

Université de Montréal

Exploration fonctionnelle des réponses cellulaires T CD4⁺ et CD8⁺ dans
l'infection par le VIH-1

Par
Gaëlle Breton

Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en virologie et immunologie

Avril, 2010

©Gaëlle Breton, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Exploration fonctionnelle des réponses cellulaires T CD4⁺ et CD8⁺ dans
l'infection par le VIH-1

présentée par :

Gaëlle Breton

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Naglaa Shoukry	président-rapporteur
Dr Rafick-Pierre Sékaly	directeur de recherche
Dr Petronela Ancuta	membre du jury
Dr Daniel C Douek	examineur externe
Dr Hugo Soudeyns	représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

L'infection par le VIH-1 est caractérisée par une déplétion progressive des cellules T CD4⁺ ainsi que par un dysfonctionnement des cellules T qui, en l'absence de traitements anti-rétroviraux, conduit inéluctablement à la progression de la maladie vers le stade SIDA. Certains des mécanismes impliqués dans ce dysfonctionnement de la réponse cellulaire T ont été élucidés et ont révélé un rôle important de la molécule PD-1 dans l'exhaustion des cellules T en phase chronique de l'infection. En effet, des niveaux élevés de PD-1 ont été associés à une charge virale élevée ainsi qu'à une diminution de la production de cytokines et de la capacité de proliférer des cellules T spécifiques du virus. De plus, bloquer *in vitro* l'interaction de PD-1 avec son ligand PD-L1 en utilisant un anticorps bloquant rétabli la fonction de ces cellules.

De façon intéressante, notre groupe ainsi que d'autres équipes, ont montré que l'expression de PD-1 était non seulement augmentée sur les cellules spécifiques de l'antigène mais aussi sur les cellules T totales. Cependant, peu de choses sont connues quant à l'impact de l'expression de PD-1 sur le renouvellement et la différenciation des cellules T qui expriment PD-1, et ce au cours de l'infection. L'expression de PD-1 n'a notamment pas été étudiée en phase aiguë de l'infection. Nous montrons clairement que, aussi bien chez les individus en phase aiguë qu'en phase chronique de l'infection, l'expression de PD-1 est augmentée sur toutes les sous-populations T, y compris les cellules naïves. Nous avons également mis en relief une distribution anormale des sous-populations T, ces cellules ayant un phénotype plus différencié, et ce à tous les stades de la maladie. Dans cette thèse, nous discutons le rôle possible de PD-1 dans l'homéostasie des cellules T chez les individus infectés par le VIH-1. En étudiant la transition de la phase aiguë à la phase chronique de l'infection, nous avons trouvé que les sous-populations T CD8⁺ des individus récemment infectés exprimaient moins de PD-1 que celles des individus à un stade plus avancé de la maladie. Ces niveaux plus élevés de PD-1

sur les cellules T CD8⁺ en phase chronique sont associés à des niveaux réduits de prolifération *in vivo* – comme mesuré par l’expression de Ki67 – suggérant que l’expression de PD-1 est partiellement impliquée dans cette perte de fonction des cellules T CD8⁺. De plus, les cellules naïves s’accumulent en fréquence lors de la transition de la phase aiguë à la phase chronique de l’infection. Considérant que les cellules naïves expriment déjà des hauts niveaux de PD-1, nous avons émis l’hypothèse que l’activation initiale des cellules T chez les individus chroniquement infectés est affectée. En résumé, nous proposons un modèle où des hauts niveaux d’expression de PD-1 sont associés à (1) un dysfonctionnement de la réponse cellulaire T CD8⁺ et (2) un défaut d’activation des cellules naïves ce qui contribue non seulement à la progression de la maladie mais aussi ce qui va limiter l’efficacité de potentiels vaccins dans l’infection par le VIH-1 en empêchant toute nouvelle réponse d’être initiée.

Afin de mieux disséquer la réponse immunitaire mise en place lors d’une infection comme celle du VIH-1, nous avons développé un outil qui permet de détecter les cellules T CD4⁺ i.e. des tétramères de CMH de classe II. Ces réactifs ont pour but d’augmenter l’avidité du CMH de classe II pour son ligand et donc de détecter des TCR de faible affinité. Dans cette thèse, nous décrivons une méthode originale et efficace pour produire diverses molécules de HLA-DR liant de façon covalente le peptide antigénique.

Mieux déterminer les mécanismes responsables de l’exhaustion des cellules T dans l’infection par le VIH-1 et de la progression de la maladie, ainsi que développer des outils de pointe pour suivre ces réponses T, est central à une meilleure compréhension de l’interaction entre le virus et le système immunitaire de l’hôte, et permettra ainsi le développement de stratégies pertinentes pour lutter contre l’infection par le VIH-1.

Mots clés: VIH-1, PD-1, cellules T CD8⁺ et T CD4⁺, infection aiguë et chronique, tétramères de CMH de classe II

ABSTRACT

HIV-1 infection leads to a progressive CD4⁺ T cell depletion and T cell dysfunction, which in the absence of successful anti-retroviral therapy, results in individuals progressing to AIDS. Some of the underlying mechanisms for this T cell dysfunction have been elucidated and reveal an important role for the inhibitory receptor program death-1 (PD-1) in T cell exhaustion during chronic HIV-1 infection. Indeed, PD-1 up regulation correlates with increased viral load as well as decreased cytokine production and proliferative capacity of HIV-1 specific T cells. Moreover, blocking *in vitro* the interaction of PD-1 with its counter-receptor PD-L1 using antibodies restores HIV-1 specific T cell effector functions. Interestingly, our group and others have shown that levels of PD-1 during chronic HIV-1 infection are not only up regulated on virus-specific T cells but also on the total pool of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. However, little is known about the impact of PD-1 expression on the turnover and maturation status of the PD-1 expressing cells during the course of the disease. Of note, PD-1 expression has never been investigated in acute HIV-1 infection. In this thesis, we clearly show that, in both acutely and chronically HIV-1 infected individuals, PD-1 is up regulated on all T cell subsets, including naïve T cells. We also uncovered an abnormal distribution of T cell subsets toward a more differentiated phenotype at all stages of the disease. In this thesis, we discuss the possible role of PD-1 in the homeostasis breakdown observed in HIV-1 infected individuals. More interestingly, if we focus on the transition from the acute to the chronic phase of the infection, we found that PD-1 is expressed at much lower levels on total CD8⁺ T cell subsets from acutely infected individuals than chronically infected individuals. These augmented PD-1 expression levels on CD8⁺ T cell in chronic infection are associated with reduced levels of *in vivo* cell proliferation - as monitored by Ki67 expression - suggesting that PD-1 expression may be partially responsible for the loss of CD8⁺ T cell function. In addition, naïve T cells accumulate in frequency during the transition from the acute to the chronic phase of the infection. Considering that naïve T cells already express high levels of PD-1, we hypothesize that priming of T cell might

be impaired in chronically infected individuals. Altogether, we propose a model where high PD-1 expression is associated with (1) impaired CD8⁺ T cell function in chronic HIV-1 infection and suggest that lower levels of PD-1 may partially preserve the CD8⁺ T cell function and (2) impaired priming of T cells contributing to the progressive immunodeficiency in HIV-1 infection but also limiting the effectiveness of vaccine strategies by preventing any new responses to be triggered.

To better understand immune responses in infection such as HIV-1 disease, we next developed multimeric reagents for the detection of CD4⁺ T cells, namely tetramers of HLA-DR molecules. These reagents aim at increasing the overall avidity of peptide-MHC class II complexes to detect low affinity TCRs. In this thesis, we describe a versatile and efficient method to produce different soluble HLA-DR molecules covalently linked to antigenic peptides.

Gaining further insights into mechanisms underlying T cell exhaustion and disease progression, in addition to the development of state-of-the-art immune monitoring tools, will be crucial in better understanding of the interplay between the virus and the host immune system, leading to rational strategies in the fight against the AIDS epidemic.

Keywords: HIV-1, PD-1, CD8⁺ and CD4⁺ T cell, acute and chronic infection, MHC class II tetramers

TABLE DES MATIÈRES

Page de titre.....	i
Identification du jury.....	ii
Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	ix
Liste des annexes.....	x
Listes des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xiv
Chapitre 1 Introduction.....	1
Pathogénèse du VIH-1 : paradoxe entre déficience immunitaire et hyperactivation immunitaire.....	2
1.1. Histoire naturelle de l'infection par le VIH-1.....	2
1.2. Déficience quantitative et qualitative de la réponse T lors de l'infection par le VIH-1.....	5
1.2.1. Déficience quantitative : la déplétion massive des cellules T CD4 ⁺	5
1.2.2. Déficience qualitative de la réponse T spécifique du VIH-1 au cours de l'infection.....	10
1.3. Hyperactivation immunitaire et pathogénèse du VIH-1.....	14
1.3.1. Les signes d'une hyperactivation immunitaire.....	15
1.3.2. Les causes de l'hyperactivation immunitaire.....	16
1.4. Lien entre hyperactivation et déficience du système immunitaire dans l'infection par le VIH-1.....	17
1.5. Conclusion.....	26
Chapitre 2 Hypothèses de travail et objectifs de recherche.....	27

Chapitre 3 Article 1 : PD-1, a marker for the breakdown of naïve/memory T cell subset homeostasis in HIV-1 infection.....	34
Chapitre 4 Article 2: Generation of a flexible expression system for human MHC class II tetrameric complexes and detection of antigen-specific CD4⁺ T cells.....	81
Chapitre 5 Discussion et perspectives.....	105
5.1. PD-1: marqueur d'activation, marqueur de differentiation et marqueur d'exhaustion.....	106
5.2. PD-1 et pathogénèse de l'infection par le VIH-1.....	109
5.2.1. PD-1 est surexprimé sur les sous-populations T naïve/mémoire à tous les stades de l'infection par le VIH-1.....	109
5.2.2. PD-1, un marqueur du déséquilibre homéostatique observé lors de l'infection par le VIH-1.....	111
5.2.3. PD-1 et hyperactivation au cours de l'infection par le VIH-1.....	117
5.2.4. PD-1 et la transition de la phase aiguë à la phase chronique de l'infection par le VIH-1.....	119
5.2.5. Reconstitution immunitaire après traitement antiviral dans l'infection par le VIH-1.....	125
5.2.6. Modèle hypothétique de l'immunopathogénèse du VIH-1.....	126
5.3. Inhiber la voie PD-1/PD-L1: potentiel thérapeutique dans l'infection par le VIH-1.....	130
5.4. Tétramères de CMH de classe II: un outil très utile dans le développement d'un vaccin anti-VIH-1.....	136
5.5. Perspectives et conclusion.....	141
Chapitre 6 Références.....	144
Chapitre 7 Annexes.....	xv

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 3 Supplementary data 1. Clinical characteristics of HIV-1 infected patients.....	76
--	----

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1 Figure 1. Représentation schématique de l'évolution naturelle du taux de cellules T CD4 ⁺ et de la charge virale au cours de l'infection par le VIH-1 chez un progresseur typique.....	4
Chapitre 3 Figure 1. Impaired homeostasis and increased expression of PD-1 on T cell subsets is associated with disease progression.....	67
Chapitre 3 Figure 2. PD-1 over expression does not correlate with increased T cell turnover in HIV-1 infection.....	69
Chapitre 3 Figure 3. PD-1 up regulation is not associated with CD28 down regulation in HIV-1 infected patients.....	72
Chapitre 3 Figure 4. PD-1 up regulation does not correlate with increased number of CD57 ⁺ T cells in HIV-1 infection.....	74
Chapitre 3 Supplementary data 2. PD-1 expression is up regulated on total ex-vivo CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells in HIV-1 infected patients.....	77
Chapitre 3 Supplementary data 3. PD-1 up regulation does not correlate with time of infection in HIV-1 infection.....	78
Chapitre 3 Supplementary data 4. CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cell differentiation and PD-1 expression.....	79
Chapitre 3 Supplementary data 5. Example of PD-1 expression on total <i>ex-vivo</i> CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells subsets in HIV-1 infected individuals.....	80
Chapitre 4 Figure 1. Production of different soluble MHC class II/peptide complexes.....	101
Chapitre 4 Figure 2. T cell activation by APCs expressing MHC class II molecules containing a covalently linked peptide.....	102

Chapitre 4 Figure 3. Detection of peptide-specific CD4 ⁺ T cells using MHC class II tetramers.....	103
Chapitre 4 Figure 4. Optimization of the conditions for MHC class II tetramer staining.....	104
Chapitre 5 Figure 2. Modèle de l'immunopathogénèse de l'infection par le VIH-1.....	129
Annexe 1 Figure 1. Identification avec un tétramère de CMH de classe II de cellules spécifiques du VIH-1.....	xv
Annexe 2 Figure 1. Inhibition of T cell activation by the PD-1/PD-L1 pathway.....	xl
Annexe 2 Figure 2. Restoration of effector functions of HIV-specific CD8 T cells by inhibiting the PD-1/PD-L1 pathway.....	xli

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 Identification de cellules T CD4 ⁺ spécifiques du VIH-1 en utilisant des tétramères de CMH de classe II.....	xiv
Annexe 2 PD-1: a critical regulator of T cell function and a strong target for immunotherapies for chronic viral infections.....	xvi

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AICD	Activated Induced Cell Death
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
CCR5	Chemokine (C-C motif) Receptor 5
CCR7	Chemokine (C-C motif) Receptor 7
CD3 ζ	Cluster of Differentiation 3 ζ
CD4	Cluster of Differentiation 4
CD8	Cluster of Differentiation 8
CD27	Cluster of Differentiation 27
CD28	Cluster of Differentiation 28
CD38	Cluster of Differentiation 38
CD57	Cluster of Differentiation 57
CD70	Cluster of Differentiation 70
CD80	Cluster of Differentiation 80
CD86	Cluster of Differentiation 86
CD107a	Cluster of Differentiation 107a
CD127	Cluster of Differentiation 127
CMH	Complexe Majeur d’Histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4
CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) Receptor 4
DC	Dendritic Cell
EBV	Epstein-Barr Virus
ELISA	Enzyme-Linked immunoSorbent Assay
ELISPOT	ELISA Spot
Env	Enveloppe
FASL	Fas Ligand
Gag	Group Antigen
GALT	Gut-Associated Lymphoid Tissue

gp120	Glycoprotein 120
HA	Hemagglutinine A
HCV	Hepatitis C Virus
HLA	Human Leucocyte Antigen
HSV	Herpes Simplex Virus
IFN- α	Interféron- α
IFN- γ	Interféron- γ
IL-1 β	Interleukine-1 β
IL-2	Interleukine-2
IL-6	Interleukine-6
IL-7	Interleukine-7
IL-7R	Interleukine-7R
IL-10	Interleukine-10
IL-10R	Interleukine-10R
IL-15	Interleukine-15
K _{off}	Constante de dissociation
LCMV	Lymphocytic Choriomeningitis Virus
LPS	Lipopolysaccharide
LTNP	Long Term Non-Progressor
MIP-1 α	Macrophage Inflammatory Protein-1 α
MIP-1 β	Macrophage Inflammatory Protein-1 β
M Φ	Macrophage
Nef	Negative factor
NF- κ B	Nuclear Factor κ B
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PD-1	Programmed Death-1
PD-L1	Programmed Death-Ligand 1
PD-L2	Programmed Death-Ligand 2
PKC- θ	Protéine Kinase C- θ
Pol	Polymerase

RANTES	Regulated Upon Activation Normally T-Expressed and Presumably Secreted
siRNA	small interfering Ribonucleic Acid
SHP-1	Src Homology Phosphatase-1
SHP-2	Src Homology Phosphatase-2
SIDA	Syndrome de l'ImmunoDéficiency Humaine
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
T _{CM}	T central memory
T _E	T effector
T _{EM}	T effector memory
T _N	T naïve
T _{TM}	T transitional memory
T _{TD}	T terminally differentiated
TCR	T Cell Receptor
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
TREC	T Cell Receptor Excision Circle
TLR	Toll-Like Receptor
TLR-4	Toll-Like Receptor-4
TLR-7	Toll-Like Receptor-7
VIH-1	Virus de l'Immunodéficiency Humaine-1
VIH-2	Virus de l'Immunodéficiency Humaine-2
VV	Vaccinia Virus
ZAP-70	ζ -associated protein-70

Remerciements

Je remercie sincèrement le Dr Rafick-Pierre Sékaly, mon directeur de recherche, de m'avoir supervisée pendant toutes ces années de doctorat, me donnant ainsi la possibilité d'évoluer dans un environnement où la création, l'innovation et la stimulation intellectuelle sont intenses.

Je remercie le Dr Bader Yassine-Diab, qui m'a pris sous son aile dès mon arrivée au laboratoire en tant qu'étudiante à la maîtrise, et m'a ainsi permis de profiter de son expérience et de son enthousiasme pour la recherche scientifique.

Je remercie tous les membres du laboratoire, passés et présents, pour les bons moments passés ensemble mais aussi les moments de difficulté inhérents à la science.

Je remercie, plus particulièrement, Anne-Elen Kernaleguen, Sandrine Crabé et Catherine Riou pour leur soutien inconditionnel et leur présence en tout temps.

1. Introduction

PATHOGÉNÈSE DU VIH-1 : PARADOXE ENTRE DÉFICIENCE IMMUNITAIRE ET HYPERACTIVATION IMMUNITAIRE.

L'infection par le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) est caractérisée par une diminution progressive du taux de lymphocytes T CD4⁺ ainsi que par une activation chronique du système immunitaire. La déplétion des lymphocytes T CD4⁺ par le virus n'explique pas à elle seule le dysfonctionnement du système immunitaire et l'incapacité à contrôler l'infection (Pandrea et al, 2007). En effet, l'activation chronique des cellules, causée par la persistance du virus mais aussi par la réaction inflammatoire due à l'infection, semble être le mécanisme le plus important par lequel le VIH-1 conduit à la déficience du système immunitaire. Ainsi, le degré d'hyperactivation constitue un meilleur indice de progression de la maladie que le niveau de la charge virale (Giorgi et al, 1999; Leng et al, 2001; Sousa et al, 2002; Hazenberg et al, 2003; Koning et al, 2005). Comprendre le lien entre déficience immunitaire et hyperactivation immunitaire au cours de l'infection semble être primordial pour prédire l'évolution de la maladie et établir de nouvelles thérapies visant à en ralentir la progression.

1.1. Histoire naturelle de l'infection par le VIH-1

L'infection par le VIH-1 évolue généralement en trois phases : une phase de primo infection, suivie d'une phase de latence puis de la phase clinique ou SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise) (Pantaleo et Fauci, 1996) (Figure 1). Chez un individu présentant une progression typique (70 à 80% des patients), l'intervalle entre l'infection initiale et l'apparition des symptômes est habituellement compris entre huit et dix ans.

L'*infection initiale* ou *primo infection* est associée à une production de virions élevée, la quantité de virus dans le sang pouvant atteindre 10^8 copies par millilitre. Le pic de virémie est observé trois à six semaines après l'infection, la charge virale diminuant ensuite pour atteindre un niveau relativement stable, propre à chaque patient, qui subira peu de variations majeures au cours de la phase chronique (Kaufmann et al, 1998). La valeur atteinte à ce stade permet de prédire la vitesse à laquelle l'infection progressera (Buchbinder et al, 1994; Mellors et al, 1996). En parallèle, une chute du nombre des cellules T CD4⁺ dans le sang est observée (Cooper et al, 1988). La réponse des cellules T cytotoxiques (CTL), quant à elle, augmente, permettant ainsi de diminuer la charge virale et de la contrôler; elle est cependant insuffisante pour éradiquer le virus (Borrow et al, 1994; Koup et al, 1994). La réaction du système immunitaire va également mener à l'apparition d'anticorps dirigés contre les protéines virales détectables dans le sérum : c'est la séroconversion.

La *phase chronique*, ou *phase de latence clinique*, est une phase asymptomatique s'étendant généralement de huit à dix ans. Durant cette phase, la concentration de virus plasmatique reste relativement stable : le virus se réplique alors à la même vitesse que celle à laquelle il est éliminé par la réponse immunitaire. Le site majeur de production du virus se trouve au niveau des organes lymphoïdes secondaires (organes lymphoïdes associés au tractus gastro-intestinal ou GALT - gut associated lymphoïd tissue -, ganglions lymphatiques et rate). Des réponses dirigées contre les différentes protéines du virus sont observées, mais restent cependant insuffisantes pour éliminer le virus. Le taux de lymphocytes T CD4⁺ va alors lentement diminuer jusqu'à être inférieur à 200 cellules par millilitre, seuil généralement associé au développement des premiers symptômes liés à une immunodépression.

La *phase clinique* ou *SIDA* est caractérisée par un effondrement du nombre de cellules T CD4⁺ associé à une augmentation rapide et importante de la charge virale. Cet état d'immunodépression est associé au développement d'infections opportunistes et à l'apparition de cancers (e.g. Sarcome de Kaposi).

Dans certains cas cependant, la progression de la maladie suit un schéma différent. En effet, alors que les signes cliniques de déficit immunitaire apparaissent en général huit à dix ans après la séroconversion, certains patients connaissent une période de latence raccourcie (progressseurs rapides) ou, au contraire, allongée (non progressseurs à long terme ou LTNP). Chez les progressseurs rapides (10 à 15% des cas), la phase chronique peut-être singulièrement réduite et les patients développent alors un SIDA en moins de 5 ans. La phase clinique peut toutefois, chez certains de ces patients, être plus longue qu'à l'ordinaire. À l'opposé, les non progressseurs à long terme (5% des cas) parviennent à contrôler leur virémie et garder un taux de cellules T CD4⁺ normal pendant plus de 10 ans.

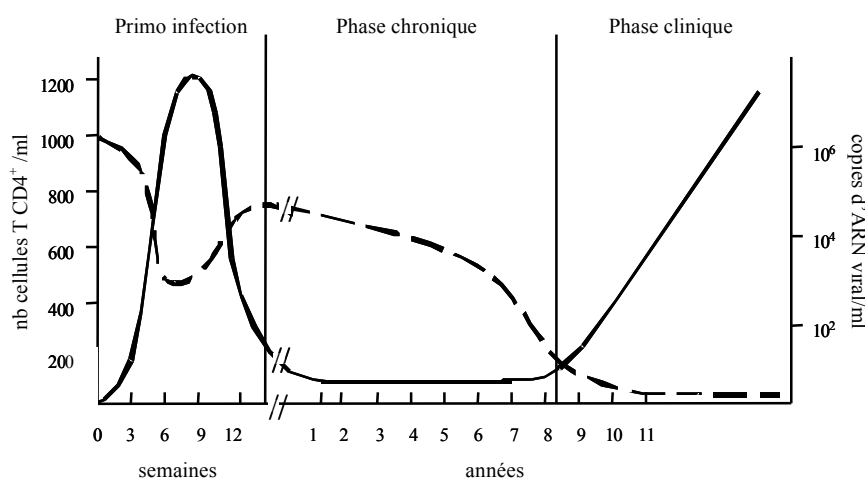


Figure 1 Représentation schématique de l'évolution naturelle du taux de cellules T CD4⁺ et de la charge virale au cours de l'infection par le VIH-1 chez un progressseur typique. En primo infection, la réplication massive du virus permet d'observer un pic de virémie trois à six semaines après l'infection initiale, causant une chute importante du taux de cellules T CD4⁺ sanguin. La réponse de l'organisme permet cependant d'éliminer la majeure partie du virus. Le taux de T CD4⁺ remonte alors. Pendant la phase chronique, le virus se réplique dans les organes lymphoïdes secondaires mais est éliminé par la réponse des cellules T à la même vitesse, permettant ainsi de conserver de façon stable une charge virale

basse. La phase clinique se déclare lorsque le système immunitaire n'est plus capable de contenir l'infection. Le taux de cellules T CD4⁺ s'effondre alors et la charge virale explose. D'après Pantaleo, G. et Fauci, A.S. 1996. Immunopathogenesis of HIV infection. Annu.Rev. Microbiol. 50 :825-854.

1.2. Déficience quantitative et qualitative de la réponse T lors de l'infection par le VIH-1

L'infection par le VIH-1 est caractérisée par une altération quantitative et qualitative de la réponse à médiation cellulaire, et notamment de la réponse des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques du virus. Ce dysfonctionnement des cellules T spécifiques du VIH-1 est, pour le virus, un moyen de persister dans l'organisme.

1.2.1. Déficience quantitative : la déplétion massive des cellules T CD4⁺

Dans un contexte non pathologique, la taille du compartiment CD4 est régulée par un équilibre entre la production de nouvelles cellules par le thymus et la prolifération et la mort de ces cellules en périphérie. Lors de l'infection par le VIH-1, cet équilibre est rompu et les mécanismes conduisant à la déplétion des cellules T CD4⁺ sont multiples. La destruction accrue des cellules T CD4⁺ peut être due soit (1) à une lyse directe des cellules infectées par effet cytopathique du virus ou par effet cytotoxique des cellules T CD8⁺ soit (2) à la mort indirecte des cellules T CD4⁺ non infectées par AICD (Activated Induced Cell Death) ou par apoptose induite par des protéines virales (Alimonti et al, 2003; Varbanov et al, 2006). En plus de la destruction massive des cellules T CD4⁺, la production de cellules T par le thymus est diminuée chez les individus infectés par le VIH-1 (Voir revue McCune, 1997).

Lyse des cellules T CD4⁺

Le VIH-1 peut infecter directement les cellules T CD4⁺ et les détruire par effet cytopathique. En effet, le VIH-1 infecte les cellules qui expriment le récepteur CD4 comme les lymphocytes T CD4⁺ mais aussi, les macrophages (MΦ) et les cellules dendritiques (DC) (Maddon et al, 1986). Un co-récepteur est également nécessaire pour l'infection par le VIH-1 : bien que plusieurs récepteurs de chimiokines puissent remplir cette fonction, le VIH-1 utilise majoritairement CCR5 (Deng et al, 1996) et/ou CXCR4 (Feng et al, 1996). Indépendamment de la route de transmission du virus (c'est-à-dire transmission par voie mucoale ou voie systémique), la plupart des nouvelles infections se font par les souches du virus utilisant CCR5. Les souches à tropisme CXCR4 apparaissent plus tard dans l'infection; elles sont associées à la progression de la maladie et ont un potentiel pathogénique plus grand (Schuitemaker et al, 1992). Dans les premières heures d'une infection par voie vaginale, les souches CCR5 du virus traversent l'épithélium vaginal par transcytose ou par l'intermédiaire de cellules comme les cellules épithéliales ou les DC. Ces cellules sont capables de capturer et transférer le virus aux cellules cibles sous épithéliales, exprimant le co-récepteur CCR5, que sont les lymphocytes T CD4⁺, les MΦ et les DC. Les cellules infectées ainsi que les virions nouvellement produits, en gagnant le ganglion lymphatique drainant, permettent la dissémination du virus par la circulation sanguine vers notamment la rate, les ganglions lymphatiques et le GALT, ce qui résulte en une infection massive de nombreuses cellules permissives (Pope et Haase, 2003).

Le GALT – et non la rate ou les ganglions lymphatiques – constitue le plus grand réservoir de cellules T CD4⁺ (environ 80% de tous les T CD4⁺). De plus, le GALT, étant un environnement exposé à de nombreux antigènes, est enrichi en cellules effectrices mémoires exprimant le co-récepteur CCR5 (Veazey et al, 1998, 2003; Kunkel et al, 2002) et constitue donc un site anatomique privilégié pour la réplication virale. Des études montrent qu'il y a une déplétion massive des T CD4⁺ au niveau du GALT lors de l'infection initiale par le VIH-1 (Guadalupe et al,

2003; Brenchley et al, 2004; Mehandru et al, 2004; Li et al, 2005; Mattapallil et al, 2005). En utilisant des techniques de PCR quantitative réalisée sur une cellule et en déterminant le nombre de copies d'ADN par cellule, Mattapallil *et al* ont montré que 60% des cellules mémoires du GALT, dans le modèle SIV, sont infectées 10 jours après la contamination; 80% de ces cellules infectées ont disparu 4 jours plus tard (Mattapallil et al, 2005). Ces observations suggèrent que, vu le très grand nombre de cellules infectées, la lyse des cellules par effet cytopathique du virus ou par effet cytotoxique des T CD8⁺ suffit à expliquer la déplétion des T CD4⁺; la mort par AICD ou apoptose des cellules non infectées semble minoritaire. Bien que les cellules effectrices mémoires constituent la moitié des cellules T de l'organisme, seulement 15% se trouvent dans le sang ou les ganglions lymphatiques. Cela explique pourquoi la déplétion observée dans le sang lors de la primo infection ne reflète pas celle mesurée au niveau de la muqueuse intestinale.

La déplétion massive des cellules T CD4⁺ dans le GALT est une caractéristique de la primo infection, mais elle persiste pendant la phase chronique de l'infection par le VIH-1. Chez le macaque infecté par le SIV, cinq mois après l'infection, la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ dans le GALT est toujours visible (Veazey et al, 1998), et il n'y a qu'une restauration partielle lors de la phase chronique de l'infection (Smit-McBride et al, 1998). D'ailleurs, la muqueuse intestinale est toujours le site d'une intense réponse T CD8⁺ spécifique du VIH-1 après la primo infection (Ibarrondo et al, 2005; Shacklett et al, 2003). Mais, contrairement à la phase de primo infection, la lyse directe des lymphocytes T CD4⁺ par le virus ou par les cellules T cytotoxiques n'expliquent qu'en partie la déplétion du compartiment CD4, et notamment des cellules T CD4⁺ mémoires, en phase chronique de l'infection (Yates et al, 2007). En effet, une hyperactivation du système immunitaire est observée à cause, notamment, du virus lui-même mais aussi de la perte d'intégrité de la barrière mucoale et donc d'infections secondaires dues à une translocation microbienne (Brenchley et al, 2006). Cette hyperactivation immunitaire entraîne (1) la différenciation d'une grande quantité

de cellules qui deviennent activées, constituant une cible potentielle pour le virus mais aussi (2) un taux de renouvellement des cellules T plus rapide et donc une durée de vie des cellules plus courte (Yates et al, 2007).

La relocalisation des lymphocytes T CD4⁺ périphériques

Afin de suivre l'évolution de la maladie chez les personnes infectées par le VIH-1, nous mesurons le taux de lymphocytes T CD4⁺ dans le sang. En phase chronique, le nombre de cellules infectées dans le sang est très faible (de 0.01 à 1%) et donc la déplétion des cellules T CD4⁺ observée dans le sang ne peut-être expliquée que par la lyse par le virus de ces cellules (Douek et al, 2002). Une autre hypothèse pour expliquer la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ en périphérie est la relocalisation de ces cellules vers les tissus lymphoïdes (Chen et al, 2002). Sachant que la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ au niveau du GALT et/ou des ganglions est massive, un phénomène de relocalisation des lymphocytes T CD4⁺ périphériques vers ces sites pourrait palier à cette déplétion massive.

Altération de la fonction thymique

Comment expliquer la diminution du nombre de cellules naïves T CD4⁺ en périphérie chez les individus infectés par le VIH-1 (Roederer et al, 1995)? La source la plus importante de cellules naïves est le thymus, même si il existe des mécanismes extra-thymiques tels que la prolifération homéostatique en périphérie des cellules naïves médiée entre autre par l'IL-7. L'infection par le VIH-1 du thymus *in vivo* a été montré chez l'humain mais aussi chez les primates (Joshi et al, 1986; Baskin et al, 1991). La dissémination du VIH-1 au niveau du thymus est possible car les co-récepteurs du virus CCR5 et CXCR4 sont exprimés à différents stades de développement des thymocytes (Gurney et al, 2006). Les individus infectés par le VIH-1 ont un thymus dont la structure est altérée, dans lequel il est observé une diminution du nombre de thymocytes et une infiltration de cellules T activées (Haynes et al, 1999).

Il est très difficile de mesurer la production de cellules naïves par le thymus. La meilleure méthode actuellement disponible est la mesure des TREC (T cell receptor excision circles) qui sont produits lors du réarrangement des chaînes α et β du TCR par les thymocytes (Poulin et al, 1999). Il a été montré que le nombre de TREC dans le compartiment CD4 est diminué chez les patients infectés par le VIH-1 (Douek et al, 1998; Douek et al, 2001; Zhang et al, 1999). La dysfonction thymique est observée très tôt dans le développement de la maladie : Dion *et al.* ont montré que l'infection par le VIH-1 affecte la fonction thymique en réduisant la capacité de prolifération intra-thymique des thymocytes dès la primo infection (Dion et al, 2004). Ce défaut de production de cellules naïves par le thymus affecte la reconstitution des compartiments T CD4⁺ et a donc des conséquences sur le remplacement des cellules épuisées et des cellules lysées par le virus.

Perturbation de l'homéostasie des cellules T CD4⁺

L'infection par le VIH-1 est non seulement caractérisée par une diminution du nombre de cellules T CD4⁺, mais aussi par un déséquilibre dans la répartition des sous-populations naïve/mémoire.

Un élément clé dans l'homéostasie des cellules T CD4⁺ est la voie de signalisation IL-7R/IL-7. En effet, l'IL-7R et l'IL-7 jouent un rôle important dans la génération/survie des cellules mémoires ainsi que dans la prolifération extra-thymique des cellules naïves (voir revue Beq et al, 2004). Chez les individus infectés par le VIH-1, les cellules T CD4⁺ ont des niveaux d'IL-7R diminués par rapport aux individus sains (Rethi et al, 2005; Koesters et al, 2006; Dunham et al, 2008; Mercier et al, 2008). Ces niveaux peu élevés d'IL-7R limitent la capacité des cellules T CD4⁺ à répondre à l'IL-7. Par conséquent, ces cellules T CD4⁺ ayant un niveau IL-7R faible sont plus sensibles à l'apoptose; elles ont notamment des niveaux d'expression de bcl-2 faibles (Koesters et al, 2006). Ces niveaux d'IL-7R faibles corréleraient d'ailleurs avec une progression de la maladie (Rethi et al, 2005;

Koesters et al, 2006; Dunham et al, 2008; Mercier et al, 2008). L'expression de l'IL-7R peut-être modulée par le TCR et l'IL-7 elle-même : mais aucun de ces paramètres ne corrèle avec la diminution de l'expression de l'IL-7R dans l'infection par le VIH-1. Cependant, la perte d'expression de l'IL-7R corrèle avec le niveau d'activation des cellules T CD4⁺ comme montré par l'expression de CD38 et HLA-DR (Koesters et al, 2006; Dunham et al, 2008; Mercier et al, 2008). Donc, la perte d'expression de l'IL-7R serait le reflet du niveau d'activation immunitaire observé chez les individus infectés.

La perte d'expression de l'IL-7R a notamment des conséquences importantes sur les cellules T_{CM}. Ces cellules sont essentielles pour la régénération du compartiment T et pour le maintien de la mémoire immunitaire (Lanzavecchia et al, 2005). Une fréquence plus élevée et une fonctionnalité intacte des cellules T_{CM} est observée chez les individus qui contrôlent l'infection par le VIH-1 (Potter et al, 2007; Younes et al, 2003). Dans le modèle SIV, la fréquence des cellules T_{CM} corrèle avec la progression de la maladie chez le macaque Rhesus (Okoye et al, 2007) et avec la protection observée chez des animaux vaccinés puis infectés par le virus (Letvin et al, 2006). En conclusion, la diminution de la génération/survie des cellules T_{CM} suite à la diminution d'expression de l'IL-7R pourrait très fortement compromettre la mise en place d'une réponse immunitaire efficace dans l'infection par le VIH-1.

1.2.2. Déficience qualitative de la réponse T spécifique du VIH-1 au cours de l'infection

Bien que les patients infectés par le VIH-1 et non traités - à l'exception des LTNP - progressent inéluctablement vers le développement de la maladie, de nombreuses évidences montrent que les réponses cellulaires T dirigées contre le

VIH-1 sont mises en place dès la primo infection et qu'elles sont essentielles pour contrôler la charge virale et ralentir la progression de la maladie.

Rôle protecteur des réponses T spécifiques du VIH-1

Il est clairement établi que la réponse T CD4⁺ est essentielle pour induire une réponse T CD8⁺ efficace (Matloubian et al, 1994). Plusieurs études soulignent le rôle important de la réponse T CD4⁺ dans le contrôle de l'infection par le VIH-1. Une réponse proliférative T CD4⁺ efficace corrèle avec une charge virale faible et un contrôle de la réplication virale (Rosenberg et al, 1997). De plus, les patients LTNP ont des réponses T CD4⁺ robustes qui permettent le contrôle de la charge virale (Iyasere et al, 2003; Harari et al, 2004; Tilton et al, 2007).

De nombreuses études mettent en avant le rôle protecteur des réponses T CD8⁺ spécifiques du VIH-1. La déplétion des lymphocytes T CD8⁺ dans le macaque Rhésus infecté par le SIV est associée à une perte de contrôle de la charge virale et à une progression fulgurante de la maladie (Schmitz et al, 1999). Les patients LTNP ont une réponse T CD8⁺ composée de cellules cytotoxiques qui ont une grande capacité de prolifération et qui sécrètent de l'interleukine 2 (IL-2) (Zimmerli et al, 2005). Des réponses T CD8⁺ ont été détectées chez des individus exposés fréquemment au virus, mais qui restent non infectés (Kaul et al, 2004; Makedonas et al, 2005; Alimonti et al, 2006). De plus, l'apparition de nombreuses mutations virales dans des épitopes CD8 démontre l'existence d'une pression de sélection exercée par la réponse T CD8⁺ sur le virus (Goulder et al, 1997; Price et al, 1997).

Réponse T CD4⁺ spécifique du VIH-1

Pendant la phase initiale de l'infection, les cellules T CD4⁺ spécifiques du VIH-1 sont caractéristiques d'une réponse effectrice (i.e. cellules sécrétant de

l'IFN- γ et ayant une capacité de prolifération limitée) (Harari et al, 2002, 2005a). Lors de la phase chronique de l'infection et en absence de traitement, la réponse T CD4⁺ spécifique du virus reste inchangée : les cellules T CD4⁺ (identifiées dans cette étude avec des tétramères de CMH de classe II) produisent de l'IFN- γ et ont un phénotype effecteur (Scriba et al, 2005). De plus, plusieurs études montrent que les cellules T CD4⁺ spécifiques du virus ont perdu leur capacité de sécréter de l'IL-2 (Iyasere et al, 2003; Younes et al, 2003; Harari et al, 2004). La persistance du virus induit un biais dans la réponse T CD4⁺ avec la sur-représentation de cellules qui produisent de l'IFN- γ et qui ne sont pas associées au contrôle de l'infection. Dans le cas des patients sous traitement antirétroviral ou des patients LTNP qui contrôlent naturellement l'infection, la réponse T CD4⁺ spécifique du virus devient polyfonctionnelle avec des cellules sécrétant de l'IL-2 ou de l'IL-2/IFN- γ et ayant une grande capacité de prolifération (Imami et al, 2002; Harari et al, 2005a; Tilton et al, 2007). Finalement, l'infection par le VIH-2, dont la progression est plus lente, est caractérisée par une forte réponse T CD4⁺ produisant de l'IL-2.

En phase initiale de l'infection, les réponses T CD4⁺ sont dirigées contre plusieurs épitopes (Gag, Nef, Pol, Env) alors qu'en phase chronique elles sont majoritairement dirigées contre les protéines Gag et Nef (Scriba et al, 2005; Kaufmann et al, 2004).

Réponse T CD8⁺ spécifique du VIH-1

Durant la phase initiale de l'infection, il y a induction d'une forte réponse T CD8⁺ cytotoxique produisant de l'IFN- γ et qui est associée à la diminution rapide et drastique de la virémie (Borrow et al, 1994; Koup et al, 1994; Pantaleo et al, 1994). En l'absence de traitement et de contrôle de la virémie, la réponse T CD8⁺ initiale tend à disparaître : ce phénomène est en partie dû à l'apparition de virus mutants qui induisent de nouvelles réponses qui sont toutefois moins efficaces à réduire la charge virale (Dalod et al, 1999). Cette réponse T CD8⁺ est typiquement une réponse de type effecteur avec sécrétion d'IFN- γ (Zimmerli et al, 2005). Il a

cependant été montré que les LTNP présentent une réponse T CD8⁺ sécrétant de l'IL-2 et de l'IFN- γ (Zimmerli et al, 2005). Une étude plus complète a confirmé que chez les patients qui contrôlent naturellement la virémie, les cellules T CD8⁺ sont polyfonctionnelles (IFN- γ /TNF- α /IL-2/MIP-1 β) et sont cytotoxiques (CD107a) (Betts et al, 2006).

Les réponses T CD8⁺ induites en primo infection sont dirigées contre de multiples épitopes (Gag, Nef, Tat et Env) (Altfeld et al, 2001; Cao et al, 2003). Ce sont des réponses oligoclonales, de forte affinité et qui imposent une forte pression sur le virus, conduisant ainsi à l'apparition de nouveaux virus mutants. En phase chronique de l'infection, les personnes infectées ont un profil de réponses T CD8⁺ polyclonales mais de moindre affinité par rapport à la réponse primaire (Lichterfeld et al, 2007). De plus, il a été montré qu'une réponse spécifique de Gag corrélait avec une charge virale faible alors que des réponses dirigées contre Env et les protéines accessoires/régulatrices étaient associées à une forte charge virale (Kiepiela et al, 2007).

Réponses T polyfonctionnelles et immunité antivirale

Toutes ces données sur les réponses cellulaires spécifiques du VIH-1 nous indiquent que, que ce soit pour les cellules T CD4⁺ ou les cellules T CD8⁺, des réponses polyfonctionnelles sont associées à un contrôle plus efficace de la charge virale dans l'infection par le VIH-1. Des réponses polyfonctionnelles sont observées dans d'autres infections virales, chroniques ou non, qui sont contrôlées. C'est le cas des réponses T CD8⁺ dans les infections dues aux virus Influenza, CMV (cytomégalovirus), EBV (Epstein Barr virus) et VV (Vaccinia virus) (Harari et al, 2007; Precopio et al, 2007). Pour les réponses T CD4⁺, les infections causées par CMV, EBV, HSV (herpes simplex virus) et HCV (hepatitis C virus) sont associées à des réponses polyfonctionnelles (Casazza et al, 2006; Harari et al, 2005a; Tilton et al, 2007).

Comprendre les facteurs qui influencent le développement d'une réponse polyfonctionnelle chez les patients infectés par le VIH-1 est donc important. Une étude, réalisée sur des individus qui contrôlent l'infection naturellement et qui ont une charge virale très faible, montre que le contrôle de la charge virale est associé à la présence fréquente de cellules T CD4⁺ sécrétant à la fois de l'IFN- γ et de l'IL-2 mais aussi à un niveau d'activation faible des cellules (Emu et al, 2005). De plus, un niveau d'activation immunitaire faible est associé à une faible susceptibilité à l'infection par le VIH-1 dans un groupe d'individus séronégatifs et exposés au virus (Koning et al, 2005).

La déplétion des lymphocytes T CD4⁺ par le virus - cellules qui sont aussi nécessaires pour développer une réponse T CD8⁺ fonctionnelle - ne semble donc pas expliquer à elle seule le dysfonctionnement du système immunitaire et l'incapacité à contrôler l'infection. Pandrea *et al* ont montré que la progression de la maladie ne dépend pas du niveau de déplétion des cellules T CD4⁺ dans le GALT mais plutôt de la capacité à restaurer le compartiment CD4 au niveau du GALT (Pandrea et al, 2007). Ce potentiel de reconstituer le compartiment CD4 dépend, selon les auteurs, de l'état d'hyperactivation du système immunitaire chez les individus infectés par le VIH-1.

1.3. Hyperactivation immunitaire et pathogénèse du VIH-1

L'activation chronique des cellules est une caractéristique de l'infection par le VIH-1 et joue un rôle important dans la progression de la maladie. Le degré d'hyperactivation constitue même un meilleur indice de progression de la maladie que le niveau de la charge virale (Giorgi et al, 1999; Leng et al, 2001; Sousa et al, 2002; Hazenberg et al, 2003; Koning et al, 2005). Ceci est corroboré par des études menées chez les primates. Malgré la persistance d'une charge virale élevée et la destruction massive des cellules T CD4⁺ au niveau de la muqueuse

intestinale, l'infection par le SIV des singes Sooty Mangabey et African Green est caractérisée par une activation immunitaire faible et ne conduit pas au développement de la maladie. À l'opposé, chez les macaques Rhésus infectés par le SIV, l'absence de contrôle de la charge virale est associée à une hyperactivation des cellules du système immunitaire et à la progression de la maladie (Kaur et al, 1998; Broussard et al, 2001; Silvestri et al, 2003; Gordon et al, 2007). De plus, l'infection par le VIH-2, caractérisée par une charge virale faible et une progression vers la maladie lente, n'est pas associée à une activation immunitaire aussi forte que dans le cas de l'infection par le VIH-1 (Sousa et al, 2002).

1.3.1. Les signes d'une hyperactivation immunitaire

La stimulation chronique du système immunitaire lors de l'infection par le VIH-1 crée un état d'hyperactivation des cellules qui se manifeste par :

- la présence d'un grand nombre de cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ exprimant des marqueurs d'activation typiques comme CD38, HLA-DR et l'antigène nucléaire Ki67 (Giorgi et al, 1993; Liu et al, 1997; Cohen Stuart et al, 2000; Hazenberg et al, 2000; Sousa et al, 2002).
- des niveaux plasmatiques accrus de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. C'est par exemple le cas du TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha), de l'IL-6 (Interleukine 6) et de l'IL-1 β (Interleukine 1 bêta) dont les concentrations sont élevées dans le plasma et dans les ganglions lymphatiques d'individus séropositifs (Weiss et al, 1989; Molina et al, 1989; Lafeuillade et al, 1991). La sécrétion de chimiokines telles que MIP-1 α (Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha), MIP-1 β (Macrophage Inflammatory Protein-1 bêta) et RANTES (Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted) est également augmentée chez les patients infectés par le VIH-1 (Canque et al, 1996).

- une susceptibilité accrue des cellules à l'AICD (Gougeon, 2005). Plusieurs études démontrent que la voie FAS/FASL est augmentée pendant la phase chronique de l'infection et que le taux de FAS soluble plasmatique est un marqueur de progression de la maladie (Badley et al, 1996; Medrano et al, 1998; Silvestris et al, 1998).
- l'hypergammaglobulinémie résultant d'une hyperactivation des lymphocytes B (De Milito et al, 2004).
- la sur-représentation de monocytes dans le sang présentant un phénotype pro-inflammatoire (Ancuta et al, 2008).

1.3.2. Les causes de l'hyperactivation immunitaire

L'activation chronique du système immunitaire est tout d'abord attribuée au virus lui-même : la persistance virale et l'émergence constante de nouveaux variants du VIH-1 produisent un état de stimulation antigénique permanent. En phase chronique de l'infection par le VIH-1, il y a jusqu'à 20% des cellules T CD8⁺ du sang qui sont spécifiques du virus (Betts et al, 2001; Papagno et al, 2002). Dans le cas des cellules T CD4⁺, c'est un peu moins de 3% des cellules du sang qui sont spécifiques du VIH-1 (Papagno et al, 2002), et ce, parce que les cellules spécifiques du VIH-1 sont préférentiellement infectées et donc lysées par le virus (Douek et al, 2002). Un autre mécanisme conduisant à l'activation des cellules par le virus est proposé : les protéines virales comme la gp120 ou Nef peuvent induire la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires ainsi que l'activation des cellules T et des macrophages (Rieckmann et al, 1991; Swingler et al, 1999, 2008; Wang et al, 2000).

Cependant, l'hyperactivation immunitaire peut-être due à des effets indirects de l'infection par le VIH-1. En effet, certains virus latents comme les virus CMV et EBV sont réactivés à cause du statut immunodéprimé des patients et

de la réaction inflammatoire environnante. Plusieurs études ont montré que des cellules T CD8⁺ spécifiques de CMV et EBV avaient un profil de cellules activées dans l'infection par le VIH-1 (Papagno et al, 2004; Doisne et al, 2004).

Douek et Brenchley ont récemment proposé un autre mécanisme qui serait impliqué dans l'activation chronique du système immunitaire (Brenchley et al, 2006). Les auteurs suggèrent que la déplétion massive des lymphocytes T CD4⁺ dans le tractus gastro-intestinal a pour conséquence la perte d'intégrité de la barrière mucoale et favorise donc le relargage de bactéries commensales dans la circulation sanguine. Ils ont montré que les niveaux plasmatiques de LPS (Lipopolysaccharide) étaient augmentés chez les patients en phase chronique de l'infection par le VIH-1 et chez les macaques infectés par le SIV. Le taux de LPS plasmatique diminue avec le traitement antirétroviral. De plus, les singes Sooty Mangabeys infectés par le SIV (modèle où l'infection par le SIV est non pathogénique) ont des niveaux de LPS plasmatiques très faibles. Et finalement les monocytes des patients infectés par le VIH-1 ne répondent plus à une stimulation *ex-vivo* par le LPS, suggérant que ces monocytes ont été stimulés *in vivo* de façon chronique par le LPS. La perte d'intégrité de la barrière mucoale est en partie due à la déplétion des cellules Th17. Les cellules Th17, qui sécrètent de l'IL-17, assurent le maintien de l'intégrité de la barrière mucoale. En l'absence d'une réponse Th17 fonctionnelle et forte, il y a translocation de bactéries du GALT vers la périphérie (Rafatellu et al, 2008).

1.4. Lien entre hyperactivation et déficience du système immunitaire dans l'infection par le VIH-1

Intuitivement, observer un grand nombre de cellules T activées lors d'une infection virale, laisse supposer qu'il y a une réponse antivirale efficace qui s'est mise en place. De façon paradoxale, lors de l'infection par le VIH-1, l'activation

chronique des cellules a, au contraire, des conséquences néfastes sur la réponse T anti-VIH-1. Voici une liste non exhaustive expliquant comment l'hyperactivation immunitaire peut conduire à la déficience immunitaire chez les individus infectés par le VIH-1.

Taux de renouvellement des cellules plus élevé

Le taux de renouvellement des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ dans l'infection par le VIH-1 est nettement augmenté. Plusieurs techniques permettent d'évaluer le taux de prolifération des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺: ce sont la détection *ex-vivo* de l'antigène nucléaire Ki67 ou encore l'incorporation *in vivo* de BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) ou de ²H-glucose dans l'ADN. Dans le compartiment CD4, le nombre de cellules qui viennent de se diviser est de 3 à 5 fois plus élevé chez les patients infectés par le VIH-1 que chez les donneurs sains, alors que pour le compartiment CD8, le nombre de cellules qui prolifèrent est de 5 à 8 fois plus élevé (Sachsenberg et al, 1998; Hellerstein et al, 1999; Lempicki et al, 2000; Douek et al, 2001). Toutes ces cellules qui prolifèrent ne sont pas uniquement des cellules spécifiques du virus. L'augmentation du taux de renouvellement des cellules T CD4⁺ lors de l'infection par le VIH-1 pourrait s'expliquer par la mise en place d'un mécanisme homéostatique permettant de compenser la déplétion de ces cellules. Mais, en phase chronique, le nombre de cellules infectées dans le sang est très faible (de 0.01 à 1%) et donc leur déplétion ne peut pas suffire à expliquer le grand nombre de cellules qui prolifèrent et qui meurent (Douek et al, 2002). De plus, l'augmentation de la prolifération des cellules touche aussi bien les cellules T CD8⁺ que les cellules T CD4⁺, alors que seules les cellules T CD4⁺ sont massivement déplétées. Il doit donc y avoir un autre phénomène pour expliquer le taux de renouvellement plus élevé des cellules T dans l'infection par le VIH-1.

Dans les dernières années, des données ont mis en relief le rôle de l'hyperactivation immunitaire dans cette prolifération accrue des cellules chez les

patients infectés par le VIH-1. En fait, la persistance de l'infection crée un état où les cellules, constamment activées, prolifèrent et meurent rapidement par AICD. Hellerstein *et al* ont montré que l'augmentation du taux de renouvellement des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ touche préférentiellement une certaine catégorie de cellules; les cellules T_{EM} ont un taux de renouvellement élevé alors que c'est moins le cas pour les cellules T_N et T_{CM} (Hellerstein et al, 2003). Le taux de prolifération élevé des cellules T_{EM} a notamment des conséquences sur la perpétuation de l'infection : (1) ces cellules, produisant de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires et pro-apoptotiques, continuent à alimenter l'état d'hyperactivation du système immunitaire et (2) les cellules CD4⁺ T_{EM} activées et exprimant CCR5 constituent de nouvelles cibles pour le virus et entretiennent donc le potentiel du virus à se répliquer (Biancotto et al, 2008).

Mais de façon plus intéressante, le taux de renouvellement plus élevé des cellules T_{EM} a des conséquences très importantes sur la dynamique des deux populations constituant le pool de cellules T mémoires [i.e. les T_{CM} qui ont une durée de vie longue et les T_{EM} qui ont une durée de vie courte (Sallusto et al, 2004)]. Okoye *et al* ont montré, dans le modèle d'infection par le SIV, que les cellules CD4⁺ T_{EM} dont le taux de prolifération est élevé, assurent leur renouvellement à partir des cellules CD4⁺ T_{CM}. Dans le contexte de l'infection par le VIH-1, les T_{CM}, tout comme les T_{EM}, ont une capacité de régénérescence qui est limitée et ce notamment à cause de l'état d'hyperactivation immunitaire mais aussi de l'altération de la fonction thymique. Donc, afin de renouveler le pool de cellules T_{EM}, il y a un épuisement de la mémoire centrale, ce qui va conduire à la progression de la maladie (Okoye et al, 2007).

Sénescence des cellules T spécifiques du VIH-1

Chez les individus âgés, la fonction immunitaire est diminuée, ce qui conduit à une susceptibilité accrue aux infections virales mais aussi potentiellement aux maladies autoimmunes et au cancer. Ce phénomène est

associé à un changement phénotypique des cellules T - notamment des cellules T CD8⁺ - et consiste en la perte d'expression du co-récepteur CD28 et l'augmentation de l'expression de CD57. De telles cellules sont dites sénescences. La perte d'expression de CD28 et l'accumulation de molécules CD57 à la surface des cellules T est le résultat d'un engagement répété du TCR. Des études ont montré que la perte d'expression de CD28 était associée, entre autres, à une diminution de la capacité à sécréter de l'IL-2 (Topp et al, 2003), une diminution de l'activité télomérase (Valenzuela et al, 2002) et une sensibilité accrue à l'AICD (Borthwick et al, 2000). L'expression de CD57 sur les cellules T CD8⁺ est, quant à elle, également associée à une incapacité à proliférer (Brenchley et al, 2003) et une susceptibilité accrue à l'apoptose (Papagno et al, 2004).

Ce phénomène de sénescence peut aussi s'observer chez des individus relativement jeunes et infectés par le VIH-1. L'accumulation de cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ hautement différenciées, qui ont perdu l'expression de CD28 et qui ont gagné l'expression de CD57, est importante chez les individus en phase chronique de l'infection par le VIH-1 (Appay et al, 2002a, 2002b; Brenchley et al, 2003; Papagno et al, 2004; Palmer et al, 2005). En effet, les cellules spécifiques du VIH-1, étant stimulées de façon répétée par le virus, deviennent sénescences de façon prématurée. Les cellules de haute affinité semblent être particulièrement sensibles à ce phénomène et la perte de telles cellules pourrait jouer un rôle important dans la progression de la maladie (Almeida et al, 2007).

Exhaustion des cellules T spécifiques du VIH-1

Dans les trois dernières années, un certain nombre de voies de signalisation ont été impliquées dans l'exhaustion des cellules T spécifiques de l'antigène dans un contexte d'infection virale persistante.

Exhaustion et PD-1

Dans une cellule T, l'interaction du TCR avec le complexe CMH/peptide est modulée par des co-récepteurs appartenant notamment à la famille B7/CD28. La balance entre l'expression relative de molécules stimulatrices et de molécules inhibitrices va déterminer le type de réponse induite. L'exemple classique de molécule stimulatrice est le co-récepteur CD28 qui s'associe avec les molécules B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) et induit par la suite la prolifération et la production de cytokines (comme l'IL-2) par la cellule activée (Bretscher, 1999). Les molécules inhibitrices comprennent entre autres les récepteurs CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4) et PD-1 (Programmed Death-1) (Greenwald et al, 2005).

L'expression de PD-1 est induite sur les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺, les lymphocytes B et les monocytes. PD-1 a deux ligands :

- PD-L1 dont l'expression est constitutive sur les lymphocytes B, les DC, les MΦ et les cellules T. Son expression sur ces cellules est augmentée après activation. PD-L1 est aussi exprimé sur des cellules non-hématopoïétiques comme, notamment, les cellules endothéliales vasculaires, les cellules gliales, les kératinocytes (Greenwald et al, 2005). Lors de réactions inflammatoires dues à une infection ou un rejet de greffe, PD-L1 est très fortement surexprimé (Koga et al, 2004; Mühlbauer et al, 2006).
- PD-L2 dont l'expression est inductible uniquement sur les DC et les MΦ (Greenwald et al, 2005).

L'engagement de PD-1 avec son ligand PD-L1, suite à l'activation du TCR, a pour conséquence le recrutement des phosphatases SHP-1 et SHP-2. Ces phosphatases déphosphorylent les molécules impliquées dans la voie proximale de signalisation du TCR (ZAP-70, PKCθ et CD3ζ) et atténuent ainsi le signal du TCR et de CD28 (Greenwald et al, 2005) .

De façon intéressante, PD-L1 et PD-L2 sont exprimés par des tumeurs et favoriseraient ainsi l'échappement de la tumeur à la réponse immunitaire (Thompson et al, 2004). L'importance de cette voie dans la tolérance est démontrée par le fait que les souris knock-out pour la protéine PD-1 développent des maladies autoimmunes (Nishimura et al, 1999).

L'importance de la voie de signalisation PD-1/PD-L1 dans les infections chroniques a été démontrée par l'équipe de Rafi Ahmed qui a observé que les cellules T CD8⁺ dans le modèle d'infection chronique LCMV (lymphocytic choriomeningitis virus) surexpriment la protéine PD-1 (Barber et al, 2006). Cette surexpression de PD-1 est due à une stimulation chronique des cellules T par les antigènes viraux (Mueller et al, 2009). Finalement, bloquer l'interaction de PD-1 avec son ligand PD-L1 restaure la fonction des cellules T CD8⁺ et permet le contrôle de la charge virale (Barber et al, 2006).

Plusieurs études, dont une réalisée au laboratoire, ont mis en évidence le rôle de PD-1 dans l'exhaustion des cellules T CD8⁺ spécifiques du VIH-1 (Day et al, 2006; Petrovas et al, 2006; Trautmann et al, 2006). Les cellules T CD8⁺ spécifiques du VIH-1 surexpriment la protéine PD-1. Cette surexpression de PD-1 corrèle avec la charge virale. Les cellules qui ont des forts niveaux d'expression de PD-1 ont un défaut de prolifération et de sécrétion de cytokines. De plus, elles ont un phénotype effecteur/effecteur mémoire avec des faibles niveaux d'expression de CD28, de perforine, de CCR7 et de CD127. Ce phénotype suggère que les cellules sont très peu fonctionnelles. Petrovas *et al* ont aussi montré que les cellules T CD8⁺ spécifiques du VIH-1 et exprimant PD-1 sont plus susceptibles à l'apoptose. Par ailleurs, dans le contexte de l'infection résolue avec VV, les cellules expriment peu ou pas de PD-1. Dans les infections chroniques avec CMV et EBV, les cellules spécifiques de ces virus expriment des niveaux intermédiaires de PD-1. Comme montré dans le modèle LCMV, ceci suggère que le niveau de PD-1 exprimé par les cellules spécifiques du virus est lié au contrôle de la réplication virale. Le fait que les patients sous traitement antirétroviral voient leur

niveau de PD-1 sur les cellules T CD8⁺ spécifiques du virus diminuer va également dans le sens d'une expression de PD-1 liée au virus. Finalement, en bloquant l'interaction de PD-1 avec PD-L1, les cellules T CD8⁺ spécifiques du VIH-1 récupèrent leur capacité de proliférer et de produire de l'IFN- γ , du TNF- α et du granzyme B.

PD-1 est aussi impliqué dans la dysfonction des cellules T CD4⁺ spécifiques du VIH-1 (Day et al, 2006; D'Souza et al, 2007). Les cellules T CD4⁺ spécifiques du virus ont des niveaux plus élevés de PD-1, et bloquer la voie de signalisation PD-1/PD-L1 restaure leur capacité de proliférer.

Il est également intéressant de noter que l'expression de PD-L1 est augmentée chez les patients infectés par le VIH-1 et que les niveaux de PD-L1 corrélaient avec la charge virale (Trabattoni et al, 2003).

Exhaustion et CTLA-4

CTLA-4 est un récepteur de la famille CD28 qui possède un motif inhibiteur. CTLA-4 interagit avec les mêmes récepteurs que CD28, c'est-à-dire les co-récepteurs CD80 et CD86, ces derniers étant exprimés sur les cellules présentatrices d'antigènes. Par ailleurs, CTLA-4 a une affinité pour CD80 et CD86 qui est beaucoup plus grande que celle de CD28 pour ces deux mêmes ligands. CTLA-4 délivre donc un signal négatif à la cellule en entrant en compétition avec le récepteur de co-stimulation CD28. CTLA-4 réduit ainsi l'activation de la cellule T en diminuant la production d'IL-2 et la prolifération (Chen, 2004; Greenwald et al, 2005).

Il a été montré que CTLA-4 jouait un rôle dans les réponses cellulaires T anti-tumorales. Chez les patients atteints de cancer, une thérapie systémique avec un anticorps bloquant CTLA-4, a été associée à une régression de la tumeur mais aussi à des effets secondaires sévères comme une inflammation systémique,

incluant colite et une hypophysite autoimmune (Hodi et al, 2003; Phan et al, 2003).

Dans le modèle d'infection chronique par LCMV, les cellules T CD8⁺ ont des niveaux élevés d'ARN messager codant pour CTLA-4. Toutefois, bloquer CTLA-4 dans l'infection chronique par LCMV ne restaure pas significativement la fonction des cellules T CD8⁺ et ne permet pas la diminution de la charge virale (Barber et al, 2006). Bloquer CTLA-4 en phase aiguë de l'infection par LCMV n'a pas plus d'impact (Homann et al, 2006).

Dans l'infection par le VIH-1, il a été montré que l'expression de CTLA-4 était augmentée sur les cellules T CD4⁺ spécifiques du VIH-1 et ce aussi bien en primo-infection qu'en phase chronique de l'infection (Kaufmann et al, 2007). Le niveau d'expression de CTLA-4 corrèle avec la progression de la maladie. De plus, le blocage *in vitro* de CTLA-4 permet d'augmenter la production de cytokines et la prolifération de ces cellules. CTLA-4 n'est pas augmenté sur les cellules T CD8⁺ spécifiques du VIH-1 (Kaufmann et al, 2007). Ceci souligne le fait qu'il existe des différences significatives dans les mécanismes d'exhaustion des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺. Cependant, le blocage *in vivo* de CTLA-4 dans l'infection chronique par le SIV augmente à la fois les réponses T CD8⁺ et T CD4⁺ (Hryniewicz et al, 2006).

Exhaustion et CD27

CD27 est un membre de la famille TNF (Tumor Necrosis factor) qui module les réponses lymphocytaire T et B quand il est engagé par son ligand, le récepteur CD70. CD27 active la voie de signalisation NF-κB et induit la survie, la prolifération et les fonctions effectrices des cellules T (Akiba et al, 1998; Hendriks et al, 2000, 2003). L'expression de son récepteur CD70 est hautement régulée. CD70 est exprimé de façon transitoire sur les cellules T et B activées ainsi que sur certaines DC, dépendamment de la façon dont elles se différencient et dont elles

maturent (Borst et al, 2005). La stimulation chronique de CD70, dans une souris transgénique CD70, conduit à une exhaustion du pool de cellules naïves et une déplétion des cellules T dans les ganglions lymphatiques (Tesselaar et al, 2003).

Dans le modèle d'infection chronique par LCMV, bloquer l'interaction de CD27 avec CD70 – en utilisant un anticorps bloquant ou en infectant des souris knock-out pour CD27 – permet de mettre en place une réponse avec des anticorps neutralisants qui parvient à contrôler l'infection (Matter et al, 2006).

Dans l'infection par le VIH-1, il a été montré que CD70 est exprimé de façon prolongée sur les cellules T et B (Hazenbergh et al, 2003; De Milito et al, 2004). Il serait donc intéressant de voir l'effet, notamment sur la fonction des cellules T, de bloquer l'interaction de CD27 avec son ligand sur le contrôle de la charge virale et la progression de l'infection par le VIH-1.

Exhaustion et IL-10

L'interleukine 10 (IL-10) est une cytokine qui est impliquée dans la différenciation Th1/Th2 des cellules T. Les souris knock-out pour l'IL-10 développent des réponses majoritairement Th1. L'IL-10 inhibe (1) la production de cytokines pro-inflammatoires par les MΦ, (2) la présentation antigénique par les DC en altérant leur maturation, (3) la production de cytokines Th1 par les cellules T, et finalement (4) la prolifération des cellules T spécifiques de l'antigène (Fiorentino et al, 1991; Mosmann et Moore, 1991; McBride et al, 2002).

Deux études, réalisées dans le modèle murin LCMV, mettent en relief le rôle de l'IL-10 dans les infections chroniques (Ejrnaes et al, 2006; Brooks et al, 2006). En utilisant un anticorps bloquant anti-IL-10R, l'infection persistante par le LCMV est résolue. De plus, bloquer l'IL-10 en complément de l'administration d'un vaccin thérapeutique, potentialise la réponse induite par le vaccin et permet un meilleur contrôle de l'infection par LCMV (Brooks et al, 2008a).

Dans l'infection chronique par le VIH-1, il a été montré que les DC infectées par le virus produisent de l'IL-10 (Granelli-Piperno et al, 2004). Ces travaux suggèrent qu'utiliser un anticorps anti-IL10-R dans l'infection par le VIH-1 pourrait peut-être permettre de contrôler la charge virale.

1.5. Conclusion

Bien que les traitements antirétroviraux aient considérablement amélioré le pronostic chez les individus infectés par le VIH-1, les tentatives de générer une réponse immunitaire efficace chez ces patients ont jusqu'à aujourd'hui échoué. Il est maintenant largement accepté que l'hyperactivation du système immunitaire conduit à la progression de l'infection par le VIH-1 même si les mécanismes qui lient hyperactivation avec déficience immunitaire sont loin d'être complètement élucidés. Des progrès certains ont été faits dans la compréhension de l'exhaustion des cellules T lors de la persistance de l'antigène. Le fait que certaines molécules comme PD-1 et CTLA-4 aient été clairement impliquées dans l'exhaustion des cellules T spécifiques du VIH-1 permet d'entrevoir des thérapies qui permettront de restaurer l'activation de ces cellules. Comprendre l'immunopathogénèse de l'infection par le VIH-1 est donc essentiel pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, améliorer les thérapies déjà existantes et concevoir un vaccin.

2 . Hypothèses de travail et objectifs de recherche

Chapitre 3 PD-1, a marker for the breakdown of naïve/memory T cell subset homeostasis in HIV-1 infection.

Gaëlle Breton, Nicolas Chomont, Catherine Riou, Mohamed-Rachid Boulassel, Jean-Pierre Routy, Bader Yassine-Diab, Rafick-Pierre Sékaly.

Justification

L'infection par le VIH-1 est caractérisée par une déplétion progressive des cellules T CD4⁺ ainsi que par un dysfonctionnement des cellules T qui, en l'absence de traitements anti-rétroviraux, conduit inéluctablement à la progression de la maladie vers le stade SIDA. Certains des mécanismes impliqués dans ce dysfonctionnement de la réponse cellulaire T ont été élucidés et ont révélé un rôle important de la molécule PD-1 dans l'exhaustion des cellules T en phase chronique de l'infection.

Une découverte faite chez la souris

La première étude mettant en relief le rôle de PD-1 dans la dysfonction des cellules T lors d'infections chroniques a été menée par l'équipe de Rafi Ahmed (Barber et al, 2006). Rafi Ahmed, qui s'attache depuis toujours à définir les réponses cellulaires T antivirales, a beaucoup travaillé sur le modèle murin LCMV. C'est un modèle particulièrement intéressant car il existe deux souches de virus : la souche Armstrong qui provoque une infection aiguë et la souche clone 13 qui elle conduit à la persistance du virus et donc à une infection chronique. Dans une étude antérieure, Rafi Ahmed et son équipe avaient montré que la persistance de l'infection LCMV était due à la dysfonction des cellules T CD8⁺ et T CD4⁺ (Zajac et al, 1998). À l'ère de la génomique, c'est tout naturellement qu'ils ont comparé le profil de gènes exprimés par les cellules T CD8⁺ lors d'une infection LCMV résolue ou lors d'une infection chronique. La découverte la plus frappante qu'ils ont fait est que les cellules dysfonctionnelles expriment des hauts niveaux de PD-1. Ils ont par la suite bloqué l'interaction de PD-1 avec son ligand PD-L1 lors de l'infection LCMV et ont montré qu'ils pouvaient restaurer la fonction de ces cellules dysfonctionnelles et contrôler la charge virale.

PD-1 et dysfonction des cellules T en phase chronique de l'infection par le VIH-1

Suite à la divulgation de ces résultats, des membres du laboratoire ainsi que les équipes de Bruce Walker et Rick Koup ont évalué le rôle de PD-1 dans la dysfonction des cellules spécifiques du VIH-1 chez des individus chroniquement infectés (Day et al, 2006; Petrovas et al, 2006; Trautmann et al, 2006). Ils ont montré, de façon conjointe, que les cellules T CD8⁺ spécifiques du VIH-1 expriment de forts niveaux de PD-1. Cette surexpression de PD-1 corrèle avec les marqueurs de progression de la maladie (i.e. charge virale et compte CD4) ainsi qu'un défaut de prolifération et de sécrétion de cytokines des cellules T CD8⁺ spécifiques du VIH-1 (valable également pour les cellules T CD4⁺). En bloquant l'interaction de PD-1 avec son ligand, ils ont pu rétablir *in vitro* la capacité de ces cellules à proliférer et sécréter des cytokines. De façon intéressante, ces équipes ont également montré que l'expression de PD-1 était non seulement augmentée sur les cellules spécifiques du VIH-1 mais aussi sur les cellules T totales.

Hypothèse et objectifs de recherche

Ces études, les premières à mettre en évidence le rôle de PD-1 dans l'exhaustion des cellules T chez les patients chroniquement infectés par le VIH-1, n'ont cependant pas adressé la question suivante : quels sont les niveaux de PD-1 en phase aiguë de l'infection par le VIH-1?

Hypothèse : en phase aiguë de l'infection par le VIH-1, des niveaux élevés de PD-1 sur les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ ne reflètent pas une exhaustion fonctionnelle.

Notre objectif premier est d'examiner les niveaux d'expression de PD-1 sur les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ au cours de l'infection par le VIH-1. Nous avons donc conduit une étude cross-sectionnelle dans laquelle nous avons mesuré l'expression de PD-1 sur les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ de 4 types de patients : des patients en primo-infection, des patients en phase chronique de l'infection, des individus sous thérapie anti-rétrovirale et des donneurs sains.

Afin d'avoir une compréhension plus exhaustive du rôle de PD-1 dans l'immunopathogénèse du VIH-1, l'étude présentée dans le chapitre 3 évalue plus précisément :

- objectif 1 : quelles sont les sous-populations naïve/mémoires T CD4⁺ et T CD8⁺ affectées par l'expression de PD-1 au cours de l'infection
- objectif 2 : quel est l'impact de l'expression de PD-1 sur le niveau de différenciation (mesuré par l'expression de CD28 et CD57) et la fonction (mesuré par l'expression de Ki67) des sous-populations T CD4⁺ et T CD8⁺ qui expriment PD-1 au cours de l'infection.

Contributions des auteurs

G.B. a conçu et fait toutes les expériences, analysé et interprété les données, préparé les figures et écrit le manuscrit. N.C. a participé aux expériences et à la préparation des figures et a fait toutes les analyses statistiques. B.Y.D. and C.R. ont participé à l'analyse des données. M.R.B. and J.-P.R. ont fourni les échantillons de patients. R.-P.S. a supervisé le projet.

Chapitre 4 Generation of a flexible expression system for human MHC class II tetrameric complexes and detection of antigen-specific CD4⁺ T cells

Gaëlle Breton, Bader Yassine-Diab, Souheil-Antoine Younes, Alain R. Dumont and Rafick-Pierre Sékaly.

Justification

Afin de caractériser les cellules T CD4⁺ spécifiques du VIH-1 au cours de l'infection (i.e. infection initiale et infection chronique), et de plus particulièrement suivre les niveaux de PD-1 de clones spécifiques du virus, nous avons besoin d'un outil permettant de détecter les cellules T CD4⁺ spécifiques d'un antigène donné.

Une multitude d'essais est à notre disposition pour identifier les cellules T spécifiques d'un antigène. C'est par exemple la détection des cytokines sécrétées par les cellules T spécifiques d'un antigène suite à la stimulation *ex-vivo* par l'antigène d'intérêt. Plusieurs méthodes permettent cette détection de cytokines bien que comportant des inconvénients : c'est l'impossibilité de caractériser les cellules qui répondent dans le cas de l'ELISA ou de l'ELISPOT, l'obligation de fixer et perméabiliser les cellules dans le cas de la coloration intracellulaire ou encore la sensibilité réduite des essais de capture des cytokines. Toutefois, toutes ces techniques sont basées sur le fait que les cellules sont fonctionnelles et ne permettent donc pas la détection des cellules spécifiques qui ne répondent pas à l'antigène, ce qui est le cas des cellules exprimant des hauts niveaux de PD-1.

La détection directe des cellules T spécifiques d'un antigène avec les tétramères de CMH a révolutionné notre façon d'analyser les réponses cellulaires T et a permis d'en réévaluer l'ampleur. La technique des tétramères est basée sur le fait qu'un TCR reconnaît un peptide dont il est spécifique dans le contexte d'une molécule de CMH. Une molécule de CMH recombinante couplée à un fluorochrome peut alors servir de sonde pour détecter une cellule spécifique d'un antigène. Du fait de la faible affinité et de la constante de dissociation (K_{off}) rapide du complexe CMH/peptide pour le TCR, il s'est avéré impossible de détecter des cellules T en utilisant un monomère soluble de CMH/peptide (Boniface et al, 1998; Davis et al, 1998; Cochran et al, 2000). Afin de contourner ce problème, les monomères de CMH/peptide ont été multimérisés – dans ce cas précis tétramérisés - afin d'en accroître l'avidité pour le TCR.

Le protocole standard pour préparer des tétramères de CMH/peptide est tout d'abord la production de molécules solubles recombinantes de CMH de classe I ou II chargées avec un antigène spécifique. Ces monomères sont par la suite biotinylés sur un site de biotinylation introduit sur une des chaînes du CMH. Les molécules biotinylées sont alors incubées avec de la streptavidine couplée à un fluorochrome pour produire des tétramères. Les tétramères ainsi générés peuvent

être utilisés pour isoler des cellules spécifiques d'un antigène ou bien incorporés dans un cocktail d'anticorps afin de faire des analyses phénotypiques sophistiquées et multiparamétriques sur des cellules spécifiques d'un antigène donné.

Altman *et al.* ont été les premiers à générer des complexes tétramériques, en l'occurrence des tétramères de classe I (Altman et al, 1996). La production des tétramères de CMH de classe I se fait traditionnellement chez *E. coli*, système qui permet de produire des grandes quantités de protéines pures. Les tétramères de classe I sont maintenant utilisés de façon fréquente dans les études portant sur les cellules T CD8⁺ spécifiques d'un antigène.

L'utilisation des tétramères de CMH de classe II est beaucoup plus confidentielle que celle des tétramères de CMH de classe I et ce pour plusieurs raisons. Ce sont, entre autres, (1) la difficulté de produire des molécules de CMH de classe II, (2) le grand polymorphisme du CMH de classe II ainsi que l'absence d'allèles prévalents, (3) la faible affinité du complexe CMH/peptide pour le TCR et enfin (4) la faible fréquence des cellules T CD4⁺ spécifiques de l'antigène.

Hypothèse et objectifs de recherche

Afin de disséquer la réponse T CD4⁺ spécifique du VIH-1 et d'en comprendre le rôle dans la progression de la maladie, nous voulons détecter, quantifier et caractériser phénotypiquement et fonctionnellement le répertoire T CD4⁺.

Hypothèse: en phase aiguë de l'infection par le VIH-1, les cellules T CD4⁺ spécifiques du virus expriment des hauts niveaux de PD-1 et sont fonctionnelles; en phase chronique de l'infection par le VIH-1, les cellules T CD4⁺ spécifiques du virus ont des niveaux élevés de PD-1 et sont non fonctionnelles.

Notre objectif premier est donc de générer des tétramères de CMH de classe II afin de détecter, quantifier et caractériser les cellules T CD4⁺ spécifiques du VIH-1 au

cours de l'infection. Dans le chapitre 4, nous présentons une méthode originale, dont chaque étape est contrôlée par un test de qualité, pour produire de telles protéines solubles:

- Nous produisons des molécules de CMH de classe II liant de façon covalente le peptide antigénique - méthode optimisée par le groupe de John Kappler (Kozono et al, 1994)- ce qui nous permet de produire avec un bon rendement des molécules correctement structurée et contenant le peptide d'intérêt.
- Nous avons choisi de produire nos tétramères dans des cellules d'insectes S2, un système qui s'est montré efficace pour la synthèse de monomères de CMH de classe II.
- Nous avons jusqu'à présent produit les molécules HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0401 et HLA-DRB1*0701. Ces 3 allèles nous permettent de couvrir environ 20% des individus de la population canadienne et surtout sont particulièrement pertinents dans un certain nombre de pathologie dont les antigènes sont décrits (Mallone et Nepom, 2004). Cependant, nous avons généré un plasmide extrêmement versatile et nous pouvons donc produire tout nouvel allèle en combinaison avec n'importe quel peptide en une simple digestion.
- Nous avons testé l'efficacité et la spécificité du tétramère HLA-DRB1*0101 liant le peptide HA₃₀₆₋₃₁₈ sur une lignée générée à partir de PBMC d'un individu HLA-DR1.

Contributions des auteurs

G.B. a fait les expériences (clonage, production et purification des protéines ainsi que toutes les données de cytométrie), analysé et interprété les données, préparé les figures. B.Y.D. a supervisé le projet, conçu les expériences, participé aux expériences, analysé et interprété les données, préparé les graphiques. S.-A. Y. a fait l'expérience pour la figure 1b. A.R.D. a écrit le manuscrit. R.-P.S. a supervisé le projet.

3. Article 1

PD-1, a marker for the breakdown of naïve/memory T cell subset homeostasis in HIV-1 infection.

Gaëlle Breton¹⁻³, Nicolas Chomont¹⁻³, Catherine Riou¹⁻³, Mohamed-Rachid Boulassel⁵, Jean-Pierre Routy^{4,5}, Bader Yassine-Diab¹⁻³, Rafick-Pierre Sékaly¹⁻⁴.

¹ Laboratoire d'Immunologie, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CR-CHUM) Saint-Luc, Montréal, Québec, Canada. ² Laboratoire d'Immunologie, Département de Microbiologie et d'Immunologie, Université de Montréal, Québec, Canada. ³ INSERM U743, CR-CHUM, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada. ⁴ Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montréal, Québec, Canada. ⁵ Immunodeficiency Service and Division of Hematology, Royal Victoria Hospital, McGill University Health Centre, McGill University, Montréal, Québec, Canada.

Correspondence should be addressed to Rafick-Pierre Sékaly, CHUM Saint-Luc, Pavillon Edouard-Asselin, 264 René Levesque Est, Bureau 1307E, Montréal (Québec) H2X 1P1, Canada.

Tel : 1 514 890 8000 #35288; Fax : 1 514 412 7415

Acknowledgements:

The authors thank Maryse Lainesse for technical assistance. This work was supported by grants awarded to R.-P.S. from the CIHR and the National Institute of Health. J.-P.R. is a clinician-scientist supported by Fonds de Recherche en Santé du Québec.

Key words: HIV-1, PD-1, CD8⁺ and CD4⁺ T cell, Immune activation, Differentiation, Acute and chronic infection.

Abstract

Chronic activation of T cells is a hallmark of HIV-1 infection and plays an important role in disease progression. Recent studies have demonstrated that the up regulation of the inhibitory receptor PD-1 on virus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells and its interaction with its ligands provides a mechanism that leads to their functional exhaustion. PD-1 is also up regulated on total T cells. Little is known about the impact of PD-1 expression on the turnover and maturation status of the PD-1 expressing cells during the course of the disease. In this manuscript, we clearly show that, in HIV-1 infected individuals, PD-1 is up regulated on all T cell subsets including naïve, central memory and transitional memory T cells. During the acute phase of the disease, levels of PD-1 on total CD4⁺ T cell subsets are comparable to those observed during chronic infection. In contrast, PD-1 is expressed at significantly lower levels on total CD8⁺ T cell subsets from acutely infected subjects when compared to chronically infected individuals. Moreover, this PD-1 expression is associated to perturbations in the distribution of naïve and memory T cells subsets during the course of the disease. Most PD-1^{hi} cells also express Ki67, a marker that identifies cells undergoing high levels of turnover. The augmented PD-1 expression levels on CD8⁺ T cells observed during the transition from the acute to the chronic phase of the infection are associated with reduced levels of *in vivo* cell proliferation suggesting that PD-1 may be responsible for the loss of CD8⁺ T cell *in vivo* clonal expansion. In contrast PD-1^{hi} CD4⁺ T cells encompass a significant proportion of Ki67⁺ cells confirming the high turnover of this subset. Altogether, our data clearly show that expression of PD-1 depicts the T cell subsets, which are the most affected by hyperimmune activation and suggest a role for PD-1 in this defect.

Introduction

HIV-1 infection leads to the progressive depletion of CD4⁺ T cells and to the dysfunction of the cellular arm of the immune response. A number of mechanisms have been put forward to explain the depletion of the CD4 compartment including cytopathic effect of the virus, reduced de novo production of T cells and killing of infected cells by HIV-1 specific CD8⁺ T cells (1, 2). The impairment of the cellular immune response has been attributed, not only to the lack of CD4 help, but also to viral persistence; the constant emergence of new HIV-1 variants leads to a state of chronic activation that results in increased cellular turnover and immune dysfunction (3, 4). An alternative model to viral persistence has recently been proposed and shows that the massive depletion of CD4⁺ T cells by HIV-1 in mucosal lymphoid tissue can result in the disruption of the mucosal barrier in the gut leading to the release of commensal bacteria in the systemic immune system and, consequently to the chronic stimulation of immune cells by microbial products (5).

This persistent mobilization of the immune system creates a state of hyperactivation which is characterized by (i) high level of activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells that over express markers including HLA-DR, CD38 and the nuclear antigen Ki67 (6-10) (ii) increased susceptibility to activation induced cell death (11) (iii) increased levels of inflammatory cytokines (12) (iv) accumulation of highly differentiated CD4⁺ and CD8⁺ T cells as shown by the loss of expression of the CD28 costimulatory molecule and the increased levels of CD57 expression (13-15). Hyperimmune activation is now widely accepted as an important factor in the pathogenesis of HIV-1 and is even a better predictor of HIV-1 disease progression than viral replication (10, 16-18). Studies carried out in African Green monkeys and Sooty Mangabeys, the natural hosts of SIV, which survive SIV infection despite high levels of virus, support this hypothesis; indeed these monkeys are characterized by low immune activation. In striking contrast, Rhesus macaques show persistent SIV replication and resultant high viral loads that is associated with high levels of immune activation and progression to AIDS (19-22).

T cell homeostasis is also affected during HIV-1 infection (For review see 4, 23, 24). Excluding the depletion of mature CD4⁺ T cells by direct cytopathic effect of the virus or killing of the infected cells, several mechanisms have been proposed to explain HIV-1 induced perturbation of the T cell compartment. A reduced de novo production of naïve T cells is observed due to decreased proliferation capacity of thymocytes (25, 26) and disruption of lymph node architecture (27). Chronic immune activation results in a constant recruitment of T cells from the naïve and central memory pools into the effector pool (28) as well as a reduced expression of CD127, particularly within the central memory subset, that affects their self-renewing capacity (29, 30). Survival of memory T cells in HIV-1 infection is also impaired, those cells having decreased phosphorylation of FOXO3a which make them more susceptible to apoptosis (31). All these perturbations result in the disruption of T cell homeostasis leading to disease progression.

Recently, the increased levels of expression of Programmed death-1 (PD-1) molecules on antigen-specific T cells, including HIV-1 specific T cells, has been described to provide a signature of functional T cell exhaustion. Indeed, the PD-1/PD-L1 pathway plays a significant role in the regulation of the immune response (32). PD-1, a T cell activation marker, is up regulated upon TCR triggering and accumulates at the immunological synapse (33). Upon engagement by its ligand PD-L1, PD-1 delivers an inhibitory signal that blocks further TCR-induced T cell proliferation and cytokine production (34, 35). In a typical acute viral infection, this mechanism constitutes a feedback loop that limits the increase in absolute numbers of effector cells during the expansion phase of the immune response. However, under conditions of chronic antigen exposure, this pathway impairs the responsiveness of T cells, ultimately leading to the exhaustion of these cells. Some studies, based on early findings in LCMV chronically infected mice (36), have shown that, during chronic HIV-1 infection, PD-1 expression on HIV-1 specific T cells correlates with viral load and that blocking PD-1 signaling using antibodies restore T-cell effector functions *in vitro* (37-41). In addition, *in vivo* PD-1

blockade in chronic SIV infection restored CD8⁺ T cell function, which resulted in reduced viral load levels and enhanced survival of SIV-infected macaques (42).

Interestingly, our group and others have shown that levels of PD-1 during chronic HIV-1 infection are not only up regulated on virus-specific T cells but also on the total pool of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. However, little is known as to whether levels of expression of PD-1 are selectively increased on specific subsets of CD4⁺ or CD8⁺ T cells and whether this occurs only at a specific stage of the disease. To gain further insights into mechanisms underlying T cell exhaustion and disease progression, we have studied the interplay between PD-1 expression, T cell differentiation and T cell activation - as monitored by Ki67, CD28 and CD57 expression - during HIV-1 infection, focusing particularly on the transition from acute to chronic infection. A cross-sectional analysis of PD-1 expression in total *ex-vivo* CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets from 51 individuals was performed in healthy subjects and in subjects at all stage of disease including subjects undergoing HAART: we found that PD-1 was up regulated on all subsets of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, including naïve T cells, and at all stages of HIV-1 infection.

Materials and methods

Study population

Thirteen chronically HIV-1 infected patients, 8 patients with acute HIV-1 infection, 15 HAART treated HIV-1 positive patients and 15 HIV-1 seronegative control individuals were enrolled in this cross-sectional study. A summary of the patient clinical data is shown in Table 1 (Supplementary data 1). None of the HIV-1 chronically and acutely infected patients were on antiretroviral therapy at the time of this study. The following guidelines proposed by the Acute HIV Infection and Early Disease Research Program sponsored by the National Institutes of Allergy and Infectious Disease Division of AIDS (Bethesda, Maryland) were used to estimate the date of infection: 1) the date of the first positive HIV RNA test or p24 Ag assay available on the same day as a negative standard HIV enzyme immunoassay test minus 14 days; 2) the date of onset of symptoms of an acute retroviral syndrome minus 14 days; 3) the date of the first indeterminate Western blot minus 35 days; 4) the detuned assay (as already described in reference 43). All patients signed informed consent approved by the Royal Victoria Hospital and CR-CHUM review boards.

Preparation of PBMCs

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from heparinised blood by density gradient centrifugation (Ficoll-Paque™) and cryopreserved in liquid nitrogen.

Antibodies and flow cytometry

The following antibodies were purchased from BD Biosciences: anti-CD3-A700 (UCHT1), anti-CD4-PB (RPA-T4), anti-CD8-PE-TR (MHCD0817), anti-CD28-PE-Cy5 (CD28.2), anti-CD45RA-APC (HI100), anti-CCR7-PE-Cy7 (3D12), anti-CD27-APC-Cy7, anti-PD-1-PE (MIH4), anti-CD57-FITC (HNK-1) and anti-Ki67-FITC (B56). Cells from donors were all simultaneously stained with two 9-color 11-parameter staining cocktails (Cocktail 1: CD3, CD4, CD8, CD45RA, CCR7,

CD27, CD28, PD-1 and CD57; cocktail 2: CD3, CD4, CD8, CD45RA, CCR7, CD27, CD28, PD-1 and Ki67). FACS staining was performed on ex-vivo whole PBMC. Titrated antibodies were added to 2 million cells in 50µl of PBS for 20 minutes at 4°C. Intracellular staining for Ki67 was conducted by incubating cells stained for cell surface markers with FACS permeabilizing solution (BD Biosciences) for 20 minutes at room temperature. Cells were then stained in permeabilization buffer (PBS containing 0,05% saponin) with Ki67 antibody or isotype control for 30 minutes at room temperature. Washed cells were fixed in 2% formaldehyde and stored at 4°C until flow cytometry analysis. Flow cytometry was performed using a LSR II flow cytometer (BD Biosciences). The whole sample was acquired and the lymphocytes were gated for further analysis, as described in figure 1a, using Diva 4.1 software (BD Biosciences).

Statistical analysis

Correlations were performed by Wilcoxon matched pairs test and statistical significances were performed by Mann-Whitney U test using Prism 3.0 software (GraphPad).

Results

Acute and chronic HIV-1 infections are associated with abnormal distribution of T cell subsets

Previous reports have shown that HIV-1 infection and disease progression were associated with significant perturbations in T cell homeostasis and cellular turnover (For review see 4, 23, 24). Experiments were performed to monitor the impact of such cellular turnover on memory T cell persistence. We first investigated the distribution of CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets at different stages of the disease (Figure 1b). A cross-sectional analysis was performed in 4 groups of individuals (13 chronically HIV-1 infected, 8 acutely HIV-1 infected, 15 HAART treated subjects and 15 healthy donors) using multiparametric flow cytometry. The combined use of the CD45RA, CCR7 and CD27 markers allowed us to identify five phenotypically and functionally distinct populations in both CD4 and CD8 compartments: Naïve (T_N: CD45RA⁺, CD27⁺, CCR7⁺), Central memory (T_{CM}: CD45RA⁻, CD27⁺, CCR7⁺), Transitional memory (T_{TM}: CD45RA⁻, CD27⁺, CCR7⁻), Effector memory (T_{EM}: CD45RA⁻, CD27⁻, CCR7⁻) and Effector CD8⁺ T cells and Terminally differentiated CD4⁺ T cells (T_E and T_{TD}: CD45RA⁺ CD27⁻, CCR7⁻) (Figure 1a).

Acute HIV-1 infection was characterized by increased frequencies of CD8⁺ T_{TM} and T_{EM} cells ($p < 0.0001$ and $p < 0.05$ respectively) concomitant to decreased frequencies of CD8⁺ T_N and T_{CM} cells ($p < 0.0001$ and $p < 0.001$ respectively) when compared to control donors. Of note, we observed a dramatic expansion of CD8⁺ T_{TM} cells during the acute phase of HIV-1 infection. In addition, increased frequencies of CD4⁺ T_{EM} cells ($p < 0.001$) were also noted in acutely infected patients when compared to healthy individuals. This shift towards a more differentiated T cell phenotype observed in acute HIV-1 infection is likely to reflect the priming of naïve T cells and their subsequent differentiation into end stage differentiated effector cells, a hallmark of acute viral infections (44). Comparative analysis of the distribution of T cell memory subsets in acutely infected individuals with patients recruited at a later stage of the disease showed a

pattern of T cell distribution in chronic infection that was different from the one observed during acute infection: although $CD4^+$ T_{EM} and $CD8^+$ T_{EM} cells were found at high frequencies in both acutely and chronically infected patients, the transition from the acute to the chronic phase was accompanied by an increased frequency of T_N in both compartments ($p < 0.05$ for the CD4 compartment and $p < 0.001$ for the CD8 compartment), while $CD4^+$ T_{CM} , $CD4^+$ T_{TM} and $CD8^+$ T_{TM} were less represented ($p < 0.05$, $p < 0.05$ and $p < 0.0001$ respectively).

Moreover, our results confirmed previous findings showing a more differentiated phenotype of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in chronically infected subjects when compared to HIV-1 negative donors with an under representation of T_{CM} cells in favor of T_{EM} cells in both CD4 and CD8 T cell subsets ($CD4^+$ T_{CM} : $p < 0.05$; $CD8^+$ T_{CM} : $p < 0.0001$; $CD4^+$ T_{EM} : $p < 0.05$; $CD8^+$ T_{EM} : $p < 0.001$), a signature of the global T cell activation observed in chronic HIV-1 infection.

A similar analysis performed in aviremic successfully treated patients showed that HAART treatment was able to restore the distribution of all memory $CD4^+$ T cell subsets to the frequencies observed in healthy donors. However, HAART failed to restore a normal $CD8^+$ T cell subsets frequencies, with a persisting disequilibrium between T_{CM} ($p < 0.05$) and T_{EM} ($p < 0.05$) subsets, indicating that antiretroviral treatment, even for a long period of time, did not fully restore the homeostasis of CD8 subsets.

Altogether, our results indicate that HIV-1 infection leads to a disequilibrium of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell homeostasis in both acutely and chronically infected patients. More importantly, the distribution of most if not all T cell subsets in both CD4 and CD8 compartments are affected. These differences while specific to each disease stage were observed in acute and chronic infection.

HIV-1 infection is associated with increased PD-1 expression in naïve and memory T cell subsets

$CD4^+$ and $CD8^+$ T cells from HIV-1 infected patients have been shown to express high levels of PD-1 molecule when compared to T cells from healthy donors (37-39). Moreover, in murine models, acutely proliferating T cells up regulate PD-1

levels and die (45). Therefore, we explored a possible role for PD-1 in the homeostasis breakdown observed in HIV-1 infected patients. We assessed the levels of expression of PD-1 in CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets from the 4 above described groups of subjects (Figure 1c).

As shown in previous studies, we observed significantly higher levels of PD-1 expression on total CD4⁺ and CD8⁺ T cells in acute ($p < 0.0001$ for CD4⁺ T cells and $p < 0.001$ for CD8⁺ T cells) and viremic ($p < 0.0001$ for both subsets) patients when compared to HIV-1 negative subjects (Supplementary data 2a). Of note, PD-1 expression was increased on total CD8⁺ T cells ($p < 0.05$) but not on total CD4⁺ T cells during the transition from acute to chronic infection indicating that in acute infection PD-1 already reached levels comparable to chronic infection in the CD4 but not in the CD8 compartment. The initiation of HAART led to a marked decrease in levels of PD-1 expression in all T cell subsets from CD4⁺ and CD8⁺ compartments; successfully treated patients displayed similar levels of expression of this molecule to those observed in healthy donors (Supplementary data 2a). Interestingly, comparison of the levels of PD-1 expression in CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells in healthy individuals ($p < 0.0001$) and chronically infected individuals ($p < 0.05$), but not in HIV-1 acutely infected and treated individuals, showed a strong positive correlation suggesting that a common and general mechanism such as T cell homeostasis could be responsible for this coordinate up regulation of PD-1 in CD4 and CD8 T cell compartments (Supplementary data 2b). This PD-1 up regulation does not correlate with time of infection in both CD4 and CD8 compartments (Supplementary data 3).

To investigate a possible role for those high levels of PD-1 expression in the above-reported perturbations of homeostasis during HIV-1 infection, we analyzed the levels of expression of this molecule on CD4 and CD8 memory T cell subsets from the afore mentioned groups of infected and healthy subjects. Analysis of PD-1 expression on T cell subsets from healthy individuals showed that PD-1 increase as both CD4⁺ and CD8⁺ T_{CM} subsets acquired the phenotype of more differentiated T_{TM}, T_{EM} and T_{TD}/T_E subsets; this suggests that PD-1 expression constitutes not only an activation marker but also a marker that correlate with a more

differentiated phenotype of T cells ($p < 0.001$ for $CD4^+$ T_{TM} , T_{EM} and T_{TD} subsets; $p < 0.0001$ for $CD8^+$ T_{TM} , T_{EM} subsets; $p < 0.001$ for $CD8^+$ T_E subset; Supplementary data 4).

We then compared PD-1 expression levels in T cell subsets from the 4 groups of healthy and HIV-1 infected subjects (Figure 1c and Supplementary data 5). Acute HIV-1 infection was characterized by a marked increase in the levels of PD-1 expression in all $CD4^+$ T cell subsets ($p < 0.0001$ for T_N , T_{CM} , T_{TM} , T_{TD} and $p < 0.001$ for T_{EM} subsets) while this up regulation was found exclusively in T_N ($p < 0.001$), T_{CM} ($p < 0.001$) and T_{TM} ($p < 0.05$) subsets in the CD8 compartment. In contrast, the transition from acute to chronic infection was accompanied by significant increased levels of PD-1 expression in all $CD8^+$ T cell subsets ($p < 0.05$ for T_N , T_{EM} and T_E subsets; $p < 0.001$ for T_{CM} subset; $p < 0.0001$ for T_{TM}); the levels of PD-1 expression were even further augmented in the three $CD8^+$ T cell subsets that already expressed PD-1 at high levels during acute infection. On the other hand, PD-1 expression levels were comparable in all $CD4^+$ T cell subsets (with the exception of the $CD4^+$ T_N subset; $p < 0.05$) when comparing acutely and chronically infected patients, suggesting that PD-1 already reached its maximal level of expression during the acute phase of the disease. Altogether, these results suggested different kinetics for the up regulation of PD-1 in CD4 and CD8 compartments upon infection with HIV-1. PD-1 was already up regulated in all memory $CD4^+$ T cell subsets from acutely infected patients and these heightened levels of expression persisted throughout the chronic phase of the disease. In contrast, the up regulation of PD-1 in $CD8^+$ T cells was small but significant during acute infection and maximal levels of expression were observed at the latter stages of infection.

To investigate the potency of HAART to reduce levels of PD-1 expression in $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells subsets, we then compared PD-1 MFI in T cells from aviremic and healthy individuals. Our results showed that PD-1 remained up regulated in the late differentiated CD4 subsets ($p < 0.05$ for T_{EM} and $p < 0.001$ for T_{TD}) and in the less differentiated CD8 subsets ($p < 0.001$ for T_N and $p < 0.05$ for T_{CM}) even after long period of potent antiviral therapy.

Taken together, our results show that (i) PD-1 is preferentially expressed by the more differentiated CD4⁺ and CD8⁺ memory T cell subsets (ii) HIV-1 infected patients express higher level of PD-1 than healthy individuals on all naïve/memory subsets with the exception of late differentiated CD8⁺ T_{EM} and T_E subsets (iii) PD-1 expression is higher in all CD8 subsets during the chronic phase of the infection when compared to the acute phase of the disease and (iv) treatment does restore PD-1 expression to the levels observed in healthy donors in most but not all CD4 and CD8 subsets.

PD-1 up regulation is not associated with increased T cell turnover

Ki67 expression has been used as a marker of T cell turnover, thereby reflecting the level of immune activation in HIV-1 pathogenesis (6-10); as we showed that PD-1 was associated to perturbations in the distribution of naïve and memory T cells subsets during the course of the disease, we extended our analysis to determine the relationship between PD-1 up regulation and T cell turnover as monitored by the expression of Ki67. We observed no correlation between PD-1 levels of expression and the percentage of Ki67 positive cells in both CD4 and CD8 compartments in each of the afore mentioned groups of subjects (with an exception for the successfully treated individuals in the CD4 compartment; $p < 0.001$) (Figure 2a). We next compared the frequencies of cells expressing Ki67 in total CD4⁺ and CD8⁺ T cells in each group of donors (Figure 2b). Strikingly, we observed higher frequencies of Ki67 positive cells in the CD8 compartment as compared to the CD4 compartment in both acutely and chronically infected patients (15.9 vs. 3.5 % and 7.6 vs. 2.7 %, respectively). Frequencies of CD4⁺ Ki67⁺ and CD8⁺ Ki67⁺ T cells were statistically increased in both acute and chronic stages of the disease when compared to normal individual ($p < 0.0001$). As expected the percentage of Ki67 expressing cells in the CD8 population was significantly increased in acutely infected patients when compared to individuals with chronic HIV-1 infection ($p < 0.001$), reflecting the massive CD8⁺ T cell response mounted by the immune system during primary HIV-1 infection required to control the initial burst of viral replication.

As shown in Figure 2c, the increased levels of Ki67 expression do not correlate with the up regulation of PD-1 within the CD4 compartment for most if not all T cell subsets in each groups of individuals. The same observations can be made within the CD8 compartment. More interestingly, the values obtained from acute and chronically infected patients did not cluster together, indicating a distinct association between PD-1 and cell turnover in these two groups of patients within the CD8 compartment. Moreover, we could not observe any differential clustering between acutely and chronically infected individuals for the most differentiated CD8⁺ T_{EM} and T_E subsets suggesting that CD8⁺ T cells from these subsets might not up regulate PD-1 upon cell proliferation. Alternatively, CD8⁺ T_{EM} and T_E cells expressing high levels of PD-1 die prior to reaching these mature T cell differentiation stages, which could explain the absence of cells expressing high levels of PD-1 in these subsets as suggested by previous reports from Petrovas *et al.* who showed that up regulation of PD-1 led to an increased sensitivity to activation induced cell death (39).

We next measured Ki67 levels of expression in all CD4⁺ and CD8⁺ subsets (Figure 2d). All subsets, irrespective of the disease status, showed significantly higher frequencies of Ki67 positive cells ($p < 0.0001$ for all CD4⁺ and CD8⁺ subsets of acutely and chronically infected patients). Comparison of chronically and acutely infected patients showed that patients in acute infection displayed higher frequencies of Ki67⁺ cells when compared to viremic patients in the CD8 but not in the CD4 compartment ($p < 0.001$ for CD8⁺ T_N and T_{CM}, $p < 0.05$ for CD8⁺ T_{TM} and T_{EM}). Interestingly, even T_N cells expressed high levels of Ki67 in HIV-1 infected patients ($p < 0.0001$ for both chronically and acutely infected individuals in comparison with healthy donors), more particularly in the acutely infected subjects, indicating that homeostatic proliferation was significantly perturbed from the earliest stages of HIV-1 infection. Frequencies of Ki67⁺ cells remained significantly higher in HAART treated aviremic patients when compared to uninfected controls ($p < 0.05$ for CD4⁺ T_N, $p < 0.001$ for CD4⁺ T_{CM}, $p < 0.0001$ for CD4⁺ T_{TM}, T_{EM}, and T_{TD} cells; $p < 0.001$ for CD8⁺ T_{CM} and T_{TM}, $p < 0.0001$ for CD8⁺ T_{EM} and T_E cells) suggesting that the low level of viremia in treated patients

could still contribute to significant perturbations in homeostatic proliferation or suggesting proliferative expansion of T cells to recover normal T cell numbers after massive T cell depletion.

As PD-1 was suggested to be both an activation and an exhaustion marker, we next assessed the levels of expression of PD-1 on Ki67⁺ versus Ki67⁻ cells in total CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Figure 2e). Control donors as well as successfully treated patients expressed similar levels of PD-1 on Ki67⁺ cells and Ki67⁻ cells in the CD4 compartment. CD4⁺ Ki67⁺ T cells expressed significant higher levels of PD-1 than their Ki67⁻ counterparts in both chronically ($p < 0.0001$) and acutely ($p < 0.001$) HIV-1 infected individuals. This result confirmed that HIV-1 infection leads to the turnover of CD4⁺ T cells and to the subsequent up regulation of PD-1 expression by activated CD4⁺ T cells. Moreover, these Ki67⁺ PD-1^{high} CD4⁺ T cells were found at similar frequencies during the acute (3,5 %) and chronic stages (2,8 %) of the disease (Figure 2b) in spite of the different distributions of CD4⁺ T cell subsets observed between the two disease stages (Figure 1b). Altogether, our observations indicated that a small pool (2-4 %) of proliferating Ki67⁺ CD4⁺ T cells present in all CD4⁺ T cells subsets were PD-1^{high} and were found at constant frequencies throughout the disease progression. A similar analysis was performed on CD8⁺ T cells from HIV-1 infected individuals and yielded a completely different pattern. First, we observed that CD8⁺ Ki67⁺ T cells from healthy individuals and successfully treated subjects expressed similar or lower levels of PD-1 when compared to CD8⁺ Ki67⁻ cells (Figure 2e). Lower levels of PD-1 expression were also observed in Ki67⁺ CD8⁺ T cells from patients with acute infection ($p < 0.05$), suggesting that the modest increase in PD-1 expression observed early in infection did not affect CD8⁺ T cell proliferation, in agreement with the very high frequencies of proliferating CD8⁺ T cells observed during primary infection. In sharp contrast with this observation, Ki67⁺ CD8⁺ T cells from chronically infected patients showed higher levels of PD-1 when compared to non-proliferating CD8⁺ T cells ($p < 0.0001$); increased PD-1 expression on Ki67⁺ cells was accompanied by a dramatic decrease in the frequency of proliferating CD8⁺ T cells when compared to acute HIV-1 infection (from 16% to 8%; $p < 0.001$). This suggested that the high

levels of PD-1 expression observed on Ki67⁺ CD8⁺ T cells from chronically infected patients were associated with reduced turnover whereas the increased but low levels of PD-1 expression during acute infection did not affect the capacity of CD8⁺ T cells to proliferate. Altogether, our results clearly established a dual role for PD-1 as both activation and exhaustion marker in CD8⁺ T cells during acute (activation marker) and chronic (exhaustion marker) HIV-1 infection with respect to the different levels of expression of this receptor.

PD-1 over expression does not correlate with decreased CD28 expression, a marker of progression to AIDS

CD28 plays a critical role in T cell activation as it enters the immunological synapse and acts as a major costimulator of T cell receptor (46). CD28 loss of expression has been correlated to HIV-1 disease progression (47). CD28⁻ cells are more differentiated (48). Hence, we explored a possible association between the levels of PD-1 expression and the percentage of cells that had lost CD28 cell surface expression. We observed that frequencies of CD28⁺ cells did not correlated with the up regulation of PD-1 expression in total CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Figure 3a). As shown in Figure 3b, significant decreases in the frequencies of CD28⁺ cells were noted in total CD4⁺ and CD8⁺ T cells from HIV-1 infected subjects when compared to healthy donors. Loss of CD28 expressing cells in chronically and acutely infected patients were highly significant in the CD8 compartment (p<0.0001) and the CD4 compartment (p<0.001). Successfully treated patients showed similar frequencies of CD28⁺ cells when compared to healthy donors, indicating that HAART initiation allowed CD4⁺ and CD8⁺ T cell to recover CD28 expression. Notably, the loss of CD28 expressing cells was very significant within the CD8 subset and to a lesser extent within the CD4 subset: percentages of CD8⁺ CD28⁺ dropped to 50% in the viremic group whereas the decrease in CD4⁺ CD28⁺ percentage did not exceed 10% in the same group of patients. In addition, similar frequencies of CD4⁺ CD28⁺ and CD8⁺ CD28⁺ T cells were observed in chronically and acutely infected patients.

As percentages of total CD4⁺ and CD8⁺ T cells expressing CD28 did not correlate with levels of PD-1, we assessed percentage of CD28⁺ cells and PD-1 expression association in all naïve/memory T cell subsets (Figure 3c). PD-1 and CD28 expression levels did not correlate in most, if not all, CD4 and CD8 subsets in all subjects. The lack of such correlation between PD-1 and CD28 expression within the CD8⁺ and CD4⁺ subpopulations could suggest that the loss of CD28 expression could be regulated independently of PD-1.

We next assessed the percentages of CD28⁺ cells in both CD4 and CD8 naïve/memory subpopulations from the 4 groups of healthy and infected subjects (Figure 3d). In healthy donors, loss of CD28 expression within the CD4⁺ T cells mainly encompassed the T_{EM} and T_{TD} subsets. When compared to control individuals, chronically and acutely infected patients showed significantly lower percentages of CD4⁺ CD28⁺ cells (Chronic individuals: p<0.05 for T_{CM}, p<0.001 for T_{TM}, T_{EM}, and T_{TD}; acute individuals: p<0.0001 for T_{TM}, p<0.001 for T_{EM}, p<0.05 for T_{TD}). Importantly, the loss of CD28 expression in CD4⁺ T cells subsets were similar in acutely and chronically infected patients, with the exception of CD4⁺ T_{CM} cells (p<0.05). Strikingly, a drastic loss of CD8⁺ CD28⁺ T cells occurred in all memory subsets during HIV-1 pathogenesis (p<0.0001 for T_{CM}, T_{TM}, T_{EM} and p<0.001 for T_E in both viremic and primary-infected patients). CD8⁺ T_N, T_{CM} and T_{TM} subsets of patients in acute HIV-1 infection were clearly more susceptible to loss of CD28 expression than in chronically infected patients (p<0.05 for all subsets). Frequencies of CD28⁺ cells in aviremic treated patients within the CD4⁺ compartment were comparable to controls with the exception of CD4⁺ T_{EM} cells (p<0.001); in contrast those numbers never reached control values in this group of patients in the CD8 compartment where differentiated subsets still showed lower percentage of CD28⁺ cells (p<0.001 for T_{TM}, p<0.05 for T_{EM} and T_E). Altogether, these data show that CD8⁺ and CD4⁺ T cells acquire a more differentiated phenotype, as monitored by CD28 expression, during the course of HIV-1 infection. This decrease in percentage of CD28 expressing cells do not correlate with PD-1 up regulation and was mainly attributed to differentiated memory subsets in both the CD4 and CD8 compartments.

PD-1 up regulation is not correlated with increased CD57 expression, which is associated with disease progression and CD28 down regulation

CD57 is a marker that has been correlated with a state of replicative senescence (13). CD57 is expressed on terminally differentiated cells and increased numbers of CD57 expressing cells have been associated with progression of HIV-1 disease and other persistent viral infections. No correlation between PD-1 expression and frequencies of CD57⁺ cells was observed in both the CD4 and CD8 compartment and in each studied group of individuals (Figure 4a).

We then monitored the percentages of CD57⁺ cells in total CD4⁺ and CD8⁺ T cells from HIV-1 infected patients and seronegative subjects (Figure 4b). Frequencies of CD57 expressing cells were higher in both CD4 and CD8 compartments from acutely and chronically infected patients when compared to HIV-1 negative controls (Acute patients: $p < 0.001$ for CD4 and CD8 compartment; Chronic patients: $p < 0.001$ for CD4 and $p < 0.05$ for CD8 compartment). Interestingly, no statistically significant differences were observed when comparing the chronically and acutely infected groups in both the CD4 and CD8 subsets. Finally, treated patients still showed an increased number of CD8⁺ T cells expressing CD57, indicating that the treatment did not allow a complete normalization ($p < 0.05$).

The number of CD57⁺ cells was not correlated with PD-1 up regulation in the CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets (Figure 4c).

We next assessed the percentage of CD57 expressing cells encompassed in each CD4 and CD8 subpopulations (Figure 4d). T cells start to express CD57 although they have not reached late differentiated stages in chronically infected patients when compared to healthy controls. In the CD4 compartment, except for T_N, all subsets show an increased percentage of CD57⁺ cells ($p < 0.05$ for T_{CM}; $p < 0.001$ for T_{TM}, T_{EM}, and T_{TD}). In the CD8 compartment, T_N, T_{CM} and T_{EM} and T_E also have increased percentage of CD57⁺ cells ($p < 0.05$, $p < 0.0001$, $p < 0.05$ and $p < 0.05$ respectively). Likewise, T cells start to express CD57 very early in the disease. In primary infected patients, all the subsequent subsets show significant increased number of CD57⁺ cells: CD4⁺ T_{CM} ($p < 0.05$), CD4⁺ T_{TM} ($p < 0.001$), CD4⁺ T_{EM} ($p < 0.001$), CD4⁺ T_{TD} ($p < 0.001$), CD8⁺ T_N ($p < 0.001$), CD8⁺ T_{CM} ($p < 0.0001$), CD8⁺

T_{TM} ($p < 0.05$) and $CD8^+ T_E$ ($p < 0.05$). No significant differences are observed between chronic and acute patients. Altogether, those data show us that the CD4 depletion in HIV-1 infected patients mainly account for the T_{EM} and T_{TD} subsets but also occur in the T_{CM} and T_{TM} subsets whereas the CD8 loss happen in all subsets, the T_{EM} and T_E compartments being the most affected. Regarding the aviremic group, patient still have increased percentage of $CD57^+$ cells in the $CD4^+$ T_{EM} ($p < 0.05$), $CD8^+$ T_{CM} ($p < 0.05$) and T_E ($p < 0.05$) in comparison with healthy individuals, once again indicating that treatment do not restore all immune function. Finally, a very strong negative correlation exists between the percentage of $CD57^+$ cells and the percentage of $CD28^+$ cells in total $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells ($p < 0.0001$ in both subsets; Data not shown). This very strong correlation is still valid on each individual CD4 and CD8 naïve/memory subset suggesting that CD57 and CD28 expression are highly associated (Data not shown). In conclusion, these data show that CD4 depletion takes place mainly in more differentiated subsets in HIV-1 infected patients and is not correlated with PD-1 up regulation; CD8 depletion happens in all subsets and is not associated to PD-1 up regulation. To summarize, those data showed that, during HIV-1 infection, $CD57^+$ cells are observed in CD4 and CD8 subsets that do not encompass senescent cells in non-infected individuals.

Discussion

We and other groups had previously shown that levels of PD-1 during chronic HIV-1 infection on virus-specific T cells but also on total CD4⁺ and CD8⁺ T cells were up regulated, thereby leading to functional exhaustion of these cells. In this study, we showed that levels of PD-1 are up regulated on total CD4⁺ and CD8⁺ T cells in both early and late infection. Moreover, PD-1 is up regulated on all T cell subsets including naïve cells. This up-regulation of PD-1 on total CD4⁺ and CD8⁺ T cells and naïve cells suggest that mechanisms other than viral antigen could be responsible for the increased levels of expression of this molecule. A number of mechanisms could account for this PD-1 up regulation among them reactivation of latent viruses such as CMV and EBV in immunosuppressed individuals, acute homeostatic proliferation of T cells (45), direct or indirect activation of T cells through TLRs – TLR7 for HIV-1 virus (50) and TLR4 for LPS (5) – and increased levels of inflammatory cytokines (12).

Since it has been shown that PD-1 expression is associated with functional capacity and susceptibility to apoptosis (36-41), all naïve/memory T cell subsets from HIV-1 infected individuals will be affected by this general PD-1 over expression. In particular, the up regulation of PD-1 on all T cell subsets could have important consequences on their blood distribution. As hypothesized, we did observe a breakdown of T cell homeostasis at all stages of the disease. Briefly, acutely infected individuals showed an expansion of highly differentiated T_{EM} cells in both the CD4 and the CD8 compartment, which is the signature of any typical acute viral infection, but also a dramatic diminution in frequencies of CD8⁺ T_N cells and a massive expansion of CD8⁺ T_{TM} cells. Chronically HIV-1 infected patients clearly showed a more differentiated profile having, mainly, lower frequencies of T_{CM} cells and higher frequencies of T_{EM} cells in both the CD4 and CD8 compartment. PD-1 up regulation could impact blood T cell subsets distribution by impairing their survival, their homeostatic self-renewal, their differentiation capacity, their priming and/or their capacity to respond to the

antigen. In conclusion, PD-1 constitutes a marker for the breakdown of naïve/memory T cell subsets homeostasis in HIV-1 infection.

Focusing more specifically on the transition from acute to chronic HIV-1 infection, we gained further insights into the possible mechanisms by which immune control in infected individuals may be lost. Strikingly, HIV-1 chronically infected individuals have an accumulation of naïve cells in both the CD4 and CD8 compartment in comparison with acutely infected individuals. As it has been well documented (26, 49), chronic individuals have defective thymic function suggesting that this accumulation of naïve cells is due to impaired priming and not to an over production by the thymus of those cells. This could have a huge impact on the diversity of the T cell repertoire of chronically infected individuals, which may have a less polyclonal repertoire than primary infected individuals; knowing that chronic individuals also display much more genetic variants of the virus than acutely infected individuals, having a less diverse repertoire could be one explanation for the lack of control of the infection in chronically infected individuals. Notably, this PD-1 up-regulation on naïve T cell may contribute to the progressive immunodeficiency in HIV-1 disease but may also limit the effectiveness of vaccines strategies in HIV-1 infection by preventing any new responses to be triggered. Furthermore, chronically infected individuals also have lower number of T_{TM} cells than acutely infected individuals, these cells constituting a pool of highly proliferative and polyfunctional cells capable of generating high numbers of effector cells and therefore capable of boosting and sustaining the immune response. This diminution in frequency of T_{TM} cells cannot be explained by a differentiation toward effector cells since the frequency of T_{EM} and T_E cells is the same during early and late HIV-1 infection. But, T_{TM} cells of chronically infected individuals express much higher levels of PD-1 than acutely infected individuals, which could suggest that those PD-1^{high} cells are more susceptible to PD-1 mediated apoptosis or are impaired in their proliferative capacity. In conclusion, this accumulation of T_N cells and this diminution of T_{TM} cells in frequency may partly explain the loss of viral control during the transition from acute to chronic infection.

We next assess *in vivo* proliferation of T cell subsets using Ki67 expression during HIV-1 infection. In the CD4 compartment, the percentage of Ki67⁺ cells in all naïve/memory subpopulations is similar in early and late HIV-1 infection. In the CD8 compartment, there is much higher frequency of Ki67⁺ proliferating cells in acute infection than in chronic infection; this being true on total CD8⁺ T cells but also on each naïve/memory T cell subsets. We could observed that levels of PD-1 were the same on CD8⁺ Ki67⁺ T cells and CD8⁺ Ki67⁻ T cells in healthy and primary infected individuals. On the contrary, PD-1 expression was higher on CD8⁺ Ki67⁺ T cells than CD8⁺ Ki67⁻ T cells in chronically infected individuals. Those increased levels of PD-1 on CD8⁺ Ki67⁺ T cells in chronically infected individuals could be associated with decreased *in vivo* proliferative capacity and partly explain the diminution in percentage of Ki67⁺ cells during transition from acute to chronic infection. Even though, we should keep in mind that the decrease in viral load and the changes in T cell subsets repartition during transition from acute to chronic infection could also contribute to the lower percentage of proliferating CD8⁺ T cells observed in chronic HIV-1 infection. In conclusion, PD-1 up regulation on proliferating CD8⁺ T cells may contribute to their loss of function by altering their proliferative capacity and therefore contribute to the progression of the disease.

Our data also show that, in early and late HIV-1 infection, patients experience not only an abnormal distribution and a loss of T cell function but also a progressive T cell differentiation towards late stages (i.e. CD57⁺ cells and CD28⁻ cells) within the CD4 and CD8 subpopulations. T cells, in both CD4 and CD8 compartment, express CD57 and lose CD28 expression although they have not reached late differentiated stages. This abnormal senescence of all naïve/memory subsets could clearly contribute to functional immune deficiency. More importantly, no correlation between PD-1 up regulation and CD28 loss/CD57 over expression was observed in none of the studied groups of subjects. PD-1 and CD57/CD28 reach maximal/minimal expression at opposing ends of the memory maturation spectrum (T_{TM} cells for PD-1 and T_{TD}/T_E for CD57/CD28). In conclusion, this accumulation of highly differentiated cells within subsets that

usually encompass non-differentiated cells during HIV-1 infection does not correlate with PD-1 up regulation and could partly explain incapacity of the immune response to control viremia.

Finally, we assessed immune reconstitution after antiretroviral therapy in HIV-1 infection. HAART seems to partially restore the CD8 compartment whereas recovery seems quite complete in the CD4 compartment. This discrepancy between the CD4⁺ and CD8⁺ populations could be explained by the fact that the CD4⁺ T cells, being massively depleted, will be predominantly renewed.

In conclusion, this study detailing T cell responses in HIV-1 infection unveiled some of the possible mechanisms that could be responsible for the loss of control of the disease during the transition from acute to chronic HIV-1 infection. Gaining further insights into these mechanisms underlying T cell exhaustion and disease progression by performing functional studies blocking the PD-1/PD-L1 pathway will be crucial for the design of rational strategies in the fight against the AIDS epidemic.

References

1. McCune JM. 2001. The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature* 410(6831): 974-9.
2. Hazenberg MD, Hamann D, Schuitemaker H, Miedema F. 2000. T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4+ T cells go out of stock. *Nat Immunol.* 1(4): 285-9.
3. Letvin NL, Walker BD. 2003. Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections. *Nat Med* 9(7): 861-6.
4. Douek DC, Picker LJ, Koup RA. 2001. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol.* 21: 265-304.
5. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC. 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 12(12):1365-71.
6. Giorgi JV, Liu Z, Hultin LE, Cumberland WG, Hennessey K, Detels R. 1993. Elevated levels of CD38+ CD8+ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 6(8): 904-12.
7. Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Prince HE, Detels R, Giorgi JV. 1997. Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 16(2): 83-92.
8. Cohen Stuart JW, Hazebergh MD, Hamann D, Otto SA, Borleffs JC, Miedema F, Boucher CA, de Boer RJ. 2000. The dominant source of CD4+ and CD8+ T-cell activation in HIV infection is antigenic stimulation. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 25(3): 203-11.

9. Hazenberg MD, Stuart JW, Otto SA, Borleffs JC, Boucher CA, de Boer RJ, Miedema F, 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(1): 249-55.
10. Sousa AE, Carneiro J, Meier-Schellersheim M, Grossman Z, Victorino RM. 2002. 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*. 169(6): 3400-6.
11. Gougeon ML. 2005. To kill or be killed: how HIV exhausts the immune system. *Cell Death Differ*. 12 (S1): 845-54.
12. Kedzierska K, Crowe SM. 2001. Cytokines and HIV-1: interactions and clinical implications. *Antivir Chem Chemother*. 12(3): 133-50.
13. Papagno L, Spina CA, Marchant A, Salio M, Rufer N, Little S, Dong T, Chesney G, Waters A, Easterbrook P, Dunbar PR, Shepherd D, Cerundolo V, Emery V, Griffiths P, Conlon C, McMichael AJ, Richman DD, Rowland-Jones SL, Appay V. 2004. Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection. *PLoS Biol*. 2(2): 173-85.
14. Palmer BE, Blyveis N, Fontenot AP, Wilson CC. 2005. Functional and phenotypic characterization of CD57+CD4+ T cells and their association with HIV-1-induced T cell dysfunction. *J Immunol*. 175(12): 8415-23.
15. Appay V, Zaunders JJ, Papagno L, Sutton J, Jaramillo A, Waters A, Easterbrook P, Grey P, Smith D, McMichael AJ, Cooper DA, Rowland-Jones SL, Kelleher AD. 2002. Characterization of CD4+ CTLs ex vivo. *J Immunol*. 168(11): 5954-8.
16. Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, Johnson TD, Owens B, Jacobson LP, Shih R, Lewis J, Wiley DJ, Phair JP, Wolinsky SM, Detels R. 1999. 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.* 179(4): 859-70.
17. Hazenberg MD, Otto SA, van Benthem BH, Roos MT, Coutinho RA, Lange JM, Hamann D, Prins M, Miedema F. 2003. Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *AIDS* 17(13): 1881-8.
 18. Koning FA, Otto SA, Hazenberg MD, Dekker L, Prins M, Miedema F, Schuitemaker H. 2005. Low-level CD4+ T cell activation is associated with low susceptibility to HIV-1 infection. *J Immunol.* 175(9): 6117-22.
 19. Kaur A, Grant RM, Means RE, McClure H, Feinberg M, Johnson RP. 1998. Diverse host responses and outcomes following simian immunodeficiency virus SIVmac239 infection in sooty mangabeys and rhesus macaques. *J Virol.* 72(12): 9597-611.
 20. Broussard SR, Staprans SI, White R, Whitehead EM, Feinberg MB, Allan JS. 2001. Simian immunodeficiency virus replicates to high levels in naturally infected African green monkeys without inducing immunologic or neurologic disease. *J Virol.* 75(5): 2262-75.
 21. Silvestri G, Sodora DL, Koup RA, Paiardini M, O'Neil SP, McClure HM, Staprans SI, Feinberg MB. 2003. Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity* 18(3): 441-52.
 22. Gordon SN, Klatt NR, Bosinger SE, Brenchley JM, Milush JM, Engram JC, Dunham RM, Paiardini M, Klucking S, Danesh A, Strobert EA, Apetrei C, Pandrea IV, Kelvin D, Douek DC, Staprans SI, Sodora DL, Silvestri G. 2007. Severe depletion of mucosal CD4+ T cells in AIDS-free simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *J Immunol.* 179(5): 3026-34.
 23. Douek DC. 2003. Disrupting T-cell homeostasis: how HIV-1 infection causes disease. *AIDS Rev.* 5(3):172-7.

24. Munier ML, Kelleher AD. 2007. Acutely dysregulated, chronically disabled by the enemy within: T-cell responses to HIV-1 infection. *Immunol Cell Biol.* 85(1):6-15.
25. Dion ML, Poulin JF, Bordi R, Sylvestre M, Corsini R, Kettaf N, Dalloul A, Boulassel MR, Debré P, Routy JP, Grossman Z, Sékaly RP, Cheynier R. 2004. HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation. *Immunity.* 21(6):757-68.
26. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, Polis MA, Haase AT, Feinberg MB, Sullivan JL, Jamieson BD, Zack JA, Picker LJ, Koup RA. 1998. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature.* 396(6712):690-5.
27. Schacker TW, Nguyen PL, Beilman GJ, Wolinsky S, Larson M, Reilly C, Haase AT. 2002. Collagen deposition in HIV-1 infected lymphatic tissues and T cell homeostasis. *J Clin Invest.* 110(8):1133-9.
28. Okoye A, Meier-Schellersheim M, Brenchley JM, Hagen SI, Walker JM, Rohankhedkar M, Lum R, Edgar JB, Planer SL, Legasse A, Sylwester AW, Piatak M Jr, Lifson JD, Maino VC, Sodora DL, Douek DC, Axthelm MK, Grossman Z, Picker LJ. 2007. Progressive CD4+ central memory T cell decline results in CD4+ effector memory insufficiency and overt disease in chronic SIV infection. *J Exp Med.* 204(9):2171-85.
29. Rethi B, Fluor C, Atlas A, Krzyzowska M, Mowafi F, Grützmeier S, De Milito A, Bellocco R, Falk KI, Rajnavölgyi E, Chiodi F. 2005. Loss of IL-7Ralpha is associated with CD4 T-cell depletion, high interleukin-7 levels and CD28 down-regulation in HIV infected patients. *AIDS.* 19(18):2077-86.
30. Paiardini M, Cervasi B, Albrecht H, Muthukumar A, Dunham R, Gordon S, Radziewicz H, Piedimonte G, Magnani M, Montroni M, Kaech SM, Weintrob A, Altman JD, Sodora DL, Feinberg MB, Silvestri G. 2005. Loss of CD127 expression defines an expansion of effector CD8+ T cells in HIV-infected individuals. *J Immunol.* 174(5):2900-9.

31. van Grevenynghe J, Procopio FA, He Z, Chomont N, Riou C, Zhang Y, Gimmig S, Boucher G, Wilkinson P, Shi Y, Yassine-Diab B, Said EA, Trautmann L, El Far M, Balderas RS, Boulassel MR, Routy JP, Haddad EK, Sekaly RP. 2008. Transcription factor FOXO3a controls the persistence of memory CD4(+) T cells during HIV infection. *Nat Med.* 14(3):266-74.
32. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. 2005. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol.* 23: 515-48.
33. Pentcheva-Hoang T, Chen L, Pardoll DM, Allison JP. 2007. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(45):17765-70.
34. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T. 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 192(7): 1027-34.
35. Carter L, Fouser LA, Jussif J, Fitz L, Deng B, Wood CR, Collins M, Honjo T, Freeman GJ, Carreno BM. 2002. PD-1:PD-L1 inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol.* 32(3): 634-43.
36. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. 2006. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439(7077): 682-7.
37. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, Boulassel MR, Delwart E, Sepulveda H, Balderas RS, Routy JP, Haddad EK, Sekaly RP. 2006. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med.* 12(10): 1198-202.

38. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, Mackey EW, Miller JD, Leslie AJ, DePierres C, Mncube Z, Duraiswamy J, Zhu B, Eichbaum Q, Altfeld M, Wherry EJ, Coovadia HM, Goulder PJ, Klenerman P, Ahmed R, Freeman GJ, Walker BD. 2006. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443(7109): 350-4
39. Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM, Price DA, Gostick E, Adams WC, Precopio ML, Schacker T, Roederer M, Douek DC, Koup RA. 2006. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med*. 203(10): 2281-92.
40. D'Souza M, Fontenot AP, Mack DG, Lozupone C, Dillon S, Meditz A, Wilson CC, Connick E, Palmer BE. 2007. Programmed death 1 expression on HIV-specific CD4+ T cells is driven by viral replication and associated with T cell dysfunction. *J Immunol*. 179(3): 1979-87.
41. Zhang JY, Zhang Z, Wang X, Fu JL, Yao J, Jiao Y, Chen L, Zhang H, Wei J, Jin L, Shi M, Gao GF, Wu H, Wang FS. 2007. PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8+ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood* 109(11): 4671-8.
42. Velu V, Titanji K, Zhu B, Husain S, Pladevega A, Lai L, Vanderford TH, Chennareddi L, Silvestri G, Freeman GJ, Ahmed R, Amara RR. 2009. Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature*. 458(7235):206-10.
43. Younes SA, Trautmann L, Yassine-Diab B, Kalfayan LH, Kernalguen AE, Cameron TO, Boulassel R, Stern LJ, Routy JP, Grossman Z, Dumont AR, Sekaly RP. 2007. The duration of exposure to HIV modulates the breadth and the magnitude of HIV-specific memory CD4+ T cells. *J Immunol*. 178(2):788-97.
44. Miller JD, Masopust D, Wherry EJ, Kaech S, Silvestri G, Ahmed R. 2005. Differentiation of CD8 T cells in response to acute and chronic viral infections: implications for HIV vaccine development. *Curr Drug Targets Infect Disord*. 5(2):121-9.

45. Lin SJ, Peacock CD, Bahl K, Welsh RM. 2007. Programmed death-1 (PD-1) defines a transient and dysfunctional oligoclonal T cell population in acute homeostatic proliferation. *J Exp Med.* 204(10):2321-33.
46. Bour-Jordan H, Blueston JA. 2002. CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. *J Clin Immunol.* 22(1):1-7.
47. Gamberg J, Pardoe I, Bowmer MI, Howley C, Grant M. 2004. Lack of CD28 expression on HIV-specific cytotoxic T lymphocytes is associated with disease progression. *Immunol Cell Biol.* 82(1):38-46.
48. Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, Ogg GS, King A, Lechner F, Spina CA, Little S, Havlir DV, Richman DD, Gruener N, Pape G, Waters A, Easterbrook P, Salio M, Cerundolo V, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. 2002. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med.* 8(4):379-85.
49. Douek DC, Betts MR, Hill BJ, Little SJ, Lempicki R, Metcalf JA, Casazza J, Yoder C, Adelsberger JW, Stevens RA, Baseler MW, Keiser P, Richman DD, Davey RT, Koup RA. 2001. Evidence for increased T cell turnover and decreased thymic output in HIV infection. *J Immunol.* 167(11):6663-8.
50. Beignon AS, McKenna K, Skoberne M, Manches O, DaSilva I, Kavanagh DG, Larsson M, Gorelick RJ, Lifson JD, Bhardwaj N. 2005. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest.* 115(11):3265-75.

Figure legends

Figure 1. Impaired homeostasis and increased expression of PD-1 on T cell subsets is associated with disease progression. **a.** Seven-parameter flow cytometry gating strategy to determine CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets. T_N, T_{CM}, T_{TM}, T_{EM} and T_{TD}/T_E subsets are identified based on their CD45RA, CCR7 and CD27 expression. **b.** Distribution of the CD4⁺ and CD8⁺ T cell subpopulation in acute-untreated (n=8), chronic-untreated (n=13), chronic-treated (n=15) and healthy (n=15) patients. **c.** PD-1 expression on ex-vivo CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets. Each symbol represents one patient. Mean response is shown as a horizontal line. Statistical significance was determined using the Mann-Whitney U test. * p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001.

Figure 2. PD-1 over expression does not correlate with increased T cell turnover in HIV-1 infection. **a.** Correlation between PD-1 expression and the number of Ki67⁺ cells in total CD4⁺ and CD8⁺ T cells. **b.** Percentage of Ki67 expressing cells in total CD4⁺ and CD8⁺ T cells of HIV-1 infected patients. **c.** Correlation between PD-1 expression and the number of Ki67 positive cells in each CD4 and CD8 subsets. **d.** Percentage of Ki67⁺ cells in CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets. **e.** Level of PD-1 expression on Ki67⁺ cells versus Ki67⁻ cells of HIV-1 infected patients. Each symbol represents one patient. Mean response is shown as a horizontal line. Statistical significance for **b** and **d** were determined using the Mann-Whitney U test. Correlations for **a** and **c** were calculated using Spearman test. * p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001.

Figure 3. PD-1 up regulation is not associated with CD28 down regulation in HIV-1 infected patients. **a.** Correlation between PD-1 expression on total CD4⁺ and CD8⁺ T cells and percentage of CD28⁺ cells. **b.** Percentage of CD28 expressing cells in total ex-vivo CD4⁺ and CD8⁺ T cells from acute-untreated (n=8), chronic-untreated (n=13), chronic-treated (n=15) and healthy (n=15) patients. **c.** Correlation between PD-1 expression and the percentage of CD28⁺

cells in each T cell subpopulations. **d.** Percentage of CD28⁺ cells in CD8⁺ and CD4⁺ T cell subsets. Each symbol represents one patient. Mean response is shown as a horizontal line. Statistics for **b** and **d** were determined using the Mann-Whitney U test. Correlations for **a** and **c** were calculated using Spearman test. * p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001.

Figure 4. PD-1 up regulation does not correlate with increased number of CD57⁺ T cells in HIV-1 infection. **a.** Correlation between PD-1 expression and percentage of CD57⁺ cells in the CD4⁺ and CD8⁺ T cell compartments. **b.** Ex-vivo expression of CD57 on total CD4⁺ and CD8⁺ T cells from HIV-1 infected patients and seronegative subjects. **c.** Correlation between PD-1 expression and percentage of CD57⁺ cells in T cell subsets. **d.** Ex-vivo distribution of CD57⁺ cells in CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets. Each symbol represents one patient. Mean response is shown as a horizontal line. Statistics for **b** and **d** were determined using the Mann-Whitney U test. Correlations for **a** and **c** were calculated using Spearman test. * p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001.

Supplementary data 1. Clinical characteristics of HIV-1 infected patients.

^a Copies of HIV-1 RNA/ml of plasma at the time of study

^b Peripheral CD4⁺ T lymphocytes count at the time of study

^c Peripheral CD8⁺ T lymphocytes count at the time of study

^d Antiretroviral drug abbreviations : ABC, abacavir; ATA, atazanavir; AZT, zidovudine; COM, combinir; DDI, didanosine; DEL, delavirdine; D4T, savudine; EFV, efavirenz; IND, indinavir; KAL, kaletra; KIV, kivexa; NFV, nelfinavir; NEV, nevirapine; REY, reyataz; RIT, ritonavir; 3TC, lamivudine.

^e Duration of infection at the time of study

Supplementary data 2. PD-1 expression is up regulated on total ex-vivo CD4⁺ and CD8⁺ T cells in HIV-1 infected patients. **a.** Mean Fluorescence Intensity (MFI) of PD-1 expression on total CD4⁺ and CD8⁺ T cells in acute-untreated (n=8), chronic-untreated (n=13), chronic-treated (n=15) and healthy (n=15)

patients. **b.** Correlation between PD-1 expression on CD4⁺ T cells and PD-1 expression on CD8⁺ T cells. Each dot represents one patient. Mean response is shown as a horizontal line. Statistics for **a** were determined using the Mann-Whitney U test. Correlations for **b** were calculated using Spearman test. * p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001.

Supplementary data 3. PD-1 up regulation does not correlate with time of infection in HIV-1 infection. Each dot represents one patient. Correlations were calculated using Spearman test. * p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001.

Supplementary data 4. CD4⁺ and CD8⁺ T cell differentiation and PD-1 expression. PD-1 expression is up regulated while CD4⁺ and CD8⁺ T cell are differentiating from T_{CM} subset to the most differentiated T_{TM}, T_{EM} and T_{TD/TE} subsets. Each symbol represents one patient. Mean response is shown as a horizontal line. Statistics were determined using the Mann-Whitney U test. * p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001.

Supplementary data 5. Example of PD-1 expression on total *ex-vivo* CD4⁺ and CD8⁺ T cells subsets in HIV-1 infected individuals. Mean Fluorescence Intensity (MFI) of PD-1 expression on total *ex-vivo* CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets in acute-untreated, chronic-untreated, chronic-treated and healthy patients.

Contributions

G.B. designed and performed all experiments, analyzed-interpreted data and prepared graphics, and wrote the manuscript. N.C. participated in performing experiments/preparing graphics and performed all statistical analysis. B.Y.D. and C.R. participated in analyzing data. M.R.B. and J.-P.R. provided donor samples and data about the viral load and cell counts. R.-P.S. supervised the project.

Figure 1

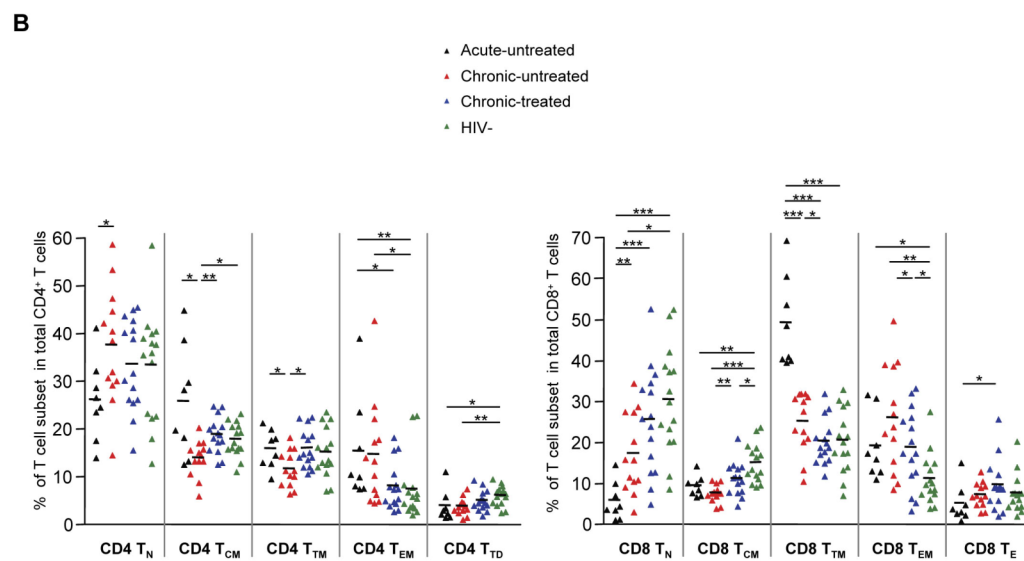
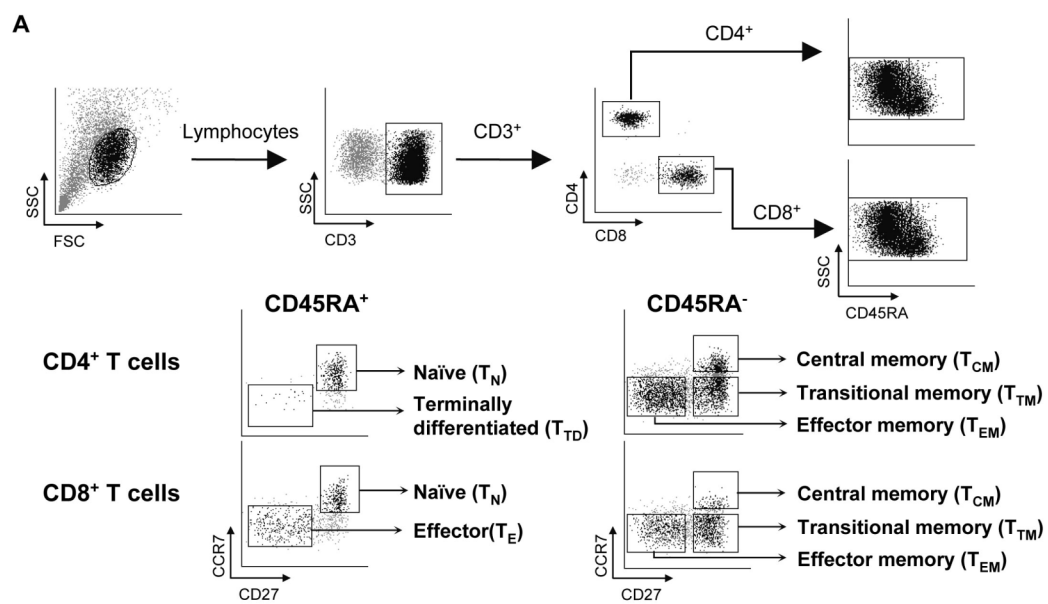


Figure 1

C

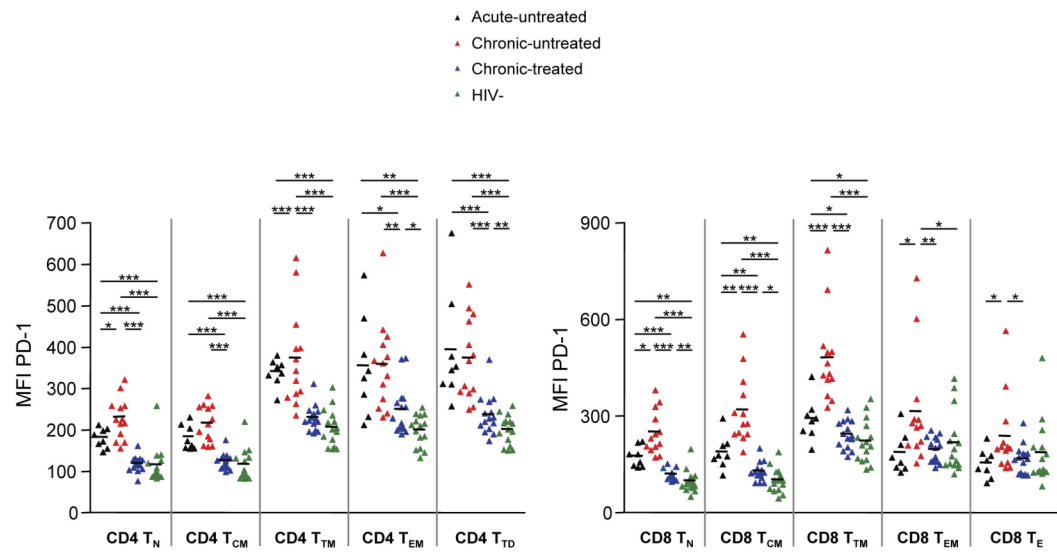
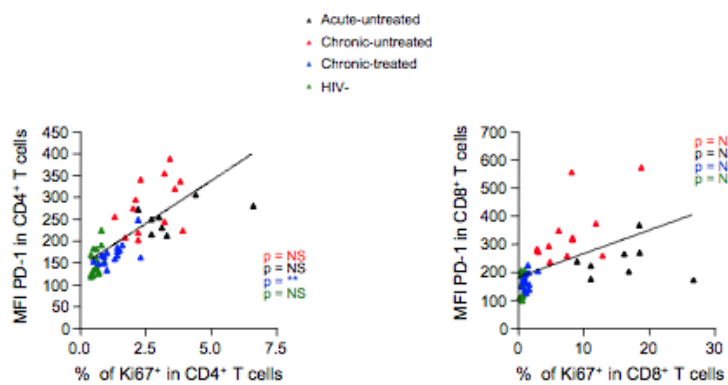


Figure 2

A



B

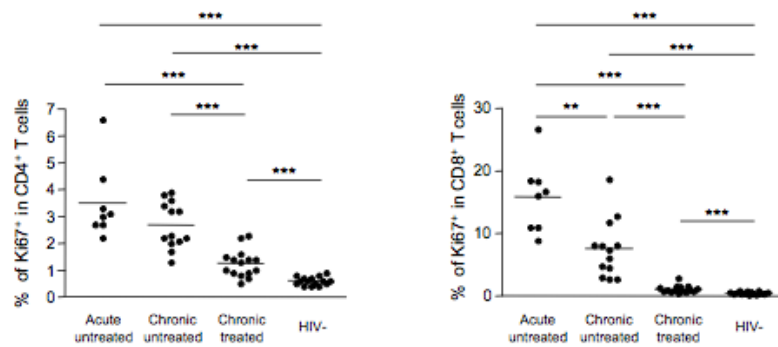


Figure 2

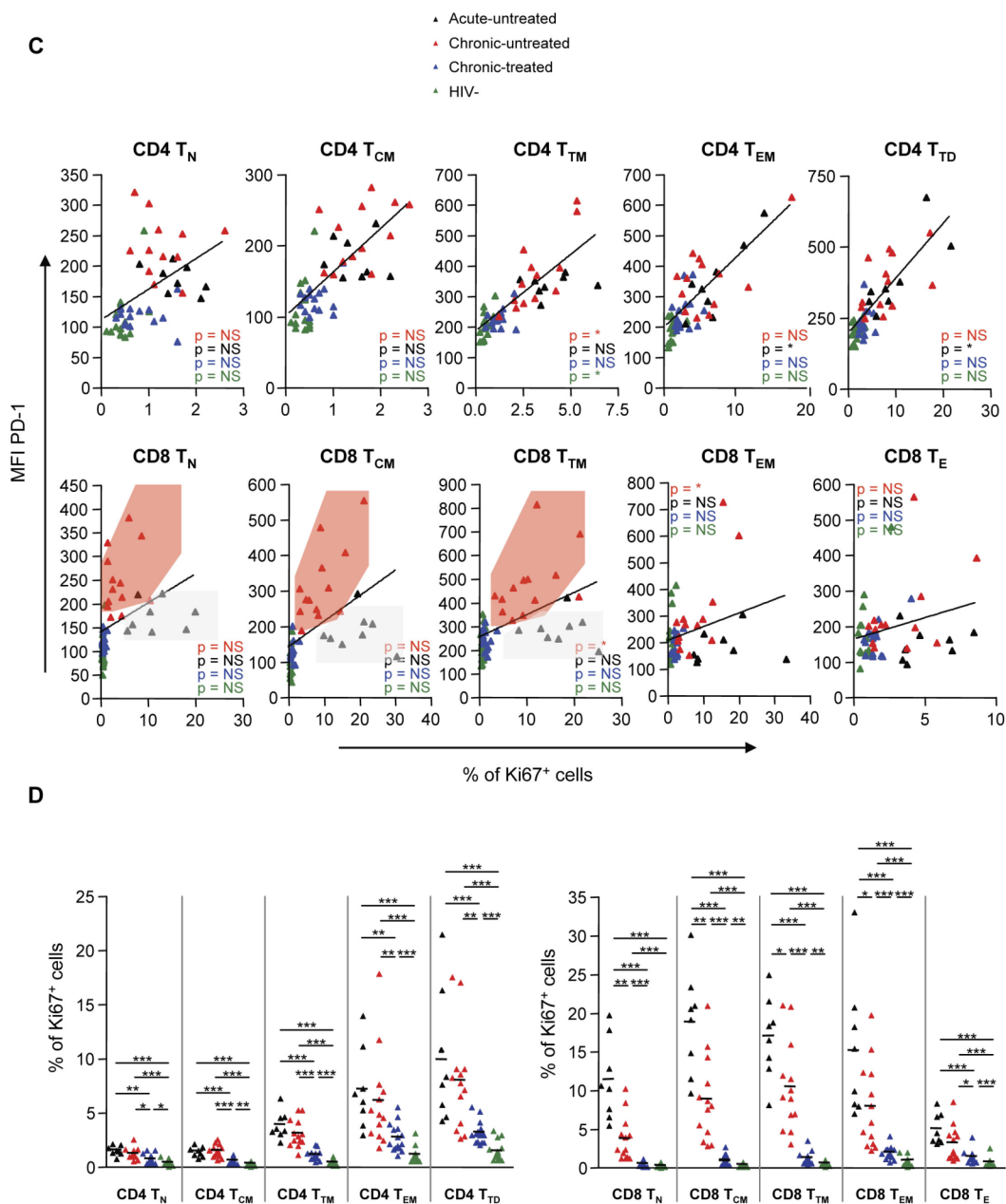


Figure 2

- ▲ Acute-untreated
- ▲ Chronic-untreated
- ▲ Chronic-treated
- ▲ HIV-

E

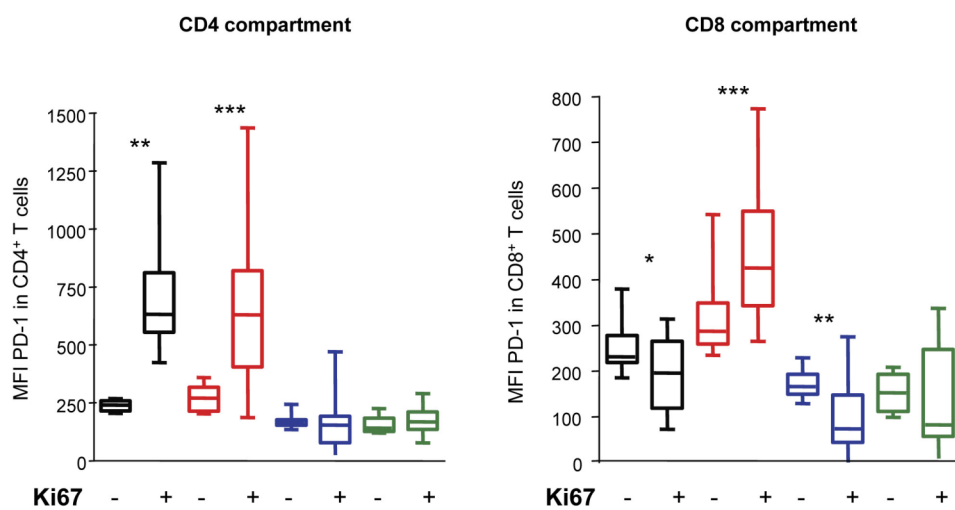


Figure 3

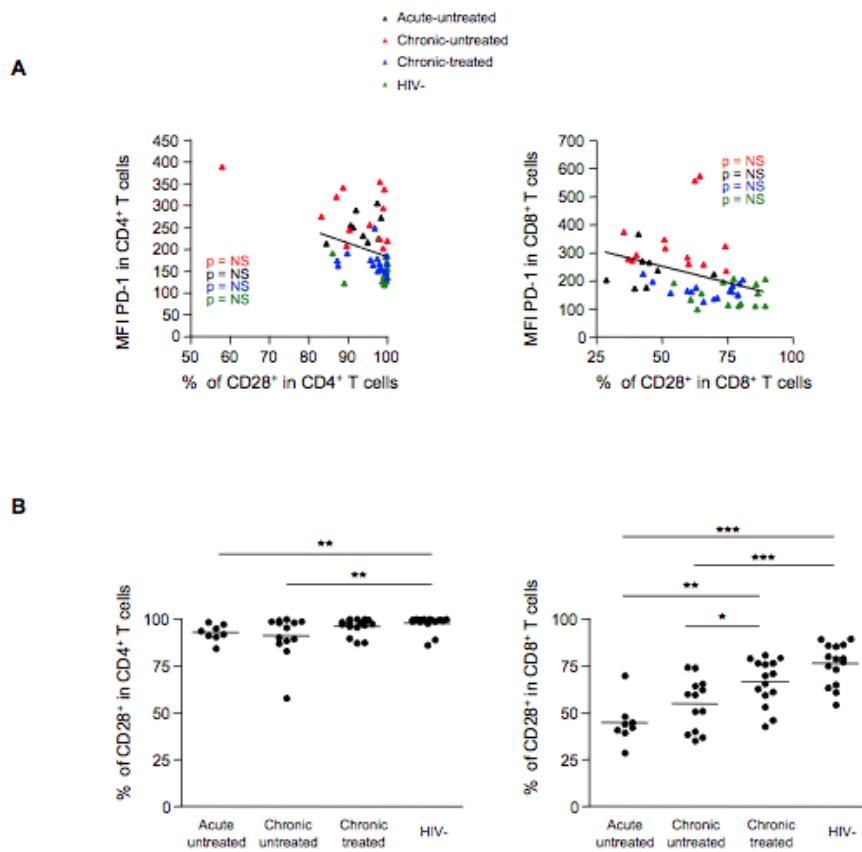


Figure 3

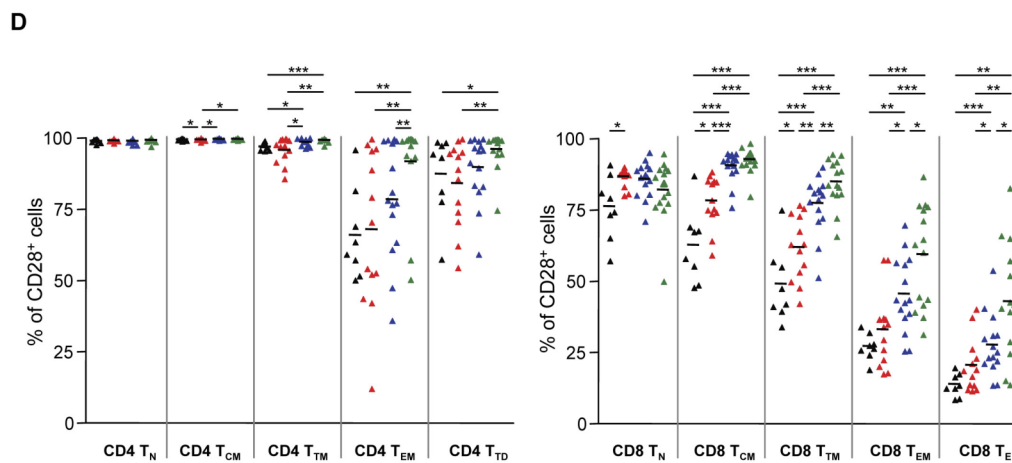
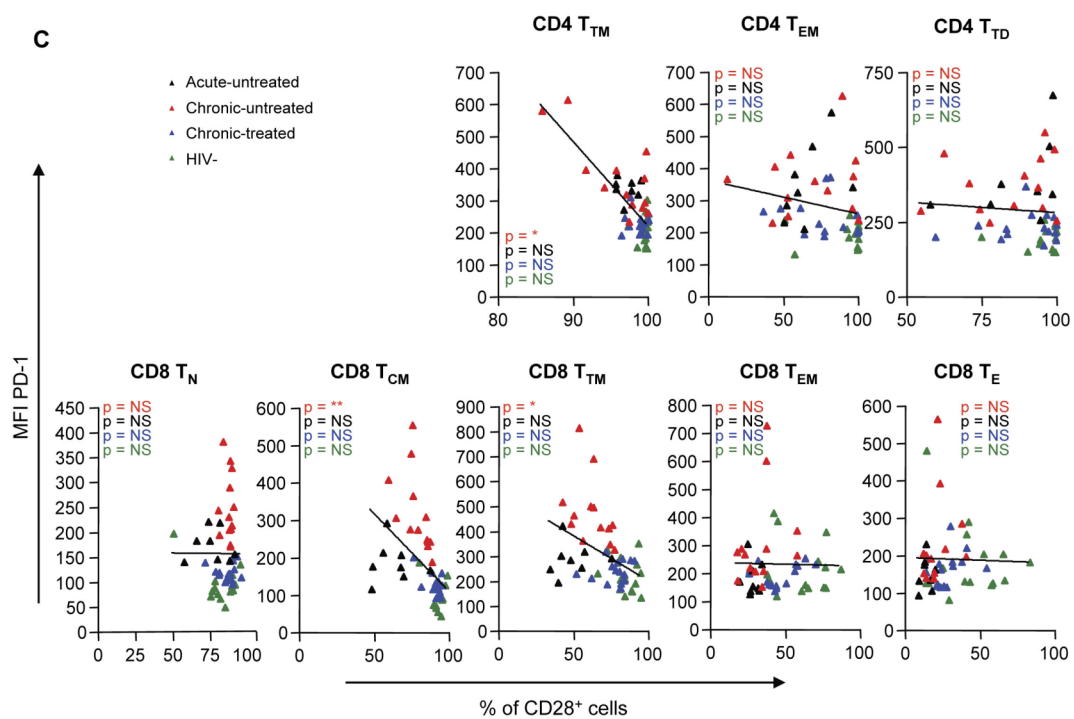


Figure 4

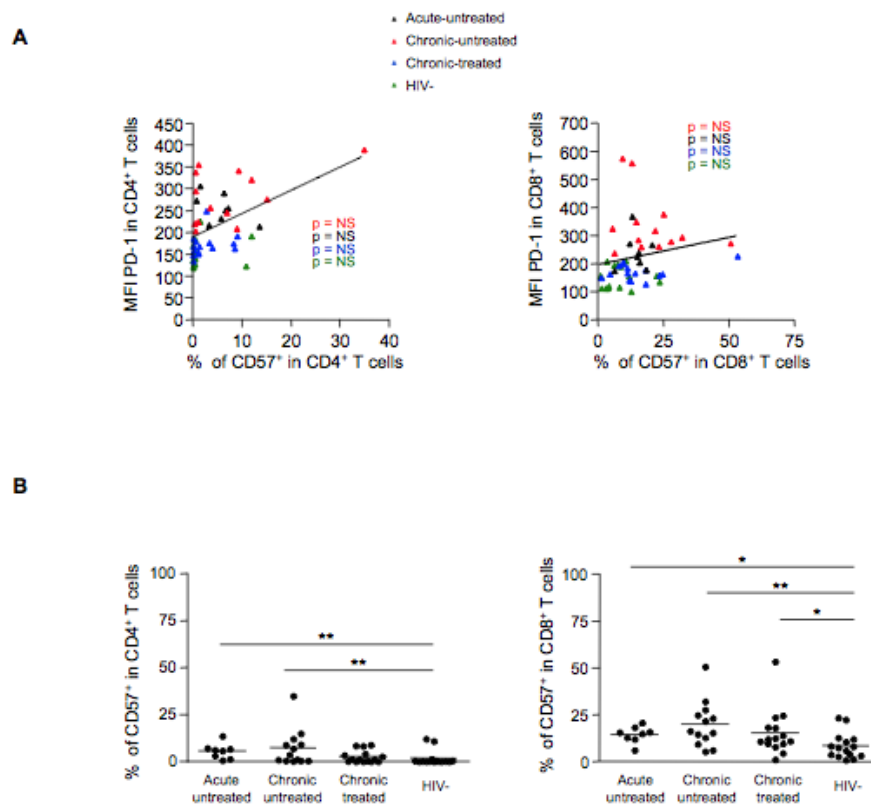
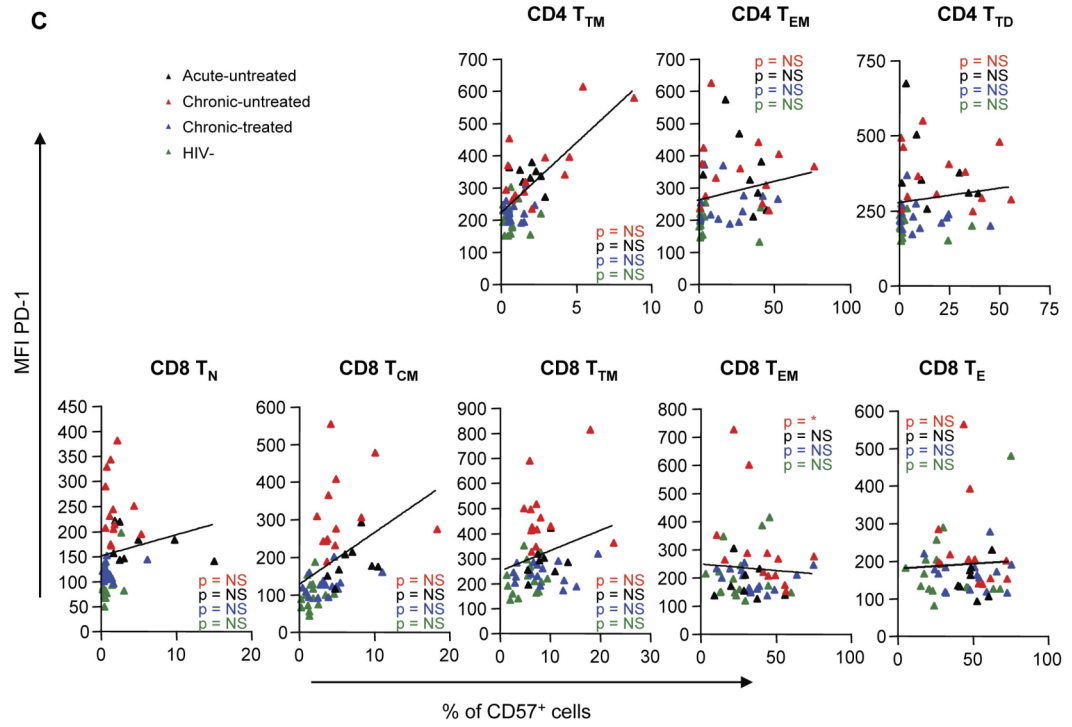
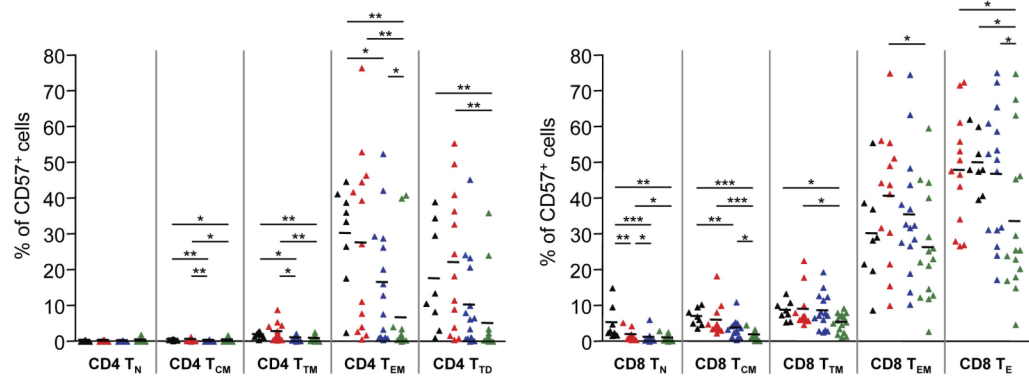


Figure 4



D

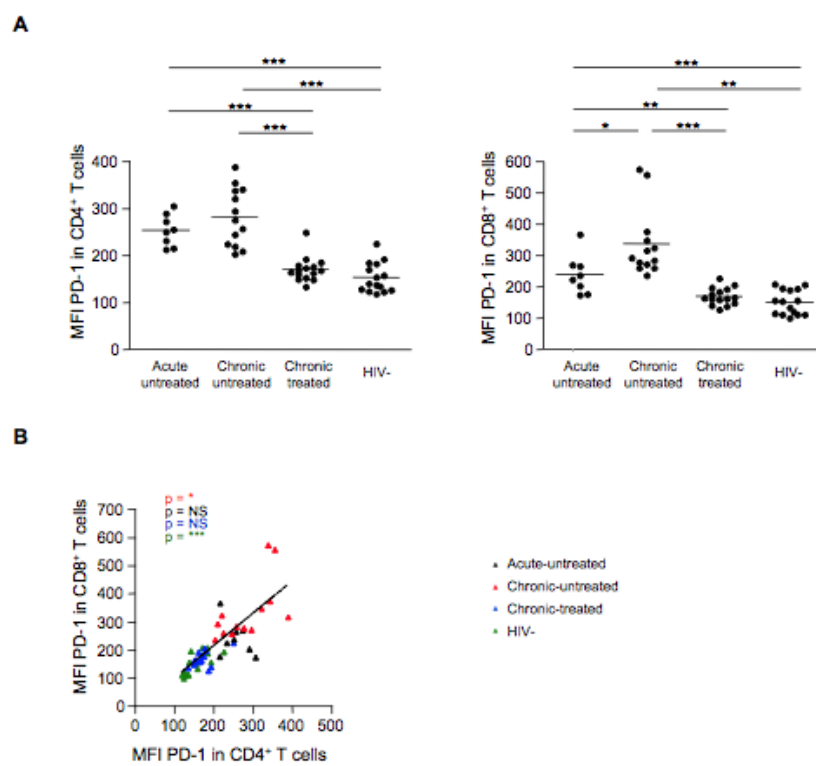


Supplementary data 1

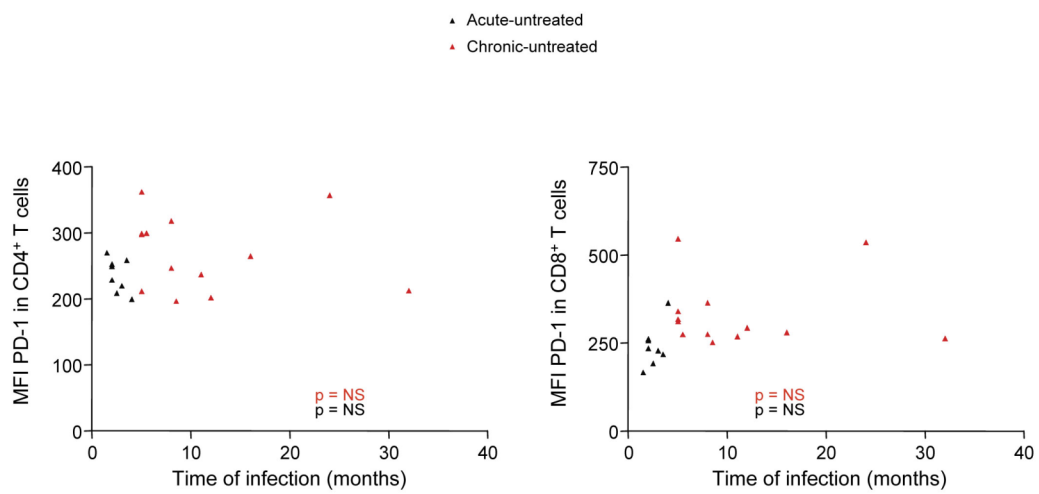
Patient	Viral load [§]	CD4 count [‡]	CD8 count	treatment [†]	Time of infection
Chronic-untreated					
VR DRPI 025	218113	296	364	untreated	24 months
VR 003001	200363	310	350	untreated	32 months
VR 378	176557	443	736	untreated	5 months
VR 021	97044	730	1310	untreated	5 months
VR 42117	68412	704	1081	untreated	8 months
VR 360	57154	316	376	untreated	8 months
VR 026	36349	442	538	untreated	6 months
VR 025	20840	479	791	untreated	7 months
VR 003	15703	494	1055	untreated	16 months
VR 016	8714	691	1122	untreated	12 months
VR 347	4456	1173	1143	untreated	10 months
VR 03006	2021	522	366	untreated	5 months
VR 026	1705	368	425	untreated	12 months
Median	28594	487	763		
Acute-untreated					
ACU 365	3221835	257	1007	untreated	43 days
ACU 013	366646	483	930	untreated	51 days
ACU 011	125536	594	692	untreated	52 days
ACU 375	93706	378	779	untreated	72 days
ACU DRPI 039	93223	857	1499	untreated	91 days
ACU 373	81984	338	1829	untreated	106 days
ACU 360	59925	359	706	untreated	87 days
ACU DRPI 041	56838	475	640	untreated	57 days
Median	93706	439	930		
Chronic-treated					
ST 101002	<50	662	1051	DDI D4T EFV	19 months
ST 008	<50	463	376	NFV D4T 3TC	20 months
ST 310	<50	650	392	D4T 3TC IND	64 months
ST 325	<50	604	1281	IND COM	53 months
ST 326	<50	883	333	EFV IND	49 months
ST 338	<50	443	322	RIT COM KAL	18 months
ST 001	<50	890	673	COM NEV	57 months
ST 002	<50	688	1273	COM NEV	100 months
ST 003	<50	434	583	3TC EFV ABC	165 months
ST 004	<50	492	582	RIT REY KIV	166 months
ST 007	<50	563	613	IND AZT 3TC	86 months
ST 009	<50	424	461	3TC D4T DEL	84 months
ST 015	<50	552	715	D4T ATA	139 months
ST 016	<50	671	1120	3TC ABC KAL	242 months
ST 017	<50	510	765	COM RIT	61 months
Median	<50	563	613		

ABC, abacavir; ATA, atazanavir; AZT, zidovudine; COM, combinir; DDI, didanosine; DEL, delavirdine; D4T, savudine; EFV, efavirenz; IND, indinavir; KAL, kaletra; KIV, kivexa; NFV, nelfinavir; NEV, nevirapine; REY, reyataz; RIT, ritonavir; 3TC, lamivudine.

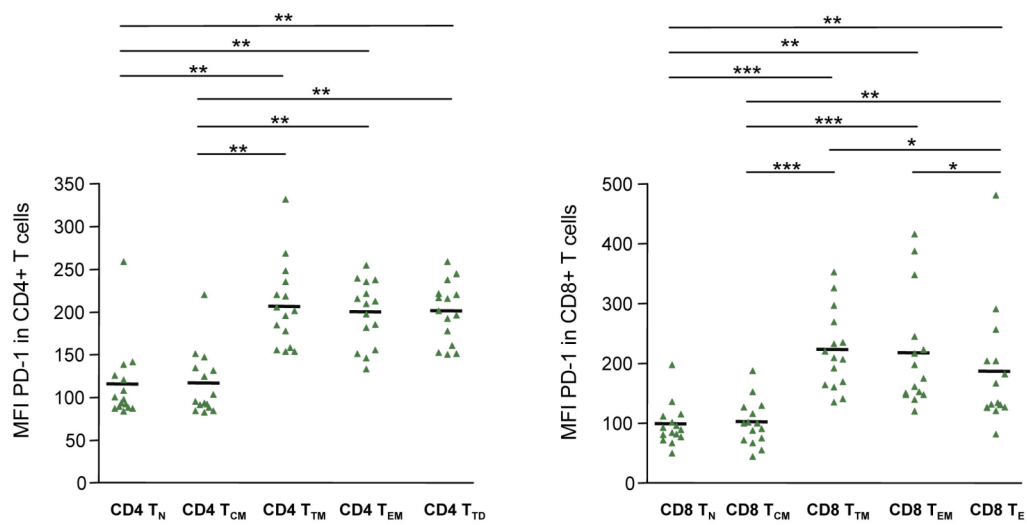
Supplementary data 2



Supplementary data 3

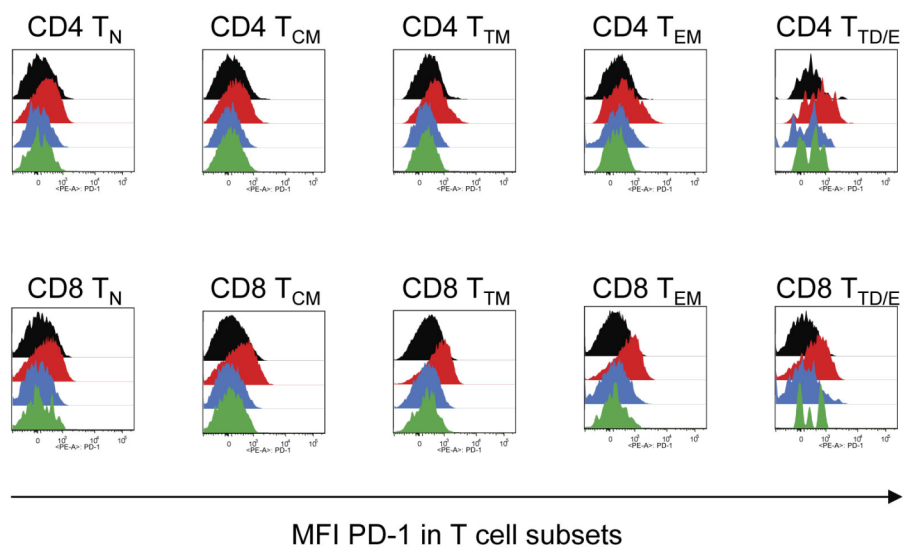


Supplementary data 4



Supplementary data 5

- ▲ Acute-untreated
- ▲ Chronic-untreated
- ▲ Chronic-treated
- ▲ HIV-



4. Article 2

Generation of a flexible expression system for human MHC class II tetrameric complexes and detection of antigen-specific CD4⁺ T cells

Gaëlle Breton^{*,1,2} Bader Yassine-Diab^{*,1}, Souheil-Antoine Younes¹, Alain R. Dumont¹ and Rafick-Pierre Sékaly^{1,2,3,4}.

From the ¹Laboratoire d'Immunologie, Centre de Recherches de l'hôpital Saint-Luc, 264 Boul. René-Lévesque Est, Montréal, Québec H2X 1P1, Canada and the ²Faculté de Médecine, Département de Microbiologie-Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada and the ³Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montréal, Québec H3A 2B4, Canada.

* These authors contributed equally to this work.

⁴ Address correspondence to Rafick-P. Sékaly, Laboratoire d'Immunologie, Centre de Recherches de l'hôpital Saint-Luc, 264 Boul. René-Lévesque Est, Montréal, Québec H2X 1P1.

Tel. : (514) 890-8000 #35289; Fax : (514) 412-7415

Key words: T Lymphocytes, MHC class II tetramers, HLA-DR1, covalently-linked peptide

Abstract

Identification and characterization of antigen-specific T cells are indispensable for understanding immune responses against infectious agents or immunopathological disorders such as autoimmune diseases. In this study, we described a versatile and efficient method to produce different soluble HLA-DR molecules covalently linked to antigenic peptides that can be multimerized using fluorescently tagged streptavidin and utilized to detect epitope-specific CD4⁺ T cells. We demonstrated that these molecules are fully functional and specifically stain a T cell clone and a T cell line diluted into irrelevant PBMC. We show that optimal staining of a polyclonal antigen-specific T cell line required a 2- to 3-hours incubation at 37°C with 20 mg/ml of the tetramers. The generation of multiple HLA-DR/peptide tetrameric complexes to directly detect, isolate and characterize antigen-specific helper T cells is crucial to better understand immune responses and immunological disorders in which CD4⁺ T lymphocytes play a key role.

Introduction

The recognition of antigenic peptides bound to MHC molecules (pMHC) by T cells bearing specific T-cell receptors (TCRs) is a central event in the development of the adaptive immune response. After the initial priming, the pathogen-specific T cell population expands and acquires effector functions such as cytotoxicity and/or cytokine production. The interaction between pMHC complexes and TCRs is characterized by a low to moderate affinity and a relatively short half-life¹. The relatively low affinity and fast dissociation rate of this interaction has hampered the labelling of antigen-specific T cells using soluble monomeric pMHC molecules². However, this problem has been circumvented by using multimerized pMHC molecules, thus increasing the avidity of the interaction and allowing the stable binding of these antigenic complexes to the TCRs of epitope-specific T cells³.

The development of fluorescent-labelled MHC class I tetrameric complexes (tetramers) to identify epitope-specific CD8⁺ T cells has been a major breakthrough in the study of CD8 T cell-mediated immune responses³. These tools have been extensively used to detect and characterize antigen-specific CD8 T cells in a large number of infectious diseases and immunopathological conditions, both in humans and in animal models. In contrast to other methods of detection and quantification of antigen-specific T cells such as ELISpot, intracellular cytokine staining, cytotoxic assays and proliferation, tetramer staining do not rely on or target any particular function of the cells, thereby identifying all peptide-specific T cells.

While MHC class I tetramers are now routinely generated and utilized in several laboratories, MHC class II tetramers have been used in a limited number of studies. Soluble MHC class I molecules are produced in large amount using a standard protocol of *in vitro* refolding, in the presence of molar excess of exogenous peptide, of MHC class I heavy chain and β_2 -microglobulin expressed in

Escherichia coli (*E. coli*). In contrast, no standard protocol to reproducibly produce large quantities of properly folded soluble MHC class II molecules has been developed to date. In fact, MHC class II multimers have been produced with inconsistent success using different methods including baculovirus/transfected *Drosophila* cell expression systems⁴⁻⁶, prokaryotic expression of chains followed by *in vitro* refolding^{7,8} as well as expression in mammalian cells⁹.

An important issue regarding the generation of soluble MHC class II molecules concerns the loading of the peptide into the antigen-binding groove. MHC class II α and β chains expressed in *E. coli* are usually folded *in vitro* in the presence of molar excess of exogenous peptides. However, the use of large amounts of synthetic peptides is very costly and the efficiency of the folding process appears to be very dependent on the nature of both the MHC molecule and the peptide. Recently, Cunliffe et al.⁸ have been able to improve the yield of properly folded MHC class II molecules in an *E. coli* expression system using a covalently-linked peptide, a strategy that is largely used for MHC class II expression in baculovirus and *Drosophila* expression systems⁴. However, because only three different constructs have been produced using this strategy in *E. coli*, it is still unknown if the *in vitro* refolding efficiency will greatly varies for different MHC/epitope combinations, as observed for exogenous peptide loading. Another challenge regarding the use of MHC class II tetramers is the high degree of polymorphism found in MHC class II genes and the absence of a highly prevalent allele in the population. It is therefore important to have a versatile system in which the HLA allele and peptide to be expressed can be straightforwardly swap in order to cover a large fraction of population and allow for the assessment of CD4⁺ T cell response in most individuals.

In this study, we describe a versatile and efficient strategy to produce several multimeric MHC class II molecules in a *Drosophila* cell expression system. We show that MHC class II tetramers produced in this system are functional and can detect epitope-specific CD4⁺ T cells. Moreover, we tested different parameters

including tetramer concentration, cell density, temperature and time of incubation in order to obtain the optimal conditions for tetramer staining.

Methods

Soluble MHC class II constructs. The gene encoding the extracellular portion of the DRA1*0101 (DR α) and DRB1*0101 (DR β) chains, with their respective leader sequence, were cloned after the *Drosophila* metallothionein promoter (pMT). A 13-amino acid sequence (LNDIFEAQKIEWH) encoding a peptide capable of being biotinylated at a lysine residue by the *E.coli* enzyme BirA was introduced at the C-terminal end of the DR α chain. The antigenic peptides was covalently linked to the N terminus of the DR β chain via a 15-amino acid glycine-rich flexible linker (motif: (Gly₄-Ser)₃). The MluI and EcoRI restriction sites were inserted by PCR at the N-terminal and C-terminal of the peptide, respectively, allowing the insertion of new antigenic epitope into the digested vector by ligation of annealed oligonucleotides (coding for the chosen epitope) with complementary ends to these restriction sites.

Production, purification and oligomerization of soluble MHC class II molecules. 20 x 10⁶ *Drosophila* Schneider 2 (S2) cells resuspended at 5 x 10⁶/ml in Shields and Sang M3 (S&S) medium supplemented with 1% FCS were co-transfected with the expression vector pCV-HLA-DR (5 μ g) and the selection vector pCoHygro (0.6 μ g) using lipofectin (Gibco-Life Technologies). To generate stable cell lines, the selection agent hygromycin (315 units/ml) was added to the culture three days after transfection. Three weeks later, highly expressing clones were sorted by flow cytometry according to high GFP fluorescence. Before induction, transfected S2 cells were grown in S&S medium supplemented with 10% FCS in spinner flask up to 1L at a density of 10-15 millions/ml. Protein expression was induced by addition of 1mM CuSO₄ (Sigma-Aldrich). After 5 days, the supernatant was collected, centrifuged at 4°C for 15 min. at 18000 x g and immediately purified or conserved at -20°C in the presence of a cocktail of protease inhibitors.

MHC class II monomers were purified by passing the supernatant on a column loaded with cyanogens bromide-activated (CnBr) Sepharose 4B beads (Amersham Pharmacia Biotech) coupled to an anti-HLA-DR conformational antibody (L243). After extensive washing with PBS, monomers were eluted with 10 ml of 50 mM 3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid (CAPS, Sigma-Aldrich), pH11.5 and the eluted fractions (800 μ l) were immediately neutralized by 200 μ l of 0.5M Tris-Cl pH7.5. Fractions containing the properly-folded monomers were pooled, concentrated and buffer-exchanged into 100 mM Tris-HCl pH 8.3 a Centricon@ Plus-20 (Amicon Canada Ltd). Protein purity was evaluated by Coomassie gel staining and protein quantification was performed by Bradford assay (Bio-Rad) and by ELISA using anti-MHC class II antibodies recognizing properly folded molecules. Typically, protein yields varied from 50 to 100 mg per liter of S2 culture depending on the MHC class II/peptide complex produced.

Purified MHC class II monomers were biotinylated using the BirA enzyme (Avidity, Denver, CO) according to the manufacturer's protocols. Briefly, monomers (2 mg/ml) were incubated at 37°C for 16 hours in the presence of BirA (20 mg/ml) in the following buffer: 10 mM Tris-Cl pH8.0, 50 mM Bicine pH8.3, 10 mM ATP, 10 mM magnesium acetate and 40mM biotin. Elimination of free biotin and buffer exchange (PBS) were performed using a Centricon@ Plus-20. Biotinylation levels were estimated by ELISA using the BRTA kit (Avidity, Denver, CO) according to the manufacturer's protocol. MHC class II monomers were mixed with Phycoerythrin (PE)-coupled streptavidin (Biosource, Camarillo, CA) at a 4:1 molar ratio. Tetramers were stored at 4°C at a final concentration of 120 ng/ml.

Western blotting. Purified MHC class II monomers were migrated on a 12% SDS-page and transferred onto a nitrocellulose membrane. After an overnight blocking in PBS containing 5% nonfat dry milk and 0.05% Tween-20, the membrane was incubated for 1 hour with primary antisera obtained by immunization of rabbits with purified recombinant HLA-DR α and β chains.

Peroxidase-conjugated goat anti-rabbit Ig was employed as secondary antibodies to detect bound proteins. For revelation, membranes were incubated with enhanced chemiluminescence substrate according to the manufacturer's instructions and then exposed to an X-ray film.

Generation of HA-specific T cell lines. PBMCs isolated from a healthy blood donor (HLA-DRB1*0101/DRB1*1101) were resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10% AB human serum. 2×10^6 PBMCs (2×10^6 /ml) were stimulated with 1 mg/ml of hemagglutinin (HA) peptide (HA₃₀₆₋₃₁₈: PKYVKQNTLKLAT) from influenza A virus H3N2 in 24-well flat-bottom plates (Falcon, VWR, Canlab, Mississauga, ON). After 7 to 10 days, cells were re-stimulated with 1 mg/ml of the peptide in presence of irradiated autologous PBMCs at a 1:1 APC/T cell ratio. Recombinant human IL-2 (200 U/ml) was added to the culture 24 hours after re-stimulation. This procedure was repeated each week and HA₃₀₆₋₃₁₈-specific CD4⁺ T cell lines were usually obtained after 3 to 5 cycles of re-stimulation, as assessed by a [³H]-thymidine incorporation assay.

Tetramer staining. Cells were spun down and resuspended in 15-25 μ l of culture media. MHC class II tetramers were added and the mixture was incubated for 2 to 3 hours at 37°C (unless stated otherwise). After this incubation, staining for cell surface markers was performed for 30 minutes on ice. Cells were then washed and resuspended in PBS supplemented with 0.5% FCS for flow cytometry acquisition on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA). Data analysis was performed using CellQuest software (BD Biosciences, San Jose, CA).

Results

Production of different HLA-DR/peptide complexes

Our flexible construct allows the easy cloning and expression of multiple HLA-DR alleles complexed with different peptides (Figure 1a). The presence of a highly conserved *Stu*I restriction site in the β 2 region of the HLA-DR alleles, along with the introduction of a unique *Spe*I site between the linker and the DR β chain, permits the swapping of the DR allele. Moreover, as described in the previous section, the peptide can be substituted using the unique *Mlu*I and *Eco*RI restriction sites.

We performed a Western blot to ensure that the MHC class II molecules were correctly expressed with their covalently linked peptide. As shown in Figure 1b, the β chain of three affinity-purified HLA-DR1/peptide complexes (lanes 3-5) migrated at higher molecular weight as compared to the β chain of empty HLA-DR1 molecules (lane 1) or of HLA-DR1 molecules containing only the linker (lane 2). These results demonstrate that, using our expression system, we can produce soluble MHC class II complexes covalently linked to three different antigenic peptides and that the covalently linked peptide is not cleaved during the expression/purification steps.

MHC class II molecules containing a covalently linked peptide are functional

We next wanted to determine if the presence of the linker alters the peptide presentation ability of the MHC class II molecules or interferes with the TCR-pMHC interaction. We transfected two different cell lines, namely DAP-3 and HeLa cells, with the cDNA coding for the full-length HLA-DR1 molecule covalently linked to the HA₃₀₆₋₃₁₈ peptide and tested if these cells can stimulate a CD4⁺ T cell line specifically recognizing HLA-DR1/ HA₃₀₆₋₃₁₈ complexes. Figure 2 demonstrates that DAP-3 or HeLa cells expressing HLA-DR1/HA₃₀₆₋₃₁₈ complexes, but not those expressing HLA-DR1 complexes not covalently linked with the HA₃₀₆₋₃₁₈ peptide, can strongly stimulate the HA₃₀₆₋₃₁₈-specific T cell line without the addition of exogenous HA₃₀₆₋₃₁₈ peptide. In fact, addition of exogenous

peptide does not significantly increase the level of proliferation of the T cell line. Therefore, these data demonstrate that the majority of MHC class II molecules express the covalently attached peptide (i.e. that the covalent peptide is not replaced by endogenous peptides) and that the linker does not interfere with the binding of MHC/peptide complexes to the TCR. Based on these results, we hypothesized that the soluble and oligomerized form of fluorescent-labelled MHC class II/peptide complexes could stably bind TCRs and thus probe epitope-specific CD4⁺ T cells.

MHC class II tetramers stain peptide-specific T cells

The ability of the HLA class II tetramers to detect antigen-specific CD4⁺ T cells was initially tested on a Jurkat T cell clone (Clone CH7C17) expressing a TCR (HA1.7, V β 3.1) specific for the HA₃₀₆₋₃₁₈ peptide complexed with the HLA-DRB1*0101 molecule. Whereas about 90% of the CH7C17 cells were stained with the HLA-DR1/HA₃₀₆₋₃₁₈ tetramers (Figure 3a, upper panels), less than 0.5% of a Jurkat T cell line expressing an irrelevant TCR could be stained with these tetramers (Figure 3a, lower panels). Similarly, more than 50% of a HA₃₀₆₋₃₁₈-specific T cell line could be stained by the HLA-DR1/HA₃₀₆₋₃₁₈ tetramers, but not by an irrelevant tetramer, confirming the specificity of our molecules.

In the next series of experiments, we serially diluted the HA₃₀₆₋₃₁₈-specific T cell line with PBMC from the same donor to test if the frequency of specific cells detected by the tetramers correlates with the frequencies expected from the serial dilution. As shown in Figure 3b (left panels), dilution of the HA-specific T cells with PBMCs resulted in a proportional decrease in the frequency of specific cells detected by the HLA-DR1/HA₃₀₆₋₃₁₈ tetramers. Indeed, a strong correlation ($R^2 = 0.961$) was established between the theoretical frequencies deduced by the serial dilution and the actual percentages obtained by tetramer staining (Figure 3c). Background levels were normally $\leq 0.4\%$ as measured by staining with PE-coupled streptavidin only or with an irrelevant tetramer loaded with an HIV peptide (Figure 3b, right panels).

Optimization of the conditions for HLA class II tetramer staining

To determine the optimal conditions for MHC class II tetramer staining, we tested the effect of varying different parameters such as tetramer concentration, temperature and time of incubation as well as cell numbers on the capacity to detect antigen-specific T cells. We first compared the staining of a HA-specific T cell line at different concentrations of HLA-DR1/HA₃₀₆₋₃₁₈ tetramers (Figure 4a). Over the range of tetramer concentrations tested (2.5 to 120 µg/ml), we observed a dose-dependent increase in both the frequency and the fluorescence intensity of the tetramer⁺ population. However, increasing tetramer concentrations above 30 µg/ml only slightly improved the level of staining. Based on these results, we determined that tetramer concentrations between 20 to 30 µg/ml minimize potential pitfalls related to unspecific binding of the tetramers and permits the optimal detection of epitope-specific CD4⁺ T cells. We also observed that optimal labelling of a T cell line with the tetramer required 2 to 3 hours of incubation at 37°C (Figure 4b and c). Shorter incubation time or lower temperatures (4°C) leads to decreased fluorescence intensity and impairs the detection of all epitope-specific T cells. Importantly, performing the staining at 37°C did not increase the level of unspecific staining (data not shown). Finally, we compared the efficiency of HLA-DR1/HA₃₀₆₋₃₁₈ tetramer staining at different cell densities (Figure 4d). We obtained very similar staining patterns with cell density ranging from 5 to 50 x 10⁶ cells/ml (1 to 10 x 10⁵ cells/20 µl). These results demonstrate that optimal MHC class II tetramer staining is achieved by incubating T cells at a density of 5-50 x 10⁶ cells/ml with 20 to 30 µg/ml of tetramers for 2-3 hours at 37°C.

Discussion

Study of CD4⁺ T cell responses has been hampered by the lack of tools to directly identify and probe all antigen-specific CD4⁺ T cells. Most of the assays currently used to detect CD4⁺ T cells have the significant disadvantage of targeting specific cell functions such as cytokine secretion or proliferation and most likely introduce a bias in the CD4⁺ T cell subsets that can be identified. In contrast, MHC class II tetramers, because they specifically bind TCR molecules expressed at the surface of CD4⁺ T cells and do not rely on any particular cell function, have the capacity to detect all CD4⁺ T cells which are specific for a given antigen. Moreover, it circumvents the phenotypic and functional biases that can be potentially introduced by *in vitro* culture systems.

In this paper, we presented a method to efficiently produce different MHC class II/peptide complexes using a *Drosophila* cell expression system. Our expression vector is designed in a way that allows the expression of different HLA-DR alleles in combination with different antigenic peptides using a one-step cloning strategy. Using this system, we have been able to express different HLA-DR alleles (HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0401 and HLA-DRB1*0701) covalently complexed with Influenza-, CMV- and HIV-derived peptides. We showed that HLA-DR molecules expressed with a covalently attached peptide are fully functional and can be used to detect antigen-specific CD4⁺ T cells, as previously demonstrated for mouse MHC class II tetramers⁴. Moreover, given the high level of polymorphism of HLA-DR genes and the lack of identified highly prevalent alleles in the Caucasian population, the possibility of easily cloning and expressing different HLA-DR alleles constitutes an obvious advantage of our system. It is very likely that a panel of several MHC class II tetramers covering several HLA-DR alleles should allow for the assessment of the CD4 T cell response in most individuals.

We have shown that the HLA-DR1 tetramers displayed high specificity with an ability to detect epitope-specific CD4⁺ T cells from a larger number of non-specific cells. Following serial dilutions of HA1.7 T cells in allogeneic PBMC, we observed that the percentage of tetramer+ CD4⁺ T cells closely correlated with the theoretical frequency of HA1.7 T cells present in the corresponding dilutions. We also determined the optimal conditions for staining a T cell line using our MHC class II tetramers. At least 2 hours of incubation at 37°C with 20 µg/ml of tetramers are required to properly stain all reactive peptide-specific CD4⁺ T cells, in agreement with previously published data^{10;11}. Recently, Cunliffe et al.⁸ reported that only a brief 30 minutes incubation at 37°C with HLA-DR1/HA₃₀₆₋₃₁₈ tetramers was sufficient to stain a HA₃₀₆₋₃₁₈-specific T cell clone. This discrepancy can be explained by the fact that our HA₃₀₆₋₃₁₈-specific T cell line is most probably composed of different T cell clones¹² bearing TCRs having a wide range of affinities for the HLA-DR1/HA₃₀₆₋₃₁₈ tetramers, whereas the HA1.7 T cell clone used in their study expresses a single high-affinity TCR^{1;13}. Therefore, it is likely that the low-affinity clones present in our T cell line require longer time of incubation to be correctly stained by the tetramers. Supporting this hypothesis, it has been reported that T cells bearing high-affinity TCR could be stained with MHC class II tetramers independently of the incubation temperature, while low-affinity T cells absolutely require an incubation at 37°C¹⁴. Given the fact that a primary antigen-specific CD4⁺ T cell population should usually be composed of several distinct T cell clonotypes having different affinities for MHC/peptides complexes, we consider that longer time of incubation might be required to ensure optimal staining of primary T cells *ex vivo*.

Due to their multi-faceted response pattern, CD4⁺ T cells play a central role during an immune response and are also implicated in several immune-related disorders. Therefore, the development of tools that permit the direct *ex vivo* detection and characterization of these cells, such as HLA class II tetramers, will undoubtedly provide a better understanding of normal and pathological immune responses in various clinical situations in humans. Indeed, MHC class II tetramers have already

been used to study CD4⁺ T cell infiltration in autoimmune disorders such as rheumatoid arthritis and Lyme arthritis^{5;15} and CD4 T cell responses to virus including Influenza¹⁶⁻¹⁸, Epstein-Barr virus (EBV)¹⁸, Herpes simplex virus (HSV)¹⁴ and Hepatitis C virus (HCV)⁹. The ability to combine MHC class II tetramer staining with other flow cytometry-based technique such as intracellular cytokine staining could allow the phenotypic and functional characterization of antigen-specific CD4⁺ T cells and provide more insight into both normal and aberrant CD4⁺ T cell responses.

References

1. Davis, M.M., J.J. Boniface, Z. Reich, D. Lyons, J. Hampl, B. Arden, and Y. Chien. 1998. Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu. Rev. Immunol* 16:523-44.
2. Bousso, P. 2000. Generation of MHC-peptide tetramers: a new opportunity for dissecting T-cell immune responses. *Microbes and Infection* 2:425-429.
3. Altman, J.D., P.A.H. Moss, P.J.R. Goulder, D.H. Barouch, M.G. McHeyzer-Williams, J.I. Bell, A.J. McMichael, and M.M. Davis. 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274:94-96.
4. Crawford, F., H. Kozono, J. White, P. Marrack, and J. Kappler. 1998. Detection of antigen-specific T cells with multivalent soluble class II MHC covalent peptide complexes. *Immunity* 8:675-682.
5. Kotzin, B.L., M.T. Falta, F. Crawford, E.F. Rosloniec, J. Bill, P. Marrack, and J. Kappler. 2000. Use of soluble peptide-DR4 tetramers to detect synovial T cells specific for cartilage antigens in patients with rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97:291-296.
6. Novak, E.J., A.W. Liu, G.T. Nepom, and W.W. Kwok. 1999. MHC class II tetramers identify peptide-specific human CD4(+) T cells proliferating in response to influenza A antigen. *J Clin Invest* 104:R63-R67.
7. Cochran, J.R., T.O. Cameron, and L.J. Stern. 2000. The relationship of MHC-peptide binding and T cell activation probed using chemically defined MHC class II oligomers. *Immunity*. 12:241-250.
8. Cunliffe, S.L., J.R. Wyer, J.K. Sutton, M. Lucas, G. Harcourt, P. Klenerman, A.J. McMichael, and A.D. Kelleher. 2002. Optimization of peptide linker length in production of MHC class II/peptide tetrameric complexes increases

yield and stability, and allows identification of antigen-specific CD4⁺T cells in peripheral blood mononuclear cells. *Eur.J Immunol* 32:3366-3375.

9. Day,C.L., N.P.Seth, M.Lucas, H.Appel, L.Gauthier, G.M.Lauer, G.K.Robbins, Z.M.Szczepiorkowski, D.R.Casson, R.T.Chung, S.Bell, G.Harcourt, B.D.Walker, P.Klenerman, and K.W.Wucherpfennig. 2003. Ex vivo analysis of human memory CD4 T cells specific for hepatitis C virus using MHC class II tetramers. *J.Clin.Invest* 112:831-842.
10. Lemaitre,F., M.Viguiere, M.S.Cho, J.M.Fourneau, B.Maillere, P.Kourilsky, P.M.Van Endert, and L.Ferradini. 2004. Detection of low-frequency human antigen-specific CD4(+) T cells using MHC class II multimer bead sorting and immunoscope analysis. *Eur.J Immunol* 34:2941-2949.
11. Cameron,T.O., P.J.Norris, A.Patel, C.Moulon, E.S.Rosenberg, E.D.Mellins, L.R.Wedderburn, and L.J.Stern. 2002. Labeling antigen-specific CD4⁺ T cells with class II MHC oligomers. *Journal of Immunological Methods* 268:51-69.
12. Cameron,T.O., G.B.Cohen, S.A.Islam, and L.J.Stern. 2002. Examination of the highly diverse CD4(+) T-cell repertoire directed against an influenza peptide: a step towards TCR proteomics. *Immunogenetics* 54:611-620.
13. Seth,A., L.J.Stern, T.H.M.Ottenhoff, I.Engel, M.J.Owen, J.R.Lamb, R.D.Klausner, and D.C.Wiley. 1994. Binary and ternary complexes between T-cell receptor, class II MHC and superantigen *in vitro*. *Nature* 369:324-327.
14. Reichstetter,S., R.A.Ettinger, A.W.Liu, J.A.Gebe, G.T.Nepom, and W.W.Kwok. 2000. Distinct T cell interactions with HLA class II tetramers characterize a spectrum of TCR affinities in the human antigen-specific T cell response. *J.Immunol.* 165:6994-6998.
15. Meyer,A.L., C.Trollmo, F.Crawford, P.Marrack, A.C.Steere, B.T.Huber, J.Kappler, and D.A.Hafler. 2000. Direct enumeration of Borrelia-reactive

CD4 T cells ex vivo by using MHC class II tetramers. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:11433-11438.

16. Danke,N.A. and W.W.Kwok. 2003. HLA class II-restricted CD4+ T cell responses directed against influenza viral antigens postinfluenza vaccination. *J.Immunol* 171:3163-3169.
17. Lucas,M., C.L.Day, J.R.Wyer, S.L.Cunliffe, A.Loughry, A.J.McMichael, and P.Klenerman. 2004. Ex vivo phenotype and frequency of influenza virus-specific CD4 memory T cells. *J Virol.* 78:7284-7287.
18. Ye,M., S.Kasey, S.Khurana, N.T.Nguyen, S.Schubert, C.T.Nugent, K.Kuus-Reichel, and J.Hampl. 2004. MHC class II tetramers containing influenza hemagglutinin and EBV EBNA1 epitopes detect reliably specific CD4(+) T cells in healthy volunteers. *Hum.Immunol* 65:507-513.

Figure legends

Figure 1. Production of different soluble MHC class II/peptide complexes. **a.** Schematic representation of the expression vector used to express MHC class II monomers in *Drosophila* S2 cells. **b.** Detection of affinity-purified MHC class II monomers by Western blot. MHC class II molecules secreted in the supernatant of S2 cell culture were affinity-purified as described in methods and separated by 12% SDS-PAGE. Lane 1: “empty” MHC class II. Lane 2: MHC class II + linker only. Lane 3-5: MHC class II + covalently linked peptide HA₃₀₆₋₃₁₈ (lane 3), CMV pp65-1₉₋₂₃ (lane 4) and pp65-2₄₈₈₋₅₀₁ (lane 5).

Figure 2. T cell activation by APCs expressing MHC class II molecules containing a covalently linked peptide. DAP-3 and HeLa cells were transfected using Calcium Phosphate. T cells and APCs were mixed at a 1:1 ratio and incubated for 72 hours at 37°C in the presence (black bars) or not (white bars) of exogenous HA₃₀₆₋₃₁₈ peptide (1 µg/ml). [³H]-thymidine (1 µCi) was added for the last 16 hours of stimulation. Cells were harvested and [³H]-thymidine incorporation was measured using a β-plate counter (Pharmacia, LKB Biotechnology AB).

Figure 3. Detection of peptide-specific CD4⁺T cells using MHC class II tetramers. **a.** Staining of a HA₃₀₆₋₃₁₈-specific T cell clone (CH7C17, upper right panel) and a HA₃₀₆₋₃₁₈-specific T cell line (lower right panel) using HLA-DR1/HA₃₀₆₋₃₁₈ tetramers. **b.** Serial dilution of a HA₃₀₆₋₃₁₈-specific T cell line with autologous PBMCs. Numbers above each dot plot represent the dilution factor (T cell/PBMC). For all the above experiments, T cells were incubated for 3 hours at 37°C with 60 µg/ml of HLA-DR1/HA₃₀₆₋₃₁₈ tetramers. Following this incubation, cells were stained using anti-CD4-FITC for 30 minutes on ice. Cells shown in the dot plots/histograms were gated as a function of size and granularity to select for live cells. Percentages shown in each quadrant represent the percentage of gated cells in that quadrant. **c.** Correlation between the theoretical frequencies of specific cells

deduced by the serial dilution and the actual percentages obtained by tetramer staining.

Figure 4. Optimization of the conditions for MHC class II tetramer staining. **a.** HA-specific T cells were incubated for 3 hours at 37°C with the indicated concentrations of HLA-DR1/HA₃₀₆₋₃₁₈ tetramers. Following this incubation, cells were stained using anti-Vβ3-FITC and anti-CD4-PerCP for 30 minutes on ice. **b.** HA-specific T cells were incubated at 37°C for the indicated period of time with 20 µg/ml of HLA-DR1/HA₃₀₆₋₃₁₈ tetramers. **c.** HA-specific T cells were incubated for 3 hours at 4°C (left panel) or 37°C (right panel) with 20 µg/ml of HLA-DR1/HA₃₀₆₋₃₁₈ tetramers. Cells were stained and gated as described in Figure 3. **d.** HLA-DR1/HA₃₀₆₋₃₁₈ tetramer staining at different cell densities.

Acknowledgements

This work was supported by Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and CANVAC grants awarded to R.-P. Sékaly. R.-P. Sékaly holds the Canada Research chair in Human Immunology.

Contributions

G.B. performed experiments (cloning, production and purification of proteins and all FACS data), analyzed-interpreted data and prepared graphics. B.Y.D. supervised the project, designed experiments, participated in performing experiments, analyzed-interpreted data and prepared graphics. S.-A. Y. performed experiment in Figure 1b. A.R.D. wrote the manuscript. R.-P.S. supervised the project.

Figure 1

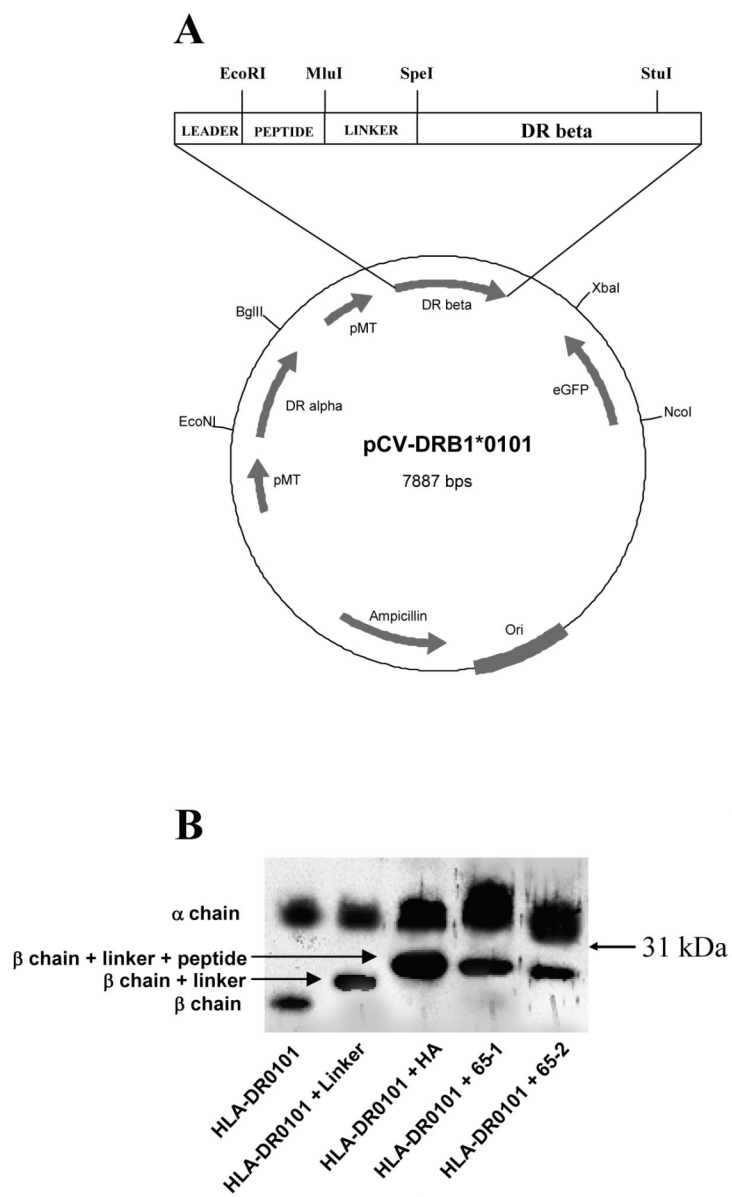


Figure 2

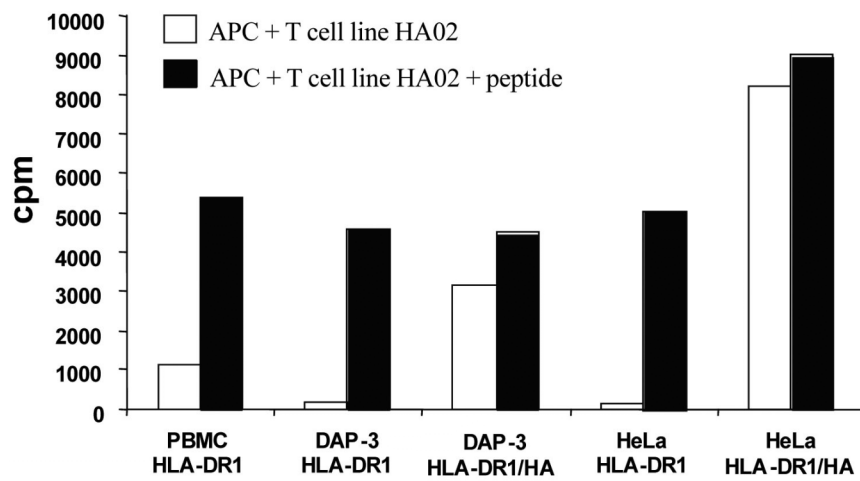


Figure 3

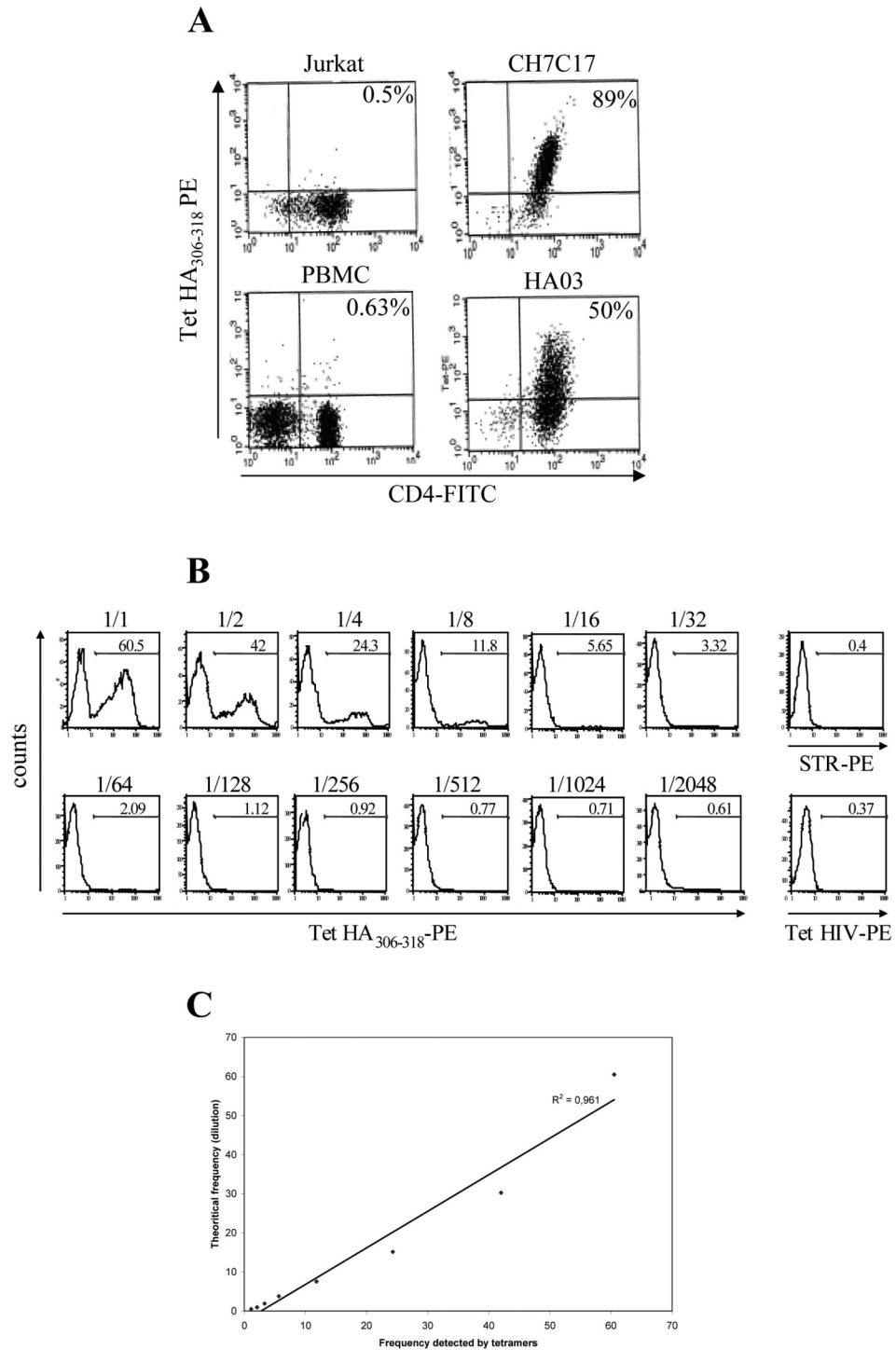
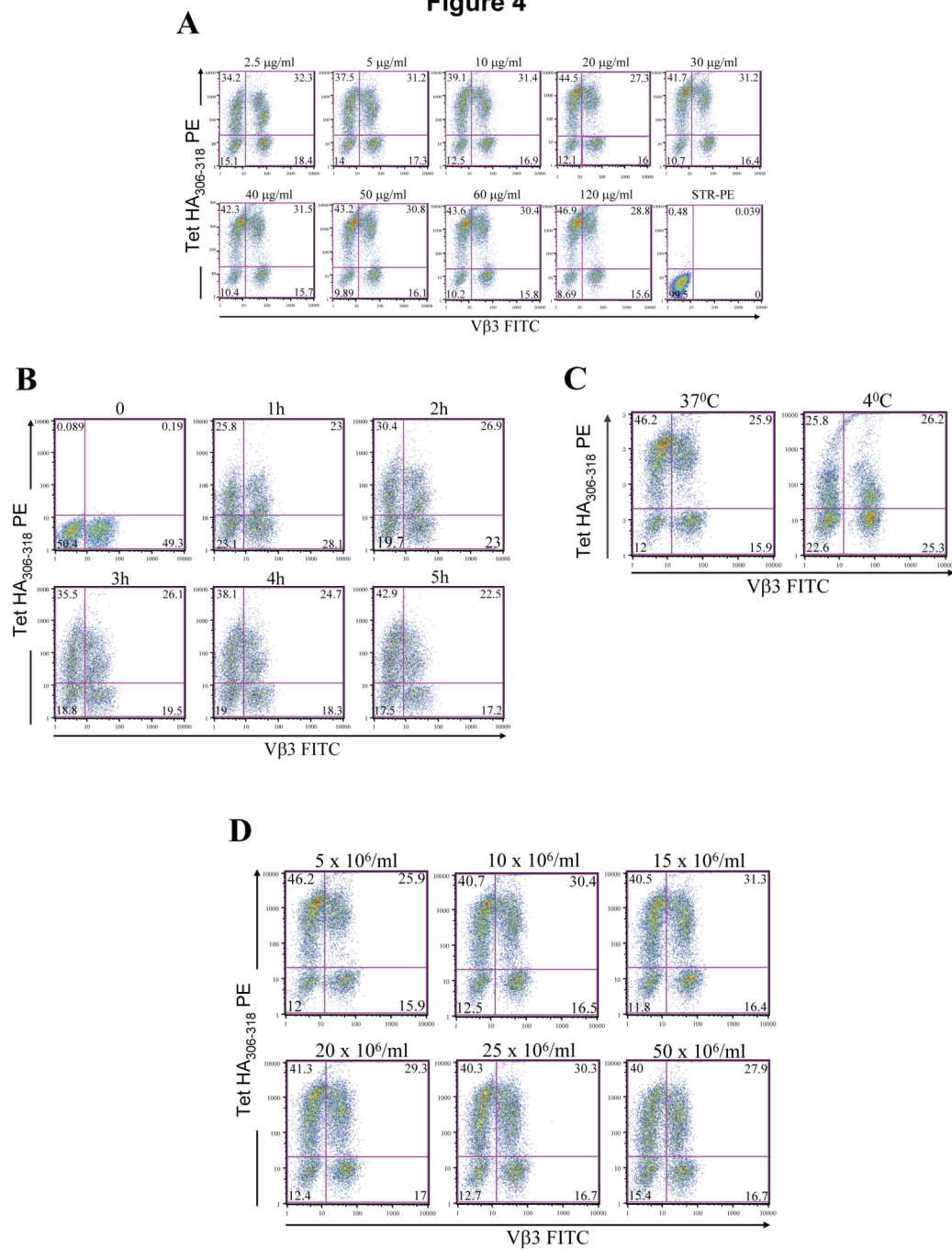


Figure 4



5. Discussion et perspectives

5.1. PD-1 : marqueur d'activation, marqueur de différenciation et marqueur d'exhaustion

Afin de mieux définir les conséquences de la surexpression de PD-1 dans l'infection par le VIH-1 et d'envisager d'inhiber la voie PD-1/PD-L1 en immunothérapie, il est important de prendre en compte les différentes facettes de PD-1.

PD-1, marqueur d'activation

PD-1 est avant tout un marqueur d'activation. En effet, PD-1 est exprimé sur les cellules T suite à l'activation du TCR et s'accumule au niveau de la synapse immunologique (Pentcheva-Hoang et al, 2007). De plus, l'expression de PD-1 est augmentée sur les cellules T CD8⁺ exprimant aussi des marqueurs d'activation « classique » comme CD38 et HLA-DR (Sauce et al, 2007). PD-1 a deux ligands connus : PD-L1 et PD-L2. PD-L1 est constitutivement exprimé par les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques, et son expression est augmentée sur ces mêmes cellules après activation (i.e. stimulation par les ligands de TLR ou interférons de type I). L'expression de PD-L2 est, quant à elle, induite sur les macrophages et les cellules dendritiques (voir revue Keir et al, 2008). L'interaction de PD-1 avec ses ligands conduit à une diminution de la fonction des cellules T que ce soit en terme de prolifération ou de production de cytokines (IFN- γ et IL-2) (Freeman et al, 2000; Latchman et al, 2001; Carter et al, 2002). En effet, l'engagement de PD-1 a pour conséquence la phosphorylation de SHP-2, une phosphatase impliquée dans la déphosphorylation des molécules de la voie de signalisation du TCR (Chemnitz et al, 2004).

Suite à l'activation de cellules naïves (T_N), le pic d'expression de PD-1 par toutes les cellules qui prolifèrent est observé après 3 ou 4 divisions cellulaires. Ces cellules retrouvent leur niveau de PD-1 initial après 7 divisions (Données non montrées). De façon intéressante, les cellules mémoires centrales (T_{CM}) expriment

des niveaux de PD-1 moins élevés que les cellules mémoires effectrices (T_{EM}) et les cellules effectrices (T_E ou T_{TD}), et surtout atteignent leur pic d'expression de PD-1 de 1 à 2 divisions plus tard que ces dernières (Données non montrées). Ces niveaux de PD-1 plus faibles doivent contribuer à la grande capacité de prolifération des T_{CM} . Autre point remarquable, les cellules T_{CD8^+} ont, après activation, des niveaux de PD-1 plus faibles que les cellules T_{CD4^+} , suggérant une régulation de l'expression de PD-1 différente sur ces deux populations (Données non montrées).

PD-1, marqueur de différenciation

Le niveau de PD-1 exprimé par les diverses sous-populations T naïve/mémoire n'est pas le même, que ce soit dans le compartiment CD4 ou CD8 (Chapitre 3, Figure supplémentaire 3). Les T_N expriment peu ou pas du tout de PD-1, ce qui peut s'expliquer par le fait qu'elles n'ont pas encore rencontré l'antigène dont elles sont spécifiques. Les T_{CM} , cellules qui sont dotées d'une grande capacité de renouvellement, expriment elles aussi peu ou pas de PD-1. Ces faibles niveaux de PD-1 exprimés sur les T_N et les T_{CM} sont probablement dus au fait que ces cellules sont maintenues en vie par stimulation avec des antigènes du soi ayant une faible affinité pour le TCR (Mahajan et al, 2005). Les cellules plus différenciées comme les cellules mémoires transitoires (T_{TM}) et les T_{EM} expriment des niveaux de PD-1 plus élevés que les T_N et les T_{CM} . Ceci est probablement la conséquence du fait que ces cellules sont stimulées par les peptides dont elles sont spécifiques et généralement de plus haute affinité pour le TCR. Pour ce qui est des cellules effectrices, il y a divergence entre les compartiments CD4 et CD8 : les cellules effectrices $CD4^+ T_{TD}$ expriment autant de PD-1 que les $CD4^+ T_{TM}$ et $CD4^+ T_{EM}$ alors que les cellules $T_{CD8^+ T_E}$ expriment moins de PD-1 que les $CD8^+ T_{TM}$ et $CD8^+ T_{EM}$ (ce qui suggère que cette population ne serait pas régulée par PD-1). Ce profil de différenciation s'observe à la fois chez les individus sains et chez les patients infectés par le VIH-1 et ce quel que soit le stade de la maladie (Chapitre 3, Figure 1c). D'autres marqueurs, comme CD28, sont aussi exprimés de façon différentielle suivant le stade de différenciation des cellules (Appay et al, 2002).

PD-1, marqueur d'exhaustion

Le rôle de PD-1 dans la dysfonction des cellules T a été montré la première fois dans le modèle d'infection chronique par LCMV (Barber et al, 2006). S'en sont alors suivies plusieurs études faites chez les patients chroniquement infectés par le VIH-1 où il a été montré que les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques du VIH-1 expriment de forts niveaux de PD-1 et que le niveau de PD-1 corrèle avec la charge virale (Day et al, 2006 ; Petrovas et al, 2006 ; Trautmann et al, 2006). Les cellules spécifiques du VIH-1 exprimant PD-1 ont un défaut de prolifération et de production de cytokines. En bloquant l'interaction de PD-1 avec son ligand PD-L1, il est possible de restaurer la fonction de ces cellules. Chose intéressante à noter, l'expression de PD-1 en tant que marqueur d'exhaustion est plus élevée chez les cellules T CD8⁺ que T CD4⁺. Finalement, il a été montré que la charge virale élevée dans les infections chroniques était la cause de la surexpression de PD-1 sur les cellules spécifiques du virus et non la conséquence (Mueller et al, 2009).

Que l'on regarde PD-1 comme marqueur d'activation ou marqueur d'exhaustion, il serait intéressant de voir quels sont les paramètres qui peuvent en moduler l'expression et avoir une incidence sur la réponse cellulaire mise en place (i.e. affinité du TCR, dose de l'antigène, niveau de différenciation). En effet, le niveau de PD-1 sur différents clones T CD4⁺ ou T CD8⁺ spécifiques du VIH-1 peut être très variable au sein d'un même individu (données non montrées). L'utilisation de tétramères de CMH de classe I et de CMH de classe II (voir chapitre 4) sera extrêmement utile et permettra de connaître le niveau de PD-1 exprimé par les cellules avant et après activation ainsi que le niveau de PD-1 en fonction de l'affinité du TCR (voir quatrième section de la discussion).

PD-1 a donc plusieurs facettes et il est très important de déterminer si l'expression de PD-1 est le reflet de l'activation ou bien de l'exhaustion - et donc de la dysfonction - des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺. Les composantes marqueur d'activation et marqueur d'exhaustion pourraient varier au cours de l'infection par

le VIH-1 et donc ne pas avoir la même incidence sur la réponse T en phase aiguë qu'en phase chronique de l'infection. Ceci sera également très important à prendre en compte au moment de considérer le blocage de la voie PD-1/PD-L1 comme traitement immunothérapeutique.

5.2. PD-1 et pathogénèse de l'infection par le VIH-1

Plusieurs groupes dont notre laboratoire ont montré que les niveaux de PD-1 étaient augmentés sur les cellules spécifiques du virus mais aussi sur les cellules T totales lors de l'infection chronique par le VIH-1, ce qui conduit à la dysfonction de ces cellules (Day et al, 2006; Trautmann et al, 2006). Afin de mieux comprendre le lien exact entre la surexpression de PD-1 et l'incapacité de contrôler l'infection par le VIH-1 en phase chronique, nous avons mesuré les niveaux de PD-1 exprimés par les sous-populations T naïve/mémoire au cours de l'infection, et ce dès la primo infection. Nous présentons donc dans le chapitre 3 une étude cross-sectionnelle dans laquelle nous avons mesuré les niveaux de PD-1 et des marqueurs d'activation/sénescence (Ki67, CD28 et CD57) exprimés par les sous-populations T CD4⁺ et T CD8⁺ naïve/mémoire du sang périphérique chez des patients en primo-infection, en phase chronique ou traités avec succès.

5.2.1. PD-1 est surexprimé sur les sous-populations T naïve/mémoire à tous les stades de l'infection par le VIH-1

Dans cette étude, nous montrons que PD-1 est exprimé sur les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ à des niveaux élevés, et ce dès la primo-infection (Chapitre 3, Figure 1c). Cette surexpression de PD-1 chez les patients infectés est observée sur toutes les sous-populations naïve/mémoire des compartiments CD4 et CD8, avec cependant une exception pour les sous-populations CD8⁺ T_{EM} et T_E. Ceci suggère que ces

deux sous-populations T CD8⁺ très différenciées, chez les individus infectés par le VIH-1, seraient régulées de façon indépendante de PD-1 (ce qui semble être le cas chez les individus sains) ou bien que toutes les cellules CD8⁺ T_{EM} et T_E exprimant de très forts niveaux de PD-1 seraient mortes par apoptose induite par PD-1 (Petrovas et al, 2006).

PD-1 étant exprimé suite à l'engagement du TCR, il est facile de comprendre que les cellules spécifiques du VIH-1 aient des hauts niveaux de PD-1. Comment expliquer que les cellules T totales, et donc non spécifiques du VIH-1, expriment aussi des forts niveaux de PD-1 lors de l'infection par le VIH-1?

Tout d'abord, certains virus latents comme CMV et EBV sont réactivés chez les patients infectés par le VIH-1 à cause de leur état immunodéprimé: plusieurs études ont d'ailleurs montré que des cellules T CD8⁺ spécifiques de CMV et de EBV avaient un profil de cellules activées chez les patients infectés par le VIH-1 (Doisne et al, 2004; Papagno et al, 2004). Il a également été montré que chez les patients chroniquement infectés par le VIH-1, les cellules T CD8⁺ spécifiques d'un virus autre que le VIH-1 surexpriment PD-1 à des niveaux comparables (EBV) voire légèrement inférieurs (CMV) aux cellules spécifiques du VIH-1 (Day et al, 2006; Trautmann et al, 2006).

Une autre hypothèse pouvant suggérer une surexpression de PD-1 de façon indépendante des antigènes viraux est la stimulation chronique du système immunitaire par les ligands de TLR, résultant en la production de cytokines pro-inflammatoires qui conduisent à une activation généralisée et à la progression de la maladie chez les individus infectés par le VIH-1. Des études menées chez la souris suggèrent que la stimulation chronique de la réponse immunitaire innée par les ligands de TLR a pour conséquence la production de cytokines pro-inflammatoires qui conduisent à une activation généralisée et à la destruction de l'architecture des organes lymphoïdes: ces mêmes observations sont faites chez les individus chroniquement infectés par le VIH-1 (Heinkenwalder et al, 2004; Baenziger et al, 2009). Des données obtenues chez le primate supportent cette hypothèse: le SIV ou un ligand du TLR7 induisent la production accrue d'interférons de type I par les

cellules dendritiques plasmacytoïdes chez le macaque Rhesus mais pas chez le singe Sooty Mangabey, l'hôte naturel du SIV et chez qui il est observé des niveaux d'activation immunitaire faibles (Mandl et al, 2008). Les ligands de TLR peuvent provenir du virus lui-même : le VIH-1 code pour plusieurs ligands des TLR7/8 qui peuvent activer *in vitro* le système immunitaire (Beignon et al, 2005; Meier et al, 2007). Mais ils peuvent également provenir de composants de la flore bactérienne commensale qui ont atteint la circulation sanguine : c'est le cas du LPS qui active le récepteur TLR4. En effet, Brenchley *et al.* ont montré que les niveaux plasmatiques de LPS sont augmentés chez les patients en phase chronique de l'infection suite à la perte d'intégrité de la barrière mucoale (Brenchley et al, 2006). Ces ligands de TLR peuvent directement activer les cellules T et ainsi entraîner la surexpression de la molécule PD-1 (Simone et al, 2009). Mais ce mécanisme peut-être indirect *via* les cellules dendritiques qui vont alors surexprimer la protéine PD-L1 et sécréter des cytokines pro-inflammatoires. Cependant, à ma connaissance, le lien entre cytokines pro-inflammatoires et expression de PD-1 sur les cellules T reste encore à faire.

PD-1 peut également être exprimé à de forts niveaux lors de la prolifération homéostatique aiguë des cellules T (Lin et al, 2007). Nous savons que l'infection par le VIH-1 cause notamment une déplétion massive des cellules T CD4⁺ et que des mécanismes homéostatiques sont mobilisés pour compenser ce déficit en cellules T. C'est une autre explication possible à la surexpression de PD-1 sur les cellules T non spécifiques du virus.

5.2.2. PD-1, un marqueur du déséquilibre homéostatique observé lors de l'infection par le VIH-1

Comme nous venons de le voir, la protéine PD-1 est surexprimée sur quasi toutes les sous-populations de cellules T lors de l'infection par le VIH-1. C'est donc naturellement que nous nous sommes demandé quelle était la conséquence de cette surexpression de PD-1 sur la répartition des cellules naïve/mémoire dans les compartiments CD4 et CD8.

La phase initiale et la phase chronique de l'infection par le VIH-1 sont associées à une distribution anormale des sous-populations de cellules T CD4⁺ et T CD8⁺

Afin de caractériser le possible déséquilibre dans l'homéostasie des cellules T lors de l'infection par le VIH-1, nous avons regardé la distribution des sous-populations T CD4⁺ et T CD8⁺ dans le sang et ce aux différents stades de la maladie (Chapitre 3, Figure 1b).

Dans le *compartiment CD4*, la primo-infection est caractérisée par une augmentation du pourcentage de cellules T_{EM} dans le sang : le système immunitaire, en réponse à l'infection, produit des cellules effectrices. Lors de la phase chronique, les cellules T_{CM} sont sous représentées alors que les cellules T_{EM} sont plus fréquentes. Ce déséquilibre reflète le niveau d'hyperactivation du système immunitaire observé en phase chronique et son ampleur a valeur de pronostic pour la progression de la maladie (Potter et al, 2007). Il est important de noter que, aussi bien lors du début qu'à un stade plus avancé de l'infection, les cellules CD4⁺ T_{TD} sont moins fréquentes que chez un individu sain : ces cellules, ayant un phénotype très différencié, sont probablement plus susceptibles à l'infection et disparaissent par effet cytopathique du virus.

Dans le *compartiment CD8*, les cellules T_N et T_{CM} diminuent en fréquence au profit des cellules T_{EM} dotées de capacités cytotoxiques, et ce, que ce soit en primo infection ou lors de la phase chronique de l'infection. Lors du début de l'infection, nous observons une expansion spectaculaire du pourcentage de cellules T_{TM} qui sont hautement polyfonctionnelles et qui doivent donc participer en grande majorité à la diminution de la charge virale constatée en primo-infection.

En conclusion, nous avons montré que l'infection par le VIH-1 conduisait à un déséquilibre dans l'homéostasie des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺, cette répartition anormale des sous-populations T variant au cours de la maladie et n'étant pas la même dans les compartiments CD4 et CD8.

PD-1 et homéostasie des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺

L'homéostasie des cellules du système immunitaire est assurée par l'équilibre entre la production de nouvelles cellules par les organes lymphoïdes primaires i.e. la moelle osseuse et le thymus, et la prolifération et la mort de ces cellules en périphérie, notamment au niveau de la rate et des ganglions lymphatiques. Dans l'infection par le VIH-1, l'homéostasie des cellules T est affectée (Douek et al, 2003a; Douek et al, 2003b; Munier et al, 2007). Mis à part la déplétion massive des cellules T CD4⁺ matures par effet cytopathique du virus et par effet cytolytique des cellules T CD8⁺, plusieurs autres mécanismes ont été proposés pour expliquer les perturbations liées au VIH-1 dans le compartiment T. La production *de novo* de cellules naïves est diminuée et ce à cause de la diminution de la fonction thymique, les thymocytes ayant une capacité réduite de proliférer (Douek et al, 1998; Dion et al, 2004). L'activation chronique du système immunitaire pousse au recrutement constant de cellules T du compartiment naïf et central mémoire vers le compartiment effecteur (Okoye et al, 2007). Les cellules mémoires, plus particulièrement les cellules T_{CM}, ont un niveau de CD127 réduit qui affecte leur capacité d'auto renouvellement (Rethi et al, 2005; Paiardini et al, 2005). Finalement, la survie des cellules T mémoires est également touchée car ces cellules ont des niveaux du facteur de transcription FOXO3a sous sa forme phosphorylée diminués ce qui les rend plus susceptibles à l'apoptose (van Grevenynghe et al, 2008). Toutes ces perturbations, qui sont loin d'être exhaustives, participent à la dérégulation de l'homéostasie des cellules T et donc à la progression de la maladie.

Lors de l'infection par le VIH-1, la surexpression de la protéine PD-1 sur toutes les sous-populations T naïve/mémoire peut avoir des conséquences sur leur fonction effectrice, comme il a été montré dans de nombreuses publications, mais aussi sur l'homéostasie de ces mêmes cellules. Voici quelques mécanismes qui pourraient expliquer un rôle de PD-1 dans l'homéostasie des cellules T.

PD-1 et apoptose

PD-1 a tout d'abord été décrit comme étant associé à une plus grande susceptibilité à l'apoptose des cellules T (Ishida et al, 1992). En conséquence, les cellules qui expriment des forts niveaux de PD-1, c'est-à-dire les cellules les plus différenciées (i.e. CD4⁺ et CD8⁺ T_{TM}, CD4⁺ et CD8⁺ T_{EM} et CD4⁺ T_{TD}), doivent être plus susceptibles à l'apoptose médiée par PD-1 que les cellules qui expriment moins de PD-1 (i.e. CD4⁺ et CD8⁺ T_N et CD4⁺ et CD8⁺ T_{CM}). Dans le contexte de l'infection par le VIH-1, toutes les sous-populations, et donc a fortiori les cellules les plus différenciées, surexpriment la molécule PD-1. Le niveau de PD-1 exprimé par les différentes sous-populations va donc déterminer leur capacité à survivre et avoir un impact sur la répartition cellulaire au sein des compartiments CD4 et CD8. Petrovas *et al.* ont montré que les cellules T CD8⁺ chez les personnes infectées par le VIH-1 expriment des hauts niveaux de PD-1 et sont plus sensibles à l'apoptose médiée par PD-1. Cette sensibilité varie suivant le niveau de différenciation des cellules T, les cellules T_{CM} étant moins susceptibles que les cellules T_{EM} (Petrovas et al, 2006). La même équipe a également montré que les cellules surexprimant PD-1 avaient un phénotype dit pro-apoptotique avec des niveaux d'expression de Bcl-2 et de CD127 faibles et des hauts niveaux d'expression de Fas (Petrovas et al, 2009). Comme déjà mentionné, les cellules CD8⁺ T_{EM} et T_E chez les patients infectés n'expriment pas significativement plus de PD-1 que chez les individus sains. Ceci suggère que ces deux sous-populations T CD8⁺ très différenciées sont régulées de façon indépendante de PD-1 ou bien que toutes les cellules CD8⁺ T_{EM} et T_E exprimant de très forts niveaux de PD-1 ont disparu par apoptose et ne sont donc plus détectables.

PD-1 et prolifération homéostatique

La prolifération homéostatique des cellules T en périphérie est notamment assurée par des cytokines comme l'IL-7 et l'IL-15. Le groupe de Fauci a montré *in vitro* que ces cytokines induisaient l'expression de PD-1 sur les cellules T ainsi que l'expression de PD-L1 et PD-L2 sur les monocytes/macrophages (Kinter et al, 2008). Ils ont fait les mêmes observations chez des individus infectés par le VIH-1

et recevant de l'IL-2 en immunothérapie. L'expression de PD-1 et de ses ligands n'empêche pas les cellules T de répondre à une stimulation subséquente par ces mêmes cytokines - stimulation qui induit phosphorylation de STAT5, prolifération et survie - mais inhibe toute activation *via* le TCR. Ces résultats s'inscrivent parfaitement dans les études montrant que (1) PD-1 inhibe la fonction des cellules T *via* le TCR et le recrutement de phosphatases comme SHP-1 et SHP-2 et que (2) le TCR et PD-1 doivent être temporellement et spatialement à proximité pour qu'il y ait un effet inhibiteur de PD-1 (Chemnitz et al, 2004; Pentcheva-Hoang et al, 2007).

À contrario, lors de la surexpression de PD-1 suite à la stimulation chronique de la réponse immunitaire innée par les ligands de TLR ou de la réponse immunitaire cellulaire par les antigènes viraux, il serait intéressant de savoir si la réponse aux cytokines impliquées dans la prolifération homéostatique est altérée ou pas. Un défaut de réponse à l'IL-7 ou à l'IL-15 pourrait directement affecter la prolifération homéostatique et la survie des cellules T.

Nous savons également que dans l'infection par le VIH-1, les cellules T perdent l'expression du récepteur à l'IL-7: c'est particulièrement le cas des cellules T_{CM} (Rethi et al, 2005; Paiardini et al, 2005; Koesters et al, 2006; Mercier et al, 2008). Il est important de rappeler que le nombre de T_{CM} est inversement corrélé à la progression de la maladie (Potter et al, 2007). Donc la survie et la prolifération de ces cellules va avoir un impact direct sur la reconstitution des compartiments T CD4 et CD8. Le niveau d'expression de CD127 sur les cellules T est inversement corrélé avec le niveau d'activation immunitaire (Koesters et al, 2006). Les mécanismes régulant l'expression de CD127 sont très peu connus et donc le lien entre CD127 et activation immunitaire reste à élucider. Des études complémentaires seraient requises pour comprendre si la diminution de l'expression de CD127 et la surexpression de PD-1 sont liées par une même voie de régulation ou si ce sont simplement des événements qui coïncident car ils ont la même cause, c'est-à-dire une stimulation antigénique chronique.

PD-1 et activation des cellules T naïves

Les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ naïves chez les patients infectés par le VIH-1 expriment des forts niveaux de PD-1, et ce dès la primo infection. Par ailleurs, les niveaux d'expression de PD-1 sur les cellules naïves chez les patients chroniquement infectés sont plus élevés que chez les individus nouvellement infectés (Chapitre 3, Figure 1c). Il serait intéressant de savoir si les cellules naïves surexpriment PD-1 alors qu'elles sont en périphérie ou si elles sortent du thymus en exprimant déjà des hauts niveaux de PD-1 (i.e. il faudrait mesurer les niveaux de PD-1 sur les cellules CD31⁺ dans le sang). De plus, notre laboratoire a montré que les thymocytes ont un défaut de prolifération : ce défaut est-il lié à l'expression de PD-1 par les thymocytes (Dion et al, 2004)?

La surexpression de PD-1 est principalement le résultat de l'engagement du TCR avec le complexe CMH/peptide. Cependant, les cellules naïves n'ont jamais rencontré l'antigène dont elles sont spécifiques. Ceci suggère donc que des mécanismes autres que les antigènes viraux sont responsables de la surexpression de PD-1 par les cellules T naïves chez les individus infectés par le VIH-1 (voir section précédente).

Quelles sont les conséquences de cette surexpression de PD-1 par les cellules T naïves? Tout d'abord, la prolifération homéostatique et la survie en périphérie des cellules naïves pourraient être altérées par l'expression de PD-1 par des mécanismes allant d'un défaut de réponse aux cytokines à la diminution de l'expression des récepteurs aux dites cytokines. PD-1 exprimé sur les cellules naïves pourrait également avoir des conséquences sur l'activation initiale de ces cellules. En effet, les cellules dendritiques sont les seules cellules présentatrices d'antigènes capables d'activer les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ naïves. Les cellules dendritiques expriment les deux ligands connus de PD-1 : PD-L1 et PD-L2. PD-L1 est constitutivement exprimé par les cellules dendritiques et est surexprimé après activation avec, par exemple, les ligands de TLR ou des cytokines pro-inflammatoires. L'expression de PD-L2 est induite sur les cellules dendritiques par ces mêmes stimuli. Dans l'infection par le VIH-1, Trabattoni *et al.* ont montré que PD-L1 était surexprimé sur les monocytes des patients infectés par le VIH-1 et

qu'il y avait une corrélation directe observée entre le niveau d'expression de PD-L1 et les niveaux de virus plasmatiques (Trabattoni et al, 2003). Il a également été montré que l'expression de PD-L1 était significativement augmentée sur les patients progressseurs et les patients au stade SIDA, mais que ces niveaux étaient maintenus à des niveaux relativement faibles chez les patients LTNPs (Wang et al, 2008). Jusqu'à présent il n'y a pas de données évaluant les niveaux de PD-L2 chez les patients infectés par le VIH-1. Il serait donc intéressant de voir si l'activation initiale des cellules T naïves par les cellules dendritiques est inhibée par PD-1, et si en bloquant la voie PD-1/PD-L1 cette activation est restaurée.

En conclusion, la surexpression de PD-1 par les cellules T naïves pourrait avoir un impact à la fois sur l'homéostasie de ces cellules mais aussi sur leur activation initiale. Ceci pourrait avoir des conséquences multiples allant de la qualité de la réponse mémoire générée, de la diversité du répertoire T à l'impossibilité de générer de nouvelles réponses dans le cadre d'une vaccination thérapeutique.

5.2.3. PD-1 et hyperactivation au cours de l'infection par le VIH-1

L'activation chronique des cellules T est une caractéristique de l'infection par le VIH-1 et joue un rôle important dans la progression de la maladie, le niveau d'hyperactivation constituant par ailleurs un meilleur indice de la progression de la maladie que le niveau de la charge virale (Giorgi et al, 1999; Leng et al, 2001; Sousa et al, 2002; Hazenberg et al, 2003; Koning et al, 2005).

Cet état d'hyperactivation des cellules du système immunitaire lors de l'infection par le VIH-1 se manifeste entre autres par (1) un taux de renouvellement des cellules élevé comme montré par le nombre de cellules Ki67⁺ (Liu et al, 1997; Giorgi et al, 1999; Cohen Stuart et al, 2000; Sousa et al, 2002; Hazenberg et al, 2003) ainsi que (2) l'accumulation de cellules T hautement différenciées qui ont perdu l'expression de CD28 et gagné l'expression de CD57 (Appay et al, 2002; Papagno et al, 2004; Palmer et al, 2005).

Nous nous sommes naturellement demandé si PD-1 avait un lien de cause à effet avec ce phénotype de cellules hyperactivées dans l'infection par le VIH-1.

PD-1 et statut hautement différencié des cellules T

Nos données montrent que les individus infectés par le VIH-1, que ce soit au début ou à un stade plus avancé de la maladie, subissent une différenciation progressive de leurs cellules T vers un phénotype hautement différencié (i.e. CD57⁺ et CD28⁻). C'est valable pour toutes les sous-populations T CD4⁺ et T CD8⁺ mis à part les cellules naïves (Chapitre 3, Figure 3 et Figure 4). Rappelons qu'un nombre élevé de cellules CD57⁺ ou de cellules CD28⁻ a été associé avec la progression de l'infection par le VIH-1 (Gamberg et al, 2004; Papagno et al, 2004).

Les cellules T expriment CD57 et perdent l'expression de CD28 alors qu'elles n'ont même pas encore atteint un stade très différencié (i.e. T_{CM} et T_{TM}). Les cellules T CD57⁺ étant des cellules vouées à mourir, nos données montrent que la déplétion des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ se passe au niveau de toutes les sous-populations et non pas seulement au niveau des sous-populations les plus différenciées (i.e T_E et T_{TD}). De plus, la perte d'expression de CD28 à la surface des cellules T doit jouer un rôle dans la dysfonction des cellules dans l'infection par le VIH-1 : en effet la perte de CD28 induit un défaut de prolifération cellulaire et une incapacité à produire de L'IL-2. De façon remarquable, l'expression de PD-1 ne corrèle ni avec un pourcentage plus élevé de cellules T CD57⁺ ni avec un pourcentage de cellules T CD28⁻ plus élevé, et ce pour toutes les sous-populations des compartiments CD4 et CD8. La surexpression de PD-1 et la perte/gain d'expression de CD28⁻/CD57⁺ semblent n'être pas régulés par une même voie de signalisation mais sont des événements qui coïncident car ils répondent à la même cause qui est la stimulation chronique par le virus ou l'état généralisé d'hyperactivation immunitaire.

PD-1 et taux de renouvellement des cellules T

Nous avons mesuré la capacité proliférative des cellules T *in vivo* en utilisant le marqueur Ki67 pour identifier les cellules qui prolifèrent. Tous les patients infectés par le VIH-1 (i.e. primo infection et infection chronique) montrent des pourcentages de cellules Ki67⁺ nettement plus élevés que les donneurs sains, et ce sur toutes les sous-populations CD4 et CD8 (Chapitre 3, Figure 2). Dans le

compartiment CD4, le pourcentage de cellules Ki67⁺ dans toutes les sous-populations naïve/mémoire est similaire chez les patients en primo infection et les patients chroniquement infectés. À l'inverse, dans le compartiment CD8, il y a une fréquence beaucoup plus élevée de cellules Ki67⁺ chez les patients nouvellement infectés que chez les patients en phase chronique. Ceci doit correspondre à l'expansion massive de cellules T CD8⁺ observée dans toute infection aiguë. Pour évaluer l'impact de PD-1 sur la capacité proliférative *in vivo* des cellules T, nous avons regardé si le niveau de PD-1 corrélait avec le pourcentage de cellules Ki67⁺. Ces deux paramètres ne corrélaient ni dans le compartiment CD4 ni dans le compartiment CD8 (Chapitre 3, Figure 2c). Mais, fait intéressant, nous constatons que dans le compartiment CD8 les individus en primo infection ne ségrégent pas au même endroit que les individus chroniquement infectés. Ceci laisse penser que PD-1 n'a pas la même signification suivant le stade de la maladie i.e. PD-1 marqueur d'activation en primo infection et PD-1 marqueur d'exhaustion en phase chronique (Voir également paragraphe 5.2.4). Ça serait bien sûr à vérifier en faisant des tests fonctionnels sur chacun des deux groupes. Ce n'est par contre pas le cas dans le compartiment CD4, mais ça peut peut-être s'expliquer par le fait que dans les sous-populations CD4 il faut prendre en compte le paramètre déplétion massive des cellules.

5.2.4. PD-1 et la transition de la phase aiguë à la phase chronique de l'infection par le VIH-1

Comme déjà mentionné, PD-1 doit être vu comme un régulateur négatif de l'activation des cellules T, mais aussi comme un médiateur de l'exhaustion de ces mêmes cellules lors d'une exposition chronique à l'antigène comme dans l'infection par le VIH-1. Nous nous sommes donc demandé si la surexpression de PD-1 sur les cellules T avait la même signification lors de la phase aiguë de l'infection par le VIH-1 que lors de la phase chronique.

PD-1 et la perte de fonction des cellules T CD8⁺ durant la transition vers la phase chronique de l'infection

Importance de la réponse T CD8⁺ au cours de l'infection

La phase aiguë de l'infection par le VIH-1 est associée à une production élevée de virus ainsi qu'à une chute dramatique du nombre de cellules T CD4⁺ et une forte expansion des cellules T CD8⁺ dans le sang (Kaufmann et al, 1998b). Plusieurs hypothèses sont émises pour expliquer le contrôle de la charge virale après le pic de virémie. Certains modèles mathématiques suggèrent que la destruction massive des cellules T CD4⁺ au niveau du GALT et des ganglions lymphatiques - les sites principaux de la réplication virale - limite le nombre de cellules permissives supportant la réplication du virus (Phillips, 1996; Davenport et al, 2007; Petravac et al, 2008). Une deuxième hypothèse, non exclusive, est que la réponse T CD8⁺ cytotoxique permet la diminution de la charge virale après le pic de virémie et ainsi l'entrée en phase chronique de l'infection. Plusieurs études soulignent l'importance de la réponse T CD8⁺ spécifique du VIH-1 dans le contrôle du pic de la virémie. Il y a tout d'abord une coïncidence temporelle entre l'apparition de la réponse T CD8⁺ et la diminution de la charge virale : la réponse T CD8⁺ apparaît dans le sang juste avant le pic de virémie, subit une forte expansion suivie d'une importante contraction alors que la charge virale diminue (Borrow et al, 1994; Koup et al, 1994; Wilson et al, 2000). La réponse T CD8⁺ est détectable avant la séroconversion (i.e. l'apparition d'anticorps dirigés contre les protéines virales) mais aussi bien avant l'apparition d'anticorps neutralisants (Huber et al, 2007). L'association de certains allèles HLA avec une valeur seuil de la charge virale basse et une progression plus lente de la maladie sont aussi en faveur d'un rôle certain de la réponse T CD8⁺ dans le contrôle du pic de la virémie (Carrington et al, 2003). L'apparition de nombreuses mutations virales dans des épitopes CD8 démontre l'existence d'une pression de sélection exercée par la réponse T CD8⁺ (Borrow et al, 1997; Goulder et al, 1997; Price et al, 1997). Et finalement, la réduction du pic de la virémie chez le macaque Rhésus infecté par le SIV nécessite la présence de la réponse T CD8⁺ (Schmitz et al, 1999).

Durant la *phase chronique* de l'infection, une stabilisation de la charge virale est observée pendant plusieurs années : le virus se réplique sensiblement à la même vitesse que celle à laquelle il est éliminé par la réponse T CD8⁺ (Benito et al, 2004). De nombreuses études mettent en avant le rôle protecteur de la réponse T CD8⁺ spécifique du VIH-1 en phase chronique de l'infection. Les patients LTNP ont une réponse T CD8⁺ importante et composée de cellules cytotoxiques qui ont une grande capacité de prolifération et qui sécrètent de l'interleukine 2 (IL-2) (Betts et al, 2006). Des réponses T CD8⁺ ont été détectées chez des individus exposés fréquemment au virus, mais qui restent non infectés (Kaul et al, 2004; Makedonas et al, 2005; Alimonti et al, 2006). De plus, la déplétion des lymphocytes T CD8⁺ chez le macaque Rhésus infecté par le SIV est associée à une perte du contrôle de la charge virale et à une progression fulgurante de la maladie (Schmitz et al, 1999). Cependant, bien que les patients infectés par le VIH-1 aient une réponse T cytotoxique, ils finissent ultimement par ne plus contrôler la charge virale et ainsi développer les premiers symptômes associés à une immunodépression. Ces dernières années, de nombreuses études ont caractérisé la réponse T CD8⁺ chez les patients chroniquement infectés : ces cellules ont notamment un phénotype de cellules « épuisées » qui présentent un défaut de production de cytokines (Zimmerli et al, 2005; Betts et al, 2006) et de survie (Mueller et al, 2001). Un des mécanismes proposés pour expliquer cette dysfonction est la surexpression de PD-1 par les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du VIH-1 (Day et al, 2006; Petrovas et al, 2006; Trautmann et al, 2006).

En conclusion, toutes ces études démontrent que les lymphocytes T CD8⁺ sont essentiels pour une immunité effective contre le VIH-1, et ce à tous les stades de la maladie.

PD-1 et la réponse T CD8⁺ au cours de l'infection

Notre travail montre que les lymphocytes T CD8⁺ expriment des niveaux de PD-1 significativement plus élevés chez les patients infectés par le VIH-1 que chez les donneurs sains, et ce, que ce soit en phase aiguë ou en phase chronique de l'infection (sachant tout de même que les patients chroniquement infectés

expriment significativement plus de PD-1 que les patients récemment infectés) (Chapitre 3, Figure 1c). La question soulevée par cette observation est : est-ce que les niveaux élevés de PD-1 observés en primo infection ont les mêmes conséquences biologiques qu'en infection chronique?

Afin de différencier PD-1 « marqueur d'activation » et PD-1 « marqueur d'exhaustion », nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux cellules Ki67⁺, Ki67 étant un facteur nucléaire - surexprimé lors de toutes les phases du cycle cellulaire à l'exception de la phase G₀ - qui identifie les cellules qui prolifèrent (Gerdes et al, 1984; Schwarting et al, 1986). Tout d'abord, les cellules T CD8⁺ exprimant Ki67 sont en fréquence beaucoup plus élevées en phase aiguë qu'en phase chronique de l'infection (Chapitre 3, Figure 2b): le pourcentage significativement plus élevé de cellules Ki67⁺ en primo infection reflète très certainement l'expansion massive des cellules T CD8⁺ qui suit l'explosion de la charge virale au début de l'infection (Borrow et al, 1994; Koup et al, 1994; Wilson et al, 2000). De plus, les niveaux de PD-1 sur les cellules T CD8⁺ Ki67⁺ sont similaires, voire inférieurs, à ceux des cellules T CD8⁺ Ki67⁻ chez les donneurs sains et les patients en primo infection (Chapitre 3, Figure 2e). À l'inverse, les niveaux de PD-1 sur les cellules T CD8⁺ Ki67⁺ sont plus élevés que sur les cellules T CD8⁺ Ki67⁻ chez les patients chroniquement infectés. Ces niveaux élevés de PD-1 sur les cellules T CD8⁺ Ki67⁺ des patients virémiques suggèrent une perte de fonction de ces cellules liée à PD-1 et donc une diminution de leur capacité proliférative *in vivo*. Ce défaut de prolifération des cellules T CD8⁺ doit donc expliquer en partie la diminution du pourcentage de cellules T CD8⁺ Ki67⁺ observé lors de la transition vers la phase chronique de l'infection. Il convient tout de même de ne pas oublier que la diminution de la charge virale et la répartition cellulaire modifiée entre la phase aiguë et la phase chronique de l'infection doivent aussi contribuer à cette diminution du pourcentage de cellules T CD8⁺ qui prolifèrent.

En conclusion, des hauts niveaux d'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD8⁺ chez les patients virémiques suggèrent une perte de fonction de ces cellules en réduisant notamment leur capacité de prolifération. À l'inverse, des niveaux de

PD-1 plus faibles - mais tout de même significativement plus élevés que chez les donneurs sains - semblent préserver la fonction des cellules T CD8⁺ en primo infection. Des études fonctionnelles sur les cellules T CD8⁺ au cours de l'infection devront être conduites pour vérifier cette hypothèse. Notons également que la surexpression de PD-1 semble ne pas avoir la même signification biologique au cours de l'infection : différencier les deux facettes de PD-1 (i.e. marqueur d'activation et marqueur d'exhaustion) au cours de l'infection influera sur le potentiel thérapeutique de bloquer la voie PD-1/PD-L1.

PD-1 et le défaut d'activation des cellules naïves durant la transition de la phase aiguë à la phase chronique de la maladie

Activation des cellules naïves au cours de l'infection

Pendant les quelques semaines que comptent la primo infection, un nombre croissant de cellules T CD8⁺ dirigées contre le virus émergent et coïncident avec le contrôle de la réplication virale et la résolution des symptômes associés à la primo infection (Borrow et al, 1994; Koup et al, 1994; Pantaleo et al, 1994). Des cellules T CD4⁺ spécifiques du virus sont également détectées (Harari et al, 2002, 2005a). Il est donc clair que les cellules naïves peuvent être activées lors de la primo infection. En phase chronique de l'infection, nous avons certaines évidences qu'il est encore possible d'activer des cellules naïves. Tout d'abord, dans le cadre de vaccination thérapeutique chez les patients infectés par le VIH-1, il a été montré qu'il était possible d'activer de nouvelles réponses T *in vivo* (Lu et al, 2004; Klooverpris et al, 2009). Il est également possible de voir l'apparition de réponses contre des mutants d'échappement du virus et des réponses contre des épitopes qui restent invariants (Allen et al, 2005; Goonetilleke et al, 2009).

PD-1 et activation des cellules naïves au cours de l'infection

Lors de la transition de la primo-infection à la phase chronique, il y a en fréquence une accumulation des cellules T_N dans les compartiments CD4 et CD8; notons tout de même que les patients infectés ont toujours moins de cellules naïves que les

donneurs sains et ce que ce soit en primo infection ou en phase chronique. Cette accumulation de cellules T_N chez les patients chroniquement infectés par rapport aux patients en primo infection laisse penser qu'il devient difficile d'activer ces cellules. La fonction thymique étant réduite chez les patients chroniquement infectés, cette augmentation en fréquence de cellules T_N ne peut pas être due à une augmentation de leur production (Douek et al, 2001; Hatzakis et al, 2001). Or le niveau de PD-1 est très nettement augmenté sur les naïves des compartiments CD4 et CD8 des patients virémiques, non seulement par rapport aux individus sains mais aussi par rapport aux patients en début d'infection. L'hypothèse qui découle de ces observations est qu'avec la progression de la maladie, les cellules T_N expriment des hauts niveaux de PD-1 et deviennent plus difficilement activables. De plus, sachant que le virus mute sous la pression de sélection exercée par les cellules $T CD8^+$, dès la primo infection (Borrow et al, 1997; Liu et al, 2006) mais aussi au cours de la phase chronique de la maladie (Koup et al, 1994; Allen et al, 2005; Jones et al, 2004), il y a plus de variants du virus en phase chronique qu'en début d'infection. Nos données suggèrent donc qu'en phase chronique de l'infection, le répertoire T est moins large puisqu'il est plus difficile d'activer de nouvelles réponses et cela pour un panel de virus plus divers à contrôler. Ce phénomène pourrait participer à la lente perte de contrôle de l'infection en phase chronique et donc à la progression de la maladie. Il serait intéressant de voir si dans le cadre d'un traitement immunothérapeutique où la voie PD-1/PD-L1 est bloquée, le répertoire T devient plus large.

PD-1 et le défaut d'expansion des cellules $T CD8^+$ mémoires transitoires durant la transition de la phase aiguë à la phase chronique de la maladie

Nous avons observé une expansion massive des cellules $CD8^+ T_{TM}$ en primo infection. Sachant que les cellules T_{TM} sont des cellules polyfonctionnelles douée d'une grande capacité de prolifération (données non montrées), elles doivent jouer un rôle important dans le contrôle de la virémie observé en début d'infection. Est-ce que ces cellules jouent un rôle direct dans la lyse des cellules infectées ou est-ce

qu'elles servent de boucle d'amplification pour produire des cellules effectrices reste à déterminer. En remarque, une telle expansion massive des cellules T_{TM} n'est pas observée dans le compartiment CD4 des patients en primo infection. La question qui découle de cette observation est : est-ce qu'il n'y a pas d'expansion des $CD4^+ T_{TM}$ ou est-ce que ces cellules sont la cible préférentielle du virus - elles expriment des hauts niveaux de CCR5 - et sont donc massivement lysées. À l'inverse, en phase chronique de l'infection, il n'y a pas d'expansion massive des cellules $CD8^+ T_{TM}$. Les niveaux de PD-1 sur cette sous-population sont supérieurs à la norme à la fois en primo infection et en phase chronique. Par contre, les niveaux de PD-1 sur les cellules $CD8^+ T_{TM}$ sont très nettement supérieurs chez les individus virémiques par rapport aux individus en primo infection. Notre hypothèse est donc que la perte de contrôle de l'infection lors de la transition vers la phase chronique de l'infection est due, entre autres, à la perte de fonction des cellules $CD8^+ T_{TM}$ médiée par PD-1.

5.2.5. Reconstitution immunitaire après traitement antiviral dans l'infection par le VIH-1

Les patients traités avec succès retrouvent une distribution normale des sous-populations naïve/mémoire dans le compartiment CD4 mais pas dans le compartiment CD8 où la sous représentation des cellules T_{CM} en faveur des cellules T_{EM} persiste. La plupart des sous-populations T_{CD4^+} et T_{CD8^+} retrouvent des niveaux de PD-1 similaires à ceux observés chez les donneurs sains; à l'exception, par exemple, des cellules $CD8^+ T_{CM}$ qui expriment toujours des hauts niveaux de PD-1, ce qui peut peut-être expliquer pourquoi cette sous-populations ne retrouvent pas une fréquence normale chez les individus sous traitement antiviral. La fréquence des cellules ayant un statut hautement différencié (i.e. $CD28^-$ ou $CD57^+$) diminuent avec le traitement, mais persiste dans certaines sous-populations T_{CD8^+} . Les individus traités ont un taux de renouvellement de leurs cellules T_{CD4^+} et T_{CD8^+} significativement plus élevé que chez les donneurs sains, même si ça reste un phénomène moins important que

chez les individus infectés. Ceci est le plus probablement dû au fait qu'il y a une prolifération des cellules T pour retrouver des comptes normaux après la déplétion massive des cellules (c'est d'ailleurs surtout le cas dans le compartiment CD4). En conclusion, les traitements antiviraux semblent restaurer de façon partielle le compartiment CD8 mais de façon quasi totale le compartiment CD4. Cette différence entre les deux compartiments s'explique peut-être par le fait que le compartiment CD4, ayant été massivement déplété, sera majoritairement renouvelé.

5.2.6. Modèle hypothétique de l'immunopathogénèse du VIH-1

D'après les données obtenues dans notre étude, voici un modèle hypothétique de l'immunopathogénèse du VIH-1 qui intègre trois composantes très importantes que sont la déplétion massive des cellules T CD4⁺, l'activation chronique du système immunitaire et l'exhaustion de la réponse cellulaire T, et ce au cours de l'infection (Figure 2).

La primo infection (Figure 2a)

Dans les premières heures suivant une contamination par transmission sexuelle, le VIH-1 infecte les cellules T CD4⁺ situées au niveau des muqueuses vaginale/rectale. Le VIH-1, utilisant préférentiellement la protéine CCR5 comme co-récepteur, infecte les cellules T effectrices mémoires CCR5⁺ qui se trouvent en abondance dans tous les tissus extra-lymphoïdes dont les muqueuses génitale/rectale. Durant la première semaine, l'infection reste localisée aux muqueuses génitale/rectale et aux ganglions lymphatiques drainant. Les virions nouvellement produits au niveau des ganglions lymphatiques drainant permettent la dissémination du virus *via* le sang aux organes lymphoïdes secondaires dont notamment la muqueuse intestinale. La muqueuse intestinale constituant le plus grand réservoir de cellules mémoires T CD4⁺ CCR5⁺, le virus s'y réplique alors abondamment conduisant ainsi à une déplétion massive des cellules T CD4⁺. À ce

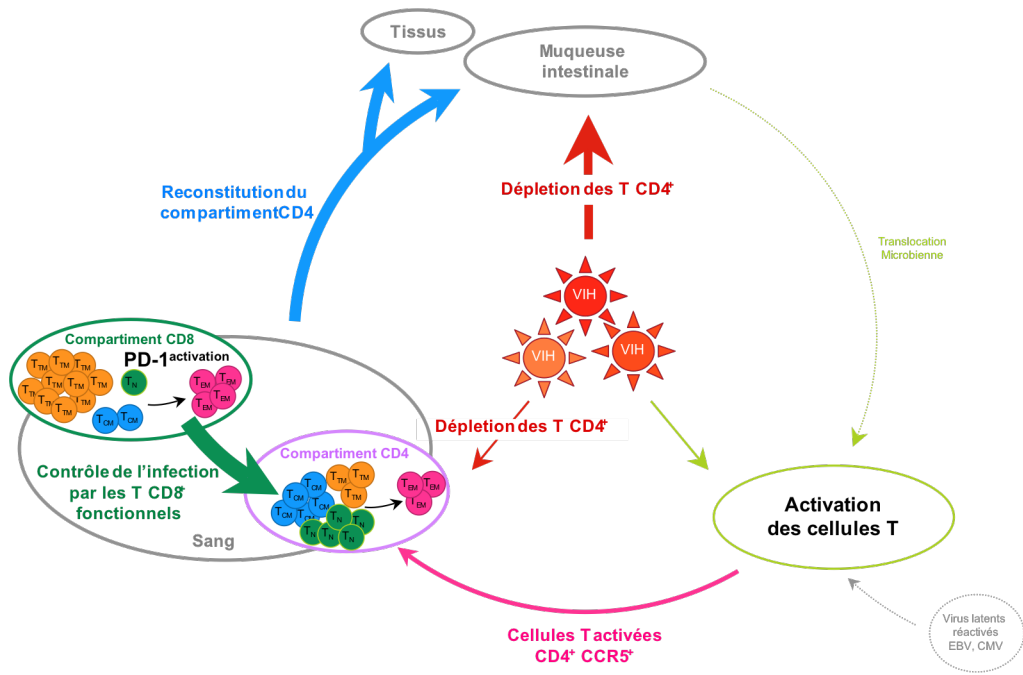
stade de l'infection - entre 21 et 28 jours après avoir été infecté - la charge virale dans le sang atteint un pic de l'ordre de 10^7 - 10^8 copies par millilitre de sang. C'est également à ce moment-là qu'apparaissent les premiers signes de la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative : il est en effet observé une forte expansion de cellules T CD8⁺ spécifiques du VIH-1 dans le sang. Les cellules naïves T CD8⁺ sont massivement mobilisées et activées – leur fréquence diminue dans le sang – pour constituer un répertoire polyclonal de cellules T CD8⁺ effectrices. Les cellules CD8⁺ T_{TM}, dont la fréquence dans le sang est très fortement augmentée, permettent très probablement d'amplifier la production de cellules CD8⁺ T_{EM} – cellules douées de fonction cytotoxique – à partir des cellules CD8⁺ T_{CM}. Ces cellules T CD8⁺ sont activées et expriment PD-1 « marqueur d'activation ». Cette réponse T CD8⁺ exerce une pression de sélection sur le virus et a pour conséquence l'émergence de variants génotypiques du virus dès la primo infection. Mais un répertoire polyclonal et fonctionnel permet le contrôle de la charge virale. La stabilisation de la charge virale signe la fin de la primo infection. Les cellules T CD4⁺ ayant encore une capacité de renouvellement relativement préservée – elles expriment également PD-1 « marqueur d'activation » – , le compartiment T CD4⁺ est potentiellement reconstitué, notamment au niveau du GALT.

La phase chronique (Figure 2b)

Avec la persistance du virus, il se crée un état d'activation immunitaire généralisé dont les conséquences sont dommageables pour le système immunitaire. En effet, avec la déplétion des cellules T CD4⁺ - majoritairement des th17 - qui continue d'avoir lieu au niveau du GALT, la muqueuse intestinale perd son intégrité. Ceci conduit à la translocation de bactéries commensales dans la circulation sanguine et donc à une activation systémique des lymphocytes T, mais aussi des monocytes et des cellules dendritiques. Les composants bactériens, le virus lui-même et les virus persistants qui réémergent (i.e. CMV et EBV) ainsi que les cytokines pro-inflammatoires découlant de cette activation systémique des cellules créent un état d'hyperactivation des cellules. Toutes les sous-populations T CD8⁺, y compris les

cellules naïves, expriment alors des hauts niveaux de PD-1 « marqueur d'exhaustion ». Les cellules T CD8⁺ ont un phénotype plus différencié, avec une fréquence plus élevée de cellules CD8⁺ T_{EM} au détriment des cellules CD8⁺ T_{CM}. Les niveaux plus élevés de PD-1 sur les cellules T CD8⁺ sont associés à des niveaux de prolifération réduits et donc à une perte de fonction. De plus, les cellules naïves T CD8⁺ s'accumulent: ces cellules ne sont plus activées à cause des hauts niveaux de PD-1 qu'elles expriment. Ce défaut d'activation des cellules naïves contribue à donner un répertoire T oligoclonal. Sachant que le nombre de variants génotypiques du virus est plus grand en phase chronique qu'en phase aiguë de l'infection, un répertoire oligoclonal - et de surcroît non fonctionnel - conduit à la progression de la maladie. Quant aux cellules T CD4⁺, elles perdent leur capacité de régénération car elles expriment des hauts niveaux de PD-1. La reconstitution du compartiment T CD4⁺ s'épuise. Il y a alors un effondrement du système immunitaire ce qui caractérise l'entrée en phase clinique de la maladie.

a.



b.

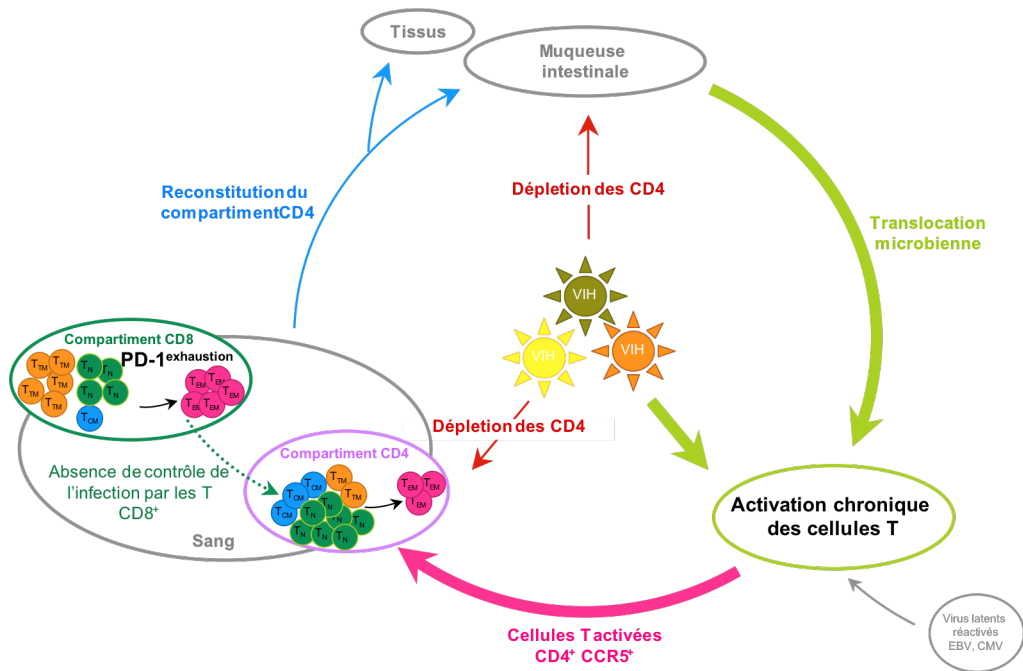


FIGURE 2. Modèle de l'immunopathogénèse de l'infection par le VIH-1. **a.** Lors de la primo infection, les cellules T CD4⁺ mémoires qui résident dans les organes extra-lymphoïdes, notamment la muqueuse intestinale, sont massivement déplétées par le virus. La réponse T CD8⁺ contrôle la charge virale : les cellules naïves sont mobilisées pour donner un répertoire divers, il y a une expansion massive des cellules T_{TM} pour générer des effecteurs. Le compartiment T CD4⁺ est alors reconstitué. **b.** En phase chronique de l'infection, la déplétion massive des cellules T CD4⁺ au niveau de la muqueuse intestinale continue. Ceci entraîne des lésions entéropathiques qui conduisent à une translocation microbienne dans le sang. Le virus lui-même et les composants bactériens, en activant le système immunitaire, fournissent au virus des cibles qui vont soutenir sa réplication. Les cellules T CD8⁺ expriment des hauts niveaux de PD-1 et ne contrôlent plus l'infection: c'est le cas des cellules naïves qui ne peuvent plus être activées ce qui contribue à donner un répertoire oligoclonal. La reconstitution du compartiment T CD4⁺, notamment des cellules CD4⁺ T_{CM}, s'épuise ce qui conduit à une perte de contrôle de l'infection au niveau des muqueuses et des autres tissus. Adapté de Douek *et al.* Annual Review of Medicine. 2009. 60 :471-84.

5.3. Inhiber la voie PD-1/PD-L1 : potentiel thérapeutique dans l'infection par le VIH-1

Dans les trois dernières années, plusieurs études ont montré que PD-1 était un marqueur de la dysfonction des cellules T CD8⁺ et T CD4⁺ spécifiques du VIH-1 chez les individus chroniquement infectés (Day et al, 2006; Petrovas et al, 2006; Trautmann et al, 2006; D'Souza et al, 2007; Sauce et al, 2007). En effet, les cellules T CD8⁺ et T CD4⁺ spécifiques du VIH-1 expriment des hauts niveaux de PD-1, le niveau d'expression de PD-1 corrélant avec la charge virale. Chez les patients sous thérapie antirétrovirale (i.e. avec une charge virale inférieure à 50 copies/ml), le niveau de PD-1 des cellules T CD8⁺ et T CD4⁺ spécifiques du VIH-

Il est nettement réduit (Day et al, 2006; Trautmann et al, 2006). Les patients LTNP, infectés par le VIH-1 mais qui contrôlent naturellement l'infection, ont également des niveaux de PD-1 plus faibles que chez les patients dits progressifs (Zhang et al, 2007). Ces mêmes études ont montré que l'association du récepteur PD-1 avec son ligand PD-L1 entraîne une diminution de la prolifération et de la production de cytokines par les lymphocytes T CD8⁺ et T CD4⁺ spécifiques du virus. Bloquer *in vitro* la liaison du récepteur PD-1 avec son ligand PD-L1 en utilisant un anticorps anti-PD-L1 neutralisant permet aux cellules T CD8⁺ et T CD4⁺ de recouvrer leur fonction, c'est-à-dire prolifération et sécrétion de cytokines (IFN- γ , IL-2 et TNF- α).

Bloquer *in vivo* l'interaction de PD-1 avec son ligand PD-L1 est le point saillant de toutes ces études sur PD-1. Le groupe de Rafi Ahmed a montré, dans le modèle d'infection chronique par LCMV (clone 13) que les cellules T CD8⁺ spécifiques du virus expriment des forts niveaux de PD-1 et qu'il est possible de restaurer *in vivo* leur fonction en utilisant un anticorps bloquant anti-PD-L1 et ainsi permettre l'élimination du virus (Barber et al, 2006). Plusieurs études ont également été menées chez les macaques infectés par le SIV (Velu et al, 2009; Finnefrock et al, 2009). Le blocage *in vivo* de la voie PD-1/PD-L1 dans ce modèle animal permet de restaurer la fonction des cellules T CD8⁺ spécifiques du virus, de diminuer la charge virale et de prolonger la survie.

Associer inhibition de la voie PD-1/PD-L1 à un vaccin thérapeutique pourrait permettre de développer des réponses immunitaires efficaces contre le virus et ainsi rendre possible le contrôle de la charge virale voire l'élimination complète du virus chez des individus infectés. La principale difficulté rencontrée lors de l'établissement d'un vaccin thérapeutique est que l'on cherche à stimuler un système immunitaire « épuisé » à cause de la persistance du virus et non un système immunitaire naïf comme dans le cas de vaccination préventive. L'équipe de Rafi Ahmed a montré, toujours dans le modèle LCMV, que combiner le blocage de l'interaction PD-1/PD-L1 à l'administration d'un vaccin thérapeutique,

améliore les réponses T CD8⁺ dirigées contre le virus et permet un plus grand contrôle de la charge virale: les CTL ainsi générés ont une production d'IFN- γ augmentée, ils expriment plus de récepteurs CD127 ce qui leur confère une plus grande capacité de survie et moins de récepteurs PD-1 (Ha et al, 2008). Dans le contexte d'une vaccination prophylactique, il a été montré que, chez le macaque Rhésus vacciné avec un vecteur adénoviral codant pour la protéine SIV Gag, que le blocage de la voie PD-1/PD-L1 augmentait le nombre de cellules spécifiques de SIV générées (Finnefrock et al, 2009).

L'aspect le plus intéressant de toutes ces recherches menées sur PD-1, et bien sûr celui qui suscite le plus d'intérêt, est le fait que bloquer la voie de signalisation PD-1/PD-L1 *in vivo* a un potentiel thérapeutique très prometteur pour toutes les infections chroniques dont le VIH-1 mais aussi l'hépatite C et l'hépatite B [Plusieurs papiers ont également montré le rôle de PD-1 dans la dysfonction des cellules T CD8⁺ spécifiques du virus de l'hépatite C (Golden-Mason et al, 2007, 2008; Maier et al, 2007; Penna et al, 2007; Radziewicz et al, 2007; Urbani et al, 2006, 2008) et des cellules T CD8⁺ spécifiques du virus de l'hépatite B (Peng et al, 2007; Boni et al, 2007)]. Les compagnies travaillent au développement d'une telle approche thérapeutique : Medarex a produit deux anticorps humanisés - le CT-011, anticorps anti-PD1, et le MDX-1106, anticorps anti-PD-L1- afin de les tester chez l'humain. Une étude clinique de phase I a montré que le CT-011 était bien toléré chez des patients atteints de désordre hématologique sévère (Berger et al, 2008). Un essai clinique actuellement en phase I teste le potentiel thérapeutique du MDX-1106 chez des patients atteints de cancers réfractaires à tout traitement (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00730639>).

Lorsque l'on utilise des anticorps bloquants, il convient d'être extrêmement prudent et d'en évaluer tous les risques et effets secondaires, d'autant plus après l'incident survenu lors de l'essai en phase I du TGN1412. En effet, une étude clinique testant chez l'humain un anticorps agoniste du co-récepteur CD28 a tourné au désastre (Suntharalingam et al, 2006). Six volontaires ayant reçu une

dose du TGN1412 ont développé très rapidement une réaction inflammatoire massive nécessitant des soins intensifs pendant plusieurs jours (Drazen, 2006). Cet anticorps anti-CD28 avait, bien entendu, été testé auparavant dans des modèles murins et primates (*Cynomolgus* et Rhesus) et n'avait montré aucun effet toxique (Schraven et Kalinke, 2008).

L'incident dramatique observé lors de cette étude clinique rappelle à l'ordre la communauté scientifique et impose d'en tirer les leçons. Tout d'abord, le choix du modèle animal utilisé pour tester toute nouvelle molécule est primordial. Le développement des souris humanisées peut s'avérer être un bon palliatif au modèle murin « classique » souvent utilisé en phase pré clinique et qui a montré ses limites. Cependant, dans le contexte de la recherche sur le VIH-1, le modèle primate reste le plus approprié et le plus pertinent sachant que l'infection par le SIV chez les macaques est celle qui se rapproche le plus de l'infection par le VIH-1 chez l'humain. Mais il est important de garder en tête qu'aucun modèle n'est pas parfait et infaillible. C'est pourquoi il est aussi nécessaire de faire un travail en amont pour mieux comprendre comment les voies ciblées sont orchestrées et quelles sont toutes les conséquences biologiques de les manipuler. Il ne faut pas perdre de vue que bloquer ou activer des voies de signalisations, qu'elles soient activatrices ou inhibitrices, peut également avoir un effet délétère. Par exemple, PD-1 joue un rôle essentiel pour mettre fin aux réponses immunitaires potentiellement dangereuses comme celles qui sont à l'origine de maladies auto-immunes. Alors que restaurer la fonction de cellules spécifiques du virus « épuisées » paraît une stratégie très séduisante, lever la tolérance d'autres cellules serait désastreux.

Plutôt que simplement administrer un anticorps bloquant anti-PD-L1, il faudrait envisager des stratégies beaucoup plus spécifiques et chercher à ne bloquer que les cellules spécifiques du virus d'intérêt. Une de ces approches pourrait être l'utilisation des cellules dendritiques. La manipulation des cellules dendritiques pour induire des réponses cellulaires antivirales s'avère un outil

prometteur pour contrôler les infections virales persistantes et pourrait également permettre de combiner vaccination thérapeutique et blocage de la voie PD-1/PD-L1. Dans le cadre de vaccination anti-cancer, les cellules dendritiques générées *ex vivo* et chargées avec la tumeur du patient ont montré dans de multiples études cliniques qu'elles pouvaient induire des réponses anti-tumeur résultant en une réduction de la tumeur (Palucka et al, 2007). Chez les patients infectés par le VIH-1, des cellules dendritiques chargées par le virus autologue du patient et réinjectées chez les patients se sont également avérées capables d'induire des réponses T CD4⁺ et CD8⁺ anti-virus ainsi qu'une diminution de la charge virale (Lu et al, 2004). Rappelons également que les cellules dendritiques sont seules capables d'activer les cellules naïves et que les cellules naïves chez les patients chroniquement infectés par le VIH-1 surexpriment la molécule PD-1. Manipuler ces mêmes cellules dendritiques pour y diminuer l'expression de PD-L1 permettrait de bloquer la voie de signalisation PD-1/PD-L1. Une des options pour diminuer l'expression de PD-L1 est l'utilisation de siRNA. J'ai développé une telle approche dans le laboratoire du Dr Steinman (Breton et al, 2009). Bloquer l'expression de PD-L1 dans des cellules dendritiques dérivés des monocytes permet de statistiquement augmenter la réponse proliférative T CD8⁺ spécifique du VIH-1 *in vitro*. Mais, l'augmentation du nombre de cellules T CD8⁺ étant relativement faible, il reste à déterminer quel impact un tel changement aura *in vivo*.

Ces trois dernières années, il y a eu beaucoup d'efforts investis autour de la molécule PD-1, et c'est bien légitime car PD-1 paraît jouer un grand rôle dans la dysfonction des cellules spécifiques du VIH-1. Mais, d'autres voies sont à l'étude car elles semblent également participer à la dysfonction des cellules T dans les infections virales persistantes. En 2006, deux équipes ont montré, dans le modèle LCMV, que bloquer le récepteur à l'IL-10 permettait l'élimination du virus chez des souris en phase chronique de l'infection (Brooks et al, 2006; Ejrnaes et al, 2006). Ce contrôle de la charge virale est associé à une amélioration de la fonction des cellules T CD8⁺. L'équipe de Bruce Walker a, quant à elle, montré que la

molécule CTLA-4 est surexprimée par les cellules T CD4⁺ spécifiques du VIH-1 et qu'un anticorps anti-CTLA-4 augmentait la fonction de ces mêmes cellules (Kaufmann et al, 2007). La molécule TIM-3 joue également un rôle dans l'exhaustion des cellules T dans le contexte d'une infection qui persiste et bloquer cette voie restaure la fonction des cellules T (Jones et al, 2008; Ju et al, 2009; Golden-Mason et al, 2009). C'est d'ailleurs l'existence de telles autres voies de signalisation dans les cellules dendritiques qui peut-être explique que nous n'avons observé qu'un modeste effet du blocage de PD-L1 dans ces mêmes cellules sur la réponse proliférative T CD8⁺ spécifique du virus (Breton et al, 2009).

Comme nous venons de le voir, des progrès certains ont été faits dans notre compréhension des mécanismes impliqués dans l'exhaustion des cellules T quand l'antigène persiste dans l'organisme. Le fait que bloquer une molécule comme PD-L1 restaure la fonction des cellules T *in vitro* (et *in vivo* chez le macaque) laisse entrevoir de nouvelles stratégies en immunothérapie pour augmenter l'immunité dans l'infection par le VIH-1 et/ou pour potentialiser un vaccin thérapeutique ou préventif. Cependant, des questions importantes restent en suspens quant à l'effet *in vivo* chez l'humain de telles approches thérapeutiques. La première interrogation concerne les effets secondaires d'un tel traitement. Par exemple, le blocage de CTLA-4 avec un anticorps bloquant est déjà pratiqué chez l'humain. Des patients atteints de cancer et qui reçoivent de façon systémique l'Ipilimumab ont une régression de leur tumeur mais aussi parfois des effets secondaires sévères comme une colite et une hypophysite (Hodi et al, 2003; Phan et al, 2003). Toutefois, le blocage *in vivo* de la voie PD-1/PD-L1 chez le macaque a engendré peu d'effets secondaires (Velu et al, 2009). Le deuxième point d'interrogation est de savoir si le bénéfice obtenu par le blocage de la voie PD-1/PD-L1 sera suffisant pour contrôler la charge virale étant donné qu'il existe d'autres voies de signalisation dites « inhibitrices » et dont le rôle a été mis en évidence dans l'exhaustion des cellules T spécifiques du VIH-1 (e.g. CTLA-4, CD70, IL-10, TIM-3). Il a par ailleurs été montré, dans le modèle murin, que bloquer *in vivo* de façon concomitante les voies PD-L1/IL-10 (Brooks et al, 2008b) et PD-L1/LAG-3

(Blackburn et al, 2009) avait un effet synergique. Finalement, nous sommes en droit de nous demander si un tel traitement va avoir un effet bénéfique chez des individus sous trithérapie, sachant que ce sont la plupart des patients dans les pays développés et qu'ils expriment des niveaux de PD-1 presque normaux.

5.4. Tétramères de CMH de class II : un outil très utile dans le développement d'un vaccin anti-VIH-1

Depuis les 25 dernières années, des efforts colossaux ont été investis dans la recherche contre le VIH-1 sans, malheureusement, aboutir au développement d'un vaccin efficace. En septembre 2008, un vaccin développé par la compagnie Merck, alors en phase II d'étude clinique et testé sur plus de 3000 individus à haut risque d'infection, a été arrêté car il n'a démontré aucune protection contre le virus (Buchbinder et al, 2008; McElrath et al, 2008). Cet échec rappelait de façon cruelle à la communauté scientifique que ce qui constitue une réponse immunitaire efficace dans l'infection par le VIH-1 n'est toujours pas connu et compris (Walker et al, 2008; Sekaly, 2008).

L'identification de corrélats de protection durant l'infection par le VIH-1 se fait urgente et est essentielle pour le développement d'une nouvelle génération de vaccins (Harari et Pantaleo, 2005; Pantaleo et Koup, 2006; Letvin, 2007; Heeney et Plotkin, 2006). Une autre approche pour développer des vaccins est de tirer les enseignements de vaccins existants et ayant montré leur efficacité (Lambert et al, 2005). L'équipe de Rafi Ahmed, ainsi que Denis Gaucher au laboratoire, ont étudié les réponses T CD8⁺ primaires générées après vaccination contre la variole (Miller et al, 2008) ou contre la fièvre jaune (Gaucher et al, 2008) dans le but de mieux comprendre ce qu'est une réponse antivirale efficace. Dans une telle perspective, il est important de mesurer de façon qualitative et quantitative les réponses induites.

De plus, la plupart des approches immunothérapeutiques et des stratégies vaccinales actuellement testées – que ce soit dans le cadre des maladies infectieuses, des désordres auto-immuns ou du cancer – sont hautement spécifiques de la pathologie ciblée. Il est donc important de développer des outils nous permettant de mesurer de façon quantitative et qualitative la nature des réponses T spécifiques de l'antigène qui sont induites afin de valider l'efficacité de tels traitements lors des études cliniques (Pantaleo et Harari, 2006).

Dans ce contexte, le développement d'outils fiables et sensibles permettant l'identification, la quantification et la caractérisation des cellules spécifiques de l'antigène est nécessaire.

Mark Davis et John Altman furent les premiers à développer des complexes tétramériques de CMH de classe I (Altman et al, 1996). Les tétramères sont un réactif utilisant le ligand naturel du TCR, c'est-à-dire le complexe CMH-peptide, comme sonde pour détecter les cellules T spécifiques d'un antigène. Du fait de la faible affinité du complexe CMH-peptide pour le TCR, il est nécessaire de multimériser ce complexe afin d'en accroître l'avidité pour le TCR. Les tétramères de classe I ont été utilisés dans de très nombreuses études pour détecter et caractériser les cellules T CD8⁺ – qu'elles soient de nature anti-virales, anti-tumorales ou auto-immunes – et ce chez l'humain et dans des modèles animaux. L'impact d'un tel outil dans le domaine de l'immunologie a été énorme. Contrairement à d'autres méthodes de détection et de quantification des cellules spécifiques de l'antigène comme le test de cytotoxicité, le marquage intracellulaire ou encore le test de prolifération, la détection des cellules par tétramères ne repose pas sur leur fonction, mais sur leur identification directe par le TCR. C'est d'autant plus important dans le contexte de l'infection par le VIH-1 où les cellules spécifiques du virus sont dysfonctionnelles.

Alors que l'utilisation de tétramères de CMH de classe I est très répandue et se fait presque de façon routinière, l'utilisation de tétramères de CMH de classe II est

beaucoup plus limitée. Les tétramères de classe I sont généralement produits en grande quantité chez *E. coli*. Produire les chaînes α et β du CMH de classe II chez *E. coli* et renaturer *in vitro* une molécule de CMH de classe II en présence d'un excès de peptide reste une méthode extrêmement coûteuse et hautement dépendante de la nature du peptide et de l'allèle de CMH de classe II choisis. La production chez *E. coli* de molécules recombinantes liant de façon covalente le peptide antigénique permet d'augmenter le rendement de protéines ayant une bonne conformation et chargées avec le peptide (Cunliffe et al, 2002). Nous avons alors choisi de produire nos molécules de CMH de classe II dans le système eucaryote *Drosophila* afin d'en faciliter la production et d'en augmenter le rendement [système où la stratégie de lier le peptide de façon covalente avait déjà été utilisée (Crawford et al, 1998)]. En effet, toutes les étapes de purification des protéines à partir des corps d'inclusion (agrégats de protéines formés chez *E. coli*) et de renaturation des protéines en présence d'un excès de peptide sont évitées. Une autre difficulté inhérente à la production de tétramère de CMH de classe II est le fait que les gènes du CMH de classe II sont extrêmement polymorphiques et qu'il n'existe pas de gènes prévalents dans la population. Nous avons alors décidé de développer un vecteur très flexible nous permettant, en une étape de clonage, de produire tout un panel de molécules de CMH de classe II liant de façon covalente une combinaison de différents peptides. Pour l'instant, nous avons produit 3 allèles différents (HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0701) nous permettant ainsi de couvrir environ 20% des individus de la population canadienne.

Comme démontré dans le chapitre 4, cet outil nous permet d'identifier et de quantifier les cellules T CD4⁺ spécifiques d'un antigène (i.e. clone T ou lignées spécifiques du peptide HA₃₀₆₋₃₁₈). En faisant varier la concentration en tétramères, le temps de coloration ou le nombre de cellules colorées, nous marquons toujours le même pourcentage de cellules avec les tétramères. Ces résultats démontrent la spécificité de nos molécules recombinantes. En utilisant des concentrations sub-optimales de tétramères, nous distinguons différentes populations de cellules T

ayant probablement des affinités différentes pour le complexe tétramérique CMH/peptide. Ce serait toutefois à démontrer en déterminant les séquences de TCR de chacune de ces populations de cellules T. Les tétramères pourraient donc être un bon outil pour différencier les cellules T en fonction de leur affinité et donc étudier l'expression de PD-1 en fonction de l'affinité du TCR pour son ligand.

Mais comme exposé dans l'annexe 1, il est très difficile de détecter des clones T CD4⁺ spécifiques du VIH-1 dans des PBMCs de patients infectés. Les limites à cette détection sont la relative faible fréquence de ces cellules dans le sang ainsi que la faible affinité du complexe TCR-CMH/peptide.

Pour contourner le problème de la faible fréquence des cellules T CD4⁺ spécifiques d'un antigène, beaucoup de protocoles utilisant les tétramères de CMH de classe II prévoient une stimulation préalable *in vitro* des cellules T CD4⁺ avec l'antigène pour induire leur prolifération. Cependant cette approche a plusieurs limites : (1) plusieurs cycles d'amplification des cellules T compliquent la détermination de leur fréquence dans la population originale [même si des techniques comme le CFSE permettent de savoir le nombre de divisions effectuées par les cellules et donc de calculer leur nombre initial (Novak et al, 1999)] (2) certaines des cellules spécifiques de l'antigène peuvent mourir par apoptose ou ne pas répondre à la stimulation antigénique car elles sont épuisées (e.g. exhaustion médiée par PD-1) ce qui conduit à une sous-estimation de leur nombre initial (Danke et al, 2003; Lucas et al, 2004) (3) et finalement une telle stimulation *in vitro* peut potentiellement changer le phénotype de ces cellules ce qui va biaiser toute tentative de les caractériser (Lemaitre et al, 2004). Une autre approche maintenant plus couramment utilisée est d'enrichir l'échantillon à étudier en cellules tétramère⁺ en les sélectionnant par billes magnétiques (Day et al, 2003; Scriba et al, 2005ab; Lemaitre et al, 2004).

La multimérisation (i.e. dans notre cas la tétramérisation) des complexes CMH/peptide a partiellement permis de surmonter le problème de faible affinité en augmentant l'avidité du complexe CMH/peptide pour le TCR. Nous avons pu ainsi détecter des clones spécifiques du peptide HA₃₀₆₋₃₁₈ dilués dans des PBMCs à une

fréquence aussi basse que 0,6%. Il faut toutefois noter que les clones T ainsi dilués avaient été générés par stimulations répétées avec le peptide HA₃₀₆₋₃₁₈ et sont donc plutôt de grande affinité pour le complexe HLA-DR1/ HA₃₀₆₋₃₁₈. Cependant, la tétramérisation des complexes CMH/peptide, largement utilisée pour la détection des cellules T CD8⁺, s'avère moins couronnée de succès pour la détection des cellules T CD4⁺. Une des explication est peut-être simplement une question d'organisation spatiale. La streptavidine a une structure rigide qui fait que les quatre sites de liaison de la biotine sont situés d'une telle manière que les quatre molécules de CMH de classe II se retrouvent projetées aux quatre coins cardinaux. Cette contrainte structurale rend quasiment impossible la liaison des quatre molécules de CMH de classe II de façon simultanée.

Finalement d'autres limites, liées à la cellule T elle-même, comme la fluidité de la membrane, l'organisation en micro domaines, la densité et l'accessibilité du CMH de classe II et du co-récepteur CD4, peuvent influencer la détection des cellules T CD4⁺ par les tétramères de CMH de classe II.

Des méthodes alternatives à la tétramérisation et dont le but est d'augmenter l'avidité du complexe CMH/peptide pour le TCR ont été décrites. C'est par exemple l'utilisation de leucine zipper (Scott et al, 1996), de peptide covalent (Kozono et al, 1994), d'immunoglobulines [IgG1 (BDTM DimerX) et IgGM (outil développé au laboratoire par Lena Kalfayan)], et finalement de liposomes dit cellules présentatrices d'antigènes artificielles (Giannoni et al, 2005). Il serait intéressant de voir si de cloner nos molécules de classe II dans ces nouvelles plateformes nous aiderait à palier à ce problème de détection de cellules T CD4⁺ spécifiques de l'antigène chez les patients infectés par le VIH-1.

Pour conclure, l'outil idéal pour détecter, quantifier et caractériser les cellules T spécifiques d'un antigène, comme les cellules T CD4⁺ spécifiques du VIH-1 dans le cas qui nous intéresse, devrait avoir comme propriété une grande spécificité, une grande sensibilité et devrait marcher entre 4 et 37°C. Sa liaison avec le TCR

devrait être réversible, ne devrait ni induire l'activation des cellules T ni compromettre leur viabilité.

5.5. Perspectives et conclusion

L'étude, présentée dans le chapitre 3, a permis de soulever de nombreuses questions comme exposé dans la discussion et m'a donné l'occasion de proposer un modèle basé sur plusieurs hypothèses. Dans ce chapitre de perspectives, je vais reprendre les points qui me paraissent les plus importants et qui mériteraient d'être poursuivis afin de comprendre davantage les mécanismes conduisant à la progression de l'infection par le VIH-1. Nous verrons également en quoi l'outil (i.e. tétramères de CMH de classe II) généré dans le chapitre 4 est extrêmement utile dans cette analyse de l'immunopathogénèse de l'infection par le VIH-1.

Pathogénèse de l'infection par le VIH-1: du défaut d'activation des cellules naïves à la dysfonction des cellules T CD8⁺

L'étude décrite dans le chapitre 3 est, à ma connaissance, unique dans le sens où c'est la seule étude qui détaille à la fois les réponses naïve/mémoire T CD4⁺ et T CD8⁺ dans l'infection par le VIH-1, et ce de la phase initiale à la phase chronique de l'infection. Cette étude a mis en relief un déséquilibre homéostatique des cellules T observé à tous les stades de la maladie. De plus, une augmentation de l'expression de PD-1 sur toutes les sous-populations T à tous les stades de la maladie suggère que PD-1 pourrait jouer un rôle dans ce déséquilibre. Il serait intéressant de savoir si bloquer *in vivo* la voie PD-1/PD-L1 restaurera la répartition des sous-populations T CD4⁺ et T CD8⁺ comme celle observée chez les patients sains. Mais de façon plus intéressante, je crois que cette étude soulève deux hypothèses pouvant s'avérer majeures dans l'immunopathogénèse du VIH-1 qui sont (1) le défaut d'activation des cellules naïves et (2) la perte de fonction des cellules T CD8⁺.

En ce qui concerne l'hypothèse suggérant un défaut d'activation des cellules naïves, il serait intéressant de la démontrer, d'en comprendre les causes et les conséquences :

- En prenant des cellules naïves triées de patients en phase chronique de l'infection par le VIH-1 et en les stimulant avec des peptides du VIH-1 en présence ou en absence d'anticorps bloquant PD-L1, nous pourrions voir si l'activation des cellules naïves est restaurée ou non.
- Afin de comprendre les causes de ce défaut d'activation des cellules naïves, il serait intéressant de voir si les cellules naïves surexpriment PD-1 alors qu'elles sont en périphérie ou si elles sortent du thymus en exprimant déjà des hauts niveaux de PD-1 (i.e. il faudrait mesurer les niveaux de PD-1 sur les cellules CD31⁺ dans le sang). De plus, les cellules naïves n'ayant jamais rencontré l'antigène dont elles sont spécifiques, il serait intéressant de voir quels sont les mécanismes conduisant à la surexpression de PD-1 par les cellules T naïves chez les individus infectés par le VIH-1.
- Mais de façon plus importante, quelles sont les conséquences de cette surexpression de PD-1 par les cellules T naïves sur la qualité de la réponse mémoire générée, la diversité du répertoire T et l'impossibilité de générer de nouvelles réponses dans le cadre d'une vaccination thérapeutique. Il serait donc intéressant de voir si l'injection *in vivo* d'anticorps bloquant PD-L1 permet à des patients chroniques non-traités d'avoir un répertoire T plus varié et de mieux contrôler la charge virale.

En ce qui concerne le défaut d'activation des cellules T CD8⁺ chez les patients chroniquement infectés par le VIH-1 mais pas chez les patients en début d'infection, des études fonctionnelles *in vitro* sur les cellules T CD8⁺ au cours de l'infection devront être conduites pour vérifier cette hypothèse. Il serait également intéressant de voir si dans le cadre d'un traitement immunothérapeutique où la voie PD-1/PD-L1 est bloquée *in vivo* dès la primo infection, la population T CD8⁺ redevient fonctionnelle notamment en ayant à nouveau une capacité de prolifération et permet ainsi d'éviter la progression de la maladie.

Les tétramères de CMH de classe II et leur utilisation pour disséquer la réponse T CD4⁺ au cours de l'infection par le VIH-1

Disséquer les réponses cellulaires - comme la réponse T CD4⁺ - mises en place dans le contexte de l'infection par le VIH-1 est un élément clé à la compréhension de l'immunopathogénèse de cette infection virale. Avec les tétramères que nous avons généré, nous pourrions essayer de suivre certains clones T CD4⁺ au cours de l'infection par le VIH-1 et de voir s'ils surexpriment PD-1 et si cette expression de PD-1 a un impact sur leur fonction et leur persistance. Il serait également intéressant de voir si le répertoire T CD4⁺ (naïf et mémoire) en début d'infection est différent de celui en phase chronique de l'infection. Nous pourrions également déterminer ce qui peut moduler l'expression de PD-1 des clones spécifiques du VIH-1 (i.e. affinité du TCR, dose de l'antigène...).

Conclusion

Mieux déterminer les mécanismes responsables de l'exhaustion des cellules T dans l'infection par le VIH-1 et de la progression de la maladie, ainsi que développer des outils de pointe pour suivre ces réponses T, est central à une meilleure compréhension de l'interaction entre le virus et le système immunitaire de l'hôte, et permettra ainsi le développement de stratégies pertinentes pour lutter contre l'infection par le VIH-1.

6. Références

1. Akiba H, Nakano H, Nishinaka S, Shindo M, Kobata T, Atsuta M, Morimoto C, Ware CF, Malinin NL, Wallach D, Yagita H, Okumura K. 1998. CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, activates NF-kappaB and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF-kappaB-inducing kinase. *J Biol Chem.* 273(21):13353-8.
2. Alimonti JB, Ball TB, Fowke KR. 2003. Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *J Gen Virol.* 84(Pt 7):1649-61.
3. Alimonti JB, Kimani J, Matu L, Wachihhi C, Kaul R, Plummer FA, Fowke KR. 2006. Characterization of CD8 T-cell responses in HIV-1-exposed seronegative commercial sex workers from Nairobi, Kenya. *Immunol Cell Biol.* 84(5):482-5.
4. Allen TM, Yu XG, Kalife ET, Reyor LL, Lichterfeld M, John M, Cheng M, Allgaier RL, Mui S, Frahm N, Alter G, Brown NV, Johnston MN, Rosenberg ES, Mallal SA, Brander C, Walker BD, Altfeld M. 2005. De novo generation of escape variant-specific CD8+ T-cell responses following cytotoxic T-lymphocyte escape in chronic human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 79(20):12952-60.
5. Almeida JR, Price DA, Papagno L, Arkoub ZA, Sauce D, Bornstein E, Asher TE, Samri A, Schnuriger A, Theodorou I, Costagliola D, Rouzioux C, Agut H, Marcelin AG, Douek D, Autran B, Appay V. 2007. Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J Exp Med.* 204(10):2473-85.
6. Altfeld M, Rosenberg ES, Shankarappa R, Mukherjee JS, Hecht FM, Eldridge RL, Addo MM, Poon SH, Phillips MN, Robbins GK, Sax PE, Boswell S, Kahn JO, Brander C, Goulder PJ, Levy JA, Mullins JI, Walker BD. 2001. Cellular immune responses and viral diversity in individuals treated during acute and early HIV-1 infection. *J Exp Med.* 193(2):169-80.

7. Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM. 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*. 274(5284):94-6.
8. Ancuta P, Kamat A, Kunstman KJ, Kim EY, Autissier P, Wurcel A, Zaman T, Stone D, Mefford M, Morgello S, Singer EJ, Wolinsky SM, Gabuzda D. 2008. Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients. *PLoS One*. 3(6):e2516.
9. Appay V, Zaunders JJ, Papagno L, Sutton J, Jaramillo A, Waters A, Easterbrook P, Grey P, Smith D, McMichael AJ, Cooper DA, Rowland-Jones SL, Kelleher AD. 2002a. Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. *J Immunol*. 168(11):5954-8.
10. Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, Ogg GS, King A, Lechner F, Spina CA, Little S, Havlir DV, Richman DD, Gruener N, Pape G, Waters A, Easterbrook P, Salio M, Cerundolo V, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. 2002b. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med*. 8(4):379-85.
11. Badley AD, McElhinny JA, Leibson PJ, Lynch DH, Alderson MR, Paya CV. 1996. Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocytes. *J Virol*. 70(1):199-206.
12. Baenziger S, Heikenwalder M, Johansen P, Schlaepfer E, Hofer U, Miller RC, Diemand S, Honda K, Kundig TM, Aguzzi A, Speck RF. 2009. Triggering TLR7 in mice induces immune activation and lymphoid system disruption, resembling HIV-mediated pathology. *Blood*. 113(2):377-88.
13. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. 2006. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 439(7077):682-7.
14. Baskin GB, Murphey-Corb M, Martin LN, Davison-Fairburn B, Hu FS, Kuebler D. 1991. Thymus in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *Lab Invest*. 65(4):400-7.

15. Beignon AS, McKenna K, Skoberne M, Manches O, DaSilva I, Kavanagh DG, Larsson M, Gorelick RJ, Lifson JD, Bhardwaj N. 2005. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest.* 115(11):3265-75.
16. Benito JM, López M, Soriano V. 2004. The role of CD8⁺ T-cell response in HIV infection. *AIDS Rev.* 6(2):79-88.
17. Beq S, Delfraissy JF, Theze J. 2004. Interleukin-7 (IL-7): immune function, involvement in the pathogenesis of HIV infection and therapeutic potential. *Eur Cytokine Netw.* 15(4):279-89.
18. Berger R, Rotem-Yehudar R, Slama G, Landes S, Kneller A, Leiba M, Koren-Michowitz M, Shimoni A, Nagler A. 2008. Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011, a humanized antibody interacting with PD-1, in patients with advanced hematologic malignancies. *Clin Cancer Res.* 14(10):3044-51.
19. Betts MR, Ambrozak DR, Douek DC, Bonhoeffer S, Brenchley JM, Casazza JP, Koup RA, Picker LJ. 2001. Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection. *J Virol.* 75(24):11983-91.
20. Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, Lederman MM, Benito JM, Goepfert PA, Connors M, Roederer M, Koup RA. 2006. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8⁺ T cells. *Blood.* 107(12):4781-9.
21. Biancotto A, Iglehart SJ, Vanpouille C, Condack CE, Lisco A, Ruecker E, Hirsch I, Margolis LB, Grivel JC. 2008. HIV-1 induced activation of CD4⁺ T cells creates new targets for HIV-1 infection in human lymphoid tissue *ex vivo*. *Blood.* 111(2):699-704.
22. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, Betts MR, Freeman GJ, Vignali DA, Wherry EJ. 2009. Coregulation of CD8⁺ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol.* 10(1):29-37.

23. Boni C, Fiscaro P, Valdatta C, Amadei B, Di Vincenzo P, Giuberti T, Laccabue D, Zerbini A, Cavalli A, Missale G, Bertoletti A, Ferrari C. 2007. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J Virol.* 81(8):4215-25.
24. Boniface JJ, Rabinowitz JD, Wülfing C, Hampl J, Reich Z, Altman JD, Kantor RM, Beeson C, McConnell HM, Davis MM. 1998. Initiation of signal transduction through the T cell receptor requires the multivalent engagement of peptide/MHC ligands. *Immunity.* 9(4):459-66.
25. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. 1994. Virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 68(9):6103-10.
26. Borrow P, Lewicki H, Wei X, Horwitz MS, Peffer N, Meyers H, Nelson JA, Gairin JE, Hahn BH, Oldstone MB, Shaw GM. 1997. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med.* 3(2):205-11.
27. Borst J, Hendriks J, Xiao Y. 2005. CD27 and CD70 in T cell and B cell activation. *Curr Opin Immunol.* 17(3):275-81.
28. Borthwick NJ, Lowdell M, Salmon M, Akbar AN. 2000. Loss of CD28 expression on CD8(+) T cells is induced by IL-2 receptor gamma chain signalling cytokines and type I IFN, and increases susceptibility to activation-induced apoptosis. *Int Immunol.* 12(7):1005-13.
29. Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, Casazza JP, Kuruppu J, Migueles SA, Connors M, Roederer M, Douek DC, Koup RA. 2003. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8⁺ T cells. *Blood.* 101(7):2711-20.
30. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, Nguyen PL, Khoruts A, Larson M, Haase AT, Douek DC. 2004. CD4⁺ T

cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med.* 200(6):749-59.

31. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC. 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med.* 12(12):1365-71.
32. Breton G, Yassine-Diab B, Cohn L, Boulassel MR, Routy JP, Sékaly RP, Steinman RM. 2009. siRNA knockdown of PD-L1 and PD-L2 in monocyte-derived dendritic cells only modestly improves proliferative responses to Gag by CD8(+) T cells from HIV-1-infected individuals. *J Clin Immunol.* 29(5):637-45.
33. Bretscher PA. 1999. A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(1):185-90.
34. Brooks DG, Trifilo MJ, Edelmann KH, Teyton L, McGavern DB, Oldstone MB. 2006. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nat Med.* 12(11):1301-9.
35. Brooks DG, Lee AM, Elsaesser H, McGavern DB, Oldstone MB. 2008a. IL-10 blockade facilitates DNA vaccine-induced T cell responses and enhances clearance of persistent virus infection. *J Exp Med.* 205(3):533-41.
36. Brooks DG, Ha SJ, Elsaesser H, Sharpe AH, Freeman GJ, Oldstone MB. 2008b. IL-10 and PD-L1 operate through distinct pathways to suppress T-cell activity during persistent viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(51):20428-33.
37. Broussard SR, Staprans SI, White R, Whitehead EM, Feinberg MB, Allan JS. 2001. Simian immunodeficiency virus replicates to high levels in naturally infected African green monkeys without inducing immunologic or neurologic disease. *J Virol.* 75(5): 2262-75.

38. Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, O'Malley PM, Holmberg SD. 1994. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS*. 8(8):1123-8.
39. Buchbinder SP, Mehrotra DV, Duerr A, Fitzgerald DW, Mogg R, Li D, Gilbert PB, Lama JR, Marmor M, Del Rio C, McElrath MJ, Casimiro DR, Gottesdiener KM, Chodakewitz JA, Corey L, Robertson MN; Step Study Protocol Team. 2008. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet*. 372(9653):1881-93.
40. Canque B, Rosenzweig M, Gey A, Tartour E, Fridman WH, Gluckman JC. 1996. Macrophage inflammatory protein-1alpha is induced by human immunodeficiency virus infection of monocyte-derived macrophages. *Blood*. 87(5):2011-9.
41. Cao J, McNevin J, Holte S, Fink L, Corey L, McElrath MJ. 2003. Comprehensive analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific gamma interferon-secreting CD8+ T cells in primary HIV-1 infection. *J Virol*. 77(12):6867-78.
42. Carrington M, O'Brien SJ. 2003. The influence of HLA genotype on AIDS. *Annu Rev Med*. 54:535-51.
43. Carter L, Fouser LA, Jussif J, Fitz L, Deng B, Wood CR, Collins M, Honjo T, Freeman GJ, Carreno BM. 2002. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol*. 32(3):634-43.
44. Casazza JP, Betts MR, Price DA, Precopio ML, Ruff LE, Brenchley JM, Hill BJ, Roederer M, Douek DC, Koup RA. 2006. Acquisition of direct antiviral effector functions by CMV-specific CD4+ T lymphocytes with cellular maturation. *J Exp Med*. 203(13):2865-77.
45. Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. 2004. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol*. 173(2):945-54.

46. Chen JJ, Huang JC, Shirliff M, Briscoe E, Ali S, Cesani F, Paar D, Cloyd MW. 2002. CD4 lymphocytes in the blood of HIV(+) individuals migrate rapidly to lymph nodes and bone marrow: support for homing theory of CD4 cell depletion. *J Leukoc Biol.* 72(2):271-8.
47. Chen L. 2004. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol.* 4(5):336-47.
48. Cochran JR, Cameron TO, Stern LJ. 2000. The relationship of MHC-peptide binding and T cell activation probed using chemically defined MHC class II oligomers. *Immunity.* 12(3):241-50.
49. Cohen Stuart JW, Hazebergh MD, Hamann D, Otto SA, Borleffs JC, Miedema F, Boucher CA, de Boer RJ. 2000. The dominant source of CD4+ and CD8+ T-cell activation in HIV infection is antigenic stimulation. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 25(3): 203-11.
50. Cooper DA, Tindall B, Wilson EJ, Imrie AA, Penny R. 1988. Characterization of T lymphocyte responses during primary infection with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis.* 157(5):889-96.
51. Crawford F, Kozono H, White J, Marrack P, Kappler J. 1998. Detection of antigen-specific T cells with multivalent soluble class II MHC covalent peptide complexes. *Immunity.* 8(6):675-82.
52. Cunliffe SL, Wyer JR, Sutton JK, Lucas M, Harcourt G, Klenerman P, McMichael AJ, Kelleher AD. 2002. Optimization of peptide linker length in production of MHC class II/peptide tetrameric complexes increases yield and stability, and allows identification of antigen-specific CD4+T cells in peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Immunol.* 32(12):3366-75.
53. Dalod M, Dupuis M, Deschemin JC, Goujard C, Deveau C, Meyer L, Ngo N, Rouzioux C, Guillet JG, Delfraissy JF, Sinet M, Venet A. 1999. Weak anti-HIV CD8(+) T-cell effector activity in HIV primary infection. *J Clin Invest.* 104(10):1431-9.

54. Danke NA, Kwok WW. 2003. HLA class II-restricted CD4⁺ T cell responses directed against influenza viral antigens postinfluenza vaccination. *J Immunol.* 171(6):3163-9.
55. Davenport MP, Ribeiro RM, Zhang L, Wilson DP, Perelson AS. 2007. Understanding the mechanisms and limitations of immune control of HIV. *Immunol Rev.* 216:164-75.
56. Davis MM, Boniface JJ, Reich Z, Lyons D, Hampl J, Arden B, Chien Y. 1998. Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu Rev Immunol.* 16:523-44.
57. Day CL, Seth NP, Lucas M, Appel H, Gauthier L, Lauer GM, Robbins GK, Szczepiorkowski ZM, Casson DR, Chung RT, Bell S, Harcourt G, Walker BD, Klenerman P, Wucherpfennig KW. 2003. Ex vivo analysis of human memory CD4 T cells specific for hepatitis C virus using MHC class II tetramers. *J Clin Invest.* 112(6):831-42.
58. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, Mackey EW, Miller JD, Leslie AJ, DePierres C, Mncube Z, Duraiswamy J, Zhu B, Eichbaum Q, Altfeld M, Wherry EJ, Coovadia HM, Goulder PJ, Klenerman P, Ahmed R, Freeman GJ, Walker BD. 2006. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature.* 443(7109):282-3.
59. De Milito A, Nilsson A, Titanji K, Thorstensson R, Reizenstein E, Narita M, Grutzmeier S, Sönnnerborg A, Chiodi F. 2004. Mechanisms of hypergammaglobulinemia and impaired antigen-specific humoral immunity in HIV-1 infection. *Blood.* 103(6):2180-6.
60. Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR. 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature.* 381(6584):661-6.
61. Dion ML, Poulin JF, Bordi R, Sylvestre M, Corsini R, Kettaf N, Dalloul A, Boulassel MR, Debré P, Routy JP, Grossman Z, Sékaly RP, Cheynier R.

2004. HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation. *Immunity*. 21(6):757-68.
62. Doisne JM, Urrutia A, Lacabartz-Porret C, Goujard C, Meyer L, Chaix ML, Sinet M, Venet A. 2004. CD8+ T cells specific for EBV, cytomegalovirus, and influenza virus are activated during primary HIV infection. *J Immunol*. 15;173(4):2410-8.
63. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, Polis MA, Haase AT, Feinberg MB, Sullivan JL, Jamieson BD, Zack JA, Picker LJ, Koup RA. 1998. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*. 396(6712):690-5.
64. Douek DC, Betts MR, Hill BJ, Little SJ, Lempicki R, Metcalf JA, Casazza J, Yoder C, Adelsberger JW, Stevens RA, Baseler MW, Keiser P, Richman DD, Davey RT, Koup RA. 2001. Evidence for increased T cell turnover and decreased thymic output in HIV infection. *J Immunol*. 167(11):6663-8.
65. Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, Casazza JP, Kuruppu J, Kunstman K, Wolinsky S, Grossman Z, Dybul M, Oxenius A, Price DA, Connors M, Koup RA. 2002. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature*. 417(6884):95-8.
66. Douek DC, Picker LJ, Koup RA. 2003a. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol*. 21:265-304.
67. Douek DC. 2003b. Disrupting T-cell homeostasis: how HIV-1 infection causes disease. *AIDS Rev*. 5(3):172-7.
68. Douek DC, Roederer M, Koup RA. 2009. Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annu Rev Med*. 60:471-84.
69. Drazen JM. 2006. Volunteers at risk. *N Engl J Med*. 355(10):1060-1.
70. D'Souza M, Fontenot AP, Mack DG, Lozupone C, Dillon S, Meditz A, Wilson CC, Connick E, Palmer BE. 2007. Programmed death 1 expression on HIV-specific CD4+ T cells is driven by viral replication and associated with T cell dysfunction. *J Immunol*. 179(3):1979-87.
71. Dunham RM, Cervasi B, Brenchley JM, Albrecht H, Weintrob A, Sumpter B, Engram J, Gordon S, Klatt NR, Frank I, Sodora DL, Douek DC,

- Paiardini M, Silvestri G. 2008. CD127 and CD25 expression defines CD4+ T cell subsets that are differentially depleted during HIV infection. *J Immunol.* 180(8):5582-92.
72. Effros RB, Allsopp R, Chiu CP, Hausner MA, Hirji K, Wang L, Harley CB, Villeponteau B, West MD, Giorgi JV. 1996. Shortened telomeres in the expanded CD28-CD8+ cell subset in HIV disease implicate replicative senescence in HIV pathogenesis. *AIDS.* 10(8):F17-22.
73. Ejrnaes M, Filippi CM, Martinic MM, Ling EM, Togher LM, Crotty S, von Herrath MG. 2006. Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. *J Exp Med.* 203(11):2461-72.
74. Emu B, Sinclair E, Favre D, Moretto WJ, Hsue P, Hoh R, Martin JN, Nixon DF, McCune JM, Deeks SG. 2005. 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.* 79(22):14169-78.
75. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science.* 272(5263):872-7.
76. Finnefrock AC, Tang A, Li F, Freed DC, Feng M, Cox KS, Sykes KJ, Guare JP, Miller MD, Olsen DB, Hazuda DJ, Shiver JW, Casimiro DR, Fu TM. 2009. PD-1 blockade in rhesus macaques: impact on chronic infection and prophylactic vaccination. *J Immunol.* 182(2):980-7.
77. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol.* 147(11):3815-22.
78. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T. 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 192(7):1027-34.

79. Gamberg J, Pardoe I, Bowmer MI, Howley C, Grant M. 2004. Lack of CD28 expression on HIV-specific cytotoxic T lymphocytes is associated with disease progression. *Immunol Cell Biol.* 82(1):38-46.
80. Gaucher D, Therrien R, Kettaf N, Angermann BR, Boucher G, Filali-Mouhim A, Moser JM, Mehta RS, Drake DR 3rd, Castro E, Akondy R, Rinfret A, Yassine-Diab B, Said EA, Chouikh Y, Cameron MJ, Clum R, Kelvin D, Somogyi R, Greller LD, Balderas RS, Wilkinson P, Pantaleo G, Tartaglia J, Haddad EK, Sékaly RP. 2008. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J Exp Med.* 205(13):3119-31.
81. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 133(4):1710-5.
82. Giannoni F, Barnett J, Bi K, Samodal R, Lanza P, Marchese P, Billetta R, Vita R, Klein MR, Prakken B, Kwok WW, Sercarz E, Altman A, Albani S. 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(6):3204-11.
83. Giorgi JV, Liu Z, Hultin LE, Cumberland WG, Hennessey K, Detels R. 1993. Elevated levels of CD38+ CD8+ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 6(8): 904-12.
84. Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, Johnson TD, Owens B, Jacobson LP, Shih R, Lewis J, Wiley DJ, Phair JP, Wolinsky SM, Detels R. 1999. 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.* 179(4): 859-70.
85. Golden-Mason L, Palmer B, Klarquist J, Mengshol JA, Castelblanco N, Rosen HR. 2007. Upregulation of PD-1 expression on circulating and

- intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells associated with reversible immune dysfunction. *J Virol.* 81(17):9249-58.
86. Golden-Mason L, Klarquist J, Wahed AS, Rosen HR. 2008. Cutting edge: programmed death-1 expression is increased on immunocytes in chronic hepatitis C virus and predicts failure of response to antiviral therapy: race-dependent differences. *J Immunol.* 180(6):3637-41.
87. Golden-Mason L, Palmer BE, Kassam N, Townshend-Bulson L, Livingston S, McMahon BJ, Castelblanco N, Kuchroo V, Gretch DR, Rosen HR. 2009. Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Virol.* 83(18):9122-30.
88. Goonetilleke N, Liu MK, Salazar-Gonzalez JF, Ferrari G, Giorgi E, Ganusov VV, Keele BF, Learn GH, Turnbull EL, Salazar MG, Weinhold KJ, Moore S; CHAVI Clinical Core B, Letvin N, Haynes BF, Cohen MS, Hraber P, Bhattacharya T, Borrow P, Perelson AS, Hahn BH, Shaw GM, Korber BT, McMichael AJ. 2009. The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *J Exp Med.* 206(6):1253-72.
89. Gordon SN, Klatt NR, Bosinger SE, Brenchley JM, Milush JM, Engram JC, Dunham RM, Paiardini M, Klucking S, Danesh A, Strobert EA, Apetrei C, Pandrea IV, Kelvin D, Douek DC, Staprans SI, Sodora DL, Silvestri G. 2007. Severe depletion of mucosal CD4⁺ T cells in AIDS-free simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *J Immunol.* 179(5): 3026-34.
90. Gougeon ML. 2005. To kill or be killed: how HIV exhausts the immune system. *Cell Death Differ.* 12 (S1):845-54.
91. Goulder PJ, Phillips RE, Colbert RA, McAdam S, Ogg G, Nowak MA, Giangrande P, Luzzi G, Morgan B, Edwards A, McMichael AJ, Rowland-Jones S. 1997. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat Med.* 3(2):212-7.

92. Granelli-Piperno A, Golebiowska A, Trumfheller C, Siegal FP, Steinman RM. 2004. HIV-1-infected monocyte-derived dendritic cells do not undergo maturation but can elicit IL-10 production and T cell regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101(20):7669-74.
93. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. 2005. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*. 23:515-48.
94. Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A, Dandekar S. 2003. Severe CD4⁺ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol*. 77(21):11708-17.
95. Gurney KB, Uittenbogaart CH. 2006. Human immunodeficiency virus persistence and production in T-cell development. *Clin Vaccine Immunol*. 13(11):1237-45.
96. Ha SJ, Mueller SN, Wherry EJ, Barber DL, Aubert RD, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. 2008. Enhancing therapeutic vaccination by blocking PD-1-mediated inhibitory signals during chronic infection. *J Exp Med*. 205(3):543-55.
97. Harari A, Rizzardi GP, Ellefsen K, Ciuffreda D, Champagne P, Bart PA, Kaufmann D, Telenti A, Sahli R, Tambussi G, Kaiser L, Lazzarin A, Perrin L, Pantaleo G. 2002. Analysis of HIV-1- and CMV-specific memory CD4 T-cell responses during primary and chronic infection. *Blood*. 100(4):1381-7.
98. Harari A, Petitpierre S, Vallelian F, Pantaleo G. 2004. Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy. *Blood*. 103(3):966-72.
99. Harari A, Vallelian F, Meylan PR, Pantaleo G. 2005a. Functional heterogeneity of memory CD4 T cell responses in different conditions of antigen exposure and persistence. *J Immunol*. 174(2):1037-45.

100. Harari A, Pantaleo G. 2005b. Understanding what makes a good versus a bad vaccine. *Eur J Immunol.* 35(9):2528-31.
101. Harari A, Cellerai C, Enders FB, Köstler J, Codarri L, Tapia G, Boyman O, Castro E, Gaudieri S, James I, John M, Wagner R, Mallal S, Pantaleo G. 2007. Skewed association of polyfunctional antigen-specific CD8 T cell populations with HLA-B genotype. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104(41):16233-8.
102. Hatzakis A, Touloumi G, Karanicolos R, Karafoulidou A, Mandalaki T, Anastassopoulou C, Zhang L, Goedert JJ, Ho DD, Kostrikis LG. 2000. Effect of recent thymic emigrants on progression of HIV-1 disease. *Lancet.* 355(9204):599-604.
103. Haynes BF, Hale LP, Weinhold KJ, Patel DD, Liao HX, Bressler PB, Jones DM, Demarest JF, Gebhard-Mitchell K, Haase AT, Bartlett JA. 1999. Analysis of the adult thymus in reconstitution of T lymphocytes in HIV-1 infection. *J Clin Invest.* 103(4):453-60.
104. Hazenberg MD, Stuart JW, Otto SA, Borleffs JC, Boucher CA, de Boer RJ, Miedema F, 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(1): 249-55.
105. Hazenberg MD, Otto SA, van Benthem BH, Roos MT, Coutinho RA, Lange JM, Hamann D, Prins M, Miedema F. 2003. Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *AIDS* 17(13): 1881-8.
106. Heeney JL, Plotkin SA. 2006. Immunological correlates of protection from HIV infection and disease. *Nat Immunol.* 7(12):1281-4.
107. Heikenwalder M, Polymenidou M, Junt T, Sigurdson C, Wagner H, Akira S, Zinkernagel R, Aguzzi A. 2004. Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. *Nat Med.* 10(2):187-92.

108. Hellerstein M, Hanley MB, Cesar D, Siler S, Papageorgopoulos C, Wieder E, Schmidt D, Hoh R, Neese R, Macallan D, Deeks S, McCune JM. 1999. Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans. *Nat Med.* 5(1):83-9.
109. Hellerstein MK, Hoh RA, Hanley MB, Cesar D, Lee D, Neese RA, McCune JM. 2003. Subpopulations of long-lived and short-lived T cells in advanced HIV-1 infection. *J Clin Invest.* 112(6):956-66.
110. Hendriks J, Gravestein LA, Tesselaar K, van Lier RA, Schumacher TN, Borst J. 2000. CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nat Immunol.* 1(5):433-40.
111. Hendriks J, Xiao Y, Borst J. 2003. CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool. *J Exp Med.* 198(9):1369-80.
112. Hodi FS, Mihm MC, Soiffer RJ, Haluska FG, Butler M, Seiden MV, Davis T, Henry-Spires R, MacRae S, Willman A, Padera R, Jaklitsch MT, Shankar S, Chen TC, Korman A, Allison JP, Dranoff G. 2003. Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(8):4712-7.
113. Homann D, Dummer W, Wolfe T, Rodrigo E, Theofilopoulos AN, Oldstone MB, von Herrath MG. 2006. Lack of intrinsic CTLA-4 expression has minimal effect on regulation of antiviral T-cell immunity. *J Virol.* 80(1):270-80.
114. Hryniewicz A, Boasso A, Edghill-Smith Y, Vaccari M, Fuchs D, Venzon D, Nacsa J, Betts MR, Tsai WP, Heraud JM, Beer B, Blanset D, Chougnet C, Lowy I, Shearer GM, Franchini G. 2006. CTLA-4 blockade decreases TGF-beta,IDO, and viral RNA expression in tissues of SIVmac251-infected macaques. *Blood.* 108(12):3834-42.
115. Huber M, Trkola A. Humoral immunity to HIV-1: neutralization and beyond. 2007. *J Intern Med.* 262(1):5-25.

116. Ibarondo FJ, Anton PA, Fuerst M, Ng HL, Wong JT, Matud J, Elliott J, Shih R, Hausner MA, Price C, Hultin LE, Hultin PM, Jamieson BD, Yang OO. 2005. Parallel human immunodeficiency virus type 1-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses in blood and mucosa during chronic infection. *J Virol.* 79(7):4289-97.
117. Imami N, Pires A, Hardy G, Wilson J, Gazzard B, Gotch F. 2002. A balanced type 1/type 2 response is associated with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 76(18):9011-23.
118. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. 1992. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 11(11):3887-95.
119. Iyasere C, Tilton JC, Johnson AJ, Younes S, Yassine-Diab B, Sekaly RP, Kwok WW, Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, Hallahan CW, Davey RT Jr, Dybul M, Vogel S, Metcalf J, Connors M. 2003. Diminished proliferation of human immunodeficiency virus-specific CD4⁺ T cells is associated with diminished interleukin-2 (IL-2) production and is recovered by exogenous IL-2. *J Virol.* 77(20):10900-9.
120. Jones NA, Wei X, Flower DR, Wong M, Michor F, Saag MS, Hahn BH, Nowak MA, Shaw GM, Borrow P. 2004. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 escape from the primary CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte response. *J Exp Med.* 200(10):1243-56.
121. Jones RB, Ndhlovu LC, Barbour JD, Sheth PM, Jha AR, Long BR, Wong JC, Satkunarajah M, Schweneker M, Chapman JM, Gyenes G, Vali B, Hyrcza MD, Yue FY, Kovacs C, Sassi A, Loutfy M, Halpenny R, Persad D, Spotts G, Hecht FM, Chun TW, McCune JM, Kaul R, Rini JM, Nixon DF, Ostrowski MA. 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(12):2763-79.

122. Joshi VV, Oleske JM, Saad S, Gadol C, Connor E, Bobila R, Minnefor AB. 1986. Thymus biopsy in children with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med.* 110(9):837-42.
123. Ju Y, Hou N, Zhang XN, Zhao D, Liu Y, Wang JJ, Luan F, Shi W, Zhu FL, Sun WS, Zhang LN, Gao CJ, Gao LF, Liang XH, Ma CH. 2009. Blockade of Tim-3 pathway ameliorates interferon-gamma production from hepatic CD8+ T cells in a mouse model of hepatitis B virus infection. *Cell Mol Immunol.* 6(1):35-43.
124. Kaufmann DE, Bailey PM, Sidney J, Wagner B, Norris PJ, Johnston MN, Cosimi LA, Addo MM, Lichterfeld M, Altfeld M, Frahm N, Brander C, Sette A, Walker BD, Rosenberg ES. 2004. Comprehensive analysis of human immunodeficiency virus type 1-specific CD4 responses reveals marked immunodominance of gag and nef and the presence of broadly recognized peptides. *J Virol.* 78(9):4463-77.
125. Kaufmann DE, Kavanagh DG, Pereyra F, Zaunders JJ, Mackey EW, Miura T, Palmer S, Brockman M, Rathod A, Piechocka-Trocha A, Baker B, Zhu B, Le Gall S, Waring MT, Ahern R, Moss K, Kelleher AD, Coffin JM, Freeman GJ, Rosenberg ES, Walker BD. 2007. Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat Immunol.* 8(11):1246-54.
126. Kaufmann GR, Cunningham P, Kelleher AD, Zaunders J, Carr A, Vizzard J, Law M, Cooper DA. 1998a. Patterns of viral dynamics during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. The Sydney Primary HIV Infection Study Group. *J Infect Dis.* 178(6):1812-5.
127. Kaufmann GR, Duncombe C, Zaunders J, Cunningham P, Cooper D. 1998b. Primary HIV-1 infection: a review of clinical manifestations, immunologic and virologic changes. *AIDS Patient Care STDS.* 12(10):759-67.
128. Kaul R, Rutherford J, Rowland-Jones SL, Kimani J, Onyango JI, Fowke K, MacDonald K, Bwayo JJ, McMichael AJ, Plummer FA. 2004.

- HIV-1 Env-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in exposed, uninfected Kenyan sex workers: a prospective analysis. *AIDS*. 18(15):2087-9.
129. Kaur A, Grant RM, Means RE, McClure H, Feinberg M, Johnson RP. 1998. Diverse host responses and outcomes following simian immunodeficiency virus SIVmac239 infection in sooty mangabeys and rhesus macaques. *J Virol*. 72(12): 9597-611.
130. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. 2008. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 26:677-704.
131. Kiepiela P, Ngumbela K, Thobakgale C, Ramduth D, Honeyborne I, Moodley E, Reddy S, de Pierres C, Mncube Z, Mkhwanazi N, Bishop K, van der Stok M, Nair K, Khan N, Crawford H, Payne R, Leslie A, Prado J, Prendergast A, Frater J, McCarthy N, Brander C, Learn GH, Nickle D, Rousseau C, Coovadia H, Mullins JI, Heckerman D, Walker BD, Goulder P. 2007. CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat Med*. 13(1):46-53.
132. Kinter AL, Godbout EJ, McNally JP, Sereti I, Roby GA, O'Shea MA, Fauci AS. 2008. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J Immunol*. 181(10):6738-46.
133. Klooverpris H, Karlsson I, Bonde J, Thorn M, Vinner L, Pedersen AE, Hentze JL, Andresen BS, Svane IM, Gerstoft J, Kronborg G, Fomsgaard A. 2009. Induction of novel CD8+ T-cell responses during chronic untreated HIV-1 infection by immunization with subdominant cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *AIDS*. 23(11):1329-40.
134. Koesters SA, Alimonti JB, Wachihhi C, Matu L, Anzala O, Kimani J, Embree JE, Plummer FA, Fowke KR. 2006. IL-7Ralpha expression on CD4+ T lymphocytes decreases with HIV disease progression and inversely correlates with immune activation. *Eur J Immunol*. 36(2):336-44.
135. Koga N, Suzuki J, Kosuge H, Haraguchi G, Onai Y, Futamatsu H, Maejima Y, Gotoh R, Saiki H, Tsushima F, Azuma M, Isobe M. 2004.

- Blockade of the interaction between PD-1 and PD-L1 accelerates graft arterial disease in cardiac allografts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(11):2057-62.
136. Koning FA, Otto SA, Hazenberg MD, Dekker L, Prins M, Miedema F, Schuitemaker H. 2005. Low-level CD4⁺ T cell activation is associated with low susceptibility to HIV-1 infection. *J Immunol.* 175(9): 6117-22.
137. Koup RA. 1994a. Virus escape from CTL recognition. *J Exp Med.* 180(3):779-82.
138. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, Farthing C, Ho DD. 1994b. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol.* 68(7):4650-5.
139. Kozono H, White J, Clements J, Marrack P, Kappler J. 1994. Production of soluble MHC class II proteins with covalently bound single peptides. *Nature.* 369(6476):151-4.
140. Kunkel EJ, Boisvert J, Murphy K, Vierra MA, Genovese MC, Wardlaw AJ, Greenberg HB, Hodge MR, Wu L, Butcher EC, Campbell JJ. 2002. Expression of the chemokine receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by human tissue-infiltrating lymphocytes. *Am J Pathol.* 160(1):347-55.
141. Lafeuillade A, Poizot-Martin I, Quilichini R, Gastaut JA, Kaplanski S, Farnarier C, Mege JL, Bongrand P. 1991. Increased interleukin-6 production is associated with disease progression in HIV infection. *AIDS.* 5(9):1139-40.
142. Lambert PH, Liu M, Siegrist CA. 2005. Can successful vaccines teach us how to induce efficient protective immune responses? *Nat Med.* 11(4 Suppl):S54-62.
143. Lanzavecchia A, Sallusto F. 2005. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol.* 17(3):326-32.
144. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N,

- Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ. 2001. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol.* 2(3):261-8.
145. Lemaître F, Viguier M, Cho MS, Fourneau JM, Maillère B, Kourilsky P, Van Endert PM, Ferradini L. 2004. Detection of low-frequency human antigen-specific CD4(+) T cells using MHC class II multimer bead sorting and immunoscope analysis. *Eur J Immunol.* 34(10):2941-9.
146. Lempicki RA, Kovacs JA, Baseler MW, Adelsberger JW, Dewar RL, Natarajan V, Bosche MC, Metcalf JA, Stevens RA, Lambert LA, Alvord WG, Polis MA, Davey RT, Dimitrov DS, Lane HC. 2000. Impact of HIV-1 infection and highly active antiretroviral therapy on the kinetics of CD4+ and CD8+ T cell turnover in HIV-infected patients. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(25):13778-83.
147. Leng Q, Borkow G, Weisman Z, Stein M, Kalinkovich A, Bentwich Z. 2001. Immune activation correlates better than HIV plasma viral load with CD4 T-cell decline during HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 27(4):389-97.
148. Letvin NL, Mascola JR, Sun Y, Gorgone DA, Buzby AP, Xu L, Yang ZY, Chakrabarti B, Rao SS, Schmitz JE, Montefiori DC, Barker BR, Bookstein FL, Nabel GJ. 2006. Preserved CD4+ central memory T cells and survival in vaccinated SIV-challenged monkeys. *Science.* 312(5779):1530-3.
149. Letvin NL. 2007. Correlates of immune protection and the development of a human immunodeficiency virus vaccine. *Immunity.* 27(3):366-9.
150. Li Q, Duan L, Estes JD, Ma ZM, Rourke T, Wang Y, Reilly C, Carlis J, Miller CJ, Haase AT. 2005. Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature.* 434(7037):1148-52.

151. Lichterfeld M, Yu XG, Mui SK, Williams KL, Trocha A, Brockman MA, Allgaier RL, Waring MT, Koibuchi T, Johnston MN, Cohen D, Allen TM, Rosenberg ES, Walker BD, Altfeld M. 2007. Selective depletion of high-avidity human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD8⁺ T cells after early HIV-1 infection. *J Virol.* 81(8):4199-214.
152. Lin SJ, Peacock CD, Bahl K, Welsh RM. 2007. Programmed death-1 (PD-1) defines a transient and dysfunctional oligoclonal T cell population in acute homeostatic proliferation. 2007. *J Exp Med.* 204(10):2321-33.
153. Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Prince HE, Detels R, Giorgi JV. 1997. Elevated CD38 antigen expression on CD8⁺ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4⁺ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 16(2): 83-92.
154. Liu Y, McNevin J, Cao J, Zhao H, Genowati I, Wong K, McLaughlin S, McSweyn MD, Diem K, Stevens CE, Maenza J, He H, Nickle DC, Shriner D, Holte SE, Collier AC, Corey L, McElrath MJ, Mullins JI. 2006. Selection on the human immunodeficiency virus type 1 proteome following primary infection. *J Virol.* 80(19):9519-29.
155. Lu W, Arraes LC, Ferreira WT, Andrieu JM. 2004. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat Med.* 10(12):1359-65.
156. Lucas M, Day CL, Wyer JR, Cunliffe SL, Loughry A, McMichael AJ, Klenerman P. 2004. Ex vivo phenotype and frequency of influenza virus-specific CD4 memory T cells. *J Virol.* 78(13):7284-7.
157. Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R. 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell.* 47(3):333-48.
158. Mahajan VS, Leskov IB, Chen JZ. 2005. Homeostasis of T cell diversity. *Cell Mol Immunol.* 2(1):1-10.

159. Maier H, Isogawa M, Freeman GJ, Chisari FV. 2007. PD-1:PD-L1 interactions contribute to the functional suppression of virus-specific CD8⁺ T lymphocytes in the liver. *J Immunol.* 178(5):2714-20.
160. Makedonas G, Bruneau J, Alary M, Tsoukas CM, Lowndes CM, Lamothe F, Bernard NF. 2005. Comparison of HIV-specific CD8 T-cell responses among uninfected individuals exposed to HIV parenterally and mucosally. *AIDS.* 19(3):251-9.
161. Mallone R, Nepom GT. 2004. MHC Class II tetramers and the pursuit of antigen-specific T cells: define, deviate, delete. *Clin Immunol.* 110(3):232-42.
162. Mandl JN, Barry AP, Vanderford TH, Kozyr N, Chavan R, Klucking S, Barrat FJ, Coffman RL, Staprans SI, Feinberg MB. 2008. Divergent TLR7 and TLR9 signaling and type I interferon production distinguish pathogenic and nonpathogenic AIDS virus infections. *Nat Med.* 14(10):1077-87.
163. Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R. 1994. CD4⁺ T cells are required to sustain CD8⁺ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J Virol.* 68(12):8056-63.
164. Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M. 2005. Massive infection and loss of memory CD4⁺ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature.* 434(7037):1093-7.
165. Matter M, Odermatt B, Yagita H, Nuoffer JM, Ochsenbein AF. 2006. Elimination of chronic viral infection by blocking CD27 signaling. *J Exp Med.* 203(9):2145-55.
166. McBride JM, Jung T, de Vries JE, Aversa G. 2002. IL-10 alters DC function via modulation of cell surface molecules resulting in impaired T-cell responses. *Cell Immunol.* 215(2):162-72.
167. McCune JM. 1997. Thymic function in HIV-1 disease. *Semin Immunol.* 9(6):397-404.
168. McElrath MJ, De Rosa SC, Moodie Z, Dubey S, Kierstead L, Janes H, Defawe OD, Carter DK, Hural J, Akondy R, Buchbinder SP, Robertson

- MN, Mehrotra DV, Self SG, Corey L, Shiver JW, Casimiro DR; Step Study Protocol Team. 2008. HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis. *Lancet*. 372(9653):1894-905.
169. Medrano FJ, Leal M, Arienti D, Rey C, Zagliani A, Torres Y, Sanchez-Quijano A, Lissen E, Clerici M. 1998. Tumor necrosis factor beta and soluble APO-1/Fas independently predict progression to AIDS in HIV-seropositive patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 14(10):835-43.
170. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, Boden D, Racz P, Markowitz M. 2004. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med*. 200(6):761-70.
171. Meier A, Alter G, Frahm N, Sidhu H, Li B, Bagchi A, Teigen N, Streeck H, Stellbrink HJ, Hellman J, van Lunzen J, Altfeld M. 2007. MyD88-dependent immune activation mediated by human immunodeficiency virus type 1-encoded Toll-like receptor ligands. *J Virol*. 81(15):8180-91.
172. Mellors JW, Rinaldo CR Jr, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. 1996. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science*. 272(5265):1167-70.
173. Mercier F, Boulassel MR, Yassine-Diab B, Tremblay C, Bernard NF, Sekaly RP, Routy JP. 2008. Persistent human immunodeficiency virus-1 antigenaemia affects the expression of interleukin-7Ralpha on central and effector memory CD4+ and CD8+ T cell subsets. *Clin Exp Immunol*. 52(1):72-80.
174. Miller JD, van der Most RG, Akondy RS, Glidewell JT, Albott S, Masopust D, Murali-Krishna K, Mahar PL, Edupuganti S, Lalor S, Germon S, Del Rio C, Mulligan MJ, Staprans SI, Altman JD, Feinberg MB, Ahmed R. 2008. Human effector and memory CD8+ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. *Immunity*. 28(5):710-22.

175. Molina JM, Scadden DT, Byrn R, Dinarello CA, Groopman JE. 1989. Production of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta by monocytic cells infected with human immunodeficiency virus. *J Clin Invest.* 84(3):733-7.
176. Mosmann TR, Moore KW. 1991. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol Today.* 12(3):A49-53.
177. Mueller SN, Ahmed R. 2009. High antigen levels are the cause of T cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(21):8623-8.
178. Mueller YM, De Rosa SC, Hutton JA, Witek J, Roederer M, Altman JD, Katsikis PD. 2001. Increased CD95/Fas-induced apoptosis of HIV-specific CD8(+) T cells. *Immunity.* 15(6):871-82.
179. Mühlbauer M, Fleck M, Schütz C, Weiss T, Froh M, Blank C, Schölmerich J, Hellerbrand C. 2006. PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and -gamma and mediates T cell apoptosis. *J Hepatol.* 45(4):520-8.
180. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. 1999. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity.* 11(2):141-51.
181. Novak EJ, Liu AW, Nepom GT, Kwok WW. 1999. MHC class II tetramers identify peptide-specific human CD4(+) T cells proliferating in response to influenza A antigen. *J Clin Invest.* 104(12):R63-7.
182. Okoye A, Meier-Schellersheim M, Brenchley JM, Hagen SI, Walker JM, Rohankhedkar M, Lum R, Edgar JB, Planer SL, Legasse A, Sylwester AW, Piatak M Jr, Lifson JD, Maino VC, Sodora DL, Douek DC, Axthelm MK, Grossman Z, Picker LJ. 2007. Progressive CD4+ central memory T cell decline results in CD4+ effector memory insufficiency and overt disease in chronic SIV infection. *J Exp Med.* 204(9):2171-85.

183. Paiardini M, Cervasi B, Albrecht H, Muthukumar A, Dunham R, Gordon S, Radziewicz H, Piedimonte G, Magnani M, Montroni M, Kaech SM, Weintrob A, Altman JD, Sadora DL, Feinberg MB, Silvestri G. 2005. Loss of CD127 expression defines an expansion of effector CD8⁺ T cells in HIV-infected individuals. *J Immunol.* 174(5):2900-9.
184. Palmer BE, Blyveis N, Fontenot AP, Wilson CC. 2005. Functional and phenotypic characterization of CD57⁺CD4⁺ T cells and their association with HIV-1-induced T cell dysfunction. *J Immunol.* 175(12):8415-23.
185. Palucka AK, Ueno H, Fay JW, Banchereau J. 2007. Taming cancer by inducing immunity via dendritic cells. *Immunol Rev.* 220:129-50.
186. Pandrea IV, Gautam R, Ribeiro RM, Brenchley JM, Butler IF, Pattison M, Rasmussen T, Marx PA, Silvestri G, Lackner AA, Perelson AS, Douek DC, Veazey RS, Apetrei C. 2007. Acute loss of intestinal CD4⁺ T cells is not predictive of simian immunodeficiency virus virulence. *J Immunol.* 179(5):3035-46.
187. Pantaleo G, Demarest JF, Soudeyns H, Graziosi C, Denis F, Adelsberger JW, Borrow P, Saag MS, Shaw GM, Sekaly RP, Fauci AS. 1994. Major expansion of CD8⁺ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV. *Nature.* 370(6489):463-7.
188. Pantaleo G, Fauci AS. 1996. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol.* 50:825-54.
189. Pantaleo G, Koup RA. 2004. Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know. *Nat Med.* 10(8):806-10.
190. Pantaleo G, Harari A. 2006. Functional signatures in antiviral T-cell immunity for monitoring virus-associated diseases. *Nat Rev Immunol.* 6(5):417-23.
191. Papagno L, Appay V, Sutton J, Rostron T, Gillespie GM, Ogg GS, King A, Makadanzhge AT, Waters A, Balotta C, Vyakarnam A, Easterbrook PJ, Rowland-Jones SL. 2002. Comparison between HIV- and

- CMV-specific T cell responses in long-term HIV infected donors. *Clin Exp Immunol.* 130(3):509-17.
192. Papagno L, Spina CA, Marchant A, Salio M, Rufer N, Little S, Dong T, Chesney G, Waters A, Easterbrook P, Dunbar PR, Shepherd D, Cerundolo V, Emery V, Griffiths P, Conlon C, McMichael AJ, Richman DD, Rowland-Jones SL, Appay V. 2004. Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection. *PLoS Biol.* 2(2):E20.
193. Peng G, Li S, Wu W, Tan X, Chen Y, Chen Z. 2008. PD-1 upregulation is associated with HBV-specific T cell dysfunction in chronic hepatitis B patients. *Mol Immunol.* 45(4):963-70.
194. Penna A, Pilli M, Zerbini A, Orlandini A, Mezzadri S, Sacchelli L, Missale G, Ferrari C. 2007. Dysfunction and functional restoration of HCV-specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 45(3):588-601.
195. Pentcheva-Hoang T, Chen L, Pardoll DM, Allison JP. 2007. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(45):17765-70.
196. Petravic J, Loh L, Kent SJ, Davenport MP. 2008. CD4+ target cell availability determines the dynamics of immune escape and reversion in vivo. *J Virol.* 82(8):4091-101.
197. Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM, Price DA, Gostick E, Adams WC, Precopio ML, Schacker T, Roederer M, Douek DC, Koup RA. 2006. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med.* 203(10):2281-92.
198. Petrovas C, Chaon B, Ambrozak DR, Price DA, Melenhorst JJ, Hill BJ, Geldmacher C, Casazza JP, Chattopadhyay PK, Roederer M, Douek DC, Mueller YM, Jacobson JM, Kulkarni V, Felber BK, Pavlakis GN, Katsikis PD, Koup RA. 2009. Differential association of programmed

- death-1 and CD57 with ex vivo survival of CD8+ T cells in HIV infection. *J Immunol.* 183(2):1120-32.
199. Phan GQ, Yang JC, Sherry RM, Hwu P, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Restifo NP, Haworth LR, Seipp CA, Freezer LJ, Morton KE, Mavroukakis SA, Duray PH, Steinberg SM, Allison JP, Davis TA, Rosenberg SA. 2003. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(14):8372-7.
200. Phillips AN. 1996. Reduction of HIV concentration during acute infection: independence from a specific immune response. *Science.* 271(5248):497-9.
201. Picker LJ, Hagen SI, Lum R, Reed-Inderbitzin EF, Daly LM, Sylwester AW, Walker JM, Siess DC, Piatak M Jr, Wang C, Allison DB, Maino VC, Lifson JD, Kodama T, Axthelm MK. 2004. Insufficient production and tissue delivery of CD4+ memory T cells in rapidly progressive simian immunodeficiency virus infection. *J Exp Med.* 200(10):1299-314.
202. Pope M, Haase AT. 2003. Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. *Nat Med.* 9(7):847-52.
203. Potter SJ, Lacabaratz C, Lambotte O, Perez-Patigeon S, Vingert B, Sinet M, Colle JH, Urrutia A, Scott-Algara D, Boufassa F, Delfraissy JF, Thèze J, Venet A, Chakrabarti LA. 2007. Preserved central memory and activated effector memory CD4+ T-cell subsets in human immunodeficiency virus controllers: an ANRS EP36 study. *J Virol.* 81(24):13904-15.
204. Poulin JF, Viswanathan MN, Harris JM, Komanduri KV, Wieder E, Ringuette N, Jenkins M, McCune JM, Sékaly RP. 1999. Direct evidence for thymic function in adult humans. *J Exp Med.* 190(4):479-86.
205. Precopio ML, Betts MR, Parrino J, Price DA, Gostick E, Ambrozak DR, Asher TE, Douek DC, Harari A, Pantaleo G, Bailer R, Graham BS, Roederer M, Koup RA. 2007. Immunization with vaccinia virus induces

- polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses. *J Exp Med.* 204(6):1405-16.
206. Price DA, Goulder PJ, Klenerman P, Sewell AK, Easterbrook PJ, Troop M, Bangham CR, Phillips RE. 1997. Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94(5):1890-5.
207. Radziewicz H, Ibegbu CC, Fernandez ML, Workowski KA, Obideen K, Wehbi M, Hanson HL, Steinberg JP, Masopust D, Wherry EJ, Altman JD, Rouse BT, Freeman GJ, Ahmed R, Grakoui A. 2007. Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression. *J Virol.* 81(6):2545-53.
208. Raffatellu M, Santos RL, Verhoeven DE, George MD, Wilson RP, Winter SE, Godinez I, Sankaran S, Paixao TA, Gordon MA, Kolls JK, Dandekar S, Bäumlér AJ. 2008. Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes *Salmonella* dissemination from the gut. *Nat Med.* 14(4):421-8.
209. Rethi B, Fluor C, Atlas A, Krzyzowska M, Mowafi F, Grützmeier S, De Milito A, Bellocco R, Falk KI, Rajnavölgyi E, Chiodi F. 2005. Loss of IL-7R α is associated with CD4 T-cell depletion, high interleukin-7 levels and CD28 down-regulation in HIV infected patients. *AIDS.* 19(18):2077-86.
210. Rieckmann P, Poli G, Fox CH, Kehrl JH, Fauci AS. 1991. Recombinant gp120 specifically enhances tumor necrosis factor- α production and Ig secretion in B lymphocytes from HIV-infected individuals but not from seronegative donors. *J Immunol.* 147(9):2922-7.
211. Roederer M, Dubs JG, Anderson MT, Raju PA, Herzenberg LA, Herzenberg LA. 1995. CD8 naive T cell counts decrease progressively in HIV-infected adults. *J Clin Invest.* 95(5):2061-6.

212. Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA, Walker BD. 1997. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science*. 278(5342):1447-50.
213. Sachsenberg N, Perelson AS, Yerly S, Schockmel GA, Leduc D, Hirschel B, Perrin L. 1998. Turnover of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in HIV-1 infection as measured by Ki-67 antigen. *J Exp Med*. 187(8):1295-303.
214. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. 2004. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 22:745-63.
215. Sauce D, Almeida JR, Larsen M, Haro L, Autran B, Freeman GJ, Appay V. 2007. PD-1 expression on human CD8 T cells depends on both state of differentiation and activation status. *AIDS*. 21(15):2005-13.
216. Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, Racz P, Tenner-Racz K, Dalesandro M, Scallon BJ, Ghayeb J, Forman MA, Montefiori DC, Rieber EP, Letvin NL, Reimann KA. 1999. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science*. 283(5403):857-60.
217. Schraven B, Kalinke U. 2008. CD28 superagonists: what makes the difference in humans? *Immunity*. 28(5):591-5.
218. Schuitemaker H, Koot M, Kootstra NA, Dercksen MW, de Goede RE, van Steenwijk RP, Lange JM, Schattenkerk JK, Miedema F, Tersmette M. 1992. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocyctotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol*. 66(3):1354-60.
219. Schwarting R, Gerdes J, Niehus J, Jaeschke L, Stein H. 1986. Determination of the growth fraction in cell suspensions by flow cytometry using the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol Methods*. 90(1):65-70.

220. Scott CA, Garcia KC, Carbone FR, Wilson IA, Teyton L. 1996. Role of chain pairing for the production of functional soluble IA major histocompatibility complex class II molecules. *J Exp Med*. 183(5):2087-95.
221. Scriba TJ, Purbhoo M, Day CL, Robinson N, Fidler S, Fox J, Weber JN, Klenerman P, Sewell AK, Phillips RE. 2005a. Ultrasensitive detection and phenotyping of CD4⁺ T cells with optimized HLA class II tetramer staining. *J Immunol*. 175(10):6334-43.
222. Scriba TJ, Zhang HT, Brown HL, Oxenius A, Tamm N, Fidler S, Fox J, Weber JN, Klenerman P, Day CL, Lucas M, Phillips RE. 2005b. HIV-1-specific CD4⁺ T lymphocyte turnover and activation increase upon viral rebound. *J Clin Invest*. 115(2):443-50.
223. Sekaly RP. 2008. The failed HIV Merck vaccine study: a step back or a launching point for future vaccine development? *J Exp Med*. 205(1):7-12.
224. Shacklett BL, Cox CA, Sandberg JK, Stollman NH, Jacobson MA, Nixon DF. 2003. Trafficking of human immunodeficiency virus type 1-specific CD8⁺ T cells to gut-associated lymphoid tissue during chronic infection. *J Virol*. 77(10):5621-31.
225. Silvestri G, Sodora DL, Koup RA, Paiardini M, O'Neil SP, McClure HM, Staprans SI, Feinberg MB. 2003. Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity*. 18(3): 441-52.
226. Silvestris F, Camarda G, Cafforio P, Dammacco F. 1998. Upregulation of Fas ligand secretion in non-lymphopenic stages of HIV-1 infection. *AIDS*. 18;12(9):1103-4.
227. Simone R, Floriani A, Saverino D. 2009. Stimulation of Human CD4 T Lymphocytes via TLR3, TLR5 and TLR7/8 Up-Regulates Expression of Costimulatory and Modulates Proliferation. *Open Microbiol J*. 3:1-8.
228. Smit-McBride Z, Mattapallil JJ, McChesney M, Ferrick D, Dandekar S. 1998. Gastrointestinal T lymphocytes retain high potential for

- cytokine responses but have severe CD4(+) T-cell depletion at all stages of simian immunodeficiency virus infection compared to peripheral lymphocytes. *J Virol.* 72(8):6646-56.
229. Sousa AE, Carneiro J, Meier-Schellersheim M, Grossman Z, Victorino RM. 2002. 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.* 169(6): 3400-6.
230. Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD, Panoskaltis N. 2006. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med.* 355(10):1018-28.
231. Swingler S, Mann A, Jacqué J, Brichacek B, Sasseville VG, Williams K, Lackner AA, Janoff EN, Wang R, Fisher D, Stevenson M. 1999. HIV-1 Nef mediates lymphocyte chemotaxis and activation by infected macrophages. *Nat Med.* 5(9):997-103.
232. Swingler S, Zhou J, Swingler C, Dauphin A, Greenough T, Jolicoeur P, Stevenson M. 2008. Evidence for a pathogenic determinant in HIV-1 Nef involved in B cell dysfunction in HIV/AIDS. *Cell Host Microbe.* 4(1):63-76.
233. Tesselaar K, Arens R, van Schijndel GM, Baars PA, van der Valk MA, Borst J, van Oers MH, van Lier RA. 2003. Lethal T cell immunodeficiency induced by chronic costimulation via CD27-CD70 interactions. *Nat Immunol.* 4(1):49-54.
234. Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, Lohse CM, Dong H, Webster WS, Krejci KG, Lobo JR, Sengupta S, Chen L, Zincke H, Blute ML, Strome SE, Leibovich BC, Kwon ED. 2004. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(49):17174-9.
235. Tilton JC, Luskin MR, Johnson AJ, Manion M, Hallahan CW, Metcalf JA, McLaughlin M, Davey RT Jr, Connors M. 2007. Changes in paracrine interleukin-2 requirement, CCR7 expression, frequency, and

- cytokine secretion of human immunodeficiency virus-specific CD4⁺ T cells are a consequence of antigen load. *J Virol.* 81(6):2713-25.
236. Topp MS, Riddell SR, Akatsuka Y, Jensen MC, Blattman JN, Greenberg PD. 2003. Restoration of CD28 expression in CD28⁻ CD8⁺ memory effector T cells reconstitutes antigen-induced IL-2 production. *J Exp Med.* 198(6):947-55.
237. Trabattoni D, Saresella M, Biasin M, Boasso A, Piacentini L, Ferrante P, Dong H, Maserati R, Shearer GM, Chen L, Clerici M. 2003. B7-H1 is up-regulated in HIV infection and is a novel surrogate marker of disease progression. *Blood.* 101(7):2514-20.
238. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, Boulassel MR, Delwart E, Sepulveda H, Balderas RS, Routy JP, Haddad EK, Sekaly RP. 2006. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8⁺ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med.* 12(10):1198-202.
239. Urbani S, Amadei B, Tola D, Massari M, Schivazappa S, Missale G, Ferrari C. 2006. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J Virol.* 80(22):11398-403.
240. Urbani S, Amadei B, Tola D, Pedrazzi G, Sacchelli L, Cavallo MC, Orlandini A, Missale G, Ferrari C. 2008. Restoration of HCV-specific T cell functions by PD-1/PD-L1 blockade in HCV infection: effect of viremia levels and antiviral treatment. *J Hepatol.* 48(4):548-58.
241. Valenzuela HF, Effros RB. 2002. Divergent telomerase and CD28 expression patterns in human CD4 and CD8 T cells following repeated encounters with the same antigenic stimulus. *Clin Immunol.* 105(2):117-25.
242. Van Grevenynghe J, Procopio FA, He Z, Chomont N, Riou C, Zhang Y, Gimmig S, Boucher G, Wilkinson P, Shi Y, Yassine-Diab B, Said EA, Trautmann L, El Far M, Balderas RS, Boulassel MR, Routy JP, Haddad EK, Sekaly RP. 2008. Transcription factor FOXO3a controls the

- persistence of memory CD4(+) T cells during HIV infection. *Nat Med.* 14(3):266-74.
243. Varbanov M, Espert L, Biard-Piechaczyk M. 2006. Mechanisms of CD4 T-cell depletion triggered by HIV-1 viral proteins. *AIDS Rev.* 8(4):221-36.
244. Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV, Shvetz DE, Pauley DR, Knight HL, Rosenzweig M, Johnson RP, Desrosiers RC, Lackner AA. 1998. Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science.* 280(5362):427-31.
245. Veazey RS, Tham IC, Mansfield KG, DeMaria M, Forand AE, Shvetz DE, Chalifoux LV, Sehgal PK, Lackner AA. 2000. Identifying the target cell in primary simian immunodeficiency virus (SIV) infection: highly activated memory CD4(+) T cells are rapidly eliminated in early SIV infection in vivo. *J Virol.* 74(1):57-64.
246. Veazey RS, Marx PA, Lackner AA. 2003. Vaginal CD4+ T cells express high levels of CCR5 and are rapidly depleted in simian immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis.* 187(5):769-76.
247. Velu V, Titanji K, Zhu B, Husain S, Pladevega A, Lai L, Vanderford TH, Chennareddi L, Silvestri G, Freeman GJ, Ahmed R, Amara RR. 2009. Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature.* 458(7235):206-10.
248. Walker BD, Burton DR. 2008. Toward an AIDS vaccine. *Science.* 320(5877):760-4.
249. Wang JK, Kiyokawa E, Verdin E, Trono D. 2000. The Nef protein of HIV-1 associates with rafts and primes T cells for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(1):394-9.
250. Wang X, Zhang Z, Zhang S, Fu J, Yao J, Jiao Y, Wu H, Wang FS. 2008. B7-H1 up-regulation impairs myeloid DC and correlates with disease progression in chronic HIV-1 infection. *Eur J Immunol.* 38(11):3226-36.
251. Weiss L, Haeffner-Cavaillon N, Laude M, Gilquin J, Kazatchkine MD. 1989. HIV infection is associated with the spontaneous production of

- interleukin-1 (IL-1) in vivo and with an abnormal release of IL-1 alpha in vitro. *AIDS*. 3(11):695-9.
252. Wilson JD, Ogg GS, Allen RL, Davis C, Shaunak S, Downie J, Dyer W, Workman C, Sullivan S, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. 2000. Direct visualization of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes during primary infection. *AIDS*. 14(3):225-33.
253. Yates A, Stark J, Klein N, Antia R, Callard R. 2007. Understanding the slow depletion of memory CD4+ T cells in HIV infection. *PLoS Med*. 4(5):e177.
254. Younes SA, Yassine-Diab B, Dumont AR, Boulassel MR, Grossman Z, Routy JP, Sekaly RP. 2003. HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity. *J Exp Med*. 198(12):1909-22.
255. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJ, Suresh M, Altman JD, Ahmed R. 1998. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med*. 188(12):2205-13.
256. Zhang JY, Zhang Z, Wang X, Fu JL, Yao J, Jiao Y, Chen L, Zhang H, Wei J, Jin L, Shi M, Gao GF, Wu H, Wang FS. 2007. PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8+ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood*. 109(11):4671-8.
257. Zhang L, Lewin SR, Markowitz M, Lin HH, Skulsky E, Karanickolas R, He Y, Jin X, Tuttleton S, Vesanen M, Spiegel H, Kost R, van Lunzen J, Stellbrink HJ, Wolinsky S, Borkowsky W, Palumbo P, Kostrikis LG, Ho DD. 1999. Measuring recent thymic emigrants in blood of normal and HIV-1-infected individuals before and after effective therapy. *J Exp Med*. 190(5):725-32.
258. Zimmerli SC, Harari A, Cellerai C, Vallelian F, Bart PA, Pantaleo G. 2005. HIV-1-specific IFN-gamma/IL-2-secreting CD8 T cells support CD4-independent proliferation of HIV-1-specific CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102(20):7239-44.

7. Annexe

Annexe 1 Identification de cellules T CD4⁺ spécifiques du VIH-1 en utilisant des tétramères de CMH de classe II

L'identification de cellules T CD4⁺ spécifiques d'un antigène est nécessaire à la compréhension de la pathogénèse des maladies humaines comme l'infection chronique par le VIH-1. La caractérisation *ex-vivo* de ces cellules est primordiale sachant qu'une étape de culture *in vitro* peut altérer la composition et la fonction de la population cellulaire d'intérêt.

Comme exposé dans le chapitre 4, nous avons développé un outil, les tétramères de CMH de classe II, afin de détecter les cellules T CD4⁺ spécifiques d'un antigène. Nous avons montré qu'il était possible de détecter des cellules T CD4⁺ spécifiques du peptide HA₃₀₆₋₃₁₈ dans une lignée générée par stimulations répétées de PBMCs d'un patient HLA-DR1 avec le peptide HA₃₀₆₋₃₁₈ (Chapitre 4, Figure 3a et Figure 4a,b,c,d).

Nous avons voulu ensuite détecter des cellules spécifiques du VIH-1 chez un patient en début d'infection chronique à l'aide de tétramères de CMH de classe II i.e. HLA-DR1/Gag p24-1 (Figure 1). Aucune cellule tétramère⁺ n'a pu être détectée *ex-vivo* dans des PBMCs, suggérant qu'une étape préalable d'enrichissement en cellules spécifiques de l'antigène était nécessaire. Nous avons donc mis en culture et stimulé avec un mix de peptides Gag des PBMCs d'un patient infecté par le VIH-1. Après stimulation peptidique, nous avons identifié une population tétramère⁺ qui a proliféré et dont la fréquence est de 2%. À noter que le patient étant virémique et non traité, des cellules tétramère⁻ prolifèrent même en l'absence de stimulation avec le mix de peptides Gag. De plus, lors de la stimulation par les peptides Gag, des cellules spécifiques d'un autre peptide que le peptide Gag p24-1 prolifèrent également.

Cette mise en culture nous permet donc de détecter des cellules spécifiques du VIH-1 qui sont capables de proliférer. Mais cette approche ne nous permet pas de détecter des cellules « épuisées » qui ont perdu leur capacité de proliférer.

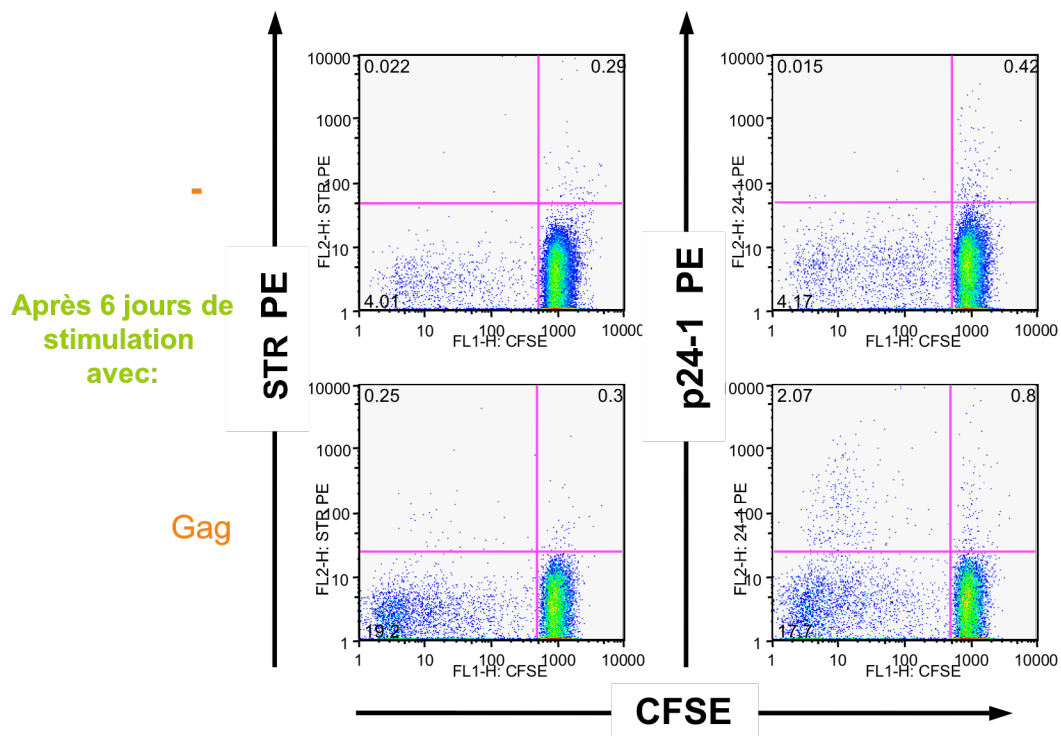


Figure 1 Identification avec un tétramère de CMH de classe II de cellules spécifiques du VIH-1. Les PBMCs d'un patient en début d'infection chronique sont colorées au CFSE puis stimulées ou non avec un mix de peptides Gag. Six jours après la stimulation, les cellules sont colorées pendant 3 heures à 37°C avec 20 µg/ml de tétramère HLA-DR1/Gag p24-1. Les cellules sont ensuite analysées au FACS. Les cellules spécifiques du peptide Gag p24-1 ont une fréquence de 2% après amplification par stimulation avec le mix de peptides Gag.

Annexe 2 PD-1: a critical regulator of T cell function and a strong target for immunotherapies for chronic viral infections.

Lydie Trautmann*^{1,2,3}, Elias A. Said*^{1,2,3}, Rabih Halwani*^{1,2,3}, Loury Janbazian^{1,4}, Nicolas Chomont^{1,2,3}, Mohamed El-Far^{1,2,3}, Gaëlle Breton^{1,2,3}, Elias K. Haddad^{1,2,3,4} and Rafick-Pierre Sekaly^{1,2,3,4}

¹Laboratoire d'Immunologie, Centre de Recherche CHUM Saint-Luc, Montréal, Québec, Canada

²Laboratoire d'Immunologie, Département de Microbiologie et d'Immunologie, Université de Montréal, Québec, Canada

³INSERM U743, CR-CHUM, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

⁴Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montréal, Québec, Canada

* Co-first authors

Corresponding author:

Rafick-Pierre Sékaly

Department of Microbiology & Immunology

Centre de Recherche Campus St. Luc

Pavillon Edouard-Asselin

264 rue René Levesque Est., Bureau 1307E

Montreal, QC H2X 1P1, Canada

Tel: 514-8908000 # 35288

Fax: 514-4127415

Abstract

Purpose of review

The intricate balance between positive and negative signals delivered by accessory molecules is crucial to generate efficient immune responses while maintaining tolerance and preventing autoimmunity. Of these molecules, PD-1 has been described as a negative regulator of T cell activation. This review will focus on current knowledge about PD-1 regulation in different diseases and discuss its potential benefits for the development of novel immune therapies.

Recent findings

Recent findings on PD-1 expression on HIV-specific CD8 T cells have introduced a new parameter to our understanding of HIV-specific CD8 and CD4 T cell exhaustion have shown that PD-1 was upregulated on HIV-specific CD8 T cells, where PD-1 expression level was significantly correlated with viral load. The blockade of PD-1/PD-L1 interaction enhanced the capacity of HIV-specific CD8 and CD4 T cells to proliferate and/or secrete cytokines and cytotoxic molecules. Future manipulations of this pathway could rescue the function of exhausted CD8 and CD4 T cells.

Summary

The engagement of PD-1 with its ligands induces inhibitory signals as it blocks TCR-induced T cell proliferation and cytokine production. The PD-1 pathway plays a crucial role in the maintenance of peripheral tolerance and in the pathogenesis of cancer and chronic viral infections. Understanding the mechanisms by which PD-1 interferes with T cell functions will pave the way for novel therapeutic immune interventions for the treatment of these diseases.

Keywords

autoimmunity, cancer, chronic viral infections, immunotherapy, programmed death 1

Introduction

The “two-signal” model governs optimal lymphocyte activation of the immune system where the first signal is triggered upon antigen recognition of lymphocytes in the context of MHC molecules, while the second signal is delivered by accessory molecules [1]. This model ensures proper discrimination of self from non-self antigens. In the absence of the second signal, lymphocytes fail to respond to specific antigens and are rendered anergic. The intricate balance between positive and negative signals delivered by accessory molecules is crucial to attaining effector immune responses while maintaining tolerance and preventing autoimmunity. Of these molecules, CD28 is known to associate with members of the B7 family mainly B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) and leads to lymphocyte proliferation and cytokine production. Moreover, ICOS engagement with its ligand (ICOSL) promotes T-helper-cell differentiation and effector function [2]. On the other hand, CTLA-4 delivers inhibitory signals and terminates lymphocyte activation by engaging B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) [3]. PD-1 molecule, which shares structural properties with members of the CD28 family, has also been shown to be a negative regulator of T cell activation [4-7]. A careful investigation of the expression patterns of these accessory molecules on CD8 and CD4 T cells from different chronic viral infections will significantly contribute to the understanding of the underlying mechanisms of CD8 and CD4 T cell exhaustion. In fact, the association of heightened PD-1 expression levels with HIV-specific CD8 T cells dysfunction will add to our understanding of HIV-1 mediated pathogenesis, and interventions with this pathway could yield to the development of novel immunotherapies.

PD-1 and PD-1 ligands expression

PD-1, a member of the Immunoglobulin gene superfamily (50-55kDa), is highly upregulated on activated lymphocytes and monocytes. PD-1 was first identified by subtractive hybridization of a T-cell hybridoma undergoing programmed cell death [8]; however, further studies have shown that PD-1 ligation does not lead to programmed cell death [9]. PD-1 is expressed on activated CD4 and CD8 T cells,

B cells, and myeloid cells including monocytes and DCs. PD-1 interacts with its two known ligands PD-L1 (B7-H1; CD274) (33-40kDa) and PD-L2 (B7-DC; CD273) (25-30kDa) that are members of the B7 family and are expressed mostly on antigen-presenting cells (APCs). PD-L1 is constitutively expressed on T cells, B cells, monocytes, macrophages and DC, and its expression is induced on activated T lymphocytes, macrophages and DCs. Moreover, PD-L1 expression has been reported on parenchymal and non-lymphoid tissues such as placenta, lung, heart, and skeletal muscle [10, 11, 12^{**}]. PD-L2 is expressed on non-lymphoid tissues and is upregulated on monocytes and DCs upon activation [12^{**}, 13].

PD-1 signaling

Despite its high homology with other family members, PD-1 interaction with its ligands activates distinctive signaling pathways and specific downstream target molecules. Indeed, PD-1 engagement with its ligands shows differences in signaling pathways from those elicited by CTLA-4. In fact both receptors are known to suppress T cell activation by inhibiting AKT phosphorylation and activity. However, PD-1 exerts its effect through the inhibition of PI3K whereas CTLA-4 tends to bypass and to preserve the activity of the later kinase, which induces the expression of the survival factor Bcl-xL. Moreover, CTLA-4 targets AKT directly where this activity is dependant on the serine/threonine phosphatase PP2A [14]. Sheppard *et al.* [15] have demonstrated that PD-1 mediated inhibitory signal is achieved by blocking the ZAP70-CD3 ζ signalosome that leads to the attenuation of PKC θ activation and signaling leading to IL-2 production. Therefore, the inhibitory effect of PD-1 on TCR-induced T cell proliferation and cytokine production might involve alternate survival pathways, the identity of which awaits careful investigation. Of note, most of these experiments were performed in T cell lines and hence confirmation of the data in primary T cells is important.

On the structural level, no homology could be found between the cytoplasmic tails of PD-1 and CTLA-4, although both of these receptors transmit the negative signal

for T cell activation through their intracellular domains [6, 16]. The PD-1 cytoplasmic tail carries an immunoreceptor tyrosine-based switch motif (ITSM) that recruits the Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1 (SHP-1) and SHP-2 (Figure 1) [7]. Suppression of T cell activation by PD-1 through the inactivation of PI3K/AKT pathway is largely dependant on the ITSM, and mutations in this motif abolish PD-1 activity [14]. The cellular factors recruited to the ITSM motif to exert its effect have, however, yet to be defined.

PD-1 ligands

Despite the fact that both PD-L1 and PD-L2 inhibit T cell proliferation and cytokine production by engaging the inhibitory receptor PD-1, their impact on T cell functions remains a controversial issue.. The differential binding properties of the PD-1 ligands may have differential contributions to immune response modulation as the binding affinity of PD-L2 to PD-1 is 2-6 fold higher than that of PD-L1 [17]. Moreover, PD-L1 and PD-L2 expression is differentially regulated by T-helper types 1 and 2 cells. As such, PD-L1 is upregulated on inflammatory macrophages by TLR4 and STAT1 downstream of IFN- γ whereas PD-L2 is upregulated by IL-4 and STAT6. The development of PD-L1 and PD-L2 knock-out mice has shed light on the differences in the functional consequences of PD-L1 and PD-L2 interaction with PD-1. In PD-L1^{-/-} mice, CD4 and CD8 T cell responses were enhanced and DCs stimulated greater wild-type CD4 T cell responses than wild-type DCs. Moreover, in contrast to PD-L1^{-/-} mice, the presence of PD-L1 on T cells and in host tissues limited responses of self-reactive CD4 T cells *in vivo*. These results demonstrate that PD-L1 on T cells, APCs and host tissue inhibits naive and effector T cell responses and plays a critical role in regulating T cell responses [18].

Findings by Shin *et al.* [19] further elucidated the above observations. When PD-L2 was knocked out in mice, a decline in IFN- γ production by CD4 T cells and IFN- γ -dependant humoral responses was observed. Moreover, a decrease in CTL responses and antigen-specific CD8 T cell counts was also obvious. The loss of

this co-stimulatory signal was further emphasized by the exacerbation of hepatic tumors. Since the effect of PD-L2 loss was partial, it could be suggested that the molecule acts as a tuning molecule for Th1 responses. This is further supported by findings by Liu *et al.* who reported that PD-L2 transfected tumors enhanced anti-tumor immunity in contrast to PD-L1 transfected tumors [20]. However, it is not clear if this co-stimulatory effect of PD-L2 is mediated by its interaction with PD-1. Altogether, the distinct binding affinities of the PD-1 ligands, their distinct patterns of expression on non-lymphoid organs, and their differential regulatory pathways support the emergence of an exclusive co-stimulatory role exhibited by PD-L2.

PD-1 mediated T cell responses

Several groups support an inhibitory role of PD-1 upon engagement with its ligands. Freeman *et al.* [11] has demonstrated that PD-1 engagement with PD-L1 leads to the inhibition of CD3-mediated T cell proliferation and cytokine production, but does not induce T cell death in either human and mice models. Moreover, although PD-1 engagement with PD-L2 also resulted in inhibition of CD4 T cell activation, PD-L2 was slightly less potent than PD-L1 at inhibiting T cell activation [13]. Furthermore, Cai *et al.* [21] showed that the inhibitory effect of PD-1 is more prominent on memory or recently activated T cells during a secondary response than its effect on naive T cells in a primary response. It is noteworthy that compelling evidence suggests a stimulatory role of PD-1 upon engagement with its ligands [10, 22-24]. These groups reported that PD-L1 co-stimulates T-cell growth and selectively induces IL-10 production. The mechanisms that explain these different outcomes of PD-1 ligation remain unclear. Interestingly one such hypothesis is that there is an unidentified receptor that engages PD-1 ligands in a manner similar to that of CD28 and CTLA-4. It should also be noted that mutants of the PD-1 ligands that fail to bind PD-1, remain co-stimulatory to T cells [19, 25]. These results further support the potential existence of a yet unidentified co-stimulatory receptor.

PD-1: a regulatory molecule in autoimmunity and peripheral tolerance

The functional significance of the PD-1 inhibitory signal was initially suggested because PD-1^{-/-} mice developed spontaneous autoimmune diseases [26]. PD-1^{-/-} mice developed lupus-like glomerulonephritis and arthritis on the C57BL/6 background and a fatal dilated cardiomyopathy on the BALB/c background. Moreover, PD-L1 expression on APCs was postulated to be responsible for peripheral tolerance by switching off autoreactive T cells whereas PD-L1 expression on parenchymal cells prevented tissue destruction by suppressing effector T cells and maintaining tolerance. In addition, naive CD4 and CD8 T cells activated *in vitro* in the absence of CD28 and inducible co-stimulatory molecule engagement entered a state of tolerance. The generation of these tolerant T cells required negative co-stimulatory molecules PD-1, B7-H3, and B7S1. Inhibition of these molecules partially restored T cell proliferation and function [27]. On the other hand, PD-L1 was shown to be highly expressed on pancreatic β cells and served as a barrier to suppress the effector function of diabetogenic T cells [28]. Moreover, using a murine abortion model, Guleria *et al.* [29] have confirmed that PD-L1 is strongly induced in placenta under condition of abortion-prone allogeneic mating (B6XCBA) but not syngeneic mating (CBAXCBA). PD-L1 has also been shown to be expressed on corneal endothelial cells and maintains long-term acceptance of corneal allografts by inducing apoptosis of effector T cells within the cornea [30]. In addition, blockade of PD-L1 or PD-L2 enhances the severity of autoimmune encephalomyelitis and accelerates relapses [31]. Using a PD-L2^{-/-} mice model, PD-L2 was shown to be a negative regulator of T cell activation and is essential for the regulation of T cell tolerance [32]. In the diabetic autoimmune model of NOD mice, both PD-1 and PD-L1 blockade resulted in the precipitation of diabetes in female and male mice [33, 34]. In contrast, Fife *et al.* [35] showed insulin-induced remission in new-onset mice by maintaining the PD-1/PD-L1 pathway. Addition of anti-PD-1 and anti-PD-L1, but not anti-PD-L2, reversed tolerance weeks after tolerogenic therapy by promoting antigen-specific T cell proliferation and inflammatory cytokine production in infiltrated tissues. These results clearly confirm the role of PD-1: PD-L1 interaction in the induction

and progression of autoimmune diabetes in the NOD mouse. Recently Keir *et al.* [33] showed that although PD-L1 and PD-L2 similarly inhibit T cell proliferation and cytokine production, PD-L1, but not PD-L2, is exclusively involved in the maintenance of peripheral tolerance. Lastly, it has been demonstrated that during the presentation of tissue antigens to CD8 T cells, PD-1/PD-L1, but not PD-L2, interaction crucially controls the effector differentiation of autoreactive T cells to maintain self tolerance [36]. Therefore, the PD-1-PD-L1 pathway might have a crucial role in maintaining a state of immunological privilege.

PD-1 and cancer

Many current immunotherapeutic vaccine approaches are capable of eliciting strong T-cell responses against tumor antigens as high frequencies of tumor antigen-specific T cells are often observed in peripheral blood, tumors and draining lymph nodes. Such responses, however, do not always coincide with tumor rejection [37-39]. This has been attributed to functional deficiencies or T cell tolerance, including suppression, anergy, ignorance, and programmed cell death in the microenvironment of residual tumors that would develop resistance to evade immune attack [40, 41]. Both soluble factors and membrane-bound molecules which potentially inhibit immune responses, such as TGF- β , IL-10, prostaglandin E₂, Fas, tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, and RACSI have been found to be upregulated in tumor sites [42, 43]. The identification of negative immunoreceptors on T cells, however, has provided a novel prospect that their manipulation may lead to enhanced tumor-specific T cell immunity *in vivo*. Blockade of CTLA-4 was indeed shown to enhance tumor-specific immunity and to induce significant inhibition of tumors *in vivo* in a number of experimental murine models [44]. Considerable recent evidence has suggested that PD-L1 is important in mechanisms of resistance against tumors associated antigen-specific immunity [45, 46]. Although not detectable in normal tissue, the PD-L1 protein was detectable in many murine and human tumors, including carcinoma of the breast, lung, ovary, head and colon, as well as gliomas.

A recent report has also demonstrated that PD-L1 is predominantly induced on oral squamous cell carcinoma [47]. This B7 family molecule could be further upregulated by factors in the tumor microenvironment, such as IFN- γ , IL-4 and VEGF, and this upregulation was shown to have important functional significance [45, 48]. Although PD-L1 appears to have both positive and negative roles in regulating T cell responses in inflammation and autoimmunity, PD-L1 is consistently inhibitory in tumor immunity [49]. Tumor-associated PD-L1 is thought to contribute to immune escape of cancer by interacting with the PD-1 receptor expressed on activated lymphocytes. Moreover, PD-1-deficient CD8 TCR transgenic T cells caused potent tumor rejection in an adoptive transfer model under conditions in which wild-type T cells as well as CTLA-4-deficient T cells failed [48].

PD-L1 blockade by specific monoclonal antibodies can enhance tumor-specific CTL response and cause tumor rejection [46, 48, 49]. *In vivo* studies on PD-1 gene-deficient mice or blocking PD-L1 with mAbs have confirmed that PD-1 can serve as a negative regulator of autoimmune responses *in vivo*, which further supports the negative regulatory function of PD-1/PD-L1 interactions [34, 50]. Interestingly, not only was the acute growth of tumors affected, but also the long-term survival of tumor-bearing animals, indicating that PD-L1 blockade might improve the development of a memory immune response. Geng *et al.* [51] have also recently demonstrated that PD-L1 expressed by residual tumor cells was responsible for tumor resistance to the HSP70 vaccine therapy. Blocking PD-L1 by the intravenous injection of pPD-1A, a plasmid encoding the extracellular domain of PD-1 (sPD-1), was shown to reverse this resistance and enhance the vaccine's therapeutic efficacy in the murine system. IFN- γ and IL-2 expression by tumor-infiltrating lymphocytes in mice treated with HSP70 vaccine in combination with sPD-1 was increased and the expression of negative regulatory molecules IL-10, TGF- β , and FoxP3 was decreased, demonstrating that multifunctional properties afforded by the combination therapy can effectively overcome tumor resistance and promote effective anti-tumor immunity [51]. Moreover, sPD-1

usage was shown to improve immunity against murine hepatocarcinoma [25]. This gene therapy approach has the advantage of avoiding the sharp peaks and drops in serum levels that occur after a bolus protein injection.

Interestingly, a strong correlation between PD-1 ligand expression on tumor cells and negative prognosis has recently been demonstrated for human cancer patients. PD-1 ligands positive esophageal cancer patients were shown to have a significantly poorer prognosis than patients negative for PD-L1 and PD-L2. Patients with tumors positive for both PD-L1 and PD-L2 showed a dramatically lower survival rate than patients with tumors negative for both of these ligands [52]. Thompson *et al.* [53] have analyzed PD-L1 expression in clinical specimens of renal cell carcinoma and found that patients with elevated tumor and/or lymphocyte PD-L1 levels are 4.5 times more likely to die from their cancer than patients showing low PD-L1 expression levels. In addition, PD-L1 was found to be constitutively expressed on human renal cell carcinoma cell lines and upregulated on human melanoma cell lines after exposure to IFN- γ . Blocking PD-L1 on human tumors *in vitro* resulted in enhanced tumour-associated antigen-specific CTL cytolytic activity and cytokine production of tumour-associated antigen-specific T-helper cells when directly interacting with the tumor [54]. Shin *et al.* [55] reported that hepatic tumours grew more quickly in PD-L2^{-/-} mice, which were associated with a decrease in intra-hepatic tumour-specific CD8 T cells. Moreover, PD-L2 expression was shown to cause rapid tumor rejection in syngeneic mice and the development of immunity to subsequent tumor challenges, further indicating a positive role for PD-L2 *in vivo*.

PD-1 and its ligands in viral infections

PD-1 ligation seems to have an inhibitory effect on the immune response to viral infections; hence following infection with adenovirus, PD-1^{-/-} mice exhibited increased proliferation of effector T-cells in the liver and enhanced virus clearance [56]. More recently findings by Barber *et al.* [57**] confirmed that PD-1 is upregulated on CD8 T cells from both acute and chronic (laboratory-derived

strain) lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)-infected mice; however, while PD-1 expression was lost on CD8 T cells upon viral clearance, it remained upregulated on CD8 T cells from chronically-infected mice. Blocking the PD-1/PD-L1 pathway through the administration of PD-1-or PD-L1-specific antibodies into mice chronically infected with LCMV restored cytokine secretion, cytotoxic activity and the capacity of exhausted CD8 T cells to proliferate and, to decrease viral load [57**]. However, infecting PD-L1^{-/-} mice with LCMV Cl13 did not result in viral clearance; rather, it induced death of these mice; this is in contrast to the PD-L1^{-/-} mice infection with the acute strain LCMV arm, which was cleared. This study demonstrated the role of the PD-1/PD-L1 pathway in regulating T cell exhaustion during chronic infection, which opened the door for investigation of this pathway in human chronic infections.

Little is known about the role of PD-L2 during viral infections, although its upregulation has been described on bronchial and alveolar epithelial cells following their infection with Respiratory Syncytial Virus (RSV) [58]. PD-L1 expression and function has been further documented in viral infections. Like PD-L2, PD-L1 is upregulated on bronchial and alveolar epithelial cells following their infection with RSV [58]. Moreover, PD-L1 is upregulated on human hepatocytes infected with adenovirus, with the result that these cells induced T cell apoptosis [59]. In addition, PD-L1 expression is also upregulated in peripheral blood CD14⁺ monocytes of patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection; a correlation with higher serum IL-10 levels in this infection has also been established [60]. Furthermore, the first demonstration that blocking the PD-1/PD-L1 interaction improves immune responses in viral infections was provided from infection of DCs with human rhinoviruses. These DCs expressed higher PD-L1 levels and induced a promiscuous and deep anergic state in co-cultured T-cells. The use of a blocking antibody directed against PD-L1 reverted the inhibitory phenotype [61]. Accordingly, in the herpes simplex virus (HSV) type 1-infected mice model, PD-L1 has been shown to be upregulated on macrophages infected with HSV-1, and the administration of antagonistic PD-L1 monoclonal antibody resulted in the

proliferation of HSV-specific CD4 T-cells that secreted IFN- γ . This treatment also inhibited the apoptosis of HSV-specific CD4 T cells [62].

During infection with hepatitis C virus, cytotoxic T lymphocytes show impaired capacity to proliferate and secrete antiviral cytokines leading to virus persistence. Urbani *et al.* [63] showed that during the acute phase of infection, HCV-specific CD8 T cells expressed high levels of PD-1, and this both for patients with a chronic or non-chronic evolving infection. However, patients who resolved the infection have a limited number of CD8 T cells that express high PD-1 levels and lost PD-1 expression after the acute phase. In chronic infections, HCV-specific CD8 T cells maintained high levels of PD-1 and did not switch to a long-lived CD127-positive memory phenotype. Blocking the PD-1/PD-L1 pathway restored the proliferative capacity of HCV-specific CD8 T cells. More recently Radziewicz *et al.* [64] phenotypically characterized peripheral and intrahepatic HCV-specific CD8 T cells during the chronic phase of infection: both expressed high levels of PD-1, but intrahepatic HCV-specific CD8 T cells also displayed lower CD127 expression. These two studies suggest that inhibiting the PD-1/PD-L1 pathway in HCV infected patients could restore the anti-HCV CD8 function.

PD-1: a novel CD8 dysfunction marker in HIV infection

A hallmark of HIV infection is the dysfunction of virus specific CD8 T cells. This exhausted phenotype of HIV-specific CD8 T cells is one of the major hindrances for the development of potential vaccines. The search for the reasons underlying CD8 exhaustion during the course of HIV infection has attracted many investigators. Several hypotheses have been put forward to better explain how the virus evades immune recognition, such as lack of CD4 help and viral escape mutants. One possible explanation for this functional impairment of CD8 effector T cells could be the lack of antigen-specific control during chronic viral infections [65, 66]. Prolonged antigen exposure in chronic infections has a negative role in the development of memory T cell properties, whereas shorter duration and

clearance of antigens during acute infections result in more efficient formation of memory CD8 T cells.

The first association between PD-L1 expression and HIV infection was reported in 2003 by Trabattoni *et al.* [67] who showed that PD-L1 expression at both protein and mRNA levels is enhanced in cell subsets (mainly CD19-positive and CD14-positive cells) of HIV patients. While PD-L1 expression was inversely correlated with CD4 counts, a direct correlation was observed between PD-L1 and HIV plasma viraemia. They also detected a correlation between increased PD-L1 expression and increased IL-10 production in HIV-infected patients. Interestingly, increased IL-10 production in these patients was largely induced by PD-L1-expressing CD14⁺ cells [67].

Recently, three groups introduced PD-1 as a novel marker of CD8 T cell dysfunction in HIV infection [12^{**}, 68^{**}, 69^{**}]. They showed that PD-1 is upregulated in HIV-specific CD8 T cells; PD-1 expression levels were significantly correlated with both viral load and the reduced capacity of cytokine production and proliferation of HIV-specific CD8 T cells. Of note, CMV-specific CD8 T cells from the same donors did not upregulate PD-1 and maintained the production of high levels of cytokines upon antigen-specific triggering. Moreover, Day *et al.* [69^{**}] and Trautmann *et al.* [69^{**}] have shown that PD-1 expression on HIV-specific CD8 T cells was reduced in patients undergoing effective antiretroviral therapy, thereby providing further evidence for the correlation between viral load and PD-1 expression in the same patients. PD-1 upregulation during the course of infection and the establishment of an exhausted phenotype of HIV-specific CD8 T cells needs to be explored. The timing of PD-1 expression and inhibition is not clear yet and it is likely that it is a progressive phenomenon as a persistent PD-1 expression could lead to the exhaustion of the cells. Although a short-term six-hour blockade of the PD-1/PD-L1 pathway was not able to rescue any HIV-specific CD8 T cell function, blocking this pathway for six days both enhanced the capacity of HIV-specific CD8 T cells to proliferate and led to an

increased cytokine and cytotoxic molecule production in response to cognate antigens (Figure 2) [12^{**}, 68^{**}, 69^{**}]. In examining apoptosis in PD-1^{hi} CD8 T cells, Petrovas *et al.* [12^{**}] showed an increase in PD-1 mediated and Fas-mediated apoptosis. The authors concluded that PD-1 is a major regulator of apoptosis that can affect the frequency of antiviral T cells in chronic infections. Day *et al.* [68^{**}] also examined the effect of PD-1/PD-L1 pathway blockade on CD4 T cell expansion. The authors showed increased antigen-specific CD4 T cell expansion in the presence of PD-L1 blocking antibody. These results pave the way for novel therapeutic immune interventions focused on blocking the PD-1/PD-L1 interaction in the treatment of chronic viral infections such as HIV.

Conclusion

Blocking the binding between PD-1 and its ligand by using monoclonal antibodies that can neutralize this interaction *in vivo* constitutes a promising strategy that could be used to increase the efficiency of a therapeutic vaccine against HIV. The shutdown of the PD-1 inhibition pathway associated with the emergence of vaccine-induced T cell responses could thus lead to the development of a sustained immune response against viral antigens. The modulation of molecular pathways that are implicated in immune responses *in vivo* should, however, be weighed very carefully. Recent published results from a disastrous clinical trial remind us the extreme fragility of the in-vivo equilibrium of the inhibition and activation pathways [70^{*}]. In that study, six healthy young male volunteers received a dose of TGN1412, a superagonistic humanized monoclonal antibody that stimulates T cells through triggering of the CD28 co-stimulatory molecule. This treatment rapidly induced a cytokine storm in all the patients, who survived only because of the intensive care delivered during the critical stages of their illness [71]. It is still unclear why this anti-CD28 antibody activates pathogenic effector T cells in humans and not in mouse models, as suggested by the preclinical studies [72]. The safety of this antibody was also reinforced in an unpublished study showing that administration of TGN412 to non-human primates led to a transient reversible

increase in CD4 and CD8 T cell numbers [73]. There was no evidence for an unintended induction of substantial pro-inflammatory cytokines release or of autoimmune disease in animals treated with this agonistic anti-CD28 monoclonal antibody.

The regrettable event that occurs in humans treated with TGN412 underlines the unavoidable risk associated with strategies that modulate immune functions *in vivo*. The development of a PD-1-targeted therapeutic strategy in humans obviously needs preclinical studies in relevant animal models. Among these, a shutdown of the PD-1 pathway in the simian model appears to be the best, because SIV infection in macaques is probably the closest model of HIV infection in humans. The TGN412 story, however, reminds us that a preclinical study conducted in the best animal model could not be enough to demonstrate the safety use of a molecule in humans. Altogether, a better understanding of the PD-1 pathway's mechanisms and involvement in the physiopathology of chronic infections will be useful to prevent unwanted damaging effects of the modulation of this pathway and will probably lead to the design of novel molecules aimed at interfering with PD-1, and eventually to the development of immunotherapies aimed at modulating PD-1 triggering in order to restore T-cell responses.

References

1. Bretscher PA. A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:185-190.
2. Khoury SJ, Sayegh MH. The roles of the new negative T cell costimulatory pathways in regulating autoimmunity. *Immunity* 2004; 20:529-538.
3. Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, et al. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 1999; 402:827-832.
4. Riley JL, June CH. The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood* 2005; 105:13-21.
5. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:515-548.
- This review revisits the roles of the B7 CD28 family members in regulating immune responses.
6. Okazaki T, Maeda A, Nishimura H, et al. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:13866-13871.
7. Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, et al. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol* 2004; 173:945-954.
8. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *Embo J* 1992; 11:3887-3895.
9. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* 1996; 8:765-772.
10. Dong H, Zhu G, Tamada K, et al. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 1999; 5:1365-1369.

11. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000; 192:1027-1034.
12. Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM, et al. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8⁺ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med* 2006; 203:2281-2292.
 - This study addresses the role of PD-1 in apoptosis in HIV infection.
13. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2001; 2:261-268.
14. Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 2005; 25:9543-9553.
15. Sheppard KA, Fitz LJ, Lee JM, et al. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKC θ . *FEBS Lett* 2004; 574:37-41.
16. Marengere LE, Waterhouse P, Duncan GS, et al. Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4. *Science* 1996; 272:1170-1173.
17. Youngnak P, Kozono Y, Kozono H, et al. Differential binding properties of B7-H1 and B7-DC to programmed death-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 307:672-677.
18. Latchman YE, Liang SC, Wu Y, et al. PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:10691-10696.
19. Shin T, Kennedy G, Gorski K, et al. Cooperative B7-1/2 (CD80/CD86) and B7-DC costimulation of CD4⁺ T cells independent of the PD-1 receptor. *J Exp Med* 2003; 198:31-38.
20. Liu X, Gao JX, Wen J, et al. B7DC/PDL2 promotes tumor immunity by a PD-1-independent mechanism. *J Exp Med* 2003; 197:1721-1730.
21. Cai G, Karni A, Oliveira EM, et al. PD-1 ligands, negative regulators for activation of naive, memory, and recently activated human CD4⁺ T cells. *Cell Immunol* 2004; 230:89-98.

22. Tamura H, Ogata K, Dong H, et al. Immunology of B7-H1 and its roles in human diseases. *Int J Hematol* 2003; 78:321-328.
23. Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, et al. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med* 2001; 193:839-846.
24. Del Rio ML, Penuelas-Rivas G, Dominguez-Perles R, et al. Antibody-mediated signaling through PD-1 costimulates T cells and enhances CD28-dependent proliferation. *Eur J Immunol* 2005; 35:3545-3560.
25. Wang S, Bajorath J, Flies DB, et al. Molecular modeling and functional mapping of B7-H1 and B7-DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction. *J Exp Med* 2003; 197:1083-1091.
26. Nishimura H, Nose M, Hiai H, et al. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 1999; 11:141-151.
27. Nurieva R, Thomas S, Nguyen T, et al. T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals. *Embo J* 2006; 25:2623-2633.
28. Wang J, Yoshida T, Nakaki F, et al. Establishment of NOD-Pdcd1^{-/-} mice as an efficient animal model of type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:11823-11828.
29. Guleria I, Khosroshahi A, Ansari MJ, et al. A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. *J Exp Med* 2005; 202:231-237.
30. Hori J, Wang M, Miyashita M, et al. B7-H1-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege of corneal allografts. *J Immunol* 2006; 177:5928-5935.
31. Zhu B, Guleria I, Khosroshahi A, et al. Differential role of programmed death-ligand 1 [corrected] and programmed death-ligand 2 [corrected] in regulating the susceptibility and chronic progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2006; 176:3480-3489.
32. Zhang Y, Chung Y, Bishop C, et al. Regulation of T cell activation and tolerance by PDL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:11695-11700.
33. Keir ME, Liang SC, Guleria I, et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* 2006; 203:883-895.

34. Ansari MJ, Salama AD, Chitnis T, et al. The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* 2003; 198:63-69.
35. Fife BT, Guleria I, Gubbels Bupp M, et al. Insulin-induced remission in new-onset NOD mice is maintained by the PD-1-PD-L1 pathway. *J Exp Med* 2006; 203:2737-2747.
- This study describes an antigen-specific therapy to treat diabetes in nonobese mice after disease onset driven by the PD-1/PD-L1 pathway.
36. Martin-Orozco N, Wang YH, Yagita H, et al. Cutting Edge: Programmed death (PD) ligand-1/PD-1 interaction is required for CD8⁺ T cell tolerance to tissue antigens. *J Immunol* 2006; 177:8291-8295.
37. Dunbar PR, Smith CL, Chao D, et al. A shift in the phenotype of melan-A-specific CTL identifies melanoma patients with an active tumor-specific immune response. *J Immunol* 2000; 165:6644-6652.
38. Lee PP, Yee C, Savage PA, et al. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat Med* 1999; 5:677-685.
39. Romero P, Dunbar PR, Valmori D, et al. Ex vivo staining of metastatic lymph nodes by class I major histocompatibility complex tetramers reveals high numbers of antigen-experienced tumor-specific cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 1998; 188:1641-1650.
40. Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 2001; 411:380-384.
41. Pardoll DM. Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:227-238.
42. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 2002; 3:999-1005.
43. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2001; 2:293-299.
44. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 1996; 271:1734-1736.

45. Curiel TJ, Wei S, Dong H, et al. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med* 2003; 9:562-567.
46. Strome SE, Dong H, Tamura H, et al. B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63:6501-6505.
47. Tsushima F, Tanaka K, Otsuki N, et al. Predominant expression of B7-H1 and its immunoregulatory roles in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2006; 42:268-274.
48. Blank C, Brown I, Peterson AC, et al. PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells. *Cancer Res* 2004; 64:1140-1145.
49. Hirano F, Kaneko K, Tamura H, et al. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res* 2005; 65:1089-1096.
50. Nishimura H, Minato N, Nakano T, et al. Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *Int Immunol* 1998; 10:1563-1572.
51. Geng H, Zhang GM, Xiao H, et al. HSP70 vaccine in combination with gene therapy with plasmid DNA encoding sPD-1 overcomes immune resistance and suppresses the progression of pulmonary metastatic melanoma. *Int J Cancer* 2006; 118:2657-2664.
52. Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, et al. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11:2947-2953.
53. Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, et al. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:17174-17179.
54. Blank C, Kuball J, Voelkl S, et al. Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro. *Int J Cancer* 2006; 119:317-327.

55. Shin T, Yoshimura K, Shin T, et al. In vivo costimulatory role of B7-DC in tuning T helper cell 1 and cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 2005; 201:1531-1541.
56. Iwai Y, Terawaki S, Ikegawa M, et al. PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *J Exp Med* 2003; 198:39-50.
57. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 2006; 439:682-687.
- This study was the first to demonstrate the role of PD-1 in exhaustion of antigen-specific CD8 T cells in the LCMV chronic infection and the restoration of effector function after blockade of the PD-1/PD-L1 pathway.
58. Stanciu LA, Bellettato CM, Laza-Stanca V, et al. Expression of programmed death-1 ligand (PD-L) 1, PD-L2, B7-H3, and inducible costimulator ligand on human respiratory tract epithelial cells and regulation by respiratory syncytial virus and type 1 and 2 cytokines. *J Infect Dis* 2006; 193:404-412.
59. Muhlbauer M, Fleck M, Schutz C, et al. PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and -gamma and mediates T cell apoptosis. *J Hepatol* 2006; 45:520-528.
60. Geng L, Jiang G, Fang Y, et al. B7-H1 expression is upregulated in peripheral blood CD14⁺ monocytes of patients with chronic hepatitis B virus infection, which correlates with higher serum IL-10 levels. *J Viral Hepat* 2006; 13:725-733.
61. Kirchberger S, Majdic O, Steinberger P, et al. Human rhinoviruses inhibit the accessory function of dendritic cells by inducing sialoadhesin and B7-H1 expression. *J Immunol* 2005; 175:1145-1152.
62. Jun H, Seo SK, Jeong HY, et al. B7-H1 (CD274) inhibits the development of herpetic stromal keratitis (HSK). *FEBS Lett* 2005; 579:6259-6264.
63. Urbani S, Amadei B, Tola D, et al. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J Virol* 2006; 80:11398-11403.
64. Radziewicz H, Ibegbu CC, Fernandez ML, et al. Liver infiltrating lymphocytes in chronic human HCV infection display an exhausted phenotype with high PD-1 and low CD127 expression. *J Virol* 2006.

65. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, et al. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* 1998; 188:2205-2213.
66. Wherry EJ, Barber DL, Kaech SM, et al. Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:16004-16009.
67. Trabattoni D, Saresella M, Biasin M, et al. B7-H1 is up-regulated in HIV infection and is a novel surrogate marker of disease progression. *Blood* 2003; 101:2514-2520.
68. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 2006; 443:350-354.
- This paper demonstrates the role of PD-1 in exhaustion of antigen-specific CD8 and CD4 T cells in HIV infection and the proliferation increase by blocking the PD-1/PD-L1 pathway.
69. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8⁺ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* 2006; 12:1198-1202.
- This paper demonstrates the role of PD-1 in exhaustion of antigen-specific CD8 T cells in HIV infection and the proliferation and effector function increase by blocking the PD-1/PD-L1 pathway.
70. Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* 2006; 355:1018-1028.
- This article describes the dramatic events that occurred when six healthy volunteers received a dose of a superagonistic anti-CD28 antibody. The infusion of this antibody produced a sudden and rapid release of proinflammatory cytokines.
71. Drazen JM. Volunteers at risk. *N Engl J Med* 2006; 355:1060-1061.
72. Sharpe AH, Abbas AK. T-cell costimulation--biology, therapeutic potential, and challenges. *N Engl J Med* 2006; 355:973-975.

73. TGN412. investigator's brochure. Wurzburg, Germany: TeGenero Immuno-therapeutics.

http://www.mhrgovuk/home/idcplg?IdcService=GET_FILE&dDocName=CON2023518&RevisionSelectionMethod=LatestReleased 2005.

Figure legends

Figure 1. Inhibition of T cell activation by the PD-1/PD-L1 pathway. Upon TCR triggering, CD3 ζ immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAM) are phosphorylated and recruit Zap70 to induce the T cell activation cascade. The interaction of PD-1 with PD-L1 leads to the phosphorylation of the immunoreceptor tyrosine-based switch motif (ITSM) domain of PD-1, the recruitment of Src homology region 2 domain-containing phosphatase (SHP-2) and inhibition of the TCR signaling pathway by blocking the Zap70 CD3 ζ signalosome. ITIM, immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif; MHC, major histocompatibility complex.

Figure 2. Restoration of effector functions of HIV-specific CD8 T cells by inhibiting the PD-1/PD-L1 pathway. PD-1 is naturally expressed by CD8 T cells at a low level. During the course of HIV infection, virus-specific CD8 T cells upregulate PD-1. The ligation of PD-1 with its ligand PD-L1 presented by the antigen-presenting cells (APCs) leads to the inhibition of T cell effector functions. The addition of a blocking PD-L1 antibody releases PD-1 induced inhibition and rescues the proliferation and the secretion of effector molecules by the HIV-specific CD8 T cells. MHC, major histocompatibility complex; TCR, T-cell receptor.

Acknowledgments

This work was supported by grants awarded to R.P.S. from the National Institutes of Health, the Canadian Institutes of Health Research, the Canadian Network for Vaccine and Immunotherapeutics, Genome Quebec, Genome Canada and Valorisation Recherche Québec. R.P.S. is the Canada Research Chair in Human Immunology.

Figure 1

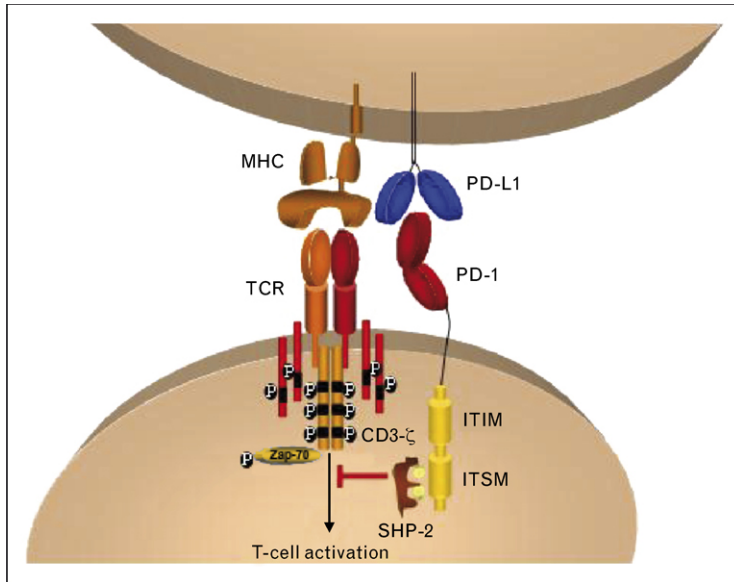


Figure 2

