):3640-6.
66. Jardetzky TS, Brown JH, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Chi YI, et al. Three-dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature*. 1994;368(6473):711-8.
67. Li H, Llera A, Tsuchiya D, Leder L, Ysern X, Schlievert PM, et al. Three-dimensional structure of the complex between a T cell receptor beta chain and the superantigen staphylococcal enterotoxin B. *Immunity*. 1998;9(6):807-16.

68. Dannecker G, Mahlke U, Schultz H, Hoffmann MK, Niethammer D. Activation of human T cells by the superantigen Staphylococcus enterotoxin B: analysis on a cellular level. *Immunobiology*. 1994;190(1-2):116-26.
69. Bueno C, Lemke CD, Criado G, Baroja ML, Ferguson SS, Rahman AK, et al. Bacterial superantigens bypass Lck-dependent T cell receptor signaling by activating a Galpha11-dependent, PLC-beta-mediated pathway. *Immunity*. 2006;25(1):67-78.
70. Judith A. Owen JP, Sharon A. Stranford;. *Kuby immunology*. 7th ed. ed: New York : W.H. Freeman; 2013.
71. Choi Y, Shi Y, Haymaker CL, Naing A, Ciliberto G, Hajar J. T-cell agonists in cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer*. 2020;8(2).
72. Damle NK, Doyle LV. Stimulation via the CD3 and CD28 molecules induces responsiveness to IL-4 in CD4+CD29+CD45R- memory T lymphocytes. *J Immunol*. 1989;143(6):1761-7.
73. Soltantoye T, Akbari B, Mirzaei HR, Hadjati J. Soluble and Immobilized Anti-CD3/28 Distinctively Expand and Differentiate Primary Human T Cells: An Implication for Adoptive T Cell Therapy. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2022;21(6):630-7.
74. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med*. 2001;193(11):1303-10.
75. Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res*. 2003;9(12):4404-8.
76. Sugie K, Jeon MS, Grey HM. Activation of naïve CD4 T cells by anti-CD3 reveals an important role for Fyn in Lck-mediated signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(41):14859-64.
77. Chylek LA, Akimov V, Dengjel J, Rigbolt KT, Hu B, Hlavacek WS, et al. Phosphorylation site dynamics of early T-cell receptor signaling. *PLoS One*. 2014;9(8):e104240.
78. Yang WAKPARAKNSAFECJS-CDSJEMXLX. The phosphorylation kinetics of the key regulators in T cell receptor signaling pathway. *J Immunol*. 2019;202(1).

79. Curtsinger J, Deeths MJ, Pease P, Mescher MF. Artificial cell surface constructs for studying receptor-ligand contributions to lymphocyte activation. *J Immunol Methods*. 1997;209(1):47-57.
80. Trickett A, Kwan YL. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *J Immunol Methods*. 2003;275(1-2):251-5.
81. Kalamasz D, Long SA, Taniguchi R, Buckner JH, Berenson RJ, Bonyhadi M. Optimization of human T-cell expansion ex vivo using magnetic beads conjugated with anti-CD3 and Anti-CD28 antibodies. *J Immunother*. 2004;27(5):405-18.
82. Hsu CJ, Hsieh WT, Waldman A, Clarke F, Huseby ES, Burkhardt JK, et al. Ligand mobility modulates immunological synapse formation and T cell activation. *PLoS One*. 2012;7(2):e32398.
83. Giannoni F, Barnett J, Bi K, Samodal R, Lanza P, Marchese P, et al. Clustering of T cell ligands on artificial APC membranes influences T cell activation and protein kinase C theta translocation to the T cell plasma membrane. *J Immunol*. 2005;174(6):3204-11.
84. Kaizuka Y, Douglass AD, Varma R, Dustin ML, Vale RD. Mechanisms for segregating T cell receptor and adhesion molecules during immunological synapse formation in Jurkat T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(51):20296-301.
85. Dustin ML. Insights into function of the immunological synapse from studies with supported planar bilayers. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;340:1-24.
86. Yokosuka T, Kobayashi W, Sakata-Sogawa K, Takamatsu M, Hashimoto-Tane A, Dustin ML, et al. Spatiotemporal regulation of T cell costimulation by TCR-CD28 microclusters and protein kinase C theta translocation. *Immunity*. 2008;29(4):589-601.
87. Shen K, Milone MC, Dustin ML, Kam LC. Nanoengineering of Immune Cell Function. *Mater Res Soc Symp Proc*. 2009;1209.
88. Jin T, Pennefather P, Lee PI. Lipobeads: a hydrogel anchored lipid vesicle system. *FEBS Lett*. 1996;397(1):70-4.
89. Cheung AS, Zhang DKY, Koshy ST, Mooney DJ. Scaffolds that mimic antigen-presenting cells enable ex vivo expansion of primary T cells. *Nat Biotechnol*. 2018;36(2):160-9.
90. Olden BR, Perez CR, Wilson AL, Cardle, II, Lin YS, Kaehr B, et al. Cell-Templated Silica Microparticles with Supported Lipid Bilayers as Artificial Antigen-Presenting Cells for T Cell Activation. *Adv Healthc Mater*. 2019;8(2):e1801188.

91. Goldstein SA, Mescher MF. Cell-sized, supported artificial membranes (pseudocytes): response of precursor cytotoxic T lymphocytes to class I MHC proteins. *J Immunol.* 1986;137(11):3383-92.
92. Gopalakrishnan G, Thostrup P, Rouiller I, Lucido AL, Belkaïd W, Colman DR, et al. Lipid bilayer membrane-triggered presynaptic vesicle assembly. *ACS Chem Neurosci.* 2010;1(2):86-94.
93. Chen JY, Agrawal S, Yi HP, Vallejo D, Agrawal A, Lee AP. Cell-Sized Lipid Vesicles as Artificial Antigen-Presenting Cells for Antigen-Specific T Cell Activation. *Adv Healthc Mater.* 2023;12(12):e2203163.
94. Kim HS, Ho TC, Willner MJ, Becker MW, Kim HW, Leong KW. Dendritic cell-mimicking scaffolds for ex vivo T cell expansion. *Bioact Mater.* 2023;21:241-52.
95. Eggermont LJ, Paulis LE, Tel J, Figdor CG. Towards efficient cancer immunotherapy: advances in developing artificial antigen-presenting cells. *Trends Biotechnol.* 2014;32(9):456-65.
96. Turtle CJ, Riddell SR. Artificial antigen-presenting cells for use in adoptive immunotherapy. *Cancer J.* 2010;16(4):374-81.
97. UNICEF. HIV Statistics - Global and Regional Trends: UNICEF July 13, 2023 [updated July 2023. Available from: <https://data.unicef.org/topic/hivaids/global-regional-trends/>.
98. Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *Lancet.* 2008;372(9635):293-9.
99. Kulpa DA, Chomont N. HIV persistence in the setting of antiretroviral therapy: when, where and how does HIV hide? *J Virus Erad.* 2015;1(2):59-66.
100. Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S. HIV infection. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15035.
101. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, et al. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med.* 2009;15(8):893-900.
102. Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JA, Baseler M, et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(24):13193-7.

103. Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, et al. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med.* 2003;9(6):727-8.
104. Conway JM, Perelson AS, Li JZ. Predictions of time to HIV viral rebound following ART suspension that incorporate personal biomarkers. *PLoS Comput Biol.* 2019;15(7):e1007229.
105. McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(1):11-23.
106. Whitney JB, Hill AL, Sanisetty S, Penaloza-MacMaster P, Liu J, Shetty M, et al. Rapid seeding of the viral reservoir prior to SIV viraemia in rhesus monkeys. *Nature.* 2014;512(7512):74-7.
107. Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A, et al. Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol.* 2003;77(21):11708-17.
108. Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature.* 2005;434(7037):1093-7.
109. Doitsh G, Galloway NL, Geng X, Yang Z, Monroe KM, Zepeda O, et al. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature.* 2014;505(7484):509-14.
110. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 1994;68(9):6103-10.
111. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol.* 1994;68(7):4650-5.
112. Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, O'Malley PM, Holmberg SD. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *Aids.* 1994;8(8):1123-8.
113. Mellors JW, Rinaldo CR, Jr., Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science.* 1996;272(5265):1167-70.

114. Patil S, Majumdar B, Sarode SC, Sarode GS, Awan KH. Oropharyngeal Candidosis in HIV-Infected Patients-An Update. *Front Microbiol.* 2018;9:980.
115. Mukadi Y, Perriens JH, St Louis ME, Brown C, Prignot J, Willame JC, et al. Spectrum of immunodeficiency in HIV-1-infected patients with pulmonary tuberculosis in Zaire. *Lancet.* 1993;342(8864):143-6.
116. Cheung TW, Teich SA. Cytomegalovirus infection in patients with HIV infection. *Mt Sinai J Med.* 1999;66(2):113-24.
117. Basavaraju A. Toxoplasmosis in HIV infection: An overview. *Trop Parasitol.* 2016;6(2):129-35.
118. Okulicz JF, Lambotte O. Epidemiology and clinical characteristics of elite controllers. *Curr Opin HIV AIDS.* 2011;6(3):163-8.
119. Altfeld M, Gale M, Jr. Innate immunity against HIV-1 infection. *Nat Immunol.* 2015;16(6):554-62.
120. Soper A, Kimura I, Nagaoka S, Konno Y, Yamamoto K, Koyanagi Y, et al. Type I Interferon Responses by HIV-1 Infection: Association with Disease Progression and Control. *Front Immunol.* 2017;8:1823.
121. Ortiz AM, Klatt NR, Li B, Yi Y, Tabb B, Hao XP, et al. Depletion of CD4⁺ T cells abrogates post-peak decline of viremia in SIV-infected rhesus macaques. *J Clin Invest.* 2011;121(11):4433-45.
122. Matano T, Shibata R, Siemon C, Connors M, Lane HC, Martin MA. Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of chimeric simian/human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques. *J Virol.* 1998;72(1):164-9.
123. Zaunders JJ, Munier ML, Kaufmann DE, Ip S, Grey P, Smith D, et al. Early proliferation of CCR5(+) CD38(+++) antigen-specific CD4(+) Th1 effector cells during primary HIV-1 infection. *Blood.* 2005;106(5):1660-7.
124. Emu B, Sinclair E, Favre D, Moretto WJ, Hsue P, Hoh R, et al. Phenotypic, functional, and kinetic parameters associated with apparent T-cell control of human immunodeficiency virus replication in individuals with and without antiretroviral treatment. *J Virol.* 2005;79(22):14169-78.

125. Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, et al. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature*. 2002;417(6884):95-8.
126. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*. 1995;270(5243):1811-5.
127. Walker CM, Moody DJ, Stites DP, Levy JA. CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. *Science*. 1986;234(4783):1563-6.
128. Walker BD, Chakrabarti S, Moss B, Paradis TJ, Flynn T, Durno AG, et al. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature*. 1987;328(6128):345-8.
129. Klein MR, van Baalen CA, Holwerda AM, Kerkhof Garde SR, Bende RJ, Keet IP, et al. Kinetics of Gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during the clinical course of HIV-1 infection: a longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatics. *J Exp Med*. 1995;181(4):1365-72.
130. Hazenberg MD, Otto SA, van Benthem BH, Roos MT, Coutinho RA, Lange JM, et al. Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *Aids*. 2003;17(13):1881-8.
131. Kestens L, Vanham G, Gigase P, Young G, Hannel I, Vanlangendonck F, et al. Expression of activation antigens, HLA-DR and CD38, on CD8 lymphocytes during HIV-1 infection. *Aids*. 1992;6(8):793-7.
132. Kestens L, Vanham G, Vereecken C, Vandenbruaene M, Vercauteren G, Colebunders RL, et al. Selective increase of activation antigens HLA-DR and CD38 on CD4+ CD45RO+ T lymphocytes during HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol*. 1994;95(3):436-41.
133. Giorgi JV, Ho HN, Hirji K, Chou CC, Hultin LE, O'Rourke S, et al. CD8+ lymphocyte activation at human immunodeficiency virus type 1 seroconversion: development of HLA-DR+ CD38- CD8+ cells is associated with subsequent stable CD4+ cell levels. The Multicenter AIDS Cohort Study Group. *J Infect Dis*. 1994;170(4):775-81.
134. Hazenberg MD, Stuart JW, Otto SA, Borleffs JC, Boucher CA, de Boer RJ, et al. T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: a

longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Blood*. 2000;95(1):249-55.

135. Doisne JM, Urrutia A, Lacabaratz-Porret C, Goujard C, Meyer L, Chaix ML, et al. CD8+ T cells specific for EBV, cytomegalovirus, and influenza virus are activated during primary HIV infection. *J Immunol*. 2004;173(4):2410-8.

136. Finkel TH, Tudor-Williams G, Banda NK, Cotton MF, Curiel T, Monks C, et al. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nat Med*. 1995;1(2):129-34.

137. Deeks SG, Kitchen CM, Liu L, Guo H, Gascon R, Narváez AB, et al. Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood*. 2004;104(4):942-7.

138. Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, Johnson TD, Owens B, Jacobson LP, et al. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis*. 1999;179(4):859-70.

139. Sousa AE, Carneiro J, Meier-Schellersheim M, Grossman Z, Victorino RM. CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J Immunol*. 2002;169(6):3400-6.

140. Hunt PW, Brenchley J, Sinclair E, McCune JM, Roland M, Page-Shafer K, et al. Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J Infect Dis*. 2008;197(1):126-33.

141. Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Bredt B, Hagos E, Lampiris H, et al. T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2003;187(10):1534-43.

142. Wang JK, Kiyokawa E, Verdin E, Trono D. The Nef protein of HIV-1 associates with rafts and primes T cells for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(1):394-9.

143. Swingler S, Mann A, Jacqué J, Brichacek B, Sasseville VG, Williams K, et al. HIV-1 Nef mediates lymphocyte chemotaxis and activation by infected macrophages. *Nat Med*. 1999;5(9):997-103.

144. Simmons A, Aluvihare V, McMichael A. Nef triggers a transcriptional program in T cells imitating single-signal T cell activation and inducing HIV virulence mediators. *Immunity*. 2001;14(6):763-77.
145. Rieckmann P, Poli G, Fox CH, Kehrl JH, Fauci AS. Recombinant gp120 specifically enhances tumor necrosis factor-alpha production and Ig secretion in B lymphocytes from HIV-infected individuals but not from seronegative donors. *J Immunol*. 1991;147(9):2922-7.
146. Lee C, Liu QH, Tomkowicz B, Yi Y, Freedman BD, Collman RG. Macrophage activation through CCR5- and CXCR4-mediated gp120-elicited signaling pathways. *J Leukoc Biol*. 2003;74(5):676-82.
147. Herbein G, Khan KA. Is HIV infection a TNF receptor signalling-driven disease? *Trends Immunol*. 2008;29(2):61-7.
148. Petrara MR, Cattelan AM, Zanchetta M, Sasset L, Freguja R, Gianesin K, et al. Epstein-Barr virus load and immune activation in human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *J Clin Virol*. 2012;53(3):195-200.
149. Wittkop L, Bitard J, Lazaro E, Neau D, Bonnet F, Mercie P, et al. Effect of cytomegalovirus-induced immune response, self antigen-induced immune response, and microbial translocation on chronic immune activation in successfully treated HIV type 1-infected patients: the ANRS CO3 Aquitaine Cohort. *J Infect Dis*. 2013;207(4):622-7.
150. Fielding K, Koba A, Grant AD, Charalambous S, Day J, Spak C, et al. Cytomegalovirus viremia as a risk factor for mortality prior to antiretroviral therapy among HIV-infected gold miners in South Africa. *PLoS One*. 2011;6(10):e25571.
151. Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Epling L, Teague J, Jacobson MA, et al. Valganciclovir reduces T cell activation in HIV-infected individuals with incomplete CD4+ T cell recovery on antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2011;203(10):1474-83.
152. Copeland NK, Eller MA, Kim D, Creegan M, Esber A, Eller LA, et al. Brief Report: Increased Inflammation and Liver Disease in HIV/HBV-Coinfected Individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2021;88(3):310-3.

153. Shmagel KV, Saidakova EV, Shmagel NG, Korolevskaya LB, Chereshev VA, Robinson J, et al. Systemic inflammation and liver damage in HIV/hepatitis C virus coinfection. *HIV Med.* 2016;17(8):581-9.
154. Chen X, Liu X, Duan S, Tang R, Zhou S, Ye R, et al. Plasma Inflammatory Biomarkers Associated with Advanced Liver Fibrosis in HIV-HCV-Coinfected Individuals. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(24).
155. Smith PD, Ochsenbauer-Jambor C, Smythies LE. Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system. *Immunol Rev.* 2005;206:149-59.
156. Epple HJ, Allers K, Tröger H, Kühl A, Erben U, Fromm M, et al. Acute HIV infection induces mucosal infiltration with CD4+ and CD8+ T cells, epithelial apoptosis, and a mucosal barrier defect. *Gastroenterology.* 2010;139(4):1289-300.
157. Nazli A, Chan O, Dobson-Belaire WN, Ouellet M, Tremblay MJ, Gray-Owen SD, et al. Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PLoS Pathog.* 2010;6(4):e1000852.
158. Maresca M, Mahfoud R, Garmy N, Kotler DP, Fantini J, Clayton F. The virotoxin model of HIV-1 enteropathy: involvement of GPR15/Bob and galactosylceramide in the cytopathic effects induced by HIV-1 gp120 in the HT-29-D4 intestinal cell line. *J Biomed Sci.* 2003;10(1):156-66.
159. Clarke TB, Davis KM, Lysenko ES, Zhou AY, Yu Y, Weiser JN. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat Med.* 2010;16(2):228-31.
160. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med.* 2006;12(12):1365-71.
161. Svärd J, Paquin-Proulx D, Buggert M, Noyan K, Barqasho B, Sönnernborg A, et al. Role of translocated bacterial flagellin in monocyte activation among individuals with chronic HIV-1 infection. *Clin Immunol.* 2015;161(2):180-9.
162. Jiang W, Lederman MM, Hunt P, Sieg SF, Haley K, Rodriguez B, et al. Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection. *J Infect Dis.* 2009;199(8):1177-85.

163. Sandler NG, Douek DC. Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(9):655-66.
164. Birx DL, Redfield RR, Tencer K, Fowler A, Burke DS, Tosato G. Induction of interleukin-6 during human immunodeficiency virus infection. *Blood*. 1990;76(11):2303-10.
165. Molina JM, Scadden DT, Byrn R, Dinarello CA, Groopman JE. Production of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta by monocytic cells infected with human immunodeficiency virus. *J Clin Invest*. 1989;84(3):733-7.
166. Pandrea I, Gaufin T, Brenchley JM, Gautam R, Monjure C, Gautam A, et al. Cutting edge: Experimentally induced immune activation in natural hosts of simian immunodeficiency virus induces significant increases in viral replication and CD4+ T cell depletion. *J Immunol*. 2008;181(10):6687-91.
167. Hileman CO, Funderburg NT. Inflammation, Immune Activation, and Antiretroviral Therapy in HIV. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2017;14(3):93-100.
168. Fuller MJ, Zajac AJ. Ablation of CD8 and CD4 T cell responses by high viral loads. *J Immunol*. 2003;170(1):477-86.
169. Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol*. 2003;77(8):4911-27.
170. Jin X, Bauer DE, Tuttleton SE, Lewin S, Gettie A, Blanchard J, et al. Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp Med*. 1999;189(6):991-8.
171. Youngblood B, Noto A, Porichis F, Akondy RS, Ndhlovu ZM, Austin JW, et al. Cutting edge: Prolonged exposure to HIV reinforces a poised epigenetic program for PD-1 expression in virus-specific CD8 T cells. *J Immunol*. 2013;191(2):540-4.
172. Youngblood B, Oestreich KJ, Ha SJ, Duraiswamy J, Akondy RS, West EE, et al. Chronic virus infection enforces demethylation of the locus that encodes PD-1 in antigen-specific CD8(+) T cells. *Immunity*. 2011;35(3):400-12.

173. Kaufmann DE, Kavanagh DG, Pereyra F, Zaunders JJ, Mackey EW, Miura T, et al. Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat Immunol.* 2007;8(11):1246-54.
174. Younes SA, Yassine-Diab B, Dumont AR, Boulassel MR, Grossman Z, Routy JP, et al. HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity. *J Exp Med.* 2003;198(12):1909-22.
175. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011;12(6):492-9.
176. Brooks DG, Teyton L, Oldstone MB, McGavern DB. Intrinsic functional dysregulation of CD4 T cells occurs rapidly following persistent viral infection. *J Virol.* 2005;79(16):10514-27.
177. Fahey LM, Wilson EB, Elsaesser H, Fistonich CD, McGavern DB, Brooks DG. Viral persistence redirects CD4 T cell differentiation toward T follicular helper cells. *J Exp Med.* 2011;208(5):987-99.
178. Lindqvist M, van Lunzen J, Soghoian DZ, Kuhl BD, Ranasinghe S, Kranias G, et al. Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. *J Clin Invest.* 2012;122(9):3271-80.
179. Raziorrouh B, Sacher K, Tawar RG, Emmerich F, Neumann-Haefelin C, Baumert TF, et al. Virus-Specific CD4+ T Cells Have Functional and Phenotypic Characteristics of Follicular T-Helper Cells in Patients With Acute and Chronic HCV Infections. *Gastroenterology.* 2016;150(3):696-706.e3.
180. Morou A, Brunet-Ratnasingham E, Dubé M, Charlebois R, Mercier E, Darko S, et al. Altered differentiation is central to HIV-specific CD4(+) T cell dysfunction in progressive disease. *Nat Immunol.* 2019;20(8):1059-70.
181. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature.* 2006;443(7109):350-4.
182. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med.* 2006;12(10):1198-202.
183. Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM, Price DA, Gostick E, Adams WC, et al. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med.* 2006;203(10):2281-92.

184. D'Souza M, Fontenot AP, Mack DG, Lozupone C, Dillon S, Meditz A, et al. Programmed death 1 expression on HIV-specific CD4+ T cells is driven by viral replication and associated with T cell dysfunction. *J Immunol.* 2007;179(3):1979-87.
185. Porichis F, Kwon DS, Zupkosky J, Tighe DP, McMullen A, Brockman MA, et al. Responsiveness of HIV-specific CD4 T cells to PD-1 blockade. *Blood.* 2011;118(4):965-74.
186. Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Sousa AE, Victorino RM, Paul WE. CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat Med.* 2002;8(4):319-23.
187. Clerici M, Stocks NI, Zajac RA, Boswell RN, Lucey DR, Via CS, et al. Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive patients. Independence of CD4+ cell numbers and clinical staging. *J Clin Invest.* 1989;84(6):1892-9.
188. Gruters RA, Terpstra FG, De Jong R, Van Noesel CJ, Van Lier RA, Miedema F. Selective loss of T cell functions in different stages of HIV infection. Early loss of anti-CD3-induced T cell proliferation followed by decreased anti-CD3-induced cytotoxic T lymphocyte generation in AIDS-related complex and AIDS. *Eur J Immunol.* 1990;20(5):1039-44.
189. Roos MT, Prins M, Koot M, de Wolf F, Bakker M, Coutinho RA, et al. Low T-cell responses to CD3 plus CD28 monoclonal antibodies are predictive of development of AIDS. *Aids.* 1998;12(14):1745-51.
190. Schellekens PT, Roos MT, De Wolf F, Lange JM, Miedema F. Low T-cell responsiveness to activation via CD3/TCR is a prognostic marker for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)-infected men. *J Clin Immunol.* 1990;10(2):121-7.
191. Clerici M, Shearer GM. A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today.* 1993;14(3):107-11.
192. Barcellini W, Rizzardi GP, Borghi MO, Fain C, Lazzarin A, Meroni PL. TH1 and TH2 cytokine production by peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected patients. *Aids.* 1994;8(6):757-62.

193. Klein SA, Dobmeyer JM, Dobmeyer TS, Pape M, Ottmann OG, Helm EB, et al. Demonstration of the Th1 to Th2 cytokine shift during the course of HIV-1 infection using cytoplasmic cytokine detection on single cell level by flow cytometry. *Aids*. 1997;11(9):1111-8.
194. Kirkpatrick CH, Davis KC, Horsburgh CR, Jr., Cohn DL, Penley K, Judson FN. Interleukin-2 production by persons with the generalized lymphadenopathy syndrome or the acquired immune deficiency syndrome. *J Clin Immunol*. 1985;5(1):31-7.
195. Clerici M, Hakim FT, Venzon DJ, Blatt S, Hendrix CW, Wynn TA, et al. Changes in interleukin-2 and interleukin-4 production in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive individuals. *J Clin Invest*. 1993;91(3):759-65.
196. Westby M, Marriott JB, Guckian M, Cookson S, Hay P, Dalgleish AG. Abnormal intracellular IL-2 and interferon-gamma (IFN-gamma) production as HIV-1-associated markers of immune dysfunction. *Clin Exp Immunol*. 1998;111(2):257-63.
197. Wang D, Jiang Y, Song Y, Zeng Y, Li C, Wang X, et al. Altered T-Cell Subsets are Associated with Dysregulated Cytokine Secretion of CD4(+) T Cells During HIV Infection. *J Inflamm Res*. 2021;14:5149-63.
198. Caruso A, Canaris AD, Licenziati S, Cantalamessa A, Folghera S, Lonati MA, et al. CD4+ and CD8+ lymphocytes of patients with AIDS synthesize increased amounts of interferon-gamma. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1995;10(4):462-70.
199. Meyaard L, Hovenkamp E, Keet IP, Hooibrink B, de Jong IH, Otto SA, et al. Single cell analysis of IL-4 and IFN-gamma production by T cells from HIV-infected individuals: decreased IFN-gamma in the presence of preserved IL-4 production. *J Immunol*. 1996;157(6):2712-8.
200. May MT, Gompels M, Delpech V, Porter K, Orkin C, Kegg S, et al. Impact on life expectancy of HIV-1 positive individuals of CD4+ cell count and viral load response to antiretroviral therapy. *Aids*. 2014;28(8):1193-202.
201. Croxford S, Kitching A, Desai S, Kall M, Edelstein M, Skingsley A, et al. Mortality and causes of death in people diagnosed with HIV in the era of highly active antiretroviral therapy compared with the general population: an analysis of a national observational cohort. *Lancet Public Health*. 2017;2(1):e35-e46.

202. Weber R, Ruppik M, Rickenbach M, Spoerri A, Furrer H, Battegay M, et al. Decreasing mortality and changing patterns of causes of death in the Swiss HIV Cohort Study. *HIV Med.* 2013;14(4):195-207.
203. Guaraldi G, Orlando G, Zona S, Menozzi M, Carli F, Garlassi E, et al. Premature age-related comorbidities among HIV-infected persons compared with the general population. *Clin Infect Dis.* 2011;53(11):1120-6.
204. Hunt PW, Lee SA, Siedner MJ. Immunologic Biomarkers, Morbidity, and Mortality in Treated HIV Infection. *J Infect Dis.* 2016;214 Suppl 2(Suppl 2):S44-50.
205. Kuller LH, Tracy R, Belloso W, De Wit S, Drummond F, Lane HC, et al. Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *PLoS Med.* 2008;5(10):e203.
206. Fahey JL, Taylor JM, Manna B, Nishanian P, Aziz N, Giorgi JV, et al. Prognostic significance of plasma markers of immune activation, HIV viral load and CD4 T-cell measurements. *Aids.* 1998;12(13):1581-90.
207. Rodger AJ, Lodwick R, Schechter M, Deeks S, Amin J, Gilson R, et al. Mortality in well controlled HIV in the continuous antiretroviral therapy arms of the SMART and ESPRIT trials compared with the general population. *Aids.* 2013;27(6):973-9.
208. Tang Z, Pan SW, Ruan Y, Liu X, Su J, Zhu Q, et al. Effects of high CD4 cell counts on death and attrition among HIV patients receiving antiretroviral treatment: an observational cohort study. *Sci Rep.* 2017;7(1):3129.
209. Lucero C, Torres B, León A, Calvo M, Leal L, Pérez I, et al. Rate and predictors of non-AIDS events in a cohort of HIV-infected patients with a CD4 T cell count above 500 cells/mm³. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2013;29(8):1161-7.
210. O'Halloran JA, Dunne E, Gurwith M, Lambert JS, Sheehan GJ, Feeney ER, et al. The effect of initiation of antiretroviral therapy on monocyte, endothelial and platelet function in HIV-1 infection. *HIV Med.* 2015;16(10):608-19.
211. Kuiper HM, de Jong R, Brouwer M, Lammers K, Wijdenes J, van Lier RA. Influence of CD28 co-stimulation on cytokine production is mainly regulated via interleukin-2. *Immunology.* 1994;83(1):38-44.

212. Rulifson IC, Sperling AI, Fields PE, Fitch FW, Bluestone JA. CD28 costimulation promotes the production of Th2 cytokines. *J Immunol.* 1997;158(2):658-65.
213. Fuse S, Zhang W, Usherwood EJ. Control of memory CD8⁺ T cell differentiation by CD80/CD86-CD28 costimulation and restoration by IL-2 during the recall response. *J Immunol.* 2008;180(2):1148-57.
214. Thomas RM, Gao L, Wells AD. Signals from CD28 induce stable epigenetic modification of the IL-2 promoter. *J Immunol.* 2005;174(8):4639-46.
215. Borowski AB, Boesteanu AC, Mueller YM, Carafides C, Topham DJ, Altman JD, et al. Memory CD8⁺ T cells require CD28 costimulation. *J Immunol.* 2007;179(10):6494-503.
216. Linterman MA, Denton AE, Divekar DP, Zvetkova I, Kane L, Ferreira C, et al. CD28 expression is required after T cell priming for helper T cell responses and protective immunity to infection. *Elife.* 2014;3.
217. Friedl P, Gunzer M. Interaction of T cells with APCs: the serial encounter model. *Trends Immunol.* 2001;22(4):187-91.
218. Gunzer M, Schäfer A, Borgmann S, Grabbe S, Zänker KS, Bröcker EB, et al. Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity.* 2000;13(3):323-32.
219. Chen CY, Del Gatto-Konczak F, Wu Z, Karin M. Stabilization of interleukin-2 mRNA by the c-Jun NH2-terminal kinase pathway. *Science.* 1998;280(5371):1945-9.
220. Salerno F, Guislain A, Freen-Van Heeren JJ, Nicolet BP, Young HA, Wolkers MC. Critical role of post-transcriptional regulation for IFN- γ in tumor-infiltrating T cells. *Oncoimmunology.* 2019;8(2):e1532762.
221. Peters PJ, Borst J, Oorschot V, Fukuda M, Krähenbühl O, Tschopp J, et al. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med.* 1991;173(5):1099-109.
222. Wolint P, Betts MR, Koup RA, Oxenius A. Immediate cytotoxicity but not degranulation distinguishes effector and memory subsets of CD8⁺ T cells. *J Exp Med.* 2004;199(7):925-36.

223. De Boer RJ, Homann D, Perelson AS. Different dynamics of CD4+ and CD8+ T cell responses during and after acute lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol.* 2003;171(8):3928-35.
224. Collins M, Ling V, Carreno BM. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol.* 2005;6(6):223.
225. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(4):251-62.
226. Schweneker M, Favre D, Martin JN, Deeks SG, McCune JM. HIV-induced changes in T cell signaling pathways. *J Immunol.* 2008;180(10):6490-500.
227. Sousa AE, Victorino RM. Single-cell analysis of lymphokine imbalance in asymptomatic HIV-1 infection: evidence for a major alteration within the CD8+ T cell subset. *Clin Exp Immunol.* 1998;112(2):294-302.
228. Fan J, Bass HZ, Fahey JL. Elevated IFN-gamma and decreased IL-2 gene expression are associated with HIV infection. *J Immunol.* 1993;151(9):5031-40.
229. Porichis F, Kaufmann DE. HIV-specific CD4 T cells and immune control of viral replication. *Curr Opin HIV AIDS.* 2011;6(3):174-80.
230. Zhang Y, Yin Y, Zhang S, Luo H, Zhang H. HIV-1 Infection-Induced Suppression of the Let-7i/IL-2 Axis Contributes to CD4(+) T Cell Death. *Sci Rep.* 2016;6:25341.
231. Sousa AE, Chaves AF, Doroana M, Antunes F, Victorino RM. Bulk cytokine production versus frequency of cytokine-producing cells in HIV1 infection before and during HAART. *Clin Immunol.* 2000;97(2):162-70.
232. Kapogiannis BG, Henderson SL, Nigam P, Sharma S, Chennareddi L, Herndon JG, et al. Defective IL-2 production by HIV-1-specific CD4 and CD8 T cells in an adolescent/young adult cohort. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2006;22(3):272-82.
233. Sen DR, Kaminski J, Barnitz RA, Kurachi M, Gerdemann U, Yates KB, et al. The epigenetic landscape of T cell exhaustion. *Science.* 2016;354(6316):1165-9.
234. Scott-Browne JP, López-Moyado IF, Trifari S, Wong V, Chavez L, Rao A, et al. Dynamic Changes in Chromatin Accessibility Occur in CD8(+) T Cells Responding to Viral Infection. *Immunity.* 2016;45(6):1327-40.

235. Yates KB, Tonnerre P, Martin GE, Gerdemann U, Al Abosy R, Comstock DE, et al. Epigenetic scars of CD8(+) T cell exhaustion persist after cure of chronic infection in humans. *Nat Immunol.* 2021;22(8):1020-9.
236. Martin GE, Sen DR, Pace M, Robinson N, Meyerowitz J, Adland E, et al. Epigenetic Features of HIV-Induced T-Cell Exhaustion Persist Despite Early Antiretroviral Therapy. *Front Immunol.* 2021;12:647688.
237. Bengsch B, Ohtani T, Khan O, Setty M, Manne S, O'Brien S, et al. Epigenomic-Guided Mass Cytometry Profiling Reveals Disease-Specific Features of Exhausted CD8 T Cells. *Immunity.* 2018;48(5):1029-45.e5.
238. Khan O, Giles JR, McDonald S, Manne S, Ngiow SF, Patel KP, et al. TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8(+) T cell exhaustion. *Nature.* 2019;571(7764):211-8.
239. Macatangay BJC, Gandhi RT, Jones RB, McMahan DK, Lalama CM, Bosch RJ, et al. T cells with high PD-1 expression are associated with lower HIV-specific immune responses despite long-term antiretroviral therapy. *Aids.* 2020;34(1):15-24.
240. Fromentin R, Bakeman W, Lawani MB, Khoury G, Hartogensis W, DaFonseca S, et al. CD4+ T Cells Expressing PD-1, TIGIT and LAG-3 Contribute to HIV Persistence during ART. *PLoS Pathog.* 2016;12(7):e1005761.
241. Prakken B, Wauben M, Genini D, Samodal R, Barnett J, Mendivil A, et al. Artificial antigen-presenting cells as a tool to exploit the immune 'synapse'. *Nat Med.* 2000;6(12):1406-10.
242. Zhang J, Li Q, Wu Y, Wang D, Xu L, Zhang Y, et al. Cholesterol content in cell membrane maintains surface levels of ErbB2 and confers a therapeutic vulnerability in ErbB2-positive breast cancer. *Cell Commun Signal.* 2019;17(1):15.
243. Cooper RA. Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells. *J Supramol Struct.* 1978;8(4):413-30.
244. Yang ST, Kreutzberger AJB, Lee J, Kiessling V, Tamm LK. The role of cholesterol in membrane fusion. *Chem Phys Lipids.* 2016;199:136-43.
245. Dustin ML, Chakraborty AK, Shaw AS. Understanding the structure and function of the immunological synapse. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(10):a002311.

246. Meddens MBM, Mennens SFB, Celikkol FB, Te Riet J, Kanger JS, Joosten B, et al. Biophysical Characterization of CD6-TCR/CD3 Interplay in T Cells. *Front Immunol.* 2018;9:2333.
247. Bashour KT, Tsai J, Shen K, Lee JH, Sun E, Milone MC, et al. Cross talk between CD3 and CD28 is spatially modulated by protein lateral mobility. *Mol Cell Biol.* 2014;34(6):955-64.
248. Moss WC, Irvine DJ, Davis MM, Krummel MF. Quantifying signaling-induced reorientation of T cell receptors during immunological synapse formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(23):15024-9.
249. Arad G, Levy R, Nasie I, Hillman D, Rotfogel Z, Barash U, et al. Correction: Binding of Superantigen Toxins into the CD28 Homodimer Interface Is Essential for Induction of Cytokine Genes That Mediate Lethal Shock. *PLoS Biol.* 2015;13(8):e1002237.
250. Dustin ML. Cell adhesion molecules and actin cytoskeleton at immune synapses and kinapses. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19(5):529-33.
251. French MA, King MS, Tschampa JM, da Silva BA, Landay AL. Serum immune activation markers are persistently increased in patients with HIV infection after 6 years of antiretroviral therapy despite suppression of viral replication and reconstitution of CD4+ T cells. *J Infect Dis.* 2009;200(8):1212-5.
252. Carlyle BC, Kitchen RR, Mattingly Z, Celia AM, Trombetta BA, Das S, et al. Technical Performance Evaluation of Olink Proximity Extension Assay for Blood-Based Biomarker Discovery in Longitudinal Studies of Alzheimer's Disease. *Front Neurol.* 2022;13:889647.
253. Younas M, Psomas C, Reynes C, Cezar R, Kundura L, Portales P, et al. Microbial Translocation Is Linked to a Specific Immune Activation Profile in HIV-1-Infected Adults With Suppressed Viremia. *Front Immunol.* 2019;10:2185.
254. Sandler NG, Wand H, Roque A, Law M, Nason MC, Nixon DE, et al. Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *J Infect Dis.* 2011;203(6):780-90.
255. Epeldegui M, Magpantay L, Guo Y, Halec G, Cumberland WG, Yen PK, et al. A prospective study of serum microbial translocation biomarkers and risk of AIDS-related non-Hodgkin lymphoma. *Aids.* 2018;32(7):945-54.

256. Artur Skowrya TM, Magdalena Suchacz, Agnieszka Skowrya, and Alicja Wiercińska-Drapała. The role of serum I-FABP concentration in assessment of small intestine mucosa among HIV-infected patients.

European Journal of Inflammation. 2015;13(2):75-81.

257. Kamphorst AO, Wieland A, Nasti T, Yang S, Zhang R, Barber DL, et al. Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent. *Science*. 2017;355(6332):1423-7.

258. Babu H, Ambikan AT, Gabriel EE, Svensson Akusjärvi S, Palaniappan AN, Sundaraj V, et al. Systemic Inflammation and the Increased Risk of Inflamm-Aging and Age-Associated Diseases in People Living With HIV on Long Term Suppressive Antiretroviral Therapy. *Front Immunol*. 2019;10:1965.

259. Lederman MM, Funderburg NT, Sekaly RP, Klatt NR, Hunt PW. Residual immune dysregulation syndrome in treated HIV infection. *Adv Immunol*. 2013;119:51-83.

260. Cai CW, Sereti I. Residual immune dysfunction under antiretroviral therapy. *Semin Immunol*. 2021;51:101471.

261. Desai S, Landay A. Early immune senescence in HIV disease. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2010;7(1):4-10.

262. Marcus JL, Leyden WA, Alexeeff SE, Anderson AN, Hechter RC, Hu H, et al. Comparison of Overall and Comorbidity-Free Life Expectancy Between Insured Adults With and Without HIV Infection, 2000-2016. *JAMA Netw Open*. 2020;3(6):e207954.

