

**Université de Montréal
Faculté de médecine
Département de microbiologie et immunologie**

**L'influence du réseau de chimiokines sur les
lymphocytes T dans le contexte de l'infection à virus
de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)**

**travail réalisé par
Vanessa Sue Wacleche**

sous la direction scientifique de Dre Petronela Ancuta

Laboratoire Chimiokines et VIH-1
CRCHUM, Hôpital Saint-Luc

**Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du diplôme de maîtrise en
microbiologie et immunologie**

Montréal, le 3 août 2010

© Vanessa Sue Wacleche 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
**L'influence du réseau de chimiokines sur les cellules T dans le contexte de
l'infection à virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)**

présenté par :
Vanessa Sue Wacleche

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Hugo Soudeyns, Ph.D.
Président-rapporteur

Nathalie Arbour, Ph.D.
Membre du jury

Petronela Ancuta, Ph.D.
Directrice de recherche

TABLE DE MATIERES

Table des matières des Figures et des Tableaux	V
Figures.....	V
Tableaux	V
Liste des abréviations	VI
RÉSUMÉ	IX
1. Introduction	1
1.1. VIH : Caractéristiques générales	1
1.2. Le génome viral du VIH-1	2
1.2.1. Gènes Structuraux	3
1.2.2. Gènes Accessoires	3
1.3. Les cellules cibles du VIH-1	4
1.4. Le Cycle de Réplication du VIH-1	5
1.4.1. Phase Précoce	5
1.4.2. Phase tardive	6
1.5. La pathogenèse du VIH-1	7
1.5.1. Phases cliniques.....	7
1.5.1.1. Phase aiguë	8
1.5.1.2. Phase Chronique	9
1.5.1.3. Phase SIDA.....	10
1.5.2. La réponse immunitaire innée et adaptative contre le VIH-1	11
1.5.2.1. Réponse immunitaire innée	11
1.5.2.2. Réponse immunitaire adaptative	13
1.5.2.2.1. Les Lymphocytes B	13
1.5.2.2.2. Les cellules T CD4 ⁺ spécifiques au VIH-1	14
1.5.2.2.3. Les cellules T CD8 ⁺ spécifiques au VIH-1	18
1.5.3. Individus infectés par le VIH	22
1.5.3.1. Individus sous trithérapie antirétrovirale	22
1.5.3.2. Individus à progression lente (LTNP).....	24
1.6. Présentation d'antigène	26
1.6.1. CMH-I	27
1.6.2. CMH-II.....	29
1.6.2.1. Cellules présentatrices d'antigène professionnelles	29
1.7. L'activation des lymphocytes T	30
1.8. Synapse immunologique	32
1.9. Différentiation des cellules T naïves	33
1.9.1. Th1.....	33
1.9.2. Th2.....	34
1.9.3. Th17.....	35
1.10. Synapse virologique	36
1.11. Les chimiokines	38
1.11.1. Récepteurs des chimiokines.....	39
1.11.2. Chimiokines subordonnées et dominantes	40

1.11.3. Chimiokines et synapse immunologique	40
1.11.4. Récepteurs de chimiokines et hétérogénéité fonctionnelle des cellules T CD4+	41
1.11.5. Chimiokines et réplication du VIH-1 dans les cellules T CD4+	41
2. Hypothèses et Objectifs.....	43
3. Méthodes	45
3.1. Sujets d'étude.....	45
3.2. Anticorps et réactifs.....	45
3.3. Isolation de PBMC par gradient de Ficoll et congélation des cellules	46
3.4. Tri des cellules T CD4+ par sélection négative à l'aide de billes magnétiques	46
3.5. Cytométrie en flux.....	47
3.6. Culture et stimulation des cellules T CD4+ pour la détection du marqueur d'activation précoce CD69	47
3.7. Analyse phénotypique par cytométrie en flux multi-couleur	48
3.8. Détection intracellulaire des cytokines par cytométrie en flux.....	49
3.9. Test de migration cellulaire	50
3.10. Préparation des pools de peptides Nef, Gag, et Pol du VIH-1.....	50
3.11. Détection des cellules spécifiques d'un antigène par marquage de la molécule de costimulation CD154/CD40L : méthode de la co-culture.....	51
3.12. Mesure de la prolifération cellulaire : méthode de la dilution de la CFSE	51
3.13. Culture et lyse de <i>Candida albicans</i> : forme levure et hyphes.....	52
3.13.1. Culture et Préparation de la forme hyphes de <i>Candida albicans</i>	52
3.13.2. Lyse de <i>Candida albicans</i> forme hyphes.....	53
3.14. Technique de Bradford.....	53
3.15. Détection de cytokines	53
3.16. Détection de la protéine p24 du VIH par ELISA	54
3.17. PCR en temps réel pour la quantification de l'ADN proviral du VIH-1.....	54
3.17. PCR en temps réel quantitative SYBR Green	55
3.18. Statistiques	56
4. Résultats	57
4.1. Rôles des récepteurs de chimiokines comme marqueurs de cellules T CD4+ à fonctionnalité distincte lors de l'infection au VIH	57
4.1.1. Les récepteurs de chimiokines CCR4, CXCR3 et CCR6 identifient des sous-populations de lymphocytes T CD4+ ayant un profil de type Th1, Th2, Th17 ou Th1Th17	57
4.1.2. Les récepteurs de chimiokines CCR4, CXCR3 et CCR6 identifient des cellules T CD4+ avec susceptibilité distincte à l'infection par le VIH.....	58
4.2. Analyse phénotypique et fonctionnelle des cellules T spécifiques au VIH	65
4.2.1. Potentiel de migration des cellules T CD4+CD154+ spécifiques au VIH.....	65
4.2.2. Analyse phénotypique du potentiel de migration des cellules T CD4+ et CD8+ proliférant en réponse à des peptides du VIH	66
4.2.3. Analyse du profil cytokinique des cellules T CD4+ et CD8+ proliférant en réponse à des peptides du VIH.....	68

4.2.4. Analyse de l'expression de CCL3, ligand de CCR5, dans les cellules T CD4 ⁺ et CD8 ⁺ proliférant en réponse à des peptides du VIH.....	69
4.2.5. Analyse de la production de CCL3 dans les lymphocytes T CD8 ⁺ β7 ⁺ et T CD8 ⁺ β7 ⁻ chez les LTNP	70
4.3. Rôle des chimiokines ligands de CCR4, CCR6 et CXCR3 dans l'activation des cellules T et la réplication du VIH.....	88
4.3.1. Effet des chimiokines «dominantes» et «subordonnées» sur la prolifération polyclonale des cellules T CD4 ⁺ ..	88
4.3.2. Effet des chimiokines «dominantes» et «subordonnées» sur la prolifération des lymphocytes T CD4 ⁺ et CD8 ⁺ spécifiques au CMV	89
4.3.3. Les chimiokines ligands de CCR4 et CCR6 augmentent la réplication du VIH dans les lymphocytes T CD4 ⁺ ..	90
5. Discussion, Conclusions et perspectives	95
5.1. Sommaire des résultats	95
5.2. Étude des récepteurs de chimiokines identifiant des sous-populations de cellules T CD4 ⁺ distinctes : profil cytokinique et susceptibilité à l'infection par le VIH-1.....	96
5.3. Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des cellules T CD4 ⁺ et T CD8 ⁺ spécifiques au VIH-1	99
5.3.1. L'analyse phénotypique des cellules T CD4 ⁺ et T CD8 ⁺ spécifiques au VIH-1.....	100
5.3.2. Les cellules T CD4 ⁺ et T CD8 ⁺ spécifiques au VIH ont le potentiel de co-localisation dans le GALT via l'intégrine β7	103
5.3.3. Une fraction mineure des cellules T CD4 ⁺ et T CD8 ⁺ spécifiques au VIH-1 produit de l'IL-17	105
5.3.4. Une fraction des cellules T CD4 ⁺ et T CD8 ⁺ produisent la chimiokine CCL3: rôle de l'intégrine β7 comme marqueur de cellules T CD8 ⁺ CCL3 ^{high}	107
5.4. Étude de l'effet des chimiokines sur la prolifération cellulaire et la réplication du VIH dans les cellules T CD4 ⁺	109
6. Bibliographie.....	112
7. Annexe – Figures supplémentaires.....	133
8. Annexe - ARTICLE.....	135

TABLE DES MATIERES DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figures

Figure 1-----	Page 2
Figure 2-----	Page 3
Figure 3-----	Page 6
Figure 4-----	Page 8
Figure 5-----	Page 28
Figure 6-----	Pages 61-62
Figure 7-----	Page 63
Figure 8-----	Page 64
Figure 9-----	Pages 74-75
Figure 10-----	Pages 76-77
Figure 11-----	Pages 78-79
Figure 12-----	Page 80
Figure 13-----	Pages 81-82
Figure 14-----	Pages 83-84
Figure 15-----	Pages 85-86
Figure 16-----	Page 87
Figure 17-----	Page 92
Figure 18-----	Page 93
Figure 19-----	Page 94

Tableaux

Tableau 1-----	Page 45
Tableau 2-----	Page 47
Tableau 3-----	Page 48
Tableau 4-----	Page 49
Tableau 5-----	Page 55
Tableau 6-----	Page 72
Tableau 7-----	Page 73

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ac, anticorps

ADN, acide désoxyribonucléique complémentaire

ADNc, ADN complémentaire

ADNm, ADN messenger

ADNt, ADN de transfert

BSA, *Bovine Serum Albumin*

CAF, *Cell Antiviral Factor*

CDR, *Complementarity-Determining Region*

CFSE, *Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester*

CLA, *Cutaneous Lymphocyte Associated Antigen*

CMH, Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV, Cytomégalovirus

CPA, Cellule Présentatrice d'Antigène

cSMAC, SMAC central

CTLA-4, *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*

dSMAC, SMAC distal

e.g, *exempli gratia (latin)*

FACS, *Fluorescence-Activated Cell Sorting*

FBS, *Fetal Bovine Serum*

GALT, *Gut-Associated Lymphoid Tissues*

gp, glycoprotéine

GPCR, *G-Protein Coupled Receptors*

HAART, *Highly Activated Anti-Retroviral Therapy*

HLA, *Human Leukocyte Antigen*

HNP, *Human Neutrophil Peptides*

HTLV, *Human T-Lymphotropic Virus*

ICAM-1 *Intercellular Cell Adhesion Molecule-1*

i.e., *id est (latin)*

IL, Interleukine

ITAM, *Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif*

LAV, *Lymphadenopathy Associated Virus*
LFA-1, *Lukocyte Function-Associated Molecule-1*
LT, *Lymphotoxine*
LTNP, *Long Term Non-Progressor*
LTR, *Long Terminal Repeat*
M, *Main*
MACS, *Magnetic Associated Cell Sorting*
MadCAM-1, *Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecules-1*
MBL, *Mannose-Binding Lectins*
MIP, *Macrophage Inflammatory Pprotein*
N, *New*
NIAID, *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*
NIH, *National Institutes of Health*
NK, *Natural Killer*
O, *Outlier*
p, *protéine*
PBMC, *Peripheral Blood Mononucleated Cells*
PBS, *Phosphate-Buffered Saline*
PD-1, *Programmed Death 1*
PDL, *Programmed Death 1 Ligand*
PKC, *Protéine Kinase*
PMA, *«Phorbol Myristate Acetate»*
PMN, *Polymorphonucléaires*
PSGL, *P-Selectin Glycoprotein Ligand-1*
pSMAC, *SMAC périphérique*
RANTES, *Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreated*
R4, *CCR4*
R5, *CCR5*
R6, *CCR6*
RCT, *récepteur de la cellule T*
RPMI, *Roswell Park Memorial Institute*

SEB, *Staphylococcal Enterotoxin B*
SI, Synapse Immunologique
SIDA, Syndrome d'Immunodéficience Acquise
SMAC, *Supra Molecular Activation Cluster*
SV, Synapse Virologique
T_{CM}, T Centrale Mémoire
T_{EM}, T Effectrice Mémoire
Th, *T Helper*
TNF, *Tumor Necrosis Factor*
TIS, Traitements Intermittents Structurés
Treg, cellule T régulatrice
Vif, *Viral Infectivity Factor*
Vpr, *Viral Protein R*
Vpu, *Viral Protein U*
VIH, Virus de l'Immunodéficience Humaine
VIS, Virus de l'Immunodéficience Simienne
VPH, virus du papillome humain
VHS, virus de l'herpès simplex
YPD, *Yeast Peptone Dextrose*
X3, CXCR3
X4, CXCR4
 α , alpha
 β , bêta
°C, degré Celsius
 δ , delta
 γ , gamma
 μ , micro
 θ , Thêta
%, pourcentage

RÉSUMÉ

Les chimiokines et leurs récepteurs respectifs jouent un rôle important dans l'immunité innée et adaptative. Les récepteurs de chimiokines identifient des cellules T CD4⁺ avec potentiel de migration dans des tissus spécifiques et à fonctionnalité distincte du point de vue de la spécificité antigénique et de la production de cytokines. L'identité de la population des cellules T CD4⁺ susceptibles *versus* résistantes à l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) reste mal définie. Le recrutement dans les muqueuses intestinales d'un excès de cellules T effectrices (CD8⁺) comparé aux cellules cibles (CD4⁺) représente un bon pronostic de l'infection par le virus de l'immunodéficience simienne (VIS), tandis que la déplétion des cellules Th17 dans les tissus lymphoïdes associés au tractus gastro-intestinal (GALT) est un marqueur de la progression de l'infection à VIH. L'effet régulateur des chimiokines sur l'activation de la réplication virale dans différentes sous-populations cellulaires T CD4⁺ reste peu étudié. Ce projet de maîtrise est divisé en 3 parties: (1) l'identification des récepteurs de chimiokines CCR4, CXCR3 et CCR6 comme marqueurs de surfaces des sous populations T CD4⁺ avec susceptibilité distincte à l'infection par le VIH; (2) la caractérisation phénotypique et fonctionnelle des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH de sujets à progression lente vers le stade sida (LTNP); et (3) les effets des chimiokines ligands de CCR4, CXCR3 et CCR6 sur l'activation cellulaire et la réplication virale *in vitro*. Nos résultats démontrent que les cellules T CD4⁺ CCR4⁺CCR6⁺ (profil cytokinique Th17) et CXCR3⁺CCR6⁺ (profil cytokinique Th1/Th17) sont hautement permissives à l'infection par le VIH. Nous proposons également de nouveaux corrélats de protection immunitaire contre le VIH chez les sujets LTNP: (i) le potentiel de co-localisation dans les muqueuses intestinales des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques au VIH via l'intégrine β 7, (ii) le ratio élevé entre les cellules T effectrices (CD8⁺) *versus* les cellules cibles (CD4⁺) spécifiques au VIH, (iii) le profil cytokinique Th17 et (iv) la capacité des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques au VIH à produire des ligands de CCR5 bloquant l'entrée virale. Finalement, nos résultats sur l'effet co-stimulateur des chimiokines sur les cellules T et leurs effets opposés sur la réplication virale démontrent l'implication du réseau des chimiokines dans la régulation de la pathogenèse de l'infection à VIH.

Mots clefs: VIH, chimiokines, récepteurs de chimiokines, cellules T CD4⁺, cellules T CD8⁺, LTNP.

ABSTRACT

The chemokines and their counter receptors play an important role in regulating innate and adaptive immunity. The chemokine receptors serve as markers for distinct CD4⁺ T cell subsets with specific tissue homing potential, antigenic specificity, and polarization profile. There is limited knowledge on the identity of primary CD4⁺ T cell subsets selectively targeted by human immunodeficiency virus (HIV) infection. The recruitment in the intestinal mucosa of excess effector (CD8⁺ T) *versus* target (CD4⁺ T) cells predicts a good outcome for the simian immunodeficiency virus (SIV) infection, while the depletion of Th17 cells in the gut-associated lymphoid tissues (GALT) represents a marker for HIV disease progression. The regulatory role of chemokines on cellular activation and on HIV replication in different CD4⁺ T cell subsets remains poorly investigated. This M.Sc. project is divided in 3 parts: (1) the identification of chemokine receptors CCR4, CXCR3 and CCR6 as surface markers of CD4⁺ T cell subsets, with susceptibility to HIV replication (2); the phenotypic and functional characterization of HIV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells in HIV-infected long-term-non progressor (LTNP) individuals and (3) the effect of chemokine ligands of CCR4, CXCR3 and CCR6 on cellular activation and viral replication *in vitro*. Our results reveal that CD4⁺ CCR4⁺CCR6⁺ T (Th17 cytokine profile) and CD4⁺ CXCR3⁺CCR6⁺ (Th1/Th17 cytokine profile) T cells are highly permissive to HIV replication. Also, our results suggest new correlates of immune protection against HIV in LTNP subjects: (i) the co-localization potential of HIV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the intestinal mucosa via the integrin β 7, (ii) the high ratio between effector (CD8⁺) *versus* target (CD4⁺) T cells, (iii) the Th17 cytokine profile and (iv) the ability of HIV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells to produce CCR5 ligands blocking viral entry. Finally, our results on the co-stimulatory effect of chemokines on T cell activation and their opposite impact on HIV replication in CD4⁺ T cells demonstrate the role played by the chemokine network during HIV pathogenesis.

Key words: HIV, chemokines, chemokine receptors, CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, LTNP.

Remerciements

Je tiens d'abord et avant tout à remercier ma directrice de recherche, Dr Petronela Ancuta, pour m'avoir acceptée au sein de son laboratoire et m'avoir guidée tout au long de ma maîtrise. Je tiens également à la remercier pour son soutien, sa confiance en moi et sa grande disponibilité.

Je désire remercier en particulier mes deux collègues de travail Dr Patricia Monteiro et Annie Gosselin qui m'ont soutenue et inspirée tout au long de mes études de maîtrise. Je remercie, également, les Drs Jean-Pierre Routy, et Mohamed-Rachid Boulassel d'avoir fourni au laboratoire les leukaphérèses de sujets VIH⁻ et VIH⁺, dont j'ai pu bénéficier pour effectuer mes expériences. Leur collaboration nous a été essentielle.

Je remercie également le grand nombre des sujets VIH⁻ et VIH⁺ pour leur don de cellules qui ont rendu ce travail possible.

Finalement, j'aimerais remercier chaleureusement ma mère et ma grand-mère qui m'ont soutenue et toujours encouragé à poursuivre mes études. Je remercie également le reste de ma famille et amis pour leur écoute, leur soutien et surtout pour avoir été là pour moi.

1. INTRODUCTION

1.1. VIH : Caractéristiques générales

Le Virus de l'immunodéficience humaine (VIH) appartient à la famille des *Retroviridae* (Rétrovirus), au genre des lentivirus, et se caractérise par une longue période d'incubation et une évolution lente de la maladie. Le VIH cause le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) associé à une réplication virale active, une diminution du taux des lymphocytes T CD4⁺ circulants (<200 cellules/ μ l), et une susceptibilité accrue à de multiples infections opportunistes. Le virus du SIDA a été isolé pour la première fois en 1983 par le groupe du Dr Luc Montagnier, qui lui a donné originellement le nom de LAV (*Lymphadenopathy Associated Virus*) (1). Le groupe du Dr Robert Gallo a obtenu des résultats similaires et proposé le nom de HTLV-III (*Human T-Lymphotropic Virus*) pour le virus du SIDA (2). Coffin et al., ont proposé en 1986 le nom de VIH pour le virus du SIDA (3).

Les rétrovirus sont des virus à ARN, de 80 à 120 nm de diamètre, à polarité positive, produits par bourgeonnement à la surface des cellules infectées. Leurs particularités se trouvent dans leurs stratégies de réplication, qui incluent l'enzyme virale et la transcriptase inverse, chargée de rétro-transcrire le génome d'ARN en ADN à double brin. Les particules virales sont formées d'une enveloppe externe et d'une nucléocapside dense. Cette enveloppe est constituée d'une double couche phospholipidique, dérivée de la membrane cellulaire, et de deux glycoprotéines, une transmembranaire nommée gp41, et une se trouvant à la surface, recouvrant la gp41, nommée gp120. Le complexe gp41/gp120 se présente sous forme généralement trimérique. L'enveloppe entoure une matrice composée de protéines p17, tapissant la surface interne de la membrane virale, et d'une capsid, constituée de la protéine core (p24) et située au centre du virus. À l'intérieur de la capsid se trouvent deux copies d'ARN viral à simple brin identiques liées à la protéine de la nucléocapside (p7) et à diverses enzymes virales incluant la transcriptase inverse, la protéase et l'intégrase (Figure 1) (4).

Le VIH est le lentivirus le plus infectieux et le plus pathogénique. Il existe deux sous-types de VIH, distingués par leurs compositions génétiques et leur potentiel pathogène : le type 1 (VIH-1) et le type 2 (VIH-2). Le VIH-2 ressemble génétiquement à un autre lentivirus,

le virus de l'immunodéficience simienne (VIS), infectant les primates tels que les Sooty mangabeys (5). Le VIH-1 est le plus pathogénique, facilement transmissible et est largement responsable de la pandémie SIDA dans le monde. Le VIH-1 est divisé en trois groupes distincts : M (*Main*), N (*New*) et O (*Outlier*) Actuellement, le groupe M est le plus répandu (>90% des infections) et est divisé en 9 sous-types (A-D, F-H, J, K) (6, 7). Le sous-type B demeure le plus répandu en Amérique. Les autres sous-types sont plus présents en Afrique, renforçant l'hypothèse que le VIH est originaire du territoire africain et s'est propagé dans d'autres pays lorsque les voyages intercontinentaux sont devenus populaires durant le 20^{ème} siècle. Les groupes N et O sont rares et surtout retrouvés chez des patients en Afrique centrale.

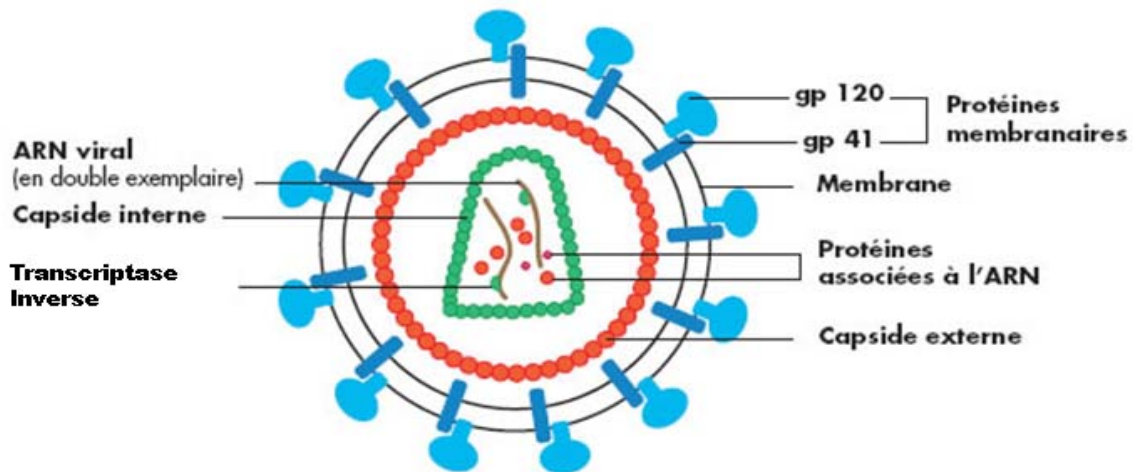


Figure 1 : Schéma organisationnel du VIH. Adapté à partir de Greene et al. (8)

1.2. Le génome viral du VIH-1

Le génome du VIH-1 a une longueur d'environ 9.2kb et est constitué de trois gènes structuraux, *gag* (groupe d'antigène spécifique), *pol* (polymérase) et *env* (enveloppe), ainsi que des gènes accessoires (*vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *nef*, *vpu*) (Figure 2). L'ADN complémentaire (ADNc) viral qui sera intégré à l'ADN cellulaire, l'ADN proviral, est flanqué aux extrémités 5' et 3' d'une séquence identique U3-R-U5, nommée LTR (*Long Terminal Repeat*). Cette séquence comprend les sites d'intégration qui permettront à l'ADN viral de s'intégrer dans le génome de la cellule hôte (8).

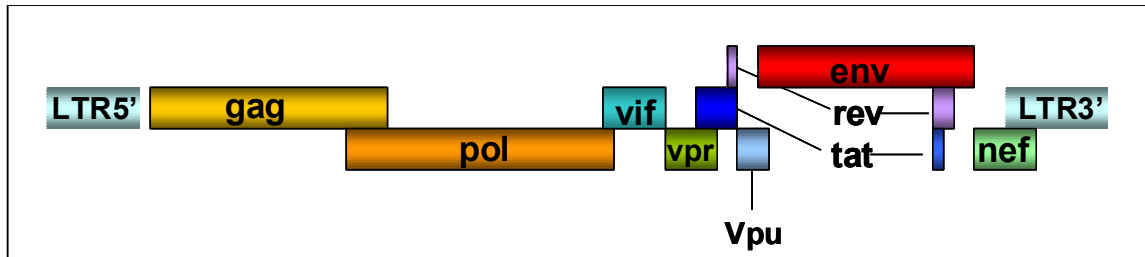


Figure 2 : Structure génomique de l'ADN proviral du VIH-1.
Adapté à partir de Greene et al. (8)

1.2.1. Gènes Structuraux

Les gènes de structure *gag*, *pol* et *env* codent respectivement pour les antigènes de la nucléocapside, les enzymes virales, et les protéines de surface du virion. En effet, le gène *gag* est traduit en un précurseur polyprotéique de 55kD. Lors de la maturation du virion, la polyprotéine est clivée en protéine de la matrice (p17) et protéine de la capsid (p24). La région génomique *pol* code pour les enzymes virales suivantes : la protéase, l'intégrase et la transcriptase inverse. La protéase permet la maturation des virions en clivant les polyprotéines virales en protéines fonctionnelles. L'intégrase est responsable de l'intégration de l'ADN viral à l'ADN cellulaire. Les enzymes virales sont produites consécutivement au clivage de la poly-protéine précurseur Gag-Pol. Ce précurseur poly-protéique est traduit suite au décalage du cadre de lecture par le ribosome, près de l'extrémité 3' du gène *gag*. Le gène *env* est traduit en précurseur polyprotéique gp160 qui est clivé en glycoprotéines membranaires gp120 et gp41 (4, 8).

1.2.2. Gènes Accessoires

Le génome viral comprend des gènes accessoires et régulateurs codant pour des protéines à fonctionnalités distinctes. La protéine Vif (*Viral Infectivity Factor*) joue un rôle dans l'infectiosité mais pas dans la production virale (9). Vif module l'assemblage et la maturation des particules virales. Il a été rapporté récemment que Vif induit la dégradation rapide de l'enzyme cytidine désaminase APOBEC3G, responsable de l'altération de l'ADN viral compromettant ainsi la réplication du VIH-1 (10). La protéine Vpr (*Viral Protein R*) joue un rôle dans la réplication en favorisant le transport nucléaire du complexe de préintégration virale, la transactivation des gènes cellulaires et la différenciation cellulaire (11). Une étude propose également que Vpr augmenterait l'infectiosité du VIH-1 dans les

cellules cibles (12). Tat est une protéine régulatrice, essentielle au virus, ayant un rôle de transactivation dans la transcription de l'ARN messager (ARNm) (13 , 14). Rev est une autre protéine régulatrice permettant le transport, la stabilisation et la traduction de l'ARNm, allant vers le cytoplasme (15, 16). Cette protéine est le second facteur de régulation nécessaire à l'expression du VIH. La plus immunogène des protéines accessoires demeure la protéine Nef. Celle-ci est indispensable à la réplication *in vivo* et à la progression de l'infection (17). Finalement, la protéine Vpu (*Viral protein U*) est uniquement associée au VIH-1. Elle favorise la dégradation de la molécule CD4 dans le réticulum endoplasmique et le renforcement de la libération des virions de la membrane plasmique des cellules infectées par le virus (18).

1.3. Les cellules cibles du VIH-1

Le VIH-1 cible les cellules du système immunitaire, principalement les lymphocytes T CD4⁺ mais également les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques (19 , 20). Ces leucocytes expriment tous à leur surface la glycoprotéine transmembranaire CD4, que le VIH utilise comme récepteur primaire lors de son entrée dans les cellules cibles (21). Les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle essentiel dans le mécanisme d'immunité adaptative à médiation cellulaire. Les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigène, ayant des fonctions dans l'immunité innée et adaptative (22). Sur la base de leur tropisme cellulaire, les souches de VIH ont été classifiées en souches avec tropisme macrophagique et souches avec tropisme lymphocytaire T. Dans les années 1990, les récepteurs de chimiokines CCR5 ou CXCR4 ont été identifiés comme des corécepteurs majeurs pour l'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles (26 , 27 , 28). Sur la base de cette découverte, une nouvelle classification des souches virales a été mise en place: souches de type R5 pour les virus utilisant CCR5 et souches de type X4 pour les virus utilisant CXCR4 (29). Cette nouvelle classification est plus correcte dans la mesure où certaines souches virales de type R5 et de type X4 peuvent infecter des macrophages aussi bien que des cellules T CD4⁺ qui expriment le corécepteur CCR5 et CXCR4, respectivement.

1.4. Le Cycle de Réplication du VIH-1

Le cycle de réplication du VIH (Figure 3) s'opère en deux phases, incluant la phase précoce et la phase tardive (23). La phase précoce commence par l'attachement du virus à la cellule cible et comprend tous les processus menant à l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire. La phase tardive inclut les étapes de régulation de l'expression de l'ADN proviral et les processus menant à la maturation et le bourgeonnement du virus.

1.4.1. Phase Précoce

Premièrement, le virus se fixe à la cellule cible par l'interaction spécifique et forte de la glycoprotéine gp120, du côté viral, avec la molécule CD4, du côté cellulaire (24). Suite à cette liaison, un changement de conformation permet l'exposition d'un site de fixation au corécepteur, CCR5 ou CXCR4 (25). L'interaction avec le corécepteur induit à nouveau un changement de conformation de la gp120, permettant ainsi la libération de la glycoprotéine gp41 et l'arrimage de son peptide de fusion dans la membrane cytoplasmique (30, 31). Suite à la pénétration dans la membrane cellulaire, les deux hélices de la gp41 se replient sur elles-mêmes, ce qui permet la fusion des membranes cellulaires et virales (32, 33). La nucléocapside pénètre alors dans le cytoplasme, puis une fois à l'intérieur, se désagrège, libérant les deux brins d'ARN et les enzymes qu'elle contenait. Ensuite, l'ARN viral est rétro-transcrit en ADN double brin par la transcriptase inverse (34). Plus précisément, l'étape de transcription inverse est initiée à l'aide d'un ARN de transfert (ARNt), d'origine cellulaire, servant d'amorce. La transcriptase inverse parcourt l'ARN viral et synthétise le premier brin d'ADNc. Au cours de cette synthèse, l'ARN servant de matrice est dégradé par une activité enzymatique de la transcriptase inverse. Cette dégradation est presque totale, sauf pour deux courtes séquences riches en purine (PPT pour *polypurine tracts*). Ces séquences serviront d'amorce pour la synthèse du deuxième brin d'ADN qui est également effectuée par la transcriptase inverse (35). Suite à la synthèse du double brin d'ADNc, il y a formation d'un complexe de préintégration, incluant l'intégrase, la protéine virale Vpr et plusieurs protéines cellulaires (e.g., LEDGF), au noyau de la cellule hôte. Rendu au noyau, l'ADN viral s'intègre à l'ADN cellulaire sous l'action de l'intégrase (36).

1.4.2. Phase tardive

La phase tardive débute avec la transcription des ARNm épissés ou non qui sont ensuite transportés hors du noyau pour l'étape de la traduction en protéines. Les ARNm épissés courts codant pour les protéines régulatrices Tat et Rev, ainsi que la protéine Nef, sont synthétisés en premier. Ensuite, la transcription des ARNm non épissés, comprenant les séquences des trois précurseurs protéiques : Gag, Gag-Pol et Env (gp160) est entreprise et leur exportation est effectuée grâce à la protéine accessoire Rev. La polyprotéine gp160 est tout d'abord traduite, suivie des précurseurs polyprotéiques Gag et Gag-Pol. Une fois la traduction terminée, les protéines virales s'associent à l'ARN intégral viral pour former ainsi des virions. Les protéines virales membranaires sont intégrées à la membrane cellulaire. Le bourgeonnement du virus s'effectue, emportant un fragment de la membrane plasmique de la cellule hôte. La maturation du virus se poursuit par le clivage des précurseurs non clivés, à l'aide de la protéase virale (23 , 37).

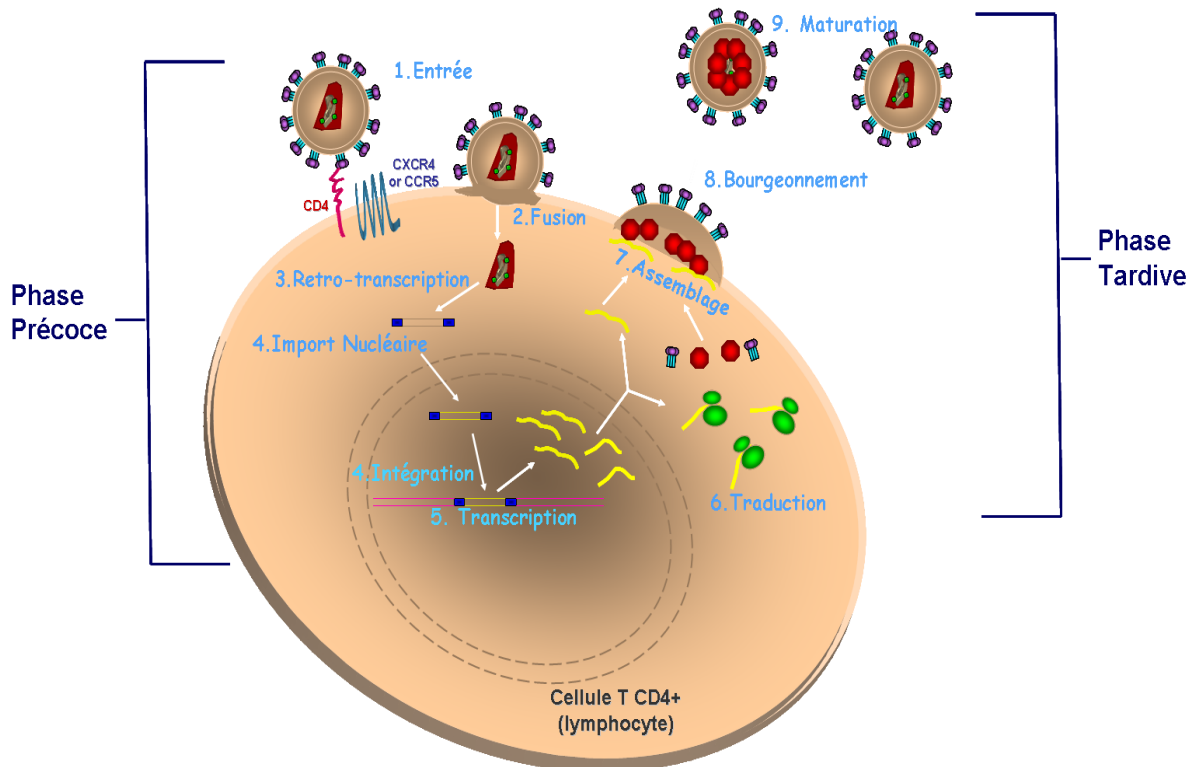


Figure 3 : Le cycle de réplication du VIH-1. Adapté de Weiss RA (38).

1.5. La pathogenèse du VIH-1

1.5.1. Phases cliniques

L'infection à VIH-1 cause une déplétion importante de la population des lymphocytes T CD4⁺ (le taux de lymphocytes T CD4⁺ chez les sujets sains varie de 500 à 1500 cellules/ μ l) (39), compromettant le fonctionnement du système immunitaire et donc rendant l'individu infecté susceptible à des infections opportunistes. L'infection à VIH-1 inclut trois phases : aiguë, chronique et SIDA (Figure 4). L'infection débute par une phase aiguë symptomatique, durant quelques semaines, caractérisée par la réplication virale active et la déplétion des cellules T CD4. Le développement des réponses immunitaires anti-VIH à médiation cellulaire (cellules NK et cellules T CD8) et humorale (anticorps) permet un contrôle temporaire de la réplication virale et une restauration partielle du taux des lymphocytes T CD4⁺ dans la périphérie mais pas au niveau des muqueuses intestinales (40). La phase chronique est généralement asymptomatique, marquée par la déplétion progressive des cellules T CD4⁺ du sang périphérique, la réplication virale persistante et l'activation immunitaire chronique. Le stade SIDA est déclaré une fois que le compte des lymphocytes T CD4⁺ du sang périphérique diminue en dessous de 200 cellules/ μ l, et qu'apparaissent des infections opportunistes (e.g., *Candida*, *Pneumocystis*, *Mycobacterium*) ou des tumeurs (e.g., sarcome de Kaposi) (20)). Chacune de ces phases a des caractéristiques cliniques spécifiques.

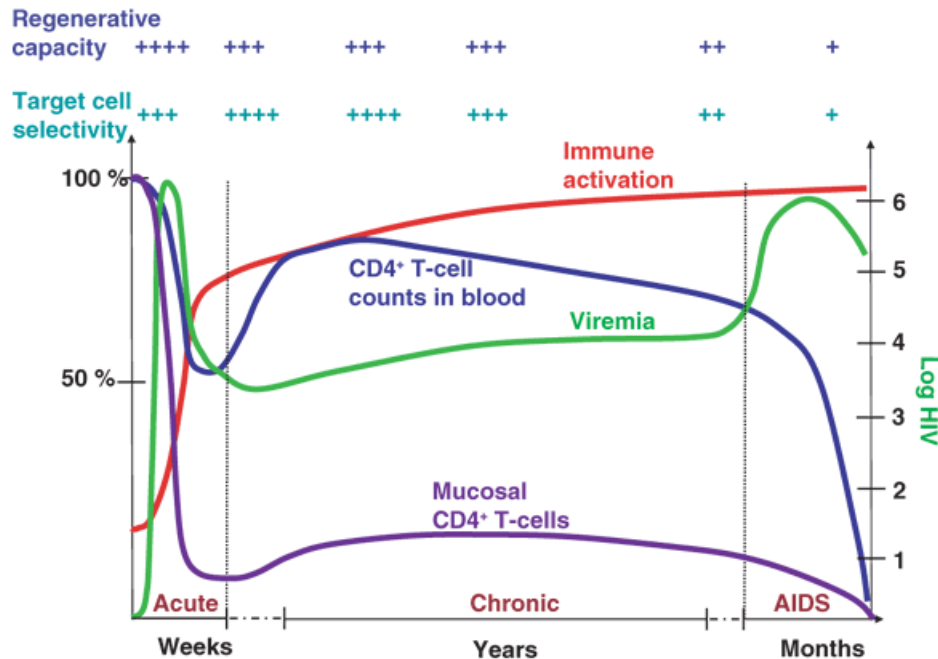


Figure 4 : Phases cliniques de l'infection à VIH-1 (40). Utilisation avec l'accord de l'éditeur de Nature Medicine.

1.5.1.1. Phase aiguë

L'infection primaire au VIH-1 affecte principalement le tractus gastro-intestinal et/ou reproductif, résultant initialement à une réplication virale massive dans les cellules cibles des tissus lymphoïdes associés à ces organes. La hausse importante de la charge virale est généralement accompagnée de fièvre, de maux de tête, de malaises et de perte de poids. Les souches virales détectées lors de la phase aiguë de l'infection utilisent principalement CCR5 comme corécepteur pour l'entrée (virus à tropisme R5) (41, 42). Les souches virales utilisant le récepteur de chimiokine CXCR4 (virus à tropisme X4) apparaissent à des stades tardifs de l'infection (43). L'utilisation de CXCR4 comme corécepteur induit une expansion de la population des cellules cibles (car la majorité des cellules T expriment CXCR4) et une accélération de la progression vers le SIDA. Autant chez les humains que chez les primates, le tractus gastro-intestinal est considéré comme l'organe lymphoïde comprenant plus de la moitié du compte total de cellules T CD4⁺ (40, 43, 44). De plus, une grande proportion de cellules T CD4⁺ réside dans les tissus muqueux et >50% expriment CCR5 (45), alors que seulement 15% des cellules T CD4⁺CCR5⁺ se retrouvent dans le sang périphérique et dans

les ganglions lymphatiques (40). Durant la phase aiguë, le VIH entraîne une déplétion majeure des cellules mémoires T CD4⁺CCR5⁺, et continue au cours des autres phases (Figure 4). Le compte des lymphocytes T CD4⁺ dans le sang périphérique, qui est diminué chez les individus infectés, sous-estime la proportion totale des lymphocytes T CD4⁺ qui est réduite au niveau des muqueuses. L'élimination massive des cellules T CD4⁺CCR5⁺ des muqueuses se déroule pendant les 2-3 semaines suivant l'infection et est associée à la mort cellulaire excessive, directement ou indirectement liée à la cytopathologie virale : la destruction des cellules T CD4⁺ infectées, induite par les cellules T cytotoxiques CD8⁺ (43) et les cellules NK (46). La capacité de régénérer les cellules T CD4⁺ est toutefois grande, dans cette phase.

Les cellules T CD4⁺CCR5⁺ sont des cellules cibles de l'infection à VIH du fait de leur état d'activation et à leur grande permissivité à l'infection virale. En effet, ces cellules expriment des marqueurs d'activation comme les molécules CD25, CD69 et HLA-DR (43, 45, 47). L'activation des cellules peut être due à la présence accrue des cytokines pro-inflammatoires dans l'environnement muqueux. De plus, les protéines virales Nef, Tat, Vpr et Rnv peuvent activer les cellules, indépendamment du récepteur de la cellule T (RCT) (48, 49). Le VIH crée des réservoirs viraux latents dans des cellules T mémoires quiescentes qui persistent à long terme (19, 50, 51), comme c'est le cas des cellules mémoires centrales (52). À la fin de la phase aiguë, la réponse immunitaire adaptative contrôlée par les lymphocytes B (section 1.5.2.2.1) et les lymphocytes T CD8⁺ (section 1.5.2.2.3) augmente et facilite le contrôle de la réplication virale et l'augmentation du taux des lymphocytes T CD4⁺ (40).

1.5.1.2. Phase Chronique

La phase chronique est principalement caractérisée par la diminution progressive des cellules T CD4⁺, la réplication virale active, l'activation persistante des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ et la production accrue de cytokines pro-inflammatoires (40, 43). Le degré d'activation chronique permet de mieux prédire la progression de l'infection que la charge virale elle-même (53, 54). Compte tenu du fait que seule une petite fraction des cellules T est infectée par le VIH *in vivo* (51, 52, 55), l'infection par le VIH en soi ne peut pas être

responsable de la déplétion massive des cellules T CD4⁺. Ainsi, il est plus probable que l'activation immunitaire chronique induise un épuisement du métabolisme cellulaire et par conséquent la mort (43 , 56). Un des facteurs potentiellement responsables de cette activation immunitaire chronique est la translocation microbienne, provenant originalement du tractus gastro-intestinal (57). Plusieurs mécanismes sont impliqués dans les événements menant à la déplétion des cellules T CD4⁺. Ces mécanismes incluent (i) l'attrition du pool de cellules mémoires causée par l'activation persistante, (ii) la vaste activation des cellules T naïves entrant dans le pool des cellules mémoires, (iii) le nombre réduit des cellules de réserve, en état d'équilibre, dû à une stimulation récurrente et (iv) la dysfonction de l'approvisionnement des cellules T naïves des sources lymphopoïétiques (43). La capacité du thymus à régénérer des cellules T naïves est diminuée (58). En outre, l'infection à VIH implique l'altération structurale majeure des ganglions lymphatiques, avec un dépôt délétère de collagène et une diminution du nombre de lymphocytes (59 , 60). La proportion des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ dans le système immunitaire est altérée, avec l'expansion du pool des cellules T CD8⁺ activées et la diminution du nombre de cellules T CD4⁺ (43).

1.5.1.3. Phase SIDA

Le stade SIDA est déclaré lorsque le nombre de cellules T CD4⁺ diminue à moins de 200 cellules/ μ l de sang (61). Cette phase est associée à une augmentation de la virémie et un déclin drastique du nombre de cellules T CD4⁺ dans le sang périphérique (Figure 4). La perte de l'intégrité du système immunitaire, touchant particulièrement l'immunité adaptative à médiation cellulaire, permet aux micro-organismes à virulence limitée (e.g., *Pneumocystis jirovecii* et *Mycobacterium avium*) de devenir des pathogènes opportunistes dangereux. Les infections opportunistes, liées à la phase SIDA, incluent (i) les infections fongiques telles que les candidoses pulmonaires et œsophagiennes et les infections pulmonaires par *P. jirovecii*; (ii) les infections virales associées au cytomégalovirus (CMV), au virus du papillome humain (VPH), et au virus de l'herpès simplex (VSH); (iii) les infections bactériennes telles que *M. tuberculosis*; (iv) les infections protozoaires causant des encéphalites toxoplasmiques et (v) des néoplasies telles que le cancer cervical invasif et le sarcome de Kaposi (20).

1.5.2. La réponse immunitaire innée et adaptative contre le VIH-1

La dissémination du VIH-1 à partir des sites d'entrée muqueux vers les ganglions lymphatiques régionaux se fait dans un temps relativement court et insuffisant pour permettre le déploiement efficace de la réponse immunitaire adaptative anti-VIH. L'immunité innée est donc premièrement déployée pour assurer une protection contre l'infection et la dissémination du pathogène. Les composantes cellulaires de l'immunité innée incluent les cellules dendritiques, les macrophages, les neutrophiles, les cellules tueuses naturelles (NK) ainsi que les cellules NK-T et les cellules T $\gamma\delta$. La capacité de l'immunité innée à contrôler temporairement une infection fournit un temps précieux à l'immunité adaptative, représentée principalement par les cellules B et les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺, pour développer une réponse immunitaire spécifique et appropriée (62). Ensemble, les réponses immunitaires innées et adaptatives vont tenter de se compléter afin de contrôler efficacement la dissémination du VIH-1. L'existence d'individus hautement exposés au VIH-1 mais non-infectés représente une preuve que dans un contexte génétique spécifique le système immunitaire est capable de contrecarrer l'infection ; toutefois, les mécanismes de protection contre l'infection à VIH restent mal compris et limités à un nombre restreint d'individus (63 , 64).

1.5.2.1. Réponse immunitaire innée

Lors de l'infection primaire, le VIH-1 rencontre les cellules de Langerhans, une catégorie de cellules dendritiques dans les muqueuses rectale ou vaginale, puis est transporté dans les ganglions lymphatiques où se déroulera sa réplication en présence des cellules cibles. À l'intérieur de 2 à 3 semaines, suite à l'infection, la réponse immunitaire innée est développée contre le VIH-1. Dans un ordre qui reste inconnu, plusieurs composantes de l'immunité innée tentent respectivement de bloquer la propagation du virus. Les macrophages et les cellules dendritiques phagocytent les particules virales et présentent les antigènes aux lymphocytes T. Les cellules dendritiques exposées au virus vont produire plusieurs cytokines dont le *Tumor Necrosis Factor* (TNF), qui renforcera l'immunité adaptative. En réponse à l'infection à VIH-1, les neutrophiles sécrètent les défensines α -1, -2 et -3, des peptides antimicrobiens, prénommés également HNP 1, -2 et -3 (HPN pour *human neutrophil peptides*) (65, 66). Ayant des propriétés similaires, les HNP1-3 ont tous la

capacité d'inhiber la réplication virale en interagissant directement avec le virus ou avec les cellules cibles (67-69).

Les cellules NK, par leur fonction cytotoxique, lysent les cellules infectées qui se distinguent des cellules non-infectées par une expression faible des molécules du CMH de classe I (20). Cette reconnaissance s'opère grâce aux récepteurs inhibiteurs KIR (pour *Killer immunoglobulin receptors*) qui interagissent avec les molécules du CMH de classe I (70). La réponse des cellules NK contre le VIH-1 est importante et son efficacité dépend de la magnitude de la charge virale. Effectivement, chez les individus infectés avec une charge virale importante, la fonction cytolytique des cellules NK est altérée (71). Elle est toutefois restaurée suite aux traitements antirétroviraux (HAART pour *highly activated anti-retroviral therapy*) qui diminuent la charge virale. En outre, de manière non cytolytique, les cellules NK ont la capacité de sécréter les chimiokines ligands de CCR5 (CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β et CCL5/RANTES (MIP pour *macrophage inflammatory protein*) afin de bloquer l'accès de ce corécepteur, empêchant ainsi l'entrée et la réplication du virus (62). Les cellules NK-T, tout comme les cellules NK et les cellules dendritiques, produisent la cytokine IFN- γ qui induit la production des molécules antivirales telles que le monoxyde d'azote via l'induction de l'enzyme NOS2 (pour *Nitric oxide synthase 2*) (72). La grande qualité des cellules NK-T est leur habileté à sécréter une vaste quantité de cytokines qui activeront d'autres cellules, telles que les cellules dendritiques, dans les heures suivant la détection d'un pathogène. Les lymphocytes T $\gamma\delta$, retrouvés dans les surfaces muqueuses, ont la capacité de lyser les cellules cibles du VIH et de produire des cytokines impliquées dans la différenciation des cellules T CD4⁺ qui influenceront la réponse immunitaire adaptative (73). La majorité des cellules NK-T reconnaissent l'antigène par leur RCT présenté dans un contexte dépendant de la molécule CD1 (74), tandis que les lymphocytes T $\gamma\delta$ reconnaissent des antigènes lipidiques ou des protéines entières (75). Les mécanismes utilisés par les cellules NKT et T $\gamma\delta$ pour la reconnaissance des cellules infectées par le VIH restent toutefois inconnus.

Les composants solubles de l'immunité innée contribuent également à la réponse immunitaire contre le VIH-1. Des facteurs solubles tels que la lectine se liant au mannose (MBL pour *mannose-binding lectins*) et les composants du système du complément

participent à la lyse ou à la phagocytose des particules virales par les macrophages. Durant la phase aiguë, des protéines tels que l'amyloïde sérique A, des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine (IL)-15, IL-10, IL-18, IL-22 et la chimiokine CXCL10/IP-10 circulent dans le sang périphérique et modulent les réponses immunitaires innée et adaptative (76, 77).

1.5.2.2. Réponse immunitaire adaptative

1.5.2.2.1. Les Lymphocytes B

Les lymphocytes B contrôlent la réponse immunitaire adaptative humorale en produisant et sécrétant une variété d'anticorps neutralisants (IgA, IgD, IgG et IgM) afin de contrôler une infection induite, entre autres, par un pathogène (22). L'activation des cellules B en réponse à un antigène et ainsi le déclenchement de la réponse humorale requièrent la présence de cellules T CD4⁺, particulièrement les cellules auxiliaires de type 2 (Th2) (voir section 1.9.2). Les cellules B sont également des cellules présentatrices d'antigènes (voir section 1.6.2.1) et peuvent promouvoir la différenciation des cellules T CD4⁺ de type Th2 qui sécrètent des cytokines incluant l'IL-10 et l'IL-6 (78, 79).

Au cours de l'infection à VIH-1, les cellules B génèrent une vaste quantité d'anticorps neutralisants (80). La première réponse des cellules B, détectée dans le plasma, est retrouvée sous forme de complexes immuns d'anticorps-virions (81). Quelques jours plus tard, des anticorps spécifiques pour la glycoprotéine gp41 sont détectés suivi des anticorps spécifiques pour la gp120 et d'anticorps spécifiques à d'autres protéines virales telles que la p24 (82, 83). La production accrue d'anticorps coïncide avec le déclin de la charge virale. D'ailleurs, durant la phase aiguë, des anticorps de type IgA spécifiques à la gp41 sont détectés dans les sécrétions muqueuses (76). Des études récentes ont démontré que les anticorps initiaux IgM et IgD spécifiques à la gp41 n'affectent pas significativement le dynamisme de la charge virale (81). En effet, suite aux mutations d'échappement au niveau de l'enveloppe, les anticorps produits à un moment donné ne neutralisent pas les virus contemporains qui échappent ainsi à la réponse antivirale humorale. Également, les anticorps spécifiques aux régions conservées de l'enveloppe virale, tel que le site d'interaction avec le

récepteur CD4, sont rarement générés et généralement sont produits 20-30 mois suivant la transmission (80, 84). La théorie du "*glycan shield*", basée sur une étude longitudinale sur la spécificité des anticorps au cours de l'évolution de l'infection à VIH-1, a été proposée pour expliquer l'échappement des virus mutés aux anticorps neutralisants (85). Selon cette théorie, les virus mutants nouvellement produits contiennent des mutations au niveau des sites de glycosylation N sur l'enveloppe, empêchant ainsi la fixation des anticorps neutralisants, mais non pas l'interaction de la gp120 au récepteur CD4. La théorie du "*glycan shield*" fournit une explication pour l'inefficacité de la réponse humorale à contenir l'infection à VIH-1 malgré la génération d'un vaste répertoire d'anticorps neutralisants spécifiques. Durant la phase chronique, la pression antigénique et l'augmentation de l'activation de l'immunité causée par le virus engendrent la dysfonction des cellules B incluant l'hypergammaglobulinémie, caractérisée par des niveaux élevés d'anticorps non-spécifiques et la perte de cellules B mémoires (20). Des études approfondies sur le design de vaccins générant des anticorps neutralisants spécifiques contre les régions conservées du VIH-1 sont présentement en cours (86, 87).

1.5.2.2.2. Les cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH-1

Lors de l'immunité adaptative, les cellules T CD4⁺ jouent un rôle important dans l'établissement et la maximisation des capacités du système immunitaire à contrôler un pathogène. Non seulement ces cellules sont responsables de l'activation des cellules B mais elles sont aussi grandement impliquées dans la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ qui contribuent principalement à la réponse cytotoxique. Lorsque les cellules T CD4⁺ naïves entrent en contact avec leurs antigènes spécifiques et reçoivent des signaux de costimulation, elles deviennent activées, sécrètent des cytokines, prolifèrent et se différencient, entraînant la formation de clones de cellules T CD4⁺ effectrices spécifiques d'un antigène (22).

Les cellules T CD4⁺ spécifiques d'antigène peuvent être identifiées *ex vivo* et *in vitro* par leur capacité de prolifération (dilution de la Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)) et de production de cytokines (IL-2, IFN- γ) (88). Récemment, une nouvelle technique de détection des cellules spécifiques à l'antigène a été introduite, basée sur la mesure de l'expression de la molécule de costimulation CD154 (appelée également CD40

ligand, CD40L) (89). Les cellules T spécifiques au VIH peuvent aussi être identifiées à l'aide de tétramères, constitués de complexes peptides-CMH multimériques, spécifiques à l'antigène étudié (e.g., VIH-1) (90, 91, 92, 93). Dépendamment de l'hétérogénéité clonale et du stade de progression de l'infection, les réponses T CD4⁺ peuvent être spécifiques aux protéines de l'enveloppe, à nef et aux polyprotéines gag et pol (88, 94, 95).

Les réponses T CD4⁺ sont altérées lors de l'infection à VIH-1. Il a été démontré dans des conditions *in vitro*, une perte progressive des réponses prolifératives aux antigènes de rappel, coïncidant avec la déplétion du nombre de cellules T CD4⁺ (96). Chez la majorité des individus infectés, la réponse proliférative spécifique aux antigènes du VIH est présente durant la phase aiguë mais est perdue peu après (97, 98). Lors de la phase aiguë, les cellules T CD4⁺ du sang périphérique spécifiques au VIH-1 expriment des marqueurs d'activation (CCR5 et CD38) et de prolifération cellulaire (Ki-67) (94). La majorité de ces cellules sont dépourvues du récepteur de la cytokine IL-7, IL-7R/CD127, qui est un marqueur cellulaire de mémoire à long terme. De plus, la petite population de cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH-1, exprimant CD127, serait plus susceptible à l'infection virale (94). En concordance avec ces résultats, d'autres études ont démontré que les cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH-1 des sujets en phase chronique sont hautement susceptibles à l'infection par le VIH (99). Également, les cellules T spécifiques au VIH de la phase aiguë expriment des bas niveaux de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, les rendant ainsi vulnérables à l'apoptose (100). Zaunders *et al.* ont tenté d'expliquer cette perte des cellules T CD4⁺ CCR5⁺CD38⁺ en démontrant qu'une grande proportion de ces lymphocytes (~40%) expriment l'intégrine $\alpha 4\beta 7$, un marqueur de migration vers les muqueuses du tractus gastro-intestinal, qui est le site majeur de réplication virale et de déplétion des cellules T (94). La circulation des cellules T spécifiques au VIH vers les muqueuses intestinales contribuerait donc à la perte des réponses antivirales. De plus, ces cellules expriment fortement CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*), une molécule qui régule négativement l'activation, la différenciation et la prolifération cellulaire. L'expression à la hausse de CTLA-4 sur les cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH-1 est une cause de dysfonctionnement de ces cellules (93, 101).

D'autres molécules de régulation négative telles que le PD-1 (pour *programmed death 1*) sont également connues pour être impliquées dans la limitation de la réponse proliférative spécifique à l'antigène chez les sujets infectés par le VIH-1. Récemment, il a été rapporté que l'expression de PD-1 est augmentée sur les cellules T CD4⁺ dans la phase chronique de l'infection; des anticorps bloquant la voie de signalisation PD-1 induisent une restauration de la prolifération et de la production de cytokines. De plus, les niveaux d'expression de PD-1 sont corrélés positivement avec la charge virale et inversement avec le nombre de cellules T CD4⁺ (92 , 102 , 103).

En plus d'être contrôlée par les molécules décrites ci-dessus, la réponse proliférative des cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH-1 peut être inhibée par les cellules T régulatrices (Tregs) par des mécanismes incluant la production d'IL-10 et de TGF- β (TGF pour *Transforming growth factor*) (104). Les Tregs ont pour fonction de diminuer l'activation cellulaire mais elles peuvent aussi diminuer les réponses cellulaires spécifiques au VIH-1 contribuant ainsi à l'immunodéficience caractéristique (105). Malgré une diminution globale du nombre de cellules T CD4⁺, la proportion des cellules Tregs est augmentée dans les tissus muqueux du tractus gastro-intestinal (106). Cette augmentation peut être modulée par la gp120, qui dans des conditions *in vitro*, favorise la prolifération et l'expansion des cellules Tregs (96). Les cellules Tregs sont permissives à l'infection par le VIH-1 et peuvent représenter un réservoir viral chez les sujets infectés par le VIH-1 (107). Le rôle délétère *versus* bénéfique des Tregs régulatrices dans l'infection à VIH-1 reste encore un sujet de débat.

La préservation des réponses prolifératives peut toutefois être en partie rétablie chez les sujets sous trithérapie antirétrovirale (108 , 109). Une étude comparant des individus avirémiques traités avec le HAART *versus* des individus virémiques échouant aux traitements a révélé des facteurs expliquant partiellement le défaut des réponses prolifératives associées à la pathogénèse de l'infection à VIH-1 (88). Chez les individus avirémiques dont la charge virale est basse, deux groupes de cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH-1 ont été identifiés: les cellules T mémoires centrales (T_{CM}) (CD45RA⁻CCR7⁺), produisant exclusivement l'IL-2, et les cellules T mémoires effectrices (T_{EM}) (CD45RA⁻CCR7⁻)

produisant à la fois l'IL-2 et l'IFN- γ . En contraste, la majorité des cellules spécifiques au VIH-1, chez les sujets virémiques, sont des cellules T_{EM}, ne produisant que de l'IFN- γ et incapables de proliférer. L'apparition des cellules T_{EM} IFN- γ ⁺ est brève et est associée à la hausse fluctuante de la virémie. Par conséquent, la réduction des réponses prolifératives spécifiques au VIH-1 est due, en partie, à l'absence de production d'IL-2 et la diminution de la fréquence de cellules T_{CM} pouvant produire cette cytokine. D'autre part, les cellules T_{CM} sont très importantes dans le développement des cellules T CD8 cytotoxiques, de par leur capacité à produire de l'IL-2 et, par conséquent, à induire l'expansion clonale et rapide en réponse à une nouvelle stimulation antigénique.

Lors de la phase chronique, une perte irréversible des cellules T_{CM} est constatée (96). Il y a une corrélation inverse entre la charge virale et la réponse proliférative (110). En effet, des interventions de traitements intermittents structurés (TIS) ont démontré que lorsque la charge virale diminue, les cellules T_{EM} CD4⁺ spécifiques au VIH-1 acquièrent un phénotype appartenant aux cellules T_{CM}, c'est-à-dire une augmentation de l'expression de CCR7 et de la production d'IL-2 (111, 112). Cependant, suite à l'interruption de traitements, les cellules T CD4⁺ spécifiques reprennent leurs caractéristiques de cellules T_{EM}. Le répertoire du RCT des cellules spécifiques semble être restrictif, suggérant que ces lymphocytes sont générés à partir de cellules effectrices mémoires au lieu de cellules naïves (113, 114).

Le phénotype des cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH-1 et leur production de cytokines caractérisant les importantes sous-populations des cellules T CD4⁺ (Th1, Th2, et Th17; voir section 1.9) restent peu documentés. Une étude a rapporté que lors de la phase aiguë, les cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH-1 produisent de l'IL-17, et donc par conséquent auraient un phénotype Th17 (95). En revanche, les cellules Th17 spécifiques au VIH-1 ne sont plus détectées lors de la phase chronique (95, 115). Par contre, les cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH-1 produisant de l'IFN- γ , cytokine de marque des cellules Th1, sont détectées lors des phases aiguë et chronique (95, 115, 116, 117). Ainsi, les cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH-1 semblent avoir majoritairement un profil fonctionnel de type Th1.

1.5.2.2.3. Les cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH-1

L'efficacité maximale de la réponse immunitaire adaptative dans le contrôle des infections virales persistantes requiert la présence accrue de lymphocytes T CD8⁺, également nommés cellules T cytotoxiques. Les cellules T CD8⁺ effectrices ont la capacité de tuer les cellules infectées suite à la reconnaissance de protéines antigéniques virales, fragmentées en peptides, puis transportées à la surface des cellules pour être présentées dans le contexte des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) (22). Les cellules T CD8⁺ spécifiques d'un pathogène lysent les cellules infectées par le relâchement d'enzymes cytolytiques perforine, granzyme A (ou granules enzymes A) et granzyme B (ou granules enzymes B), qui activent la voie de la mort cellulaire et induisent conséquemment l'apoptose des cellules cibles.

La réponse cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺, incluant leur capacité de lyse par les enzymes mentionnées ci-dessus, est associée aux réponses antivirales contre le VIH-1 (118). Néanmoins, l'effet de cette réponse suscite une controverse. Des études *in vitro* ont démontré que les protéines granzymes A ou B libres, normalement sécrétées par les cellules T CD8⁺, n'ont aucun contrôle sur la dissémination du virus (119). En contrepartie, il a été récemment rapporté que les cellules T CD8⁺ de patients contrôlant la charge virale pendant plus de 15 ans, sans thérapie, restreignent efficacement la réplication virale par le granzyme B, qui module la mort des cellules cibles (120). Par ailleurs, d'autres études démontrent que la prolifération des cellules T CD8⁺ est directement associée à la production de perforine (121), un élément très important pour le mécanisme cytolytique des lymphocytes T CD8⁺. D'ailleurs, la réponse cytotoxique altérée chez les individus infectés par le VIH-1 est reflétée par le manque de production de cette enzyme (122). L'incapacité des cellules T CD8⁺ à produire la perforine serait causée par une défaillance dans la maturation de ces cellules.

Comparé à l'infection à VIH, l'infection à CMV est contrôlée avec succès chez les individus immunocompétents, incluant aussi certains individus co-infectés par le VIH et le CMV (123, 124). Contrairement aux cellules T CD8⁺ spécifiques au CMV, les cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH-1 peuvent se différencier en cellules mémoire centrale (T_{CM}, CD45RA⁻CCR7⁺), puis en cellules mémoires effectrices (T_{EM}, CD45RA⁻CCR7⁺), mais ont de

la difficulté à poursuivre le processus de maturation vers des cellules différenciées de façon terminale (CD45RA⁺CCR7⁻) produisant de la perforine (125). Donc, la majorité des cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH seraient bloquées aux stades de cellules effectrices qui ne produisent ou ne sécrètent pas de granules et d'enzymes cytolytiques. De plus, il a été rapporté que l'expression forte de PD-1 à la surface des cellules T spécifiques au VIH-1 pourrait être liée à l'absence de production de perforine et de granzyme (102). Le blocage de l'interaction fonctionnelle entre le PD-1 et ses deux ligands, PDL-1 et PDL-2, entraîne non seulement une plus grande production de cytokines (IL-2, IFN- γ et TNF) mais aussi une meilleure habileté à produire les enzymes cytolytiques (102).

Les propriétés non cytotoxiques des lymphocytes T CD8⁺ sont également associées aux réponses antivirales contre le VIH. Tout comme les cellules NK, les cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH-1 peuvent sécréter les ligands de CCR5 (MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES) qui bloquent l'entrée et la réplication du VIH-1 (126). Par ailleurs, un autre facteur soluble désigné CAF (pour *cell antiviral factor*) a été décrit pour ses activités antivirales (127). Le CAF est une molécule thermostable avec une petite masse moléculaire (<20 kD) qui inhibe la réplication du VIH en bloquant la transcription virale. Ainsi, l'effet du CAF n'est pas restreint au tropisme de type R5, contrairement aux ligands de CCR5 (128, 129). Le CAF est uniquement produit par les cellules T CD8⁺ des sujets avec progression lente vers le SIDA (130) et son identité moléculaire n'a toujours pas été caractérisée. Une étude avait proposé que CAF avait les caractéristiques des protéines antimicrobiennes défensines α 1, 2 et 3 (131). Toutefois, ce dernier article fut rétracté car d'autres études ont démontré que les cellules T CD8⁺ ne produisent pas les défensines α (68). Des études plus approfondies devront être effectuées pour déterminer l'identité de CAF.

Les réponses T CD8⁺ spécifiques au VIH-1 peuvent être détectées dans les premiers mois suite à l'infection primaire et sont présentes tout au long de la phase chronique (132, 133). Dans un modèle d'infection par le VIS chez le macaque, il a été très récemment démontré que la co-localisation des cellules T CD8⁺ effectrices et des cellules T CD4⁺ dans les muqueuses cervicales utérines détermine la vitesse de la progression du SIV, un ratio élevé entre les cellules T CD8⁺ et les cellules T CD4⁺ étant favorable pour limiter la

dissémination virale (134). Durant la phase aiguë, les premières réponses T CD8⁺ contre le VIH-1 surviennent alors que le pic de la virémie approche. Elles sont généralement spécifiques pour la gp 41, la gp 120 et pour la protéine Nef (135, 136). Les réponses dirigées contre les protéines Gag (p24) et Pol surviennent un peu plus tard et semblent avoir un rôle important dans la maintenance de la charge virale au point de contrôle. L'émergence de la réponse cytotoxique se fait une à deux semaines suivant le pic de la virémie, coïncidant avec le déclin de la charge virale. Cette association temporelle entre la diminution de la charge virale et l'arrivée des réponses cytotoxiques reflète l'effet des cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH-1 dans la restriction de la réplication virale. L'activité des lymphocytes T CD8⁺ reste un déterminant majeur de la longueur de la période asymptomatique (120, 137).

Suivant le pic des réponses T CD8⁺, la séquence génomique du virus change dramatiquement. La sélection rapide des mutations se déroule dans les sites discrets du génome viral alors que la virémie atteint le point de contrôle. Les premiers changements d'acides aminés, entraînant l'apparition de mutations d'échappement, sont causés entre autre par les cellules T CD8⁺ qui reconnaissent l'épitope exprimé uniquement par le virus original et conséquemment vont induire une sélection pour la production de virus mutants (135). Les mutations d'échappement constituent un facteur nuisant à l'efficacité des réponses T CD8⁺. Plusieurs mutations sélectionnant pour les protéines p24 et Nef ont pu être observées (138, 139). La sélection de mutations d'échappement n'implique pas un seul changement d'acide aminé à un épitope particulier, mais inclut plusieurs modifications à l'épitope en question, qui ne sera plus reconnu par les cellules T CD8⁺ spécifiques à cet épitope. La réponse cytotoxique devient donc inefficace, étant incapable de s'ajuster à l'émergence de nouveaux virus mutants. Ces virus à mutations d'échappement requièrent de nouvelles réponses immunitaires qui doivent être générées dans un environnement caractérisé par la constante présence d'antigènes et par une réduction des cellules T CD4⁺ disponibles. Ainsi, la production récurrente de virus mutants contribuerait à un épuisement du système immunitaire par la requête de nouvelles générations de réponses T CD8⁺ spécifiques aux virions nouvellement produits.

L'activité antivirale efficace des cellules T CD8⁺ dépend de la capacité des cellules cytotoxiques à circuler dans les tissus où la réplication virale a lieu. En ce qui concerne le VIH-1, les tissus lymphoïdes associés au tractus gastro-intestinal (GALT pour *gut-associated lymphoid tissues*), demeurent les sites majeurs de réplication virale. Le recrutement des lymphocytes T à partir du sang périphérique vers le GALT se fait à l'aide de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$, une molécule d'adressage exprimée à la surface des lymphocytes et qui se lie à son ligand MadCAM-1, une molécule d'adhésion exprimée à la surface des cellules épithéliales intestinales (140). Une fois arrivés à destination, les lymphocytes T changent de phénotype et expriment l'intégrine $\alpha E\beta 7$, qui va les retenir dans le GALT (141). Peu d'études décrivent les cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH dans les muqueuses du tractus gastro-intestinal à partir de biopsies. Malgré la lymphopénie des cellules T CD4⁺, les cellules T CD8⁺ de la phase chronique restent présentes et continuent d'exercer les fonctions cytotoxiques (142). Les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VIH-1 ont des caractéristiques de cellules mémoires et expriment majoritairement CCR5 (143). Dans le GALT des individus infectés par le VIH-1, les niveaux d'expression des ligands de CCR5 sont très élevés (144). Cette hausse pourrait expliquer le recrutement des lymphocytes T via CCR5 au site d'infection. En outre, les cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH-1 expriment fortement l'intégrine $\alpha E\beta 7$, les retenant au GALT (143). Cette particularité est propre aux cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH car les cellules T CD8⁺ spécifiques au CMV, exprimant elles aussi majoritairement CCR5, n'expriment pas $\alpha E\beta 7$ (143).

La dysfonction des cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH est associée à la progression de l'infection vers le stade SIDA. L'infection à VIH induit une inflammation impliquant une grande production de chimiokines pro-inflammatoires, tels que les ligands de CCR5 et de CXCR3, qui recruteront et retiendront les lymphocytes T au site d'infection (145). Il a été récemment rapporté que le CXCR3 guide les cellules T spécifiques au VIH vers les tissus lymphoïdes infectés (146). Comparées aux cellules provenant de patients VIH⁺ en phase chronique, les cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH-1 provenant des ganglions lymphatiques du GALT d'individus séropositifs en phase avancée montrent une diminution de l'expression de CXCR3 (146). L'expression des cellules T CD8⁺CXCR3⁺ spécifiques au VIH serait positivement corrélée avec le compte des cellules T CD4⁺ et inversement corrélée avec la

charge virale (146). De plus, la production des ligands de CXCR3 (MIG et IP-10) serait réduite dans les ganglions lymphatiques d'individus séropositifs en phase avancée. La dysfonction des cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH impliquerait donc également un défaut de recrutement des lymphocytes T vers les sites d'infection.

1.5.3. Individus infectés par le VIH

Tel que mentionné plus haut, l'infection à VIH-1 est caractérisée par une importante déplétion des cellules T CD4⁺ et par une charge virale très élevée. Les individus progressant rapidement vers le SIDA développent une profonde immunodéficience et succombent aux infections opportunistes. La progression de la maladie est ralentie grâce à la trithérapie antirétrovirale ou HAART, qui induit une restauration du compte total des cellules T CD4⁺ dans le sang périphérique et une réduction considérable de la charge virale, variant pour chaque sujet. Il est remarquable de constater qu'au sein de la population des individus séropositifs un petit pourcentage (5-15%) de personnes arrivant à contrôler la charge virale sur une période de plus de 10 ans et à conserver un taux de cellules T CD4⁺ relativement normal, sans avoir recours aux traitements. Ces personnes forment le groupe des individus à progression lente (LTNP pour *long-term nonprogressors*). Comprendre les différences entre les individus à progression rapide, requérant la trithérapie antirétrovirale pour leur survie, et les LTNP permettra une meilleure compréhension des corrélats de protection immunitaire anti-VIH et potentiellement la découverte des nouvelles stratégies thérapeutiques anti-VIH-1.

1.5.3.1. Individus sous trithérapie antirétrovirale

La trithérapie antirétrovirale représente une combinaison de médicaments antirétroviraux incluant des inhibiteurs de la transcriptase inverse (AZT ou 3TC) et de la protéase virale (indinavir, ritonavir) qui a été mise en place dans les années 1990' (108 , 109). Plus récemment, de nouvelles molécules antivirales ont été mises sur le marché: les inhibiteurs de CCR5 (maraviroc) (147) et les inhibiteurs de l'intégrase (raltegravir) (148). L'augmentation rapide des cellules T CD4⁺ est observée à l'intérieur des deux premiers mois suivant la thérapie antirétrovirale incluant des inhibiteurs de la transcriptase inverse et des inhibiteurs de protéases (108 , 109). Avec le déclin de la charge virale qui se déroule parallèlement, cette augmentation contribue à la reconstitution du système immunitaire,

reflétée au moins en partie par une recirculation des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ dans le sang périphérique en provenance des tissus lymphoïdes (108 , 109 , 149 , 150 , 151). Pour certains individus, la charge virale plasmatique diminue en-dessous du seuil de détection (<50 copies d'ARN du VIH/ml). Une réduction remarquable de l'activation cellulaire est observée. L'expression du marqueur intracellulaire de prolifération Ki-67 par les cellules T CD4⁺ est diminuée chez les sujets sous HAART (150, 152). La baisse de la production des cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF et l'IL-6 reflète une diminution de l'inflammation associée à l'infection à VIH-1 (153). Également, l'expression du marqueur de costimulation CD28, qui est négativement régulé durant l'infection résultant en anergie cellulaire et en apoptose, est en partie rétablie après le traitement (108). La réduction de l'activation cellulaire est associée au prolongement de la survie des lymphocytes T et à la restauration de leur nombre, augmentant ainsi la diversité de leur répertoire au niveau du RCT. D'ailleurs, les réponses T CD4⁺ spécifiques aux pathogènes opportunistes tels que le CMV et le *Mycobacterium tuberculosis* sont rétablies rapidement suite aux traitements (108, 153). La translocation microbienne est aussi partiellement réduite suite aux traitements (57). De plus, la thérapie induit une augmentation de la taille du thymus, signe d'augmentation de la thymopoïèse qui coïncide avec la production des nouvelles cellules T naïves (58, 154).

Sur la base de plusieurs études, l'initiation du traitement durant la phase aiguë est fortement recommandée (98, 155). D'ailleurs, une étude a démontré que les individus traités en phase aiguë comparés aux individus dont les traitements ont débuté durant la phase chronique conservent de façon quantitative et qualitative les réponses T CD8⁺ spécifiques au VIH-1 (97). Cette conservation est associée à une réponse efficace des cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH-1. Lorsque la thérapie antirétrovirale est initiée durant la phase chronique, son effet est diminué, résultant en un déclin des réponses T CD8⁺. Au niveau de l'intestin, le nombre et la fonction des cellules T CD4⁺ sont restaurés chez les individus traités longtemps (>5 ans) avec la thérapie antirétrovirale (156).

Bien que l'utilisation de la thérapie antirétrovirale ait ses d'indiscutables avantages, elle n'éradique pas le virus qui continue à persister dans des réservoirs cellulaires sous forme latente. Récemment, Chomont et al. ont démontré que les cellules T CD4⁺ à phénotype

mémoire centrale (CD45RA⁻CCR7⁺CD27⁺) et mémoires transitoires (CD45RA⁻CCR7⁻CD27⁺) sont des réservoirs cellulaires majeurs chez les sujets recevant une thérapie antirétrovirale et ayant une charge virale plasmatique indétectable (52). De nouvelles stratégies thérapeutiques seront nécessaires pour achever l'éradication du VIH-1.

1.5.3.2. Individus à progression lente (LTNP)

À ce jour, les LTNPs représentent la confirmation de la capacité du système immunitaire à contrôler le VIH-1 et à prévenir les pathologies liées à la phase SIDA. À l'origine, la définition des LTNPs regroupait les individus infectés depuis plus de 7 ans, avec un compte de cellules T CD4⁺ supérieur à 500 cellules/ μ l sans déclin au fil des années, une absence de symptômes liés à la phase SIDA, cela sans recours aux traitements antirétroviraux (20). À présent, les LTNP sont définis par leur capacité à maintenir un taux de cellules T CD4⁺ supérieurs à 500 cellules/ μ l et une charge virale basse pendant une période de plus de 10 ans, sans avoir recours aux traitements antirétroviraux (118). Au sein des LTNPs, une petite population, nommée contrôleurs d'élite, se distingue par leur capacité de maintenir une charge virale plasmatique indétectable (<50 copies ARN viral/ml de plasma) pour >10 ans en absence de tout traitement antirétroviral (118). Les LTNPs ont été identifiés dans tous les groupes à risque du VIH et ils ne sont pas distingués démographiquement des patients à progression rapide (118).

Bien qu'ils soient présentement peu définis, les mécanismes de contrôle de la charge virale chez les LTNPs devraient impliquer des facteurs virologiques, des facteurs génétiques de l'hôte et/ou l'efficacité de la réponse immunitaire. L'infection avec des souches de VIH-1 à virulence faible peut expliquer la progression lente vers le SIDA chez certains individus. Une étude, portant sur une cohorte d'individus de LTNPs infectés par le même donneur a démontré que la progression lente de l'infection était associée à la délétion du gène *nef* (157). Cependant, peu d'indices soutiennent les facteurs virologiques comme mécanisme dominant dans le contrôle de la virémie chez les LTNP, compte tenu du fait que des virus infectieux ont pu être isolés chez des individus à progression lente et rapide à la fois (118).

Les molécules HLA (pour *human leukocyte antigen*), impliquées dans la reconnaissance immunitaire des cellules infectées, sont reconnues pour être des facteurs génétiques jouant un rôle primordial dans le contrôle de la virémie (118, 158). En effet, les molécules HLA-B5701 et HLA-B27 sont fréquemment retrouvées dans les cohortes des LTNPs de l'Amérique du Nord et de l'Europe (118). Il a également été démontré que l'expression homozygote du gène mutant du CCR5, le *CCR5-Δ32*, protège efficacement contre les infections à VIH-1, tandis que l'expression hétérozygote ralentit la progression de l'infection vers la phase SIDA (159, 160). De plus, l'augmentation du nombre de copies disponibles du gène du MIP-1 α , le *CCL3L1*, entraînant une plus forte production de cette chimiokine, est également associée au contrôle de la charge virale (161, 162). Le mécanisme par lequel ces facteurs génétiques mentionnés protègent contre la progression de l'infection est multifactoriel et inclut une entrée virale restreinte et la conservation de l'immunité à médiation cellulaire (162).

Les mutations au gène du CCR5 et les virus atténués touchent une minorité de la population des LTNPs. Ainsi, une forte réponse immunitaire, combinée à des allèles molécules HLA, est possiblement responsable du contrôle de la virémie chez les LTNPs. D'ailleurs, une étude a démontré que la co-expression et l'interaction entre KIR3DS1, un récepteur de la régulation sur la surface des cellules NK, et l'allèle HLA-Bw4-081 entraînent une réduction de la virémie au point de contrôle (163, 164). Plusieurs différences ont été observées entre les sujets à progression rapide et les LTNPs au niveau des immunités innée et adaptative. Les LTNPs ont effectivement une plus grande fréquence de cellules dendritiques plasmacytoïdes, qui sécrètent des cytokines antivirales (interférons α et β) (165). De plus, comparés aux individus à progression rapide, les LTNPs affichent une meilleure polyfonctionnalité des réponses T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques au VIH-1 (IL-2 et IFN- γ) (166, 167). D'autre part, les cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH expriment des niveaux élevés de CTLA-4 chez les individus à progression rapide comparés aux LTNPs (93). Cette expression pourrait être la cause de l'incapacité des cellules T CD4⁺ des individus à progression rapide à proliférer en réponse aux peptides ou à la protéine p24 du VIH-1, fonction qui est maintenue chez les LTNPs (168, 169). En comparaison avec les individus à progression rapide, les réponses T CD8⁺ spécifiques au VIH-1 sont plus efficaces chez les LTNPs, reflétant leur

capacité supérieure à proliférer suite à la présentation des antigènes du VIH, et à produire une multitude de cytokines telles que l'IFN- γ , le TNF, l'IL-2, le marqueur de dégranulation CD107a ainsi que la perforine (120, 170). De plus, les cellules T CD8⁺, fraîchement isolées des LTNPs, ont une grande capacité à inhiber la réplication du VIH dans les cellules T CD4⁺ autologues par un mécanisme de cytotoxicité (171). Les réponses cytotoxiques spécifiques à la protéine Gag du VIH-1 sont également conservées chez les LTNPs. La perte de ces réponses, observée chez les individus à progression rapide, est associée à l'augmentation de la charge virale et à la déplétion des cellules T CD4⁺ (20). Une des plus grandes particularités des LTNP demeure leur capacité à préserver l'intégrité des organes lymphoïdes (172, 173, 174). Par ailleurs, l'activation cellulaire est moindre chez les sujets LTNPs comparés aux individus à progression rapide. En bref, les LTNPs se trouvent dans un état immunologique où le système répond au VIH en favorisant la maintenance et l'expansion des lymphocytes T sans épuiser les réponses immunitaires et tout en gardant une immunité en quiescence. Mieux comprendre le système immunitaire des individus à progression lente pourra possiblement contribuer à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques telles que des stratégies vaccinales.

1.6. Présentation d'antigène

La présentation antigénique représente un processus primordial dans l'immunité adaptative. Principalement, elle implique les cellules présentatrices d'antigènes qui captent et fragmentent les protéines en peptides, qui sont présentés par la suite dans le contexte des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Le complexe CMH-peptides sera exprimé à la surface cellulaire pour être présenté et reconnu par le RCT des lymphocytes T naïfs ou des cellules T mémoires. Le mécanisme entraînant la formation du complexe CMH-peptide est différent pour les deux principales classes de CMH (CMH de classe I et CMH de classe II). Les molécules CMH de classe I présentent des fragments de protéines intracellulaires, d'origine virale, bactérienne ou autologue, qui seront reconnus principalement par les lymphocytes T CD8⁺ (Figure 5) (131). Quant aux molécules du CMH de classe II, elles présentent des peptides provenant du milieu extracellulaire, localisés dans des vésicules cellulaires et vont être reconnues par les lymphocytes T CD4⁺. La

reconnaissance des antigènes par le RCT, dans le contexte des molécules du CMH, est essentielle à l'activation des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺.

1.6.1. CMH-1

Les gènes du CMH codent pour des molécules qui appartiennent au système HLA. Chez les humains, les loci retrouvés parmi les gènes des CMH de classe I incluent les HLA-A, B et C. La présentation d'antigène dans le contexte du CMH de classe I est active dans la majorité des cellules nucléées humaines, fournissant ainsi un mécanisme favorisant l'affichage, à tout moment, de peptides dérivés de protéines synthétisées dans le cytosol. Les cellules saines présentent des peptides autologues. En revanche, les cellules infectées par un pathogène viral ou bactérien et les cellules tumorales présentent respectivement, par l'intermédiaire des CMH de classe I, des peptides viraux, bactériens ou tumoraux à la surface cellulaire.

Les molécules du CMH de classe I sont constituées d'une chaîne lourde (α) associée à la β_2 -microglobuline et sont produites dans le réticulum endoplasmique (Figure 5A). Lors des événements menant à la biosynthèse des molécules de CMH de classe I, les protéines destinées pour la dégradation subissent premièrement l'ubiquitination, puis la fragmentation en peptides de 8 à 10 acides aminés à l'aide du protéasome, un complexe cytolitique de protéase. Dans certaines infections virales, la production de l'IFN- γ mène au recrutement de plusieurs protéines distinctes au protéasome afin d'augmenter la production de peptides adéquats pour l'interaction avec les molécules du CMH de classe I. Ces peptides sont ensuite translocalisés par le transporteur couplé au processus de fragmentation, TAP (22), du cytosol au réticulum endoplasmique, où se déroulera l'association des peptides de grande affinité aux molécules du CMH-1. Le polymorphisme des gènes codant pour les molécules du CMH de classe I entraîne des affinités distinctes pour différents peptides. Le complexe peptide-CMH-1 se dirige alors vers l'appareil de Golgi pour être exprimé à la surface de la cellule (Figure 5A). La reconnaissance des antigènes, par les lymphocytes T CD8⁺ entraîne la lyse des cellules exprimant le complexe peptide-CMH-1 (177).

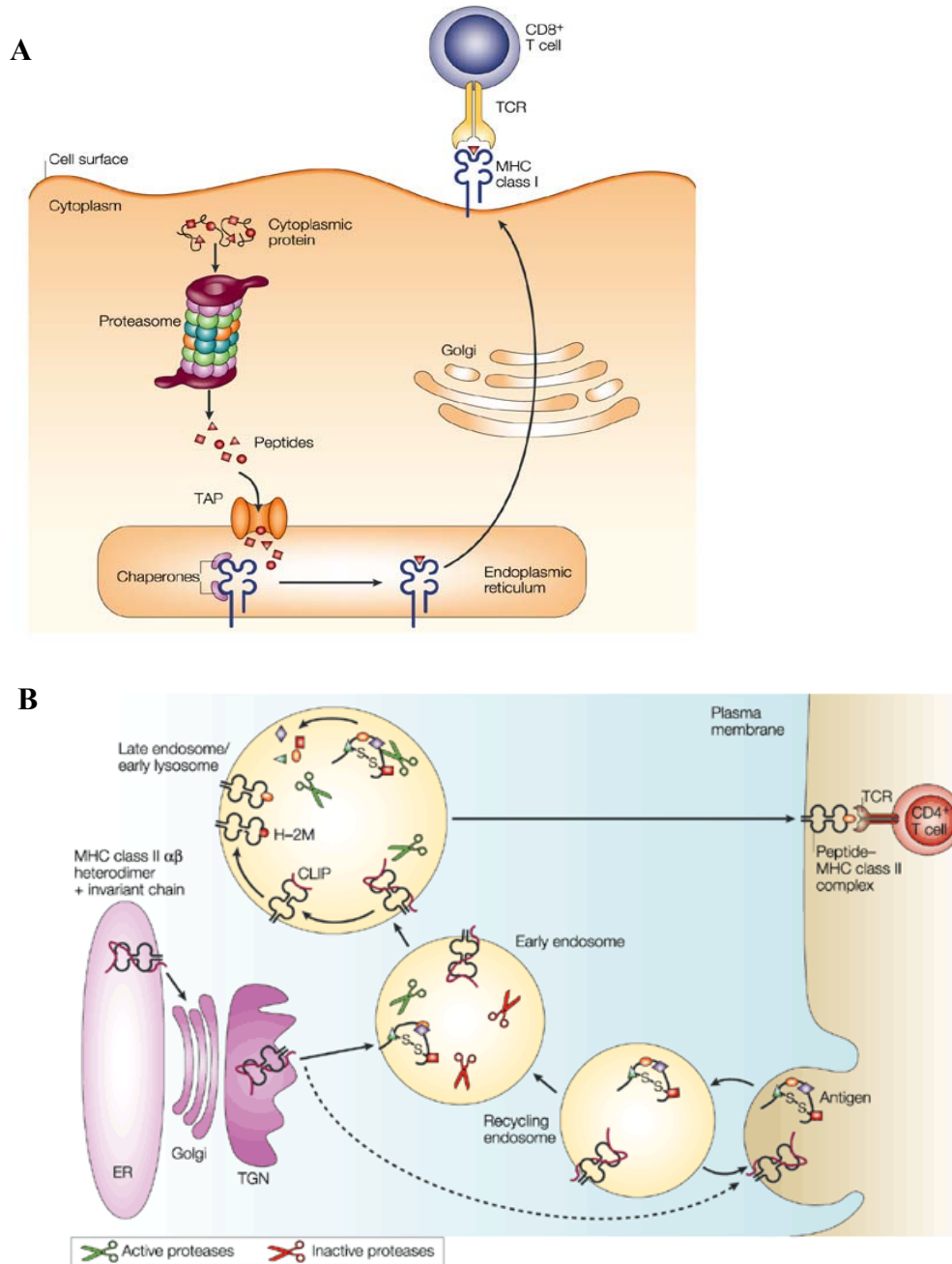


Figure 5: Présentation d'antigène. (A) Présentation d'antigène dans le contexte des molécules CMH de classe I (175) (avec l'accord de l'éditeur). (B) Présentation d'antigène dans le contexte des molécules CMH de classe II (176). Utilisation avec l'accord de l'éditeur de Nature Review Immunology.

1.6.2. CMH-II

Chez l'homme, les gènes codant pour les molécules du CMH de classe II comprennent les loci HLA-DR, DP et DQ. La présentation antigénique, dans ce contexte, requiert des cellules présentatrices d'antigène (CPA), incluant les cellules dendritiques, les macrophages, les cellules B et les cellules épithéliales du thymus (voir section 1.6.2.1). Les molécules du CMH de classe II sont constituées d'hétérodimères α et β , qui sont assemblés dans le réticulum endoplasmique. L'assemblage stable des molécules du CMH-II dépend de la chaîne invariante (Ii), une chaperonne transmembranaire servant de peptide de substitution en attendant l'arrivée des peptides de soi ou non-autologues, de provenance virale ou bactérienne. En effet, la protéine Ii se fixe sur la cavité de liaison des molécules de CMH de classe II, procurant ainsi de la stabilité aux protéines hétérodimères et empêchant la fixation des peptides endogènes. Les molécules du CMH de classe II se lient uniquement à des peptides exogènes provenant du milieu extracellulaire. Les protéines antigéniques sont, premièrement, internalisées dans les CPAs par phagocytose pour les cellules dendritiques et macrophages ou par endocytose pour les cellules B, formant ainsi respectivement le phagosome ou l'endosome (Figure 5B). Les protéines seront dégradées en peptides de 13 à 18 acides aminés par voie endocyttaire. Cette voie implique des modifications biologiques dans le phagosome ou l'endosome menant à l'étape finale de la dégradation, soit la fusion de ces compartiments intracellulaires avec les lysosomes comprenant des protéases, responsables de la lyse des antigènes. L'interaction entre le peptide et les molécules du CMH de classe II s'ensuit. La protéine Ii est partiellement dégradée, laissant, dans la cavité de liaison, un petit peptide court, appelé CLIP qui empêche toute liaison prématurée du peptide antigénique. L'échange entre CLIP et le peptide est catalysé par HLA-DM, une molécule du CMH de classe II. Le complexe peptide-CMH-II nouvellement formé est ensuite transporté à la surface cellulaire et est présenté et reconnu par les RCT des lymphocytes T CD4 lors de la réponse immunitaire adaptative (Figure 5B) (178).

1.6.2.1. Cellules présentatrices d'antigène professionnelles

Les principales cellules présentatrices d'antigènes sont les cellules dendritiques, les monocytes/macrophages et les lymphocytes B (22, 178). D'autres cellules, telles que les cellules épithéliales du thymus, exprimant les molécules du CMH de classe II, peuvent

également présenter les peptides aux lymphocytes T CD4⁺ (178). Les cellules dendritiques, retrouvées dans la peau et dans d'autres organes (e.g. organes lymphoïdes), phagocytent les protéines et les transportent dans les régions des ganglions lymphatiques ou de la rate où se retrouvent les cellules T CD4⁺ où, donc, se déroule la présentation antigénique. Les cellules dendritiques sont les CPA les plus importantes car elles sont responsables de présenter les antigènes aux cellules T CD4⁺ naïves. Les CPA peuvent également présenter les peptides exogènes aux lymphocytes T CD8⁺, dans le contexte du CMH de classe I, phénomène que l'on appelle présentation croisée (22). Les macrophages sont situés principalement dans les tissus non-lymphoïdes ou dans des régions des ganglions lymphatiques ou de la rate, dépourvues de cellules T CD4⁺. Les macrophages ne sont pas aussi efficaces que les cellules dendritiques pour présenter l'antigène aux cellules T CD4⁺ naïves. Ils sont plutôt impliqués dans l'activation des cellules T CD4⁺ mémoires. Tout comme les macrophages, les cellules B ont la capacité d'activer les cellules T CD4⁺ mémoires en présence de faibles concentrations d'antigènes via leurs récepteurs de surface de type IgG (BCR pour *B cell receptor*) (22).

1.7. L'activation des lymphocytes T

La reconnaissance des peptides par le RCT dans le contexte des molécules du CMH entraîne l'activation des lymphocytes T naïfs. Le RCT est catégorisé en deux types : le RCT $\alpha\beta$ et le RCT $\gamma\delta$ (179). Le RCT $\alpha\beta$, exprimé majoritairement dans la population des lymphocytes T, est constitué d'hétérodimères α et β , reliés par pont disulfure. Chaque RCT formé est unique, du fait, entre autres, de la grande variabilité génétique du domaine CDR (pour *complementarity-determining region*), région formant une interface de liaison du complexe peptide-CMH. Lors du développement du lymphocyte T, les récepteurs subissent des étapes successives de réarrangements des segments V D (pour les chaînes α et γ) et V D J (pour les chaînes β et δ), qui sont incluses dans la séquence génomique du RCT (22). Ainsi, cette diversité procure aux lymphocytes T un large répertoire de RCTs spécifiques à divers pathogènes. Les chaînes α et β sont physiquement associées à une série de polypeptides, collectivement désignés CD3. Cette association est requise pour l'expression du TCR à la surface cellulaire. Le CD3 comprend 5 polypeptides, dont la chaîne invariante ζ , primordiale pour l'activation cellulaire. Tout comme le RCT $\alpha\beta$, le RTC $\gamma\delta$ (constitué d'une chaîne γ et

d'une chaîne δ) s'associe au CD3, mais est exprimé dans une petite population des lymphocytes T, localisée principalement dans l'épithélium de l'intestin (179).

Lorsque le RCT reconnaît le peptide antigénique spécifique, le corécepteur CD4 ou CD8 va se lier également au complexe peptide-CMH (22). Un premier signal est donc envoyé à la cellule T. Ce signal n'est toutefois pas suffisant pour activer complètement la cellule. L'activation cellulaire requiert un deuxième signal, appelé « signal de costimulation », qui est délivré par les CPAs, par la production et l'expression de molécules de costimulation à la surface cellulaire. Sans ce deuxième signal, la cellule T entre dans un état anergique où elle devient réfractaire à l'interaction du complexe peptide-CMH, malgré la présentation maintenue et subséquente de l'antigène particulier par les CPAs. Les molécules de costimulation se lient à des récepteurs du côté de la cellule T. Les ligands les plus étudiés sont les glycoprotéines CD80/B7-1 et CD86/B7-2 qui interagissent avec le récepteur CD28 (22, 179). L'agrégation des RCT, corécepteurs et CD28, liés à leurs ligands respectifs, initie l'activation d'une cascade de signaux de transduction. Le premier événement survient à la suite de l'interaction du corécepteur au complexe peptide-CMH, qui active la protéine kinase Lck. Par phosphorylation de la région ITAM (pour *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) de la chaîne invariante ζ du CD3, Lck, à son tour, mène à l'activation d'autres protéines telles que le Zap-70, qui va propager le signal vers le noyau cellulaire où se déroule la transcription de gènes reliés à l'activation cellulaire. Les signaux passant par la protéine kinase Zap-70 entraînent la formation fonctionnelle de la synapse immunologique (voir [section 1.8](#)), par la réorganisation des protéines impliquées dans la formation du cytosquelette (180). Plusieurs cytokines sont produites suite à l'activation de la cellule T, en réponse à la présentation de l'antigène. D'ailleurs, la ligation CD80/CD86 au CD28 entraîne une cascade d'événements menant directement à la production de l'IL-2, favorisant grandement la prolifération cellulaire. En bref, l'activation des lymphocytes T entraîne la différenciation et la prolifération cellulaire, afin de bâtir une réponse immunitaire efficace et spécifique contre un pathogène particulier (22, 181).

1.8. Synapse immunologique

L'interaction du RCT avec le complexe peptide-CMH et les événements subséquents menant à l'activation cellulaire engendrent une réorganisation des molécules à la surface et au cytosol de la cellule T et de la CPA liée, pour former une jonction adhésive et stable, appelée la synapse immunologique (SI). Par exemple, du côté de la cellule T, on assiste à la formation de radeaux lipidiques où se trouvent plusieurs protéines telles que le Lck et le Zap-70. La SI est une structure où se déroule la communication entre les lymphocytes T et les CPA en réponse à un peptide spécifique et est constituée de molécules formant des complexes supramoléculaires d'activation (SMAC). L'agrégation des RCTs liés aux complexes peptide-CMH forme le SMAC central (cSMAC). Par ailleurs, le cSMAC est divisé en deux compartiments: le cSMAC interne et externe (182). Le cSMAC interne comprend une région concentrée de RCTs liés aux complexes peptide-CMH, tandis que le cSMAC externe inclut les molécules de signaux de transduction (protéine lck et la protéine kinase C θ (PKC θ)), ainsi que les molécules de co-stimulation (CD80/CD86) et leurs récepteurs respectifs (CD28). Le SMAC périphérique (pSMAC) entoure le cSMAC et est composé, du côté de la cellule T, de l'intégrine LFA-1 (pour *leukocyte function-associated molecule-1*) et du côté de la CPA, de son ligand ICAM-1 (pour *intercellular cell adhesion molecule-1*) et de la taline, une protéine adaptatrice associée du cytosquelette. La formation complète d'une SI requiert un cytosquelette intact, du côté de la cellule T. Le pSMAC renforce l'interaction entre le RCT et le complexe peptide-CMH. Entourant le pSMAC, le SMAC distal (dSMAC) est composé principalement de la phosphatase CD45. Une étude affirme que le dSMAC est important pour la séquestration des régulateurs négatifs tels que la phosphatase SHP-1 (183, 182).

L'interaction initiale entre la cellule T et la CPA se fait par la liaison de faible affinité entre le LFA-1 et l'ICAM-1. Lorsque le RCT reconnaît l'antigène, un regroupement de RCT, des molécules reliées aux signaux de transduction et de molécules de costimulation s'accumule au même endroit (182). On assiste à un changement de conformation pour le LFA-1, augmentant ainsi l'affinité pour son ligand et resserrant le contact entre la cellule T et la CPA. La SI est alors formée, menant à la différenciation et à la prolifération cellulaires. Ensuite, après un certain temps, le RCT est internalisé. En outre, l'expression du LFA-1 est

diminuée tandis que celle des protéines régulatrices CTLA-4 et PD-1 est augmentée à la surface de la cellule T (22, 184). Le CTLA-4 interagit aux CD80 et CD86 avec une meilleure affinité que le CD28, délivrant des signaux inhibiteurs à la cellule T. Conséquemment, la cellule T se détache de la synapse et est libre d'interagir avec une autre CPA (182).

1.9. Différentiation des cellules T naïves

Suite à la présentation antigénique et l'activation cellulaire, les lymphocytes T CD4 auxiliaires (Th) naïfs ont la possibilité de se différencier en 3 sous-populations majeures : soit les Th1, les Th2 ou les Th17 (22, 185). De plus, les cellules T CD4 ont la capacité de se développer en d'autres sous-types cellulaires connus: soit les Th3 produisant du TGF- β , les Th9 et les Th22 (186-188). Chacune de ces sous-populations mentionnées a des rôles distincts, associés à la production de cytokines qui leurs sont propres, afin de contribuer de façon appropriée à l'immunité adaptative. La différenciation des cellules T CD4⁺ dépend non seulement de l'environnement cytokinique et des facteurs génétiques, mais également du pathogène rencontré par la cellule T et par la CPA. Ainsi, le système immunitaire diversifie ses réponses afin de mieux contrôler l'infection par un pathogène.

1.9.1. Th1

Les cellules T CD4⁺ de type Th1 secrètent principalement de l'IFN- γ et de l'IL-2; l'IFN- γ étant la cytokine de marque de cette sous-population. À elle seule, cette cytokine peut inhiber la réplication virale ou induire l'élimination d'un pathogène sans tuer la cellule infectée. Les cellules Th1 également produisent également des cytokines telles que la lymphotoxine (LT) et le TNF- α (*tumor necrosis factor*) qui favorisent la production de molécules ayant des activités antimicrobiennes (par exemple l'oxyde d'azote). Le rôle des cellules Th1 consiste à maximiser la destruction des pathogènes intracellulaires en activant les macrophages, qui tuent par phagocytose et en augmentant la prolifération des cellules T CD8 cytotoxiques. Par ailleurs, les cellules Th1 induisent les cellules B à produire des anticorps efficaces pour l'opsonisation des pathogènes extracellulaires, menant ainsi à une endocytose par les cellules phagocytaires. L'environnement cytokinique est très important dans la différenciation cellulaire. Lorsqu'une cellule dendritique rencontre un pathogène, elle peut sécréter de l'IL-12 qui active d'autres cellules de l'immunité innée telles que les cellules

NK, qui, à leur tour, produisent de l'IFN- γ . La présence des deux cytokines mentionnées (IFN- γ et IL-12) favorise grandement la différenciation des cellules T naïves en cellules Th1. Par ailleurs, la grande production d'IFN- γ empêche la différenciation des cellules en cellules de type Th2 ou Th17 (22, 189). L'expression de cette cytokine requiert le facteur de transcription des Th1, T-bet (190). D'autre part, l'expression de T-bet corrèle positivement avec la production de cette cytokine et peut être augmentée par l'IL-12 (191). Les pathogènes humains qui induisent la génération de cellules Th1 incluent entre autres le CMV et le *Mycobacterium leprae* (22, 192).

1.9.2. Th2

Les cellules de type Th2 sont spécialisées dans la défense contre les pathogènes extracellulaires en favorisant la réponse immunitaire humorale, impliquant l'activation des cellules B naïves pour produire des anticorps. Elles ont la capacité de stimuler la production de différents isotypes d'anticorps (e.g., IgA et IgE) ainsi que des anticorps IgG neutralisants ou opsonisants. Les cellules de type Th2 produisent l'IL-4, caractérisant principalement cette sous-population, et plusieurs autres cytokines associées telles que l'IL-5, l'IL-9, l'IL-10, et l'IL-13, qui agissent sur les cellules B. L'association de l'IL-10 aux Th2 demeure controversée, car il a été récemment démontré qu'elle peut être également produite par les cellules Th1 (193). À elle seule, l'IL-4 peut favoriser l'activation des cellules B et l'hypermutation somatique induisant les isotypes d'anticorps de type IgA et IgE. Sa présence en grande quantité peut inhiber la génération des cellules Th1. Lorsqu'elle est sécrétée par la cellule de type Th2, l'IL-4 peut agir directement dans la zone de contact avec la cellule B. Les pathogènes extracellulaires induisent l'activation des cellules NK et autres cellules de l'immunité innée pour produire l'IL-4 qui favorise la différenciation des cellules T CD4 naïves en cellules de type Th2 (22). La différenciation des cellules de type Th2 nécessite le facteur de transcription GATA-3 (191). Ce facteur est grandement responsable de la production de l'IL-4 par les cellules T CD4⁺ et son expression peut inhiber les réponses de type Th1. L'IL-4, à son tour, favorise l'expression de GATA 3. Le STAT5 et le Gfi-1 sont les autres facteurs de transcription impliqués dans la polarisation des cellules de type Th2 (191). Les pathogènes induisant une réponse de type Th2 incluent le *Pneumocystis jirovecii*,

le *Streptococcus pneumoniae* et également des nématodes tels que l'*Acanthocheilonema viteae* (22, 194).

1.9.3. Th17

Récemment identifiées, les cellules Th17 ont un rôle important dans les immunités innée et adaptative. Elles produisent la cytokine pro-inflammatoire IL-17, qui interagit avec son récepteur IL-17R pour induire l'infiltration des macrophages et des leucocytes polymorphonucléaires (PMNs) tels que les neutrophiles dans les sites d'infection. De plus, l'IL-17 peut, à elle seule, déclencher la production (a) des cytokines telles que l'IL-22 qui induit la production des peptides microbiens (défensine β) et (b) des chimiokines telles que la CCL20 qui recrute les cellules dendritiques et les lymphocytes T et B, afin de procéder à l'élimination du pathogène. L'IL-17 est un membre de la famille de cytokines incluant l'IL-17A (appelée simplement IL-17), l'IL-17-B, l'IL-17-C, l'IL-17-D, l'IL-17-E et l'IL-17-F. L'IL-17A est la cytokine caractérisant les cellules de type Th17 (195). Les cytokines associées aux Th17 incluent le TGF- β , l'IL-6, l'IL-21, l'IL-22 et l'IL-23. Les facteurs de transcriptions ROR γ t (l'orthologue chez l'homme étant RORC (185)), ROR α , STAT3 et IRF4 contrôlent la différenciation des cellules de type Th17. L'expression seule de ROR γ t ou de ROR α chez la souris a la capacité d'induire la production de l'IL-17 (196). Dans un modèle de souris, la présence d'IL-6 et d'TGF- β est requise pour la différenciation des cellules T naïves en cellules de type Th17. Par contre, chez les humains, la controverse demeure en ce qui a trait aux cytokines impliquées dans la différenciation cellulaire. Selon certaines études, les cytokines impliquées incluent la combinaison d'IL-1 β et d'IL-23 (197), d'IL-1 β et d'IL-6 (185) ou encore d'IL-1 β et d'IL-6, d'IL-21 ou d'IL-23 en présence de TGF- β , dans des conditions sans sérum (198). La polarisation des cellules de type Th17 en l'absence de TGF- β génère des cellules IL-17⁺IFN- γ ⁺ (185, 197), caractérisant les cellules Th1/Th17, tandis que la présence de TGF- β induit seulement l'IL-17 (198). Les cellules Th1/Th17 expriment simultanément le ROR γ t et le T-bet (185). Les pathogènes induisant une réponse de type Th17 incluent le *Candida albicans* (version hyphe), le *Staphylococcus aureus* et le *Toxoïde tétanique* (199); (115). Quant aux cellules Th1/Th17, elles seront générées en réponse au *Mycobacterium tuberculosis* (199).

1.10. Synapse virologique

La synapse virologique est définie comme étant une jonction adhésive, requérant une organisation intacte du cytosquelette, dans laquelle les virus sont efficacement transmis d'une cellule «donneuse» à une cellule «receveuse» (200, 201). Concernant le VIH-1, deux types de synapses ont été récemment décrites : (1) la synapse infectieuse de la cellule dendritique à la cellule T (202, 203) et (2) la synapse virologique (SV) d'une cellule T à une autre cellule T (200). Le transfert du virus d'une cellule à une autre se déroule probablement dans les organes lymphoïdes secondaires où la majorité des cellules T se trouvent, et où un contact étroit est maintenu avec les CPAs. En général, la synapse infectieuse de type cellules dendritique-cellule T implique la lectine de type C DC-SIGN, qui capte le virus (204). Les cellules dendritiques ont également la capacité d'internaliser le virus, afin de le retenir avant de le transmettre à la cellule T. Elles deviennent donc infectieuses pour une longue période de temps. Bien que ces cellules dendritiques soient enrichies de compartiments pouvant induire la dégradation du virus, qui se fait de façon partielle, elles ne parviennent pas à complètement détruire le VIH-1. Certaines cellules dendritiques n'expriment pas le DC-SIGN mais expriment d'autres lectines capables de capter le virus. Ceci est le cas pour des cellules de Langerhans (LC) qui expriment la lectine langerine, qui a la capacité de détruire le VIH, et, de ce fait, de protéger les LCs de l'infection (205, 206). Toutefois, une étude récente par Hladick et al. démontre que les LC des muqueuses génitales, contrairement aux LCs de la peau, ont la capacité de transmettre le VIH-1 aux cellules T CD4⁺, participant ainsi à la dissémination virale *in vivo* (207). Lorsque la cellule dendritique rencontre une cellule T, le virus, préalablement internalisé ou à la surface, est relocalisé, du côté de la cellule dendritique, à la jonction liant la cellule «receveuse». Du côté de la cellule T, il y a une accumulation des corécepteurs du virus, soit le CXCR4 et le CCR5. Le transfert robuste du VIH-1 à la cellule T s'ensuit, par l'entremise de la synapse (202). De plus, durant cette infection en *trans*, l'interaction entre le virus et le DC-SIGN recrute la protéine LARG qui resserre la formation de la synapse virologique (208). Des études rapportent que le DC-SIGN, en plus de favoriser l'infection des cellules T CD4 en *trans*, facilite l'infection des cellules dendritiques *en cis* (209, 210).

Contrairement à la SI, le mécanisme moléculaire intégral impliqué dans la SV reste à élucider. En revanche, une étude sur la synapse virologique de cellule T à cellule T rapporte que l'interaction initiale de l'enveloppe du VIH-1 avec le CD4 et le CXCR4 est primordiale pour le recrutement d'autres molécules de CD4, de CXCR4 et de LFA-1 à la jonction (200). Ce recrutement est dépendant de l'actine, une protéine du cytosquelette. Ce mécanisme est primordial pour la formation de la SV. L'engagement du RCT au complexe peptide-CMH n'est pas requis. De plus, il n'y a pas d'observation d'enrichissement du CD3 à la jonction. En contrepartie, la molécule impliquée dans les signaux de transduction, Zap-70, a été désignée comme molécule essentielle à la synapse virologique, devant être exprimée primordialement dans la cellule « donneuse » (211). L'absence de cette protéine entraîne un défaut empêchant une infection efficace. La signalisation du RTC au sein de la synapse infectieuse est altérée du fait de l'accumulation intracellulaire de Lck (212).

De plus, les cellules dendritiques ont la capacité de transmettre le virus aux cellules T CD4⁺ sans contact proche et étroit, à l'aide de leurs filopodes, une élongation cellulaire (213). Ces longs filopodes facilitent la disémination de cellule à cellule du VIH-1. Le Nef serait, entre autres, responsable de l'induction de ces filopodes (214). Récemment, il a été découvert que les CPAs, incluant les cellules dendritiques et les macrophages, ainsi que les cellules T, infectent à distance en se servant également de nanotubes, une élongation cellulaire plus mince (215, 216). Également, les cellules infectées ont la capacité de transmettre le virus simultanément à plusieurs cellules cibles, soit par contact cellule-cellule ou à l'aide de filopodes et de nanotubes, formant une structure appelée « poly-synapse » (217). Des recherches *in vitro* affirment que les cellules T infectées peuvent aussi transférer le virus aux macrophages ou aux cellules endothéliales exprimant des récepteurs alternatifs tels que le galactosyl céramide (218) et les syndecans (219), mais ces aspects sont peu étudiés. En conclusion, le virus utilise tous les moyens envisageables pour promouvoir sa réplication. L'élucidation complète du mécanisme de la formation des synapses infectieuses et virologiques servira peut-être à identifier de nouveaux traitements contre l'infection.

1.11. Les chimiokines

Les chimiokines sont des cytokines avec un potentiel chimiotactique interagissant avec leurs récepteurs respectifs (voir [section 1.11.1](#)). Elles ont un rôle critique dans la régulation de la migration des leucocytes durant la surveillance de l'immunité, l'inflammation et le développement cellulaire. En fait, les chimiokines et leurs récepteurs régulent la migration cellulaire en deux étapes. La première inclut l'extravasation des cellules du sang vers les organes lymphoïdes ou les tissus démontrant une inflammation. Plusieurs autres molécules dont les sélectines et les intégrines sont impliquées dans cette étape. Les sélectines permettent le roulement des leucocytes sur l'endothélium vasculaire des vaisseaux sanguins, entraînant l'exposition des récepteurs de chimiokines à leurs ligands qui se situent sur la surface des cellules endothéliales. L'interaction entre les chimiokines et leurs récepteurs va déclencher l'activation des intégrines menant à la transmigration cellulaire ou la diapédèse. La seconde étape, contrôlée exclusivement par les chimiokines, est la migration directionnelle et le positionnement spécifique des leucocytes dans l'organe lymphoïde ou les tissus ayant une inflammation (220).

À ce jour, approximativement 50 chimiokines humaines et 20 récepteurs ont été découverts. Selon la séquence protéique de résidus de cystéine conservés, les chimiokines sont classifiées en 4 familles: CC, CXC, C et CX3C; le C représentant l'acide aminé cystéine et le X ou X3 représentant un ou trois acides aminés autres que la cystéine (221). À l'origine, les chimiokines étaient nommées sur la base de leur fonction (MCP-1, *Monocyte chemotactic protein-1*) ou de leur origine (SDF-1, *Stromal cell-derived factor-1*). Depuis l'année 2000, un nouveau système de nomenclature a été introduit pour chaque chimiokine et récepteur, les identifiant sur la base de leur classification et d'un nombre attribué (e.g.,: CCL2 pour chimiokine ligand de la famille CC numéro 2. Il en va de même pour le récepteur associé, CCR2, R pour récepteur) (221).

Une autre classification, un peu plus générale, a été attribuée aux chimiokines selon leurs rôles dans l'inflammation ou dans l'homéostasie du système immunitaire (220, 221). Les chimiokines pro-inflammatoires (e.g., CCL2/MCP-1) sont produites en réponse à un pathogène, à des lésions tissulaires ou à une anomalie physiologique. Les chimiokines

homéostatiques (ex : CXCL12/SF-1) sont produites constitutivement, coordonnant la migration cellulaire continue, nécessaire au bon fonctionnement du système immunitaire et des processus physiologiques tels que la lymphopoïèse. Elles sont également impliquées dans la migration des lymphocytes durant l'immuno-surveillance. Certaines chimiokines (CXCL12/SF-1) peuvent à la fois appartenir aux deux catégories dépendant du contexte biologique ou de l'état pathologique (220).

1.11.1. Récepteurs des chimiokines

Les récepteurs de chimiokines sont des protéines à sept domaines transmembranaires, couplées aux protéines G (GPCR, *G-protein coupled receptors*). Une fois liés à leurs ligands les récepteurs de chimiokines envoient des signaux intracellulaires impliqués dans le mouvement et l'activation cellulaire. La famille des GPCR demeure la plus grande famille de protéines membranaires et joue un rôle critique dans plusieurs processus physiologiques (e.g., neurotransmission, angiogenèse). Les chimiokines sont environ 2.5 fois plus nombreuses que leurs récepteurs. Ainsi, plusieurs ligands peuvent interagir avec un récepteur identique (e.g., CCL3, CCL4 et CCL5 pour CCR5). Il existe aussi des récepteurs qui reconnaissent la même chimiokine (e.g., MCP-1/CCL2 pour CCR2 et CCR4) et des chimiokines qui sont spécifiques pour un seul récepteur (e.g., CXCR4 et son ligand SDF-1). Finalement, d'autres récepteurs peuvent interagir avec des chimiokines de type CC et CXC à la fois (e.g., l'antigène Duffy). De plus, le génome de certains virus (e.g., le virus de l'herpès) code pour des GPCR, jouant un rôle clé dans les pathologies associées (222).

L'interaction chimiokine-récepteur induit un changement de conformation au niveau du récepteur activant la protéine G. La sous-unité $G\alpha$, sous la forme inactive est initialement liée à la molécule GDP (guanine diphosphate), au récepteur et au complexe formé des sous-unités $G\beta$ et $G\gamma$. L'activation entraîne le remplacement du GDP par la molécule GTP (guanosine triphosphate) et la dissociation du nouveau complexe $G\alpha$ -GTP au complexe $G\beta\gamma$ et au récepteur. Le complexe $G\beta\gamma$ induit donc l'activation des molécules de signalisation telles que le PIP_3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate), la PI3K (phosphoinositide-3 kinases) et la protéine kinase B, impliquées dans les mécanismes du mouvement cellulaire (220).

1.11.2. Chimiokines subordonnées et dominantes

Suite à une étude effectuée dans un modèle de souris, il a été démontré que les chimiokines, ainsi que leurs récepteurs respectifs, peuvent être classifiées en deux catégories, soit en chimiokines dominantes ou subordonnées, selon leurs habiletés à rentrer en compétition avec le signal induisant l'arrêt de la cellule T, lors de la formation de la SI (223). Avant de rencontrer la CPA, la cellule T est en mouvement. Lorsque le RCT reconnaît le complexe peptide-CMH, le signal envoyé par cette interaction met fin à la migration pour favoriser l'établissement de la SI. Les chimiokines dominantes annulent ce signal d'arrêt sans induire l'anergie. Elles ont donc le potentiel de supprimer les réponses des cellules T en inhibant la prolifération et en favorisant la migration. Les chimiokines dominantes incluent les chimiokines ligands du CCR7 (CCL19/MIP-1 β et CCL21/SLC) et du CXCR3 (CXCL9/MIG, IP-10/CXCL10 et CXCL11/ITAC). Les chimiokines subordonnées n'annulent pas le signal d'arrêt transmis par le RCT. Elles renforcent le signal, au contraire, entraînant ainsi la prolifération. Les chimiokines subordonnées comprennent les chimiokines ligands du CCR2 (CCL2), du CCR4 (CCL2, CCL17/TARC, CCL22/MDC) du CCR5 (CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β et CCL5/RANTES) et du CXCR4 (SDF-1) (223).

1.11.3. Chimiokines et synapse immunologique

Les chimiokines ont des propriétés immuno-stimulatrices car elles renforcent le signal d'arrêt en agissant comme des molécules de costimulation (224). Au niveau de la SI, les récepteurs de chimiokines CCR5 et CXCR4 sont recrutés à la jonction, du côté de la cellule T, et interagissent avec leurs ligands respectifs, sécrétés par les cellules dendritiques (225). Cette interaction renforce l'interaction entre les deux cellules et favorise la production de cytokines telles que l'IFN- γ et la prolifération. Il a également été démontré que le SDF-1 induisait l'association du CXCR4 au RCT, activant ainsi la kinase ZAP-70 et d'autres molécules de signalisation telles que les kinases Ras (226). Ces signaux de transduction entraînent la production des cytokines IL-2 et IL-10. De plus, une étude récente démontre que lors du développement de la cellule T dans le thymus, le CXCR4 s'associe fonctionnellement avec le pré-RCT, induisant les signaux de survie ainsi que la prolifération des cellules T immatures (thymocytes) (227). Cette association régule aussi la localisation des thymocytes dans les différentes régions du thymus. D'autres chimiokines, comme le

TARC/CCL17 et le MDC/CCL22, ligands de CCR4 et CCR8, induisent la maturation des cellules dendritiques et favorisent grandement le contact avec les cellules T (228 , 229). Conséquemment, ce contact entraîne la prolifération des cellules T et la production de cytokines. Ainsi, les chimiokines ont un effet immunoactivateur en plus de leur rôle dans la régulation de la migration cellulaire.

1.11.4. Récepteurs de chimiokines et hétérogénéité fonctionnelle des cellules T CD4+

Récemment, des études ont identifié les récepteurs de chimiokines comme des marqueurs de surface pour des sous-populations de cellules T à stade d'activation et de différenciation cellulaire et de fonctionnalités distinctes. Par exemple, le CCR7 identifie les cellules T naïves et mémoires centrales (230), qui ont le potentiel de migrer dans les ganglions lymphatiques qui expriment de façon préférentielle les ligands du CCR7 (231). Les cellules T effectrices perdent l'expression du CCR7 et expriment d'autres marqueurs de migration, les dirigeant vers les tissus enflammés. Les récepteurs de chimiokines CCR4, CXCR3 et CCR6 identifient des cellules T CD4⁺ ayant une fonctionnalité distincte, du point de vue de la production de cytokines et de facteurs de transcription spécifiques des cellules de type Th1, Th2 et Th17. Ainsi, le CXCR3 est un marqueur de cellules mémoires pré-Th1 sécrétant de l'IFN- γ , et le CCR4 est un marqueur de cellules pré-Th2 associées à la production de l'IL-4 (192). L'expression du CCR3 a été également associée aux cellules de type Th2 (232). Des études plus récentes démontrent que la co-expression du CCR4 et du CCR6 identifie les cellules Th17, produisant de l'IL-17 et exprimant le facteur de transcription ROR γ t, alors que la co-expression du CXCR3 et du CCR6 identifie des cellules de type Th1/Th17, produisant à la fois l'IFN- γ et l'IL-17(199). De plus, ces trois récepteurs de chimiokines sont des marqueurs de migration dans des tissus spécifiques. Le CXCR3 et le CCR6 sont des marqueurs de migration vers l'intestin (233, 234), comme l'intégrine α 4 β 7 (140), tandis que le CCR4 est un marqueur de la migration vers la peau (235).

1.11.5. Chimiokines et réplication du VIH-1 dans les cellules T CD4+

Le VIH utilise le CXCR4 et le CCR5 comme corécepteurs. Lors de la synapse infectieuse, ces deux corécepteurs s'accumulent à la jonction entre les cellules dendritiques et les cellules T, favorisant la dissémination du virus (202). Il a été démontré que les ligands du

CCR5 activaient les cellules T CD4, menant à une susceptibilité accrue à l'infection par les souches X4 (236), et que les ligands des CCR3 et CCR4 produits par les monocytes CD16⁺ augmentent la permissivité au VIH-1 des cellules T CD4 (237). Des études très récentes chez le macaque d'infection au VIS démontrent que le microbicide glycérol monolaurate a la capacité de bloquer le recrutement des cellules T dans la muqueuse cervicale en interférant avec la chimiokine CCL20 qui se lie au CCR6, limitant ainsi la dissémination systémique et la pathogénèse associée au VIS (134). Cette étude suggère que les cellules T CCR6⁺ pourraient être des cibles préférentielles à l'infection par le VIS *in vivo*.

2. Hypothèses et Objectifs

L'immunodéficience induite par l'infection à VIH-1 est caractérisée par la destruction des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses intestinales et cervicales, et l'altération du profil fonctionnel des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques au VIH-1. Ce projet de maîtrise est divisé en trois parties sur la base de trois hypothèses différentes:

Hypothèse #1: Le VIH-1 infecte des cellules T CD4⁺ qui expriment des récepteurs de chimiokines responsables de la migration vers les muqueuses intestinales et cervicales et avec un profil fonctionnel de type Th17. Cette hypothèse est inspirée des études récentes démontrant que les récepteurs de chimiokines CCR4, CXCR3, et CCR6 sont des biomarqueurs des cellules à fonctionnalité distincte: Th1, Th2, Th17 et Th1Th17 (199).

Objectif #1.1: Valider le profil de production de cytokines spécifiques des lignées de cellules T CD4⁺ et l'expression différentielle des récepteurs de chimiokines CCR4, CXCR3, et CCR6

Objectif #1.2: Analyser la susceptibilité à l'infection par le VIH *in vitro* des cellules T CD4⁺ avec une expression différentielle des récepteurs de chimiokines CCR4, CXCR3, et CCR6

Hypothèse #2: La co-localisation dans les muqueuses intestinales des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH représente un nouveau corrélat de la protection immunitaire anti-VIH-1 chez les sujets avec une progression lente vers le SIDA. Cette hypothèse est inspirée des études récentes démontrant que la co-localisation des cellules T CD8⁺ "effectrices" et des cellules T CD4⁺ "cibles" spécifiques au VIS dans les muqueuses cervicales, déterminent la vitesse de dissémination de l'infection à VIS, un ratio élevé entre les cellules "effectrices" et les cellules "cibles" étant favorable pour limiter la dissémination virale (134).

Objectif #2.1: Analyser le potentiel de co-localisation dans les muqueuses intestinales des cellules T CD8⁺ et des cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH et leur capacité à produire des chimiokines antivirales (ligands de CCR5) chez les sujets avec une progression lente vers le SIDA.

Objectif #2.2 : Analyser le profil fonctionnel Th1 *versus* Th17 des cellules T CD8⁺ et des cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH chez les sujets avec une progression lente vers le SIDA.

Hypothèse #3 : Les chimiokines ligands de CCR4, CXCR3 et CCR6 régulent la prolifération des cellules T CD4⁺ spécifiques d'antigène et la réplication du VIH-1. Cette hypothèse est inspirée d'une part des études classifiant les chimiokines en immunostimulatrices «subordonnées» et inhibitrices «dominantes» (223), et d'autre part des études récentes démontrant que les chimiokines induisent des signaux de costimulation dans les lymphocytes T CD4⁺ (224).

Objectif #3.1 : Déterminer le rôle des chimiokines ligands de CCR4, CXCR3 et CCR6 dans la régulation de la prolifération des cellules T CD4⁺ spécifiques d'antigène.

Objectif #3.2 : Déterminer le rôle des chimiokines ligands de CCR4 et CCR6 dans la régulation de la réplication du VIH-1 dans les cellules T CD4⁺.

3. MÉTHODES

3.1. Sujets d'étude

Six LTNPs et dix sujets non-infectés (contrôles) ont été recrutés au Centre de Santé de l'Université McGill, à l'Hôpital Royal Victoria et à l'Hôpital Saint-Luc, Montréal, Québec, Canada, *via* le réseau FRSQ/SIDA-Maladies Infectieuses et avec la collaboration des Drs Jean-Pierre Routy et Mohamed-Rachid Boulassel. Le consentement éclairé et l'approbation par le Comité d'éthique interne ont été obtenus pour tous les participants. Le tableau 1 résume les paramètres immunologiques, virologiques et cliniques des LTNPs. La charge virale plasmatique a été mesurée en utilisant la méthode ultrasensible Amplicor VIH-1 (Roche, Pleasanton, California, États-Unis). Les PBMCs (pour « *Peripheral Blood Mononucleated Cells* ») (10^9 - 10^{10} cellules) ont été récoltées auprès des sujets infectés et non infectés par le VIH par leucaphérèse selon un protocole décrit précédemment (238). Pour des expériences spécifiques, 10 ml de sang frais ont été prélevés sur des donneurs non infectés.

Tableau 1 : Paramètres cliniques des sujets infectés par le VIH avec progression lente vers le SIDA (LTNP, long-term nonprogressors)

	LTNP01*	LTNP05 [#]	LTNP06*	LTNP07 ^{#,*}	LTNP11 ^{#,*}	LTNP15 ^{#,*}	LTNP07
				Visite 1 [#]			Visite 5 [#]
Compte CD4 (cellules/ μ l)	860	435	991	720	325	448	670
Compte CD8 (cellules/ μ l)	1148	694	921	631	941	403	475
Charge virale plasmatique ^{&}	2.2	3.27	<1.7	<1.7	3.73	<1.7	<1.7
Durée de l'infection	15	19	15	15	19	16	15
ART	non	non	non	non	non	non	non

[&], Log₁₀ du nombre de copies d'ARN de VIH par ml de plasma; ART, thérapie antirétrovirale

3.2. Anticorps et réactifs

Les anticorps (Ac) suivants (Tableaux 3 et 4) ont été utilisés: -CD3 Pacific Blue, anti-CD3 PeCy7, anti-CD4 Alexa700, anti-CD4 APC, anti-CXCR3 PeCy5, anti-CCR4 PeCy7, anti-

CCR6 PE et anti-IFN- γ Alexa700 (BD Bioscience); anti-CLA FITC, anti CD69, anti-IL-10 PE, anti- IFN- γ PE et anti-IL-2 PE (Miltenyi, Auburn, CA, États-Unis) ; anti-CXCR3 FITC, anti-CCR7 FITC et anti-CCL3 (R&D Systems); anti-IL-10 Pacific Blue, anti-Beta7 PE et anti-TNF- α Pacific Blue (eBioscience, San Diego, CA); et anti-HIVp24 PE (Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada). Avant utilisation, les Ac ont été titrés et le titre optimal a été choisi pour chaque lot. Les chimiokines recombinantes suivantes ont été utilisées: MCP-1/CCL2, MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, ITAC/CXCL11, MIP-3 β /CCL19, SDF-1/CXCL12, RANTES/CCL5, et MIP-3 α /CCL20 (R&D Systems, Minneapolis, MN, États-Unis). Les autres réactifs utilisés sont: phosphate-buffered saline (PBS) 1X (Gibco, Grand Island, NY, États-Unis), RPMI (Gibco), FBS (Sigma, St. Louis, MO, États-Unis), et pénicilline et streptomycine (Gibco).

3.3. Isolation de PBMC par gradient de Ficoll et congélation des cellules

Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC, incluant les lymphocytes T et B, les monocytes, les cellules NK, les basophiles et les cellules dendritiques) de donneurs infectés par le VIH ont été obtenues à partir de leucaphérèses, suivi d'une centrifugation sur gradient de Ficoll. Cette centrifugation permet de séparer les PBMC des granulocytes neutrophiles et éosinophiles et des globules rouges. Les PBMC sont ensuite récupérées, lavées et comptées. Des aliquots de PBMCs contenant 20-50x10⁶ cellules par ampoule ont ensuite été congelés dans du FBS 10% (volume/volume) DMSO (Sigma) et conservés dans l'azote liquide.

3.4. Tri des cellules T CD4⁺ par sélection négative à l'aide de billes magnétiques

Les PBMCs de sujets sains ont été décongelées, filtrées, comptées et resuspendues dans un tampon MACS (MACS, pour *magnetic associated cell sorting*) (PBS 1X (Gibco), 10% FBS (Sigma), 2 mM EDTA (Bioshop, Burlington, ON Canada) à une concentration de 10⁷ cellules/10 μ l de solution. Le tri cellulaire a été effectué avec le kit d'isolation par sélection négative des T CD4⁺ de Miltenyi (Auburn, CA, États-Unis). Brièvement, les PBMCs ont été marquées par un cocktail d'anticorps couplés à la biotine ciblant tous les leucocytes, excepté les T CD4⁺ (ciblant les molécules CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ / β et glycophorine), pendant 10 minutes à 4°C. Après lavage, les cellules ont été suspendues dans 20 μ l de tampon MACS par 10⁷ cellules et incubées à 4°C durant 10 minutes avec 20 μ l

d'anticorps anti-biotine couplés à des billes magnétiques par 10^7 cellules. Par la suite, les T CD4⁺ ont pu être isolées grâce aux colonnes MACS. La pureté des cellules ainsi isolées a été typiquement >95% cellules T CD3⁺CD4⁺, comme démontré par marquage extracellulaire et analyse par cytométrie en flux.

3.5. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique permettant de faire défiler des particules, molécules ou cellules à grande vitesse dans le faisceau d'un laser. La lumière réémise (par diffusion ou fluorescence) permet de classer la population suivant plusieurs critères et de trier les cellules (Tableau 2).

Tableau 2: Caractéristiques des cytomètres en flux LSR II and BD Aria (Becton Dickinson)

Lasers	Détecteurs	Filtres	Fluorochromes
Bleu 488nm	FSC		<i>Forward Scatter</i>
	SSC	488/10	<i>Side Scatter</i>
	F	530/30	FITC, CFSE GFP, Alexa-488
	E	575/26	PE, PI
	D	610/20	PE-TxR
	C	675/14	PE-Cy5, PerCP
	B	710/20	PerCP-Cy5.5, PE-Cy5.5
Rouge 633nm	A	780/40	PE-Cy7
	C	660/20	APC, Cy5, Alexa-647
	B	720/30	APC-Cy5.5, Alexa-680, Alexa-700
Violet 407nm	A	780/60	APC-Cy7
	B	440/40	Alexa-405, Pacific Blue, Cascade Blue
	A	525/50	Alexa-430, CFP, AMCyan

3.6. Culture et stimulation des cellules T CD4⁺ pour la détection du marqueur d'activation précoce CD69

Pour induire l'activation des cellules T CD4⁺ purifiées, les cellules purifiées comme indiqué ci-dessus ont été stimulées avec des Ac anti-CD3 (BD Bioscience), immobilisées (1 µg/ml, 1-2 heures à température ambiante ou la nuit à 4°C) au fond d'une plaque Costar de 24, 48 ou 96-puits (Corning Incorporated, Corning, NY, États-Unis), et stimulées avec des Ac anti-CD28 (BD Bioscience) solubles (1 µg/ml) en présence ou en absence de chimiokines recombinantes ligands de CXCR3 (MIG, IP-10, et ITAC), CCR4 (CCL2), CCR5 (RANTES)

ou CXCR4 (SDF-1) (la concentration optimale de 100 ng/ml est documentée par des études précédentes du laboratoire (239) pendant une période de 16 heures à 37°C dans un incubateur de culture cellulaire à 5% CO₂. La mesure de l'activation cellulaire a été effectuée par marquage extracellulaire avec des Ac anti-CD69 et analyse par cytométrie en flux.

Tableau 3: Cocktail d'anticorps utilisés pour chaque expérience

Expériences	Anticorps spécifiques	Fluorochrome
Caractérisation phénotypique des cellules spécifiques à l'antigène par la mesure de prolifération via le test de la dilution de la CFSE	Anti-CD3	Pacific Blue
	Anti-CD4	Alexa700
	Anti-CXCR3	PE-Cy5
	Anti CCR4	PE-Cy7
	Anti-CCR6	PE
Caractérisation phénotypique des cellules spécifiques à l'antigène exprimant la molécule CD154	Anti-β7	PE
	Anti-CD3	Pacific Blue
	Anti-CD4	Alexa700
	Anti-CXCR3	FITC
	Anti-CCR7	FITC
	Anti-CLA	FITC
Caractérisation du profil cytokinique des cellules spécifiques à l'antigène	Anti CCR4	PE-Cy7
	Anti-CCR6	PE
	Anti-β7	PE
	Anti-CD3	PE-Cy7
	Anti-CD4	APC
Mesure de l'activation cellulaire	Anti-IFN-γ	Alexa700
	Anti-TNF-α	Pacific Blue
	Anti-CCL3	PE
Identification phénotypique des lymphocytes T CD4 ⁺	Anti-IL-17	PE
	Anti-CD69	PE
	Anti-CD3	Pacific Blue
	Anti-CD4	Alexa700

PE, Phycoerythrin; *FITC*, Fluorescein isothiocyanate; *APC*, Allophycocyanin; *PE-Cy5*, Phycoerythrin cyanine 5; *PE-Cy7*, Phycoerythrin cyanine7.

3.7. Analyse phénotypique par cytométrie en flux multi-couleur

Les PBMCs ou les lymphocytes T CD4⁺ purifiés ont été lavés avec le tampon FACS (PBS 1X (Gibco), 10% FBS (volume/volume) (Sigma), 0.02% (poids/volume) azide de sodium (Sigma)). Les cellules ont été par la suite marquées avec des Ac spécifiques pour la détection des protéines membranaires, selon l'objectif de chaque expérience, pendant 20 minutes à 4°C. Les cocktails d'Ac utilisés sont décrits dans le Tableau 3. Après marquage, l'excès d'Ac a été

enlevé par lavage des cellules avec le tampon FACS, puis les cellules ont été fixées avec un tampon FACS contenant 2% de paraformaldéhyde (Sigma). L'analyse de l'expression des différentes molécules a été effectuée à l'aide d'un cytomètre en flux LSRII à 11-couleurs (BD, Franklin Lakes, NJ, États-Unis). Pour la cytométrie en flux multicolore il est impossible de déterminer la fenêtre de positivité pour un Ac spécifique en utilisant les cellules sans marquage ou le contrôle isotypique. Ainsi, les fenêtres de positivité ont été définies en fonction du seuil de fluorescence en absence d'un seul Acps ou FMO (pour *fluorescence minus one*).

Tableau 4: Caractérisation phénotypique des cellules T CD4⁺

Anticorps	Fluorochrome	Origine	Titre optimal
M anti-H CD3	Pacific blue	BD Biosciences	0.5 µl/10 ⁶ cellules
M anti-H CD4	Alexa700	BD Biosciences	0.5 µl/10 ⁶ cellules
M anti-H CD45RA	APC-CY7	BD Biosciences	0.1 µl/10 ⁶ cellules
M anti-H CCR7	FITC	R&D Systems	4 µl/10 ⁶ cellules
M anti-H CCR4	PE-CY7	BD Biosciences	2 µl/10 ⁶ cellules
M anti-H CXCR3	PE-CY5	BD Biosciences	4 µl/10 ⁶ cellules
M anti-H CCR6	PE	BD Biosciences	1 µl/10 ⁶ cellules

M, mouse; H, human

3.8. Détection intracellulaire des cytokines par cytométrie en flux

La détection intracellulaire des cytokines a été effectuée à l'aide d'Ac anti-cytokines (Tableau 3) et du kit *Cytofix/Cytoperm* (BD Biosciences). En bref, les PBMCs ou les lymphocytes T CD4⁺ purifiés ont été stimulés avec le PMA (pour *Phorbol Myristate Acetate*) (50 ng/ml) et l'Ionomycine (1µg/ml) (Sigma) ou avec des Ac anti-CD3 immobilisés et anti-CD28 solubles en présence de la Brefeldin A (10 µg/ml) (Sigma) pour 16 h à 37°C. Ensuite, les cellules ont été perméabilisées avec le tampon *Cytofix* pendant 20 minutes à 4°C, puis lavées avec le tampon *Cytoperm IX* et marquées avec des Ac spécifiques anti-cytokines pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules ont été lavées avec du tampon *Cytoperm IX*, puis avec du tampon FACS et ont été resuspendu dans ce même tampon. L'analyse a été effectuée à l'aide d'un cytomètre en flux LSRII à 11-couleurs (BD) (Tableau 2). Pour certaines expériences les cellules ont d'abord été marquées en surface et un marquage intracellulaire a ensuite été réalisé (Tableau 3).

3.9. Test de migration cellulaire

Les lymphocytes T CD4⁺ purifiés ont préalablement été stimulés avec des Ac anti-CD3 immobilisés et anti-CD28 solubles pendant 4 jours à 37°C. Le test de migration cellulaire a été effectué à l'aide du système Transwell (Costar) en utilisant des filtres à pores de 5 µm diamètre. Les cellules T CD4⁺ (0.5x10⁶ cellules par chambre de migration) suspendues dans 200 µl un milieu DMEM (Gibco) 0.5% (poids/volume) BSA (Sigma) ont pu migrer vers un gradient chimiotactique créé par l'ajout des chimiokines ligands de CXCR3 (MIG, IP-10, ITAC), CCR4 (MCP-1), CCR5 (RANTES), CCR6 (MIP-3α), CCR7 (MIP-3β) et de CXCR4 (SDF-1) (100 ng/ml). Les cellules ayant migré dans la chambre du bas du système transwell ont été récupérées 4 heures plus tard et resuspendues dans 250 µl de tampon FACS contenant 2% de paraformaldéhyde. Pour compter les cellules ayant migré, 10⁴ billes fluorescentes (Flow-CountsTM Fluorespheres, Beckman Coulter) ont été rajoutées à chaque suspension cellulaire. Le pourcentage relatif des cellules et des billes a été déterminé par analyse en cytométrie en flux sur la base des paramètres différentiels de taille et de granularité des cellules et des billes. En connaissant la concentration des billes par volume, la concentration des cellules par volume et le nombre total des cellules par tube a pu être déterminé. L'acquisition a été faite sur 1,000 billes et <5,000 cellules.

3.10. Préparation des pools de peptides Nef, Gag, et Pol du VIH-1

Les peptides consensus Nef, Gag et Pol du VIH-1 de sous-type B, chacun comptant 15 acides aminés avec un chevauchement de 11 acides aminés ont été obtenus via le programme *NIH (National Institute of Health) AIDS Research and Reference Reagent* et générés dans un laboratoire du *NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases)* (Germantown, MD, États-Unis). Les peptides (n=49 pour Nef, n=123 pour Gag et n=249 pour Pol) ont d'abord été dilués dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à des concentrations variant de 12.5 à 50 mg/ml selon la solubilité de chacun des peptides, puis conservés à -80°C. À partir des peptides individuels, un volume équivalent à 50 µg a été prélevé pour la préparation de divers pools de peptides, le nombre variant de 11 à 28 peptides par pool. Également, des pools équivalant à la séquence intégrale des protéines Nef, Gag et Pol ont été préparés. À l'exception de la séquence intégrale de Pol, dont la concentration finale du pool est fixée à 50 µg/ml par peptide individuel pour une question de solubilité optimale, tous les autres pools de peptides

ont été préparés avec une concentration finale de 100 µg/ml. Les pools ont été ensuite conservés à -80° C.

3.11. Détection des cellules spécifiques d'un antigène par marquage de la molécule de costimulation CD154/CD40L : méthode de la co-culture

La détection de la molécule CD154 a été réalisée en utilisant un protocole publié (89). En bref, les PBMCs de sujets infectés par le VIH ont été décongelées, filtrées puis re-suspendues dans un milieu RPMI, 2% (volume/volume) FBS, 100 unités/ml de pénicilline (P), 100µg/ml de streptomycine (S), et 2 mM L-glutamine, en présence de Monensin (2 µM, Sigma) pour bloquer l'exocytose. 2×10^6 cellules/200µl ont été ensuite stimulées avec du SEB (*Staphylococcal Enterotoxin B*, Toxin Technology, Sarasota, FL, États-Unis), (1µg/ml), de la protéine pp65 du CMV (Cytomegalovirus, Miltenyi) ou des peptides du VIH en présence de 20 µl d'Ac anti-CD154 conjuguées au PeCy5 dans une plaque de 96-puits. Cette quantité d'Ac anti-CD154 choisie a été préalablement titrée pour une détection maximale de CD154. Les cellules ont été incubées pendant 16 heures à 37° C. Par la suite, les lymphocytes T CD4⁺ ont été marqués en surface avec des Ac anti-CD3 et anti-CD4 et analysés par cytométrie en flux pour l'expression du CD154 sur les cellules T CD3⁺CD4⁺. L'analyse par cytométrie en flux a été réalisée après acquisition de 150 à 1,000 cellules T CD4⁺CD154⁺-spécifiques au VIH et de >1,000 cellules T CD4⁺CD154⁺ spécifiques au SEB. Il est à noter que la fréquence des cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH est relativement faible est que 4×10^6 PBMC ont été utilisées par test.

3.12. Mesure de la prolifération cellulaire : méthode de la dilution de la CFSE

Pour mesurer la prolifération des cellules T, les PBMCs ou les lymphocytes T CD4⁺ purifiés ont été chargés avec la CFSE (*Carboxy Fluoroscein Succinimidyl Ester*; Sigma) pendant 8 min à température ambiante. La concentration optimale de CFSE (0.5-2.5 µM) a été choisie pour chaque lot de CFSE par titration. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS 1X et ensuite avec du RPMI contenant des antibiotiques (P, 100 unités/ml et S, 100 µg/ml). Les PBMCs ont été mises en culture dans des tubes en polypropylène de 5 ml (Becton Dickinson), à une concentration de 2×10^6 cellules/ml dans le milieu de prolifération RPMI contenant des antibiotiques (P, 100 unités/ml et S, 100µg/ml), 10 % (volume/volume) sérum humain

(Gemini, West Sacramento, CA, États-Unis), 10 mM HEPES (Gibco) et 2 mM de L-glutamine (Gibco). Les cellules ont été stimulées puis incubées pendant 6 jours à 37°C. Pour mesurer le potentiel costimulateur des chimiokines, les lymphocytes T CD4⁺ isolés à l'aide des billes magnétiques et chargés en CFSE, ont été mis en culture à une concentration de 10⁶/ml et stimulés avec des Ac anti-CD3 immobilisés et anti-CD28 solubles en présence ou en absence de chimiokines recombinantes ligands du CXCR3 (IP-10, ITAC), du CCR4 (MCP-1), du CCR6 (CCL20), du CCR5 (RANTES) ou du CCR7 (MIP-3β). Les cellules ont été incubées pendant 5 jours à 37°C. La prolifération a été analysée par cytométrie en flux, les cellules ayant proliféré exprimant de faibles niveaux de CFSE (CFSE^{low}). Pour la détection de cellules T spécifiques d'un antigène, les PBMCs ont été stimulées avec divers groupes de peptides Pol, Gag et Nef de VIH à une concentration finale de 500 ng/ml. Comme antigènes contrôles, la SEB (25 ng/ml), le pp65 du CMV (1μg/ml) (Miltenyi) et le *Candida albicans* version hyphes (25 μl de lysat cellulaire, 5x10⁴ cellules de *Candida albicans*/ml) (voir section 3.13) ont été utilisés. L'analyse par cytométrie en flux a été effectuée après acquisition de 300 à 1,000 cellules T CD4⁺CFSE^{low} spécifiques au VIH, 500 à 2,000 cellules T CD8⁺CFSE^{low} spécifiques au VIH et de >2,000 cellules T CD4⁺ ou CD8⁺ spécifiques au SEB. Il est à noter que la fréquence des cellules T spécifiques au VIH est relativement faible et que 4x10⁶ PBMC ont été utilisées par test.

3.13. Culture et lyse de *Candida albicans* : forme levure et hyphes

3.13.1. Culture et Préparation de la forme hyphes de *Candida albicans*

La souche LAM-1 de *Candida albicans* a été fournie par le D^r Louis De Repentigny (Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada) sous forme de colonies dans une plaque d'agar. À partir de colonies isolées, les levures du *Candida albicans* ont été cultivées pendant 12 heures à 37°C, dans une solution *Yeast Peptone Dextrose* (YPD) à pH 6 contenant 1% (poids/volume) d'extrait de levure (Bioshop), 2% (poids/volume) peptone (BD), et 2% (poids/volume) de dextrose (Bioshop). Pour la préparation des hyphes, les levures ont été comptées et cultivées à 0.1-0.5x10⁶ cellules/ml dans un milieu YPD 20% (poids/volume) FBS pendant 4-5 heures à 37°C, puis conservées à 4°C pour un usage ultérieur.

3.13.2. Lyse de *Candida albicans* forme hyphes

Les cellules du *Candida albicans* sous forme d'hyphes ont été lavées dans 10 ml de PBS 1x, puis suspendues à 2×10^6 cellules/100 μ l de PBS. Des micro-billes en verre (Sigma) ont ensuite été rajoutées dans la suspension pour effectuer la lyse des cellules à l'aide de la machine FastPrep FP120 (Thermo Savant, Carlsbad, CA, États-Unis). Les cellules ont été lysées à une vitesse de 5 m/s 4 fois pendant 30 sec, puis placées pour une période de 2 minutes à 4°C. Cette étape a été répétée 10 fois. La concentration en protéines du lysat a été mesurée par la technique de Bradford. Le lysat de protéine a été échantillonné et conservé à -20°C pour une utilisation ultérieure.

3.14. Technique de Bradford

La technique de Bradford a été effectuée à l'aide de la trousse *Quick Start Bradford Protein Assay* (Bio-Rad Hercules, CA, États-Unis). Brièvement, diverses concentrations (0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1 et 2 mg/ml) de la protéine BSA (BSA, pour *Bovine Serum Albumin*) ont été fournies par le kit et ajoutées à une plaque de 96 puits afin de constituer la courbe standard. Une série de dilutions 1/10, 1/100 et 1/1000 du lysat protéique à tester ont été préparées et ajoutées à la plaque. Le colorant bleu de Coomassie a été ajouté et la plaque a été incubée à température pièce pour une période de 5 minutes. L'absorbance à 595nm de la plaque a été lue à l'aide d'un spectrophotomètre (Biotek, Winooski, VT, États-Unis) et la densité optique des échantillons a été utilisée pour déterminer la concentration par rapport à la courbe standard.

3.15. Détection de cytokines

Les cytokines ont été quantifiées à l'aide de tests ÉLISA commerciaux (eBioscience, San Diego, CA, États-Unis). Pour résumer, des surnageants provenant de cellules stimulées ont été ajoutés à la plaque de 96 puits, préalablement recouverte d'Ac spécifiques à la cytokine testée, pendant 2 heures à température ambiante. Une courbe standard de la protéine testée a été préparée en réalisant des dilutions de 1/2 allant de 2000 pg/ml à 62.5 pg/ml. Suite à des lavages, l'Ac anti-cytokine couplé à la biotine a été ajouté et la plaque a été incubée à la température ambiante pour 60 min. Suivant les lavages, la solution d'avidine-HRP (100 μ l/puits) (HRP, pour *horseradish peroxidase*) a été ajoutée pour une période de 30 minutes. Le substrat a ensuite été ajouté, suivi par l'ajout de la solution d'arrêt. La plaque a été lue par un

lecteur de plaque ELISA à une absorbance de 450nm (Bio-Rad Hercules, CA, États-Unis). La densité optique des échantillons a été utilisée pour déterminer la concentration par rapport à la courbe standard.

3.16. Détection de la protéine p24 du VIH par ELISA

La souche R5 NL4.3BaL et la souche X4 NL4.3 du VIH-1 ont été produites par transfection de cellules 293T en utilisant le réactif de transfection, composé de lipides, Fugene6 (Roche) qui forment un complexe avec l'ADN permettant ainsi le transport du matériel génétique dans les cellules. La réplication virale a été quantifiée par la mesure de la protéine p24 du VIH, en utilisant une trousse ÉLISA développée par le laboratoire du Dr Sekaly (55). Les lymphocytes T CD4⁺ triés ont été stimulés pendant 3-4 jours via des Ac CD3/CD28, puis exposés au VIH (50 ng HIV-P24 per 10⁶ cellules) pendant 3 heures à 37° C. Les virions en excès ont été éliminés par lavage. Les cellules ont ensuite été mises en culture à 10⁶ cellules/ml dans un milieu RPMI 10% (volume/volume) FBS et IL-2 (5 ng/ml; R&D Systems). Le surnageant des cellules infectées a été récupéré tous les trois jours suivant l'infection, jusqu'au jour 15 post-infection. En parallèle, les cellules ont été récoltées au jour 3 et au jour 12 post-infection et les lysats de cellules ont été utilisés pour la quantification de l'ADN total ou intégré (proviral) du VIH-1 par la technique de PCR en temps réel.

3.17. PCR en temps réel pour la quantification de l'ADN proviral du VIH-1

La quantification de l'ADN total et intégré a été effectuée comme décrit précédemment (8,23) en utilisant les réactifs inclus dans le Tableau 5 ci-dessous. En bref, les lymphocytes T CD4⁺ infectés par le VIH ont été lysés par un tampon comprenant la protéinase K (Invitrogen, Grand Island, NY, États-Unis) et 10⁵ cellules /15µl de lysat ont été utilisées pour l'amplification. Au cours de la première étape d'amplification (12 cycles), l'ADN proviral a été amplifié avec deux amorces Alu et une amorce spécifique pour la séquence LTNP du VIH. Le gène CD3 a été également amplifié en utilisant des amorces spécifiques (Tableau 5). Les amplicons du VIH et du CD3 de la première amplification ont été séparément re-amplifiés (Light Cycler, Roche Diagnostics). L'ADN proviral a été amplifié avec une amorce lambda spécifique et une amorce LTR, en présence de deux sondes fluorescentes s'attachant spécifiquement à la séquence du LTR (50 cycles) (Tableau 5). L'ADN du CD3 a été amplifié

en utilisant les amorces et deux sondes spécifiques (40 cycles). Les conditions incluent la dénaturation, l'élongation. La réaction d'amplification a été effectuée en *triplicata* en utilisant les réactifs Jumpstart Taq Ready Mix (Sigma) et Taq Polymerase (Invitrogen). Les cellules ACH2 (obtenues par le NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) portant une copie d'ADN proviral ont été utilisées pour générer la courbe standard. Les cellules non-infectées de la lignée A301 ont été utilisées comme contrôle négatif. Les résultats ont été exprimés comme nombre de copies d'ADN proviral/10⁶ cellules en considérant 2 copies de CD3 par cellule.

Table 5 : PCR en temps réel pour la quantification de l'ADN proviral

Amorces et sondes	Séquences	T _m ^a
Amorce sens HCD3-externe	5'-ACT GAC ATG GAA CAG GGG AAG-3'	60.0 °C
Amorce anti-sens HCD3-externe	5'-CCA GCT CTG AAG TAG GGA ACA TAT-3'	60.3 °C
Amorce sens HCD3 interne	5'-GGCTATCATTCTTCTTCAAGGT-3'	56.3 °C
Amorce anti-sens HCD3-interne	5'-CCTCTCTTCAGCCATTTAAGTA-3'	56.3 °C
Sonde 1	5'-GGC TGA AGG TTA GGG ATA CCA ATA TTC CTG TCT C-3'-Fluorescein	66.9 °C
Sonde 2	LCred705-5'-CTA GTG ATG GGC TCT TCC CTT GAG CCC TTC-3'-Phosphate	68.9 °C
Amorce LM667-λT	5'-ATG CCA CGT AAG CGA AAC TCT GGC TAA CTA GGG AAC CCA CTG-3'	65.3 °C
Amorce Alu1	5'-TCC CAG CTA CTG GGG AGG CTG AGG-3'	68.8 °C
Amorce Alu2	5'-GCC TCC CAA AGT GCT GGG ATT ACA G-3'	65.3 °C
Amorce sens λT	5'-ATG CCA CGT AAG CGA AAC T -3'	55.4 °C
Amorce anti-sens AA55M	: 5'-GCT AGA GAT TTT CCA CAC TGA CTA A-3'	58.7 °C
Sonde 1 - LTR FL	5'-CAC AAC AGA CGG GCA CAC ACT ACT TGA-3'-Fluorescein	65 °C
Sonde 2 - LTR LC	LC 640 5'-CAC TCA AGG CAA GCT TTA TTG AGG C-3'-Phosphate	62 °C

^aT_m, *melting temperature* (température de fusion)

3.17. PCR en temps réel quantitative SYBR Green

Les cellules T CD4⁺ ont été isolées à partir des PBMC à l'aide de billes magnétique et les sous-populations des cellules T CD4⁺ ont été ensuite triées par cytométrie en flux après marquage avec des Ac anti-CD45RA, anti-CXCR3, anti-CCR4, anti-CCR6. Les cellules ont été stimulées avec des Ac anti-CD3 immobilisés (1 µg/ml) et anti-CD28 solubles (1 µg/ml) pendant 3 jours. L'ARN total des sous-populations des cellules T CD4⁺ a été isolé à l'aide de la trousse RNeasy de Qiagen (Ambion, Inc. Austin, Texas, États-Unis). La membrane des cellules a été lysée à l'aide du tampon RLN, fournit par la trousse. L'ARN a été obtenu par centrifugation à l'aide

de colonnes de la trousse RNeasy. La qualité de l'ARN a été vérifiée à l'aide d'un bioanalyseur (Aligent, Palo Alto, CA, États-Unis) et la quantité a été mesurée avec le spectrophotomètre Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, États-Unis). La PCR en temps réel quantitative SYBR Green a été effectuée dans l'appareil Light Cycler (Roche), selon les recommandations du fabricant. Les amorces ont été achetées auprès de Qiagen (e.g. *rorc*, *gata3*, *t-bet* et *foxp3*). Pour résumer, 5 ng d'ARN total ont été rétrotranscrits dans 20 µl d'une mixture de SYBR Green contenant 5 µM d'amorces. L'électrophorèse en gel d'agarose a été utilisée pour déterminer la taille du produit d'amplification (100-200 paires de bases) et pour la purification de l'ADN complémentaire (ADNc) (Qiagen). L'ADNc a été utilisé pour la préparation de la courbe standard (200, 20, 2, 0.2, 0.02, et 0.002, fgs/reaction), permettant ainsi la quantification absolue de l'expression du gène ciblé par PCR en temps réel. L'analyse de la courbe de fusion a été effectuée pour chaque produit d'amplification et révèle l'uniformité du profil de la dissociation thermique par produit d'amplification. Les échantillons qui n'ont pas été soumis à la transcription inverse ont été utilisés comme contrôles négatifs. L'expression relative de chaque gène a été normalisée avec les niveaux d'ARN ribosomal 28S (RRN28S : sens, 5'-CGAGATTCCCACTGTCCCTA-3' ; anti-sens, 5'-GGGCCTCCCACTTATTCTA-3'). Chaque réaction de PCR en temps réel a été effectuée en *duplicata*.

3.18. Statistiques

Les différences statistiquement significatives entre différents groupes (des valeurs de $p < 0.05$ ont été considérées statistiquement significatives) ont été calculées à l'aide du test paramétrique de Student pour des échantillons appariés et non appariés, les tests non-paramétriques de Mann-Whitney (pour des échantillons non appariés) et de Wilcoxon (pour des échantillons appariés), comme indiqué dans les légendes des figures. Toutes les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA, États-Unis) sous les conseils du statisticien du CRCHUM, Hôpital Saint-Luc, Mr Robert Boileau.

4. Résultats

4.1. Rôles des récepteurs de chimiokines comme marqueurs de cellules T CD4⁺ à fonctionnalité distincte lors de l'infection au VIH

4.1.1. Les récepteurs de chimiokines CCR4, CXCR3 et CCR6 identifient des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ ayant un profil de type Th1, Th2, Th17 ou Th1Th17

Des études récentes ont démontré que les récepteurs de chimiokines CCR4 (R4), CXCR3 (X3) et CCR6 (R6) sont des marqueurs de surface pour différentes sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ mémoires: Th1 (CXCR3⁺CCR6⁻), Th2 (CCR4⁺CCR6⁻), Th1Th17 (CXCR3⁺CCR6⁺) et Th17 (CCR4⁺CCR6⁺) (192, 199, 240). Le rôle de CXCR3, CCR4 et CCR6 dans l'identification des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ susceptibles *versus* les sous-populations résistantes à l'infection au VIH est toujours inconnu et représente l'objectif de la première partie de ce mémoire. Nous avons d'abord vérifié le profil de polarisation des lymphocytes T CD4⁺ exprimant de façon différentielle les CXCR3, CCR4 et CCR6. La caractérisation phénotypique des différentes sous-populations cellulaires a été réalisée par cytométrie en flux multi-couleur. Les cellules mémoires ont été identifiées par l'absence d'expression du marqueur de cellules naïves CD45RA (230). Les cellules CD45RA⁻ ont été triées sur la base de l'expression des CCR4, CXCR3 et CCR6 à la surface cellulaire (Figure 6A et 6B). Les CCR4 et CXCR3 différencient 2 populations cellulaires, incluant les populations CCR4⁺CXCR3⁻ et CCR4⁻CXCR3⁺ (Figure 6A).

L'expression de CCR6 nous a permis d'identifier les sous-populations CCR4⁺CCR6⁺, CCR4⁺CCR6⁻, CXCR3⁺CCR6⁺ et CXCR3⁺CCR6⁻ (Figure 6B). Ces quatre sous-populations ont été triées et leur polarisation a été déterminée en mesurant de l'expression des cytokines et des facteurs de transcription spécifiques pour les cellules de type Th1, Th2, et Th17. La production de cytokines dans les surnageants de culture a été mesurée par ELISA. La quantification de l'expression des ARNm de différents gènes a été réalisée par RT-PCR en temps réel. Nos résultats démontrent que la sous-population cellulaire CXCR3⁺CCR6⁻ sécrète

de l'IFN- γ et exprime fortement l'ARN messenger (ARNm) pour le facteur de transcription attribué aux cellules de type Th1 T-bet (Figure 6C et 6D). La sous-population cellulaire CCR4⁺CCR6⁻ produit l'IL-5 et exprime l'ARNm pour le facteur de transcription des cellules Th2 GATA3. La sous-population cellulaire CXCR3⁺CCR6⁺ produit de l' IFN- γ et de l'IL-17 et exprime l'ARNm pour les facteurs de transcription associés aux Th1 et Th17 (T-bet et RORC). Enfin, nos résultats démontrent que la sous-population CCR4⁺CCR6⁺ de l'IL-17 et exprime l'ARNm pour le facteur de transcription des cellules Th17, RORC (Figure 6D) (55). L'expression de l'ARN messenger du facteur de transcription FoxP3, spécifique aux cellules T régulatrices, est relativement faible dans les 4 sous-populations comparée à celle observée dans les cellules CD25^{high} Tregs (Figure 6D) (55). Tel qu'observé dans la figure 6D, chaque sous-populations exprime certains niveaux de tous les facteurs de transcriptions testés. L'expression forte et distinguée d'un facteur de transcription (par exemple : GATA3) liée à une lignée cellulaire en particulier (par exemple : Th2) permet de conclure qu'une sous-population cellulaire est enrichie en un certain type de cellules Th. En conclusion, les récepteurs des chimiokines CCR4, CXCR3 et CCR6 sont des marqueurs de surface pour des populations des lymphocytes T CD4⁺ à fonctionnalité distincte dont le rôle dans la pathogenèse de l'infection à VIH reste inconnu.

4.1.2. Les récepteurs de chimiokines CCR4, CXCR3 et CCR6 identifient des cellules T CD4⁺ avec susceptibilité distincte à l'infection par le VIH

La susceptibilité des quatre sous-populations de cellules T CD4⁺ Th1 (CXCR3⁺CCR6⁻), Th2 (CCR4⁺CCR6⁻), Th1Th17 (CXCR3⁺CCR6⁺) et Th17 (CCR4⁺CCR6⁺) à la réplication des souches R5 ou X4 du VIH-1 a été déterminée *in vitro*. La mesure de la réplication virale a été réalisée par quantification de la production de la p24 dans les surnageants de culture par ELISA. La quantification de la charge ADN de VIH total et proviral (intégré) a été réalisée par PCR en temps réel en utilisant des amorces et des sondes FRET spécifiques. La réplication de la souche R5 a été détectée à des niveaux élevés dans les cellules T CCR4⁺CCR6⁺ et CXCR3⁺CCR6⁺, mais à des niveaux faibles, voire indétectables dans les cellules CCR4⁺CCR6⁻ et CXCR3⁺CCR6⁻, sur une période de 12 jours post-infection (Figure 7A). À jour 3 post-infection, les niveaux de l'ADN viral intégré et total étaient relativement élevés dans les cellules T CCR4⁺CCR6⁺ et CXCR3⁺CCR6⁺, mais faibles dans les cellules CCR4⁺CCR6⁻ et

CXCR3⁺CCR6⁻ (Figure 7B). La réplication de la souche X4 a été détectée, également, à des hauts niveaux dans les sous-populations CCR4⁺CCR6⁺, CCR4⁺CCR6⁻ et CXCR3⁺CCR6⁺ et à des niveaux faibles, voire indétectables, dans les cellules T CXCR3⁺CCR6⁻ (Figure 7C). Les niveaux de l'ADN intégré et total de la souche X4 étaient plus élevés dans les cellules T CCR4⁺CCR6⁺ et CXCR3⁺CCR6⁺ comparées aux cellules T CXCR3⁺CCR6⁻, à jour 3 post-infection (Figure 7D). En corrélation avec leur niveau d'expression de CXCR4 (résultats non présentés) (55), les cellules T CCR4⁺CCR6⁻ étaient permissives à l'infection de la souche X4 du VIH (Figure 7C-D). Curieusement, les cellules T CXCR3⁺CCR6⁻ ont été relativement résistantes à la réplication des deux souches X4 et R5 et les niveaux de l'ADN intégré des deux souches virales étaient significativement plus faibles comparées aux cellules T CXCR3⁺CCR6⁺, à jour 3 et 12 post-infection (Figure 7A-D) (valeurs p du test t de Student apparié <0.05 ; cellules T CXCR3⁺CCR6⁺ *versus* CXCR3⁺CCR6⁻). Cette différence a été remarquée malgré l'expression modérée *ex vivo* de CCR5 et CXCR4 à la surface des cellules CXCR3⁺CCR6⁻ (résultats non présentés) (55). De plus, d'autres études dans notre laboratoire utilisant différents clones du VIH (e.g. souche YU2 de tropisme R5 ou souche NDK de tropisme X4) ont confirmé la réplication préférentielle du VIH-1 dans les quatre sous-populations cellulaires (résultats non présentés) (55). La réplication de la souche virale de type R5 dans les cellules T CCR4⁺CCR6⁺ et CXCR3⁺CCR6⁺ a été beaucoup plus importante comparativement à la réplication de la souche virale de type X4. En somme, nos résultats démontrent que (i) les cellules T CCR4⁺CCR6⁺ et CXCR3⁺CCR6⁺ sont hautement permissives à la réplication des souches R5 et X4 du VIH-1 ; (ii) les cellules CCR4⁺CCR6⁻ sont permissives aux souches X4 du VIH-1 seulement, et (iii) la sous-population T CXCR3⁺CCR6⁻ est relativement résistante à la réplication des souches R5 et X4 du VIH-1 *in vitro*. Pour déterminer un lien potentiel entre la réplication du VIH et la prolifération des cellules, les quatre sous-populations cellulaires ont été chargées en CFSE, stimulées en présence des Ac anti-CD3 et anti-CD28 pendant 5 jours, et le pourcentage de prolifération a été déterminé à l'aide de la cytométrie en flux. Les résultats démontrent des niveaux maximaux de prolifération cellulaires pour les quatre sous-populations cellulaires testées (Figure 8), signifiant que la susceptibilité différentielle à l'infection par le VIH-1 des quatre sous-populations de cellules T n'est pas due à des différences dans leur capacité de prolifération après stimulation via le RTC. Ainsi, les mécanismes moléculaires à la base de ces propriétés

fonctionnelles distinctes restent à être identifier. Considérant le rôle essentiel des souches R5 durant la transmission du VIH-1, les cellules T $CD4^+ CCR4^+CCR6^+$ et $CXCR3^+CCR6^+$ pourraient contribuer significativement à la pathogénèse du VIH-1 *in vivo*.

Note: Ces résultats ont été générés en collaboration avec les autres membres du laboratoire du Dr Ancuta, notamment Annie Gosselin et Dr Patricia Monteiro, et ont été inclus dans un article publié dans *The Journal of Immunology*, 2010, dont je suis co-auteure (55). Ma contribution à cet article consiste en la génération des résultats inclus dans la Figure supplémentaire 3 et de certains résultats inclus dans les Figures 1A, 1B, 1C, 2A, 2B, 2C, 3A et 3B.

Figures - Section 4.1

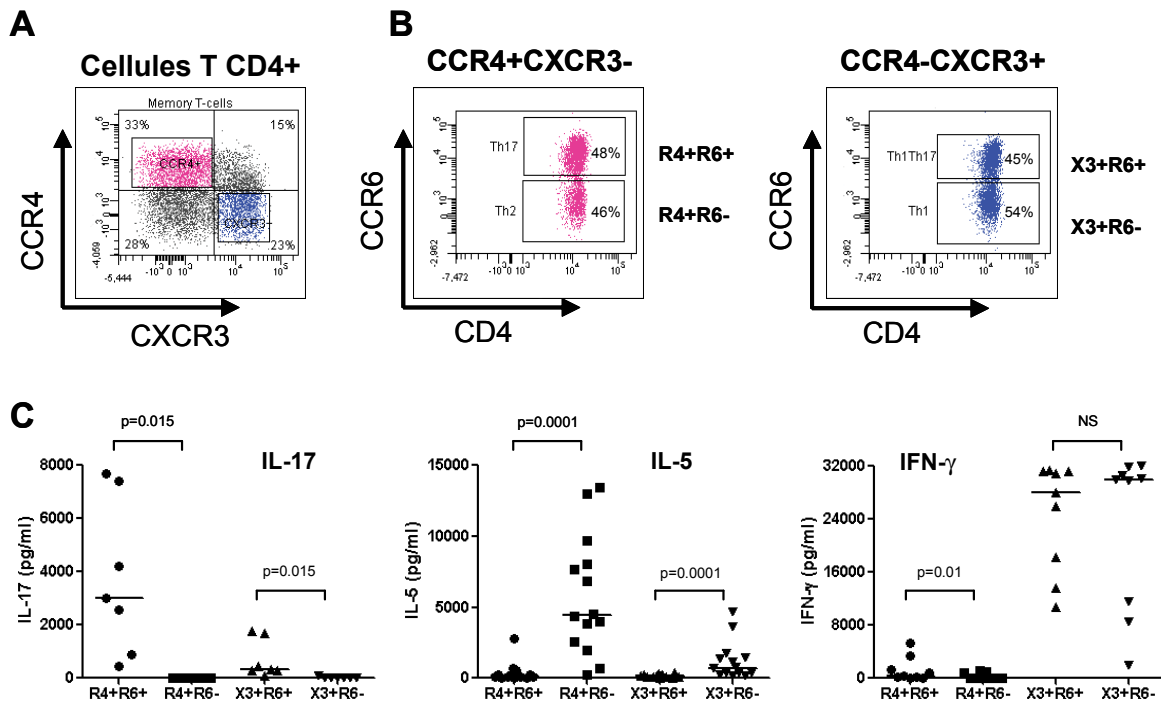


Figure 6: Les récepteurs de chimiokines CCR4, CXCR3 et CCR6 identifient des sous-populations des lymphocytes T CD4⁺ ayant un profil de polarisation de type Th1, Th2, Th1Th17 ou Th17. Les PBMCs des sujets non-infectés par le VIH ont été marquées à la surface avec des Ac anti-CD3, -CD4, -CD45RA, CCR4, CXCR3 et CCR6 couplés à des fluorochromes et ont été analysées par cytométrie en flux. **(A)** L'expression de CCR4 et de CXCR3 identifie quatre sous-populations de cellules T CD4⁺ mémoires, incluant les sous-populations CCR4⁺CXCR3⁻ et CCR4⁻CXCR3⁺. **(B)** L'expression de CCR6 identifie quatre autres sous-populations cellulaires au sein des populations CCR4⁺CXCR3⁻ et CCR4⁻CXCR3⁺: CCR4⁺CCR6⁺, CCR4⁺CCR6⁻, CXCR3⁺CCR6⁺ et CXCR3⁺CCR6⁻. Les résultats en A et B sont représentatifs des résultats obtenus sur >10 donneurs différents. **(C-D)** Les lymphocytes T CD4⁺ totaux ont été d'abord purifiés à l'aide des billes magnétiques en utilisant un kit Miltenyi de sélection négative (MACS). Ensuite, les quatre sous-populations cellulaires identifiées du panel B ont été isolées par cytométrie en flux et ont été stimulées avec des Ac anti-CD3 immobilisés (1µg/ml) et anti-CD28 soluble (1µg/ml) pendant 3 jours. **(C)** La mesure de la production des cytokines IL-17, IL-5 et IFN-γ a été quantifiée par ÉLISA. Les résultats sont représentatifs des expériences réalisées sur des cellules de n=7 (IL-17), n=14 (IL-5), et n=9 (IFN-γ) sujets différents. Les valeurs p du test de Wilcoxon sont indiquées dans les figures. Les lignes horizontales indiquent les valeurs médianes. NS : non significatif. Voir la page suivante.

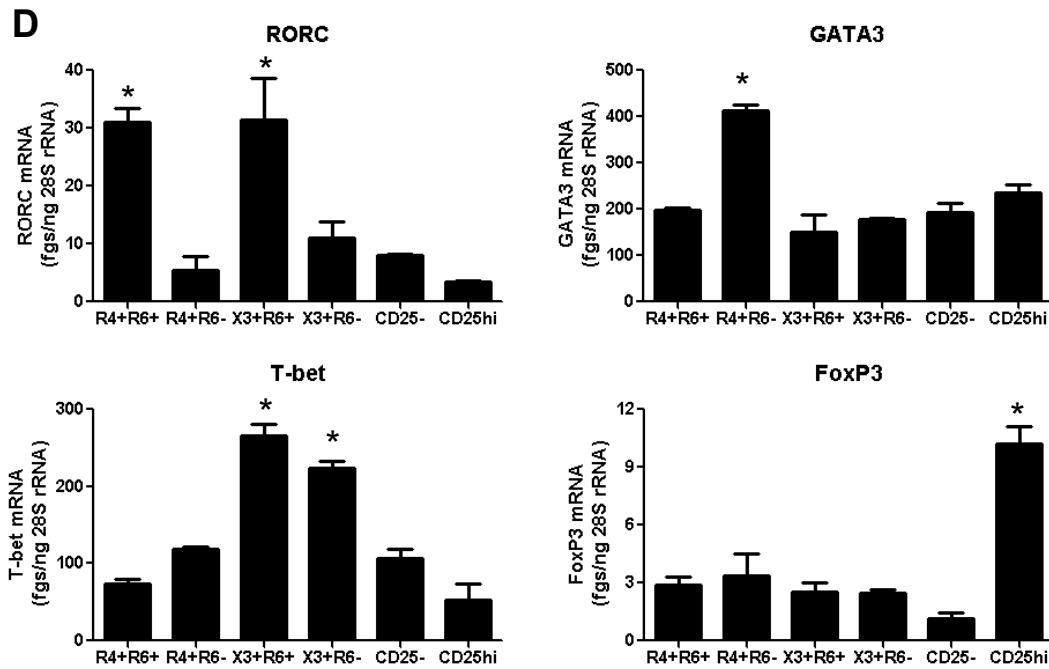


Figure 6 (suite): Les récepteurs de chimiokines CCR4, CXCR3 et CCR6 identifient des sous-populations des lymphocytes T CD4⁺ à profil de polarisation Th1, Th2, Th1Th17 et Th17. (D) La mesure de l'expression des facteurs de transcription associés aux sous-populations Th1, Th2, Th17 et les cellules T régulatrices a été quantifiée par RT-PCR en temps réel. Ces résultats sont représentatifs des expériences réalisées sur des cellules de n=4 (pour les cellules Th1, Th2, Th1Th17 et Th17) et de n=2 donneurs différents (pour les populations T CD4⁺ CD25⁺ et CD25⁻) (moyenne ± déviation standard provenant des duplicata). *, p<0.05, test de Student, échantillons non appariés (Note: l'expression de l'ARNm de RORC et de T-bet dans les cellules T R4⁺R6⁺ et X3⁺R6⁺ a été comparée à celle des autres types cellulaires ; l'expression de l'ARNm de GATA3 dans les cellules T R4⁺R6⁻ a été comparée à celle des autres types cellulaires ; et l'expression de l'ARNm de FoxP3 dans les cellules T CD25^{high} a été comparée à celle des autres types cellulaires).

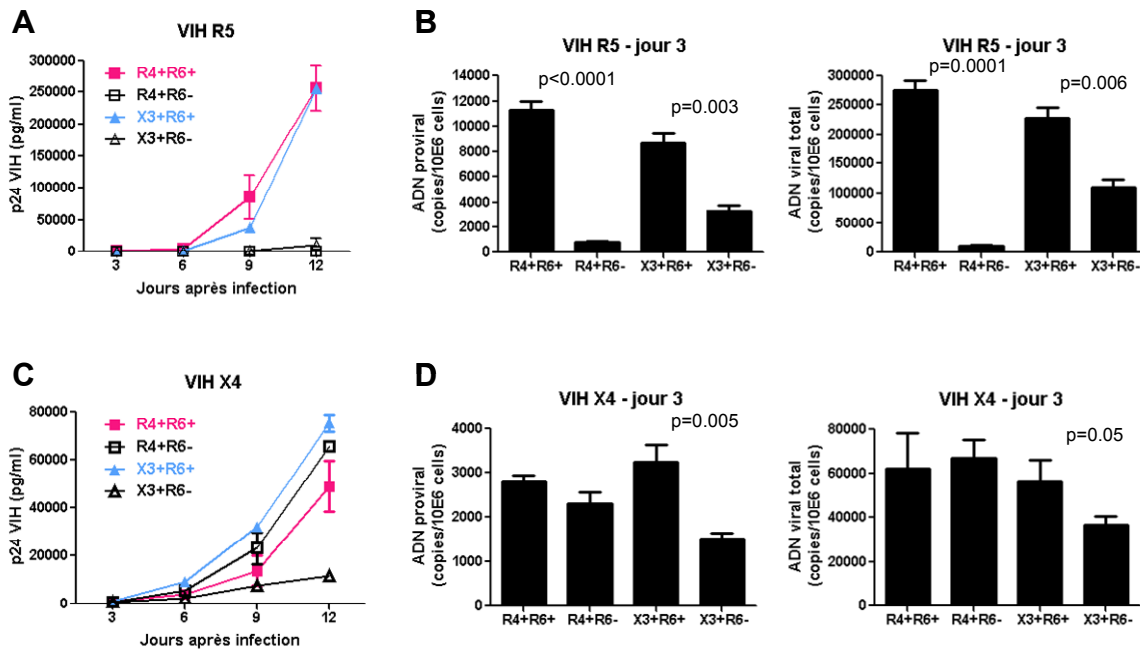


Figure 7 : Analyse de la susceptibilité à la réplication des souches R5 et X4 du VIH des lymphocytes T $CD4^+ CCR4^+ CCR6^+$, $CCR4^+ CCR6^-$, $CXCR3^+ CCR6^+$, et $CXCR3^+ CCR6^-$. Les quatre sous-populations cellulaires ont été triées par MACS et par FACS comme décrit dans Figures 6A et 6B. Les cellules ont été, ensuite, stimulées avec des Ac anti-CD3 immobilisés (1 μ g/ml) et anti-CD28 solubles (1 μ g/ml) pendant 3 jours, puis exposées à des souches R5 (NL4.3BaL) ou X4 (NL4.3) du VIH (50 ng p24 de VIH/10⁶ cellules) pendant 3 heures à 37°C. L'excès de virus non-liés aux cellules a été éliminé par lavage et les cellules ont été cultivées à 10⁶ cellules par ml dans le milieu RPMI 1640 10% FBS, en présence de l'IL-2 (5 ng/ml). **(A, C)** Les surnageants ont été recueillis tous les trois jours post-infection et les niveaux de p24 de VIH ont été mesurés par ELISA. **(B et D)** La charge virale ADN du VIH intégré et total a été quantifiée par PCR en temps réel à jours 3 et 12 post-infection. Les figures A à D illustrent les résultats d'une expérience représentative des résultats obtenus avec des cellules provenant de plus de trois sujets (moyenne \pm déviation standard des duplicatas (A et C) ou quadruplicatas (B et D)). Les valeurs p du test de Student, échantillons non appariés, sont indiquées dans les figures B et D. (Note: le nombre de copies d'ADN proviral ou d'ADN viral total a été comparé dans les cellules T $R4^+R6^+$ versus $R4^+R6^-$ et dans les cellules T $X3^+R6^+$ versus $X3^+R6^-$).

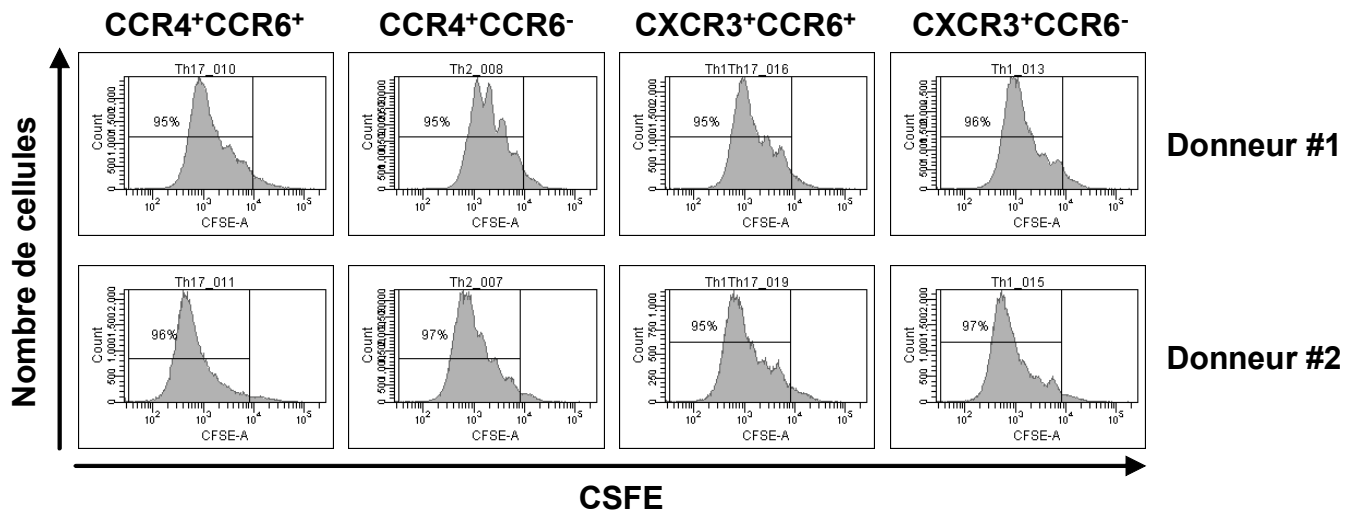


Figure 8: Prolifération polyclonale des cellules T CD4⁺ CCR4⁺CCR6⁺, CCR4⁺CCR6⁻, CXCR3⁺CCR6⁺ et CXCR3⁺CCR6⁻. Les sous-populations de cellules T CD4⁺ triées par MACS et ensuite par FACS ont été chargées en CFSE (0.5 μM) et stimulées via CD3/CD28 pendant 5 jours. La prolifération cellulaire est associée à la dilution de la CFSE. Le pourcentage de cellules CFSE^{low} est indiqué dans la figure pour chaque sous-population. Les résultats présentés dans cette figure sont représentatifs de deux expériences effectuées avec des cellules provenant de deux donneurs différents.

4.2. Analyse phénotypique et fonctionnelle des cellules T spécifiques au VIH

4.2.1. Potentiel de migration des cellules T CD4⁺CD154⁺ spécifiques au VIH

Les tissus lymphoïdes associés au GALT sont des sites majeurs de réplication du VIH et de déplétion des cellules T CD4⁺ (241, 242). Les cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH sont préférentiellement susceptibles à l'infection par le VIH, mais leur potentiel d'être recrutées dans les GALT des LTNPs reste inconnu (99). Afin de déterminer le potentiel de migration des cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH associées aux LTNPs, nous avons quantifié l'expression des marqueurs de migration spécifiques vers les muqueuses du tractus gastro-intestinal (intégrine $\alpha 4\beta 7$, CCR6 et CXCR3) (140, 233, 234), vers la peau (CLA pour *Cutaneous Lymphocyte associated Antigen* (un épitope sur le ligand de la sélectine P, le PSGL1) et CCR4 (243) et vers les ganglions lymphatiques (CCR7 (231)). Les paramètres cliniques des quatre sujets inclus dans cette étude (i.e., LTNP05, LTNP07 visite 1 et visite 5, LTNP11, LTNP15) sont présentés dans le Tableau 1 : leurs taux de CD4 médian >300 cellules/ μ l, la charge virale médiane est relativement basse et le temps d'infection minimal est de 15 ans sans recours à la thérapie antirétrovirale.

Les cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH ont d'abord été identifiées selon l'expression de la molécule de costimulation CD154 (CD40L) en utilisant un système de co-culture décrit précédemment (89). En bref, les PBMCs des quatre sujets LTNP ont été stimulées avec divers pools de peptides consensus Nef, Gag et Pol du VIH-1 de sous-type B, avec la protéine recombinante p24 du VIH-1 le SEB et des peptides de la protéine pp65 recombinante du CMV, servant tous deux de contrôle, pendant une nuit, en présence des anticorps anti-CD154 conjugués au fluorochrome PE-Cy5 (Tableau 6). L'analyse des cellules T CD3⁺CD4⁺ pour l'expression de CD154 a été effectuée par cytométrie en flux (Figure supplémentaire 1 et Figure 9A). Les cellules T CD4⁺CD154⁺ ont été détectées chez quatre, trois et trois des cinq sujets dont les cellules ont été stimulées respectivement avec SEB, CMV et la protéine recombinante p24, alors que les cellules T CD4⁺ des quatre sur quatre sujets ont exprimé CD154 suite à la stimulation avec les peptides du VIH (Tableau 6).

Ensuite, l'expression des molécules de migration spécifiques de tissu sur les cellules T CD4⁺CD154⁺ spécifiques aux SEB, CMV et au VIH a été déterminée (Figure 9B). Le SEB est

un superantigène utilisé comme contrôle positif pour l'activation des cellules T. La majorité des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ répondent au SEB, qui se fixe à la région non-polymorphique du TCR (273, 274). En dépit d'une certaine hétérogénéité parmi les cinq sujets dans l'expression des marqueurs de migration (Figure 9C), les cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH-1 expriment plus fortement l'intégrine β7 ainsi que l'épitope CLA et les récepteurs de chimiokines CCR6, CXCR3 et CCR4, comparativement aux cellules spécifiques au SEB (Figure 9D). Les cellules spécifiques au VIH-1 se distinguent des cellules T CD4⁺ spécifiques au CMV par leurs niveaux élevés d'expression de l'intégrine β7 (Figure 9D). L'expression de CCR7 fut similaire à la surface des cellules spécifiques au SEB, CMV et VIH (Figure 9D). Donc, contrairement aux cellules spécifiques au SEB et au CMV, les cellules T CD4⁺CD154⁺ spécifiques au VIH démontrent un vaste potentiel de migration vers les muqueuses intestinales, la peau et les ganglions lymphatiques du fait de forte expression respective de l'intégrine β7, de l'épitope CLA, et des récepteurs de chimiokines CCR6, CXCR3 et CCR4 (Figure 9D). Les cellules dendritiques intestinales ont la capacité unique de transformer le rétinol en acide rétinoïque, qui est responsable de l'induction de l'expression de l'intégrine β7 sur les cellules T (244, 245). Ainsi, le fait que les cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH comparées aux cellules spécifiques au CMV expriment le marqueur de migration vers l'intestin, l'intégrine β7 (Figure 9D) suggère leur potentielle induction par des cellules présentatrices d'antigène au niveau du GALT. Le potentiel de migration dans l'intestin, qui est un site majeur de réplication virale *in vivo* (40), pourrait justifier le fait que les cellules spécifiques au VIH-1, comparées à celles spécifiques au CMV, expriment des niveaux supérieurs d'ADN proviral chez les sujets infectés par le VIH (99).

4.2.2. Analyse phénotypique du potentiel de migration des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ proliférant en réponse à des peptides du VIH

La réplication virale dans les cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH, qui infiltrent le GALT, peut être contrôlée par la co-localisation avec des cellules T CD8⁺ effectrices. Ce scénario est appuyé par la découverte récente dans un modèle de macaque qu'un ratio élevé de cellules effectrices *versus* les cellules cibles s'avère bénéfique pour le contrôle de la réplication et la dissémination virale au cours des infections à LCMV et VIS (246). La réplication du VIH

dans les cellules T CD4⁺ est bien contrôlée chez les LTNPs par les lymphocytes T CD8⁺ (171 , 247). Afin de déterminer si le potentiel de co-localisation des cellules effectrices et des cibles *in situ* représente un nouveau corrélat de protection immunitaire contre le VIH, nous avons comparé le potentiel de migration des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH chez les 5 sujets LTNP (Figure supplémentaire 2 et Figures 10 et 11). Les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH ont été identifiées sur la base de leur prolifération en réponse à la p24 et à divers pools de peptides du VIH par la technique de dilution de la CFSE. Les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ des cinq sujets LTNPs ont proliféré en réponse à un ou plusieurs pools de peptides, ainsi qu'aux stimulations par SEB et CMV, tandis que la prolifération induite par la protéine p24 a été observée chez deux des cinq sujets LTNPs (Tableau 7).

Afin de déterminer le potentiel de migration des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH, l'expression de l'intégrine β 7 et de CCR6, CXCR3 et CCR4 a été quantifiée par la cytométrie en flux à la surface des cellules proliférant en réponse au VIH (pool de 25 peptides) et identifiées comme CFSE^{low} (Figures 10B et 11B). Une grande hétérogénéité a été observée dans l'expression des marqueurs de migration à la surface des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH, au sein du même donneur (Figures 10C et 11C) et également lorsque les cellules T spécifiques pour le même pool de peptides étaient comparées parmi les 5 donneurs (e.g., l'expression de l'intégrine β 7 sur les cellules T CD4⁺ spécifiques au pool Gag 705-827) (Figures 10C et 11C). Malgré cette hétérogénéité, l'analyse statistique révèle que les cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH en comparaison des cellules spécifiques au CMV expriment des niveaux significativement plus élevés d'intégrine β 7 et de CCR6 et des niveaux similairement élevés de CXCR3 et CCR4 (Figure 10D). Les cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH en comparaison des cellules spécifiques au CMV, expriment des niveaux plus élevés de l'intégrine β 7, et des niveaux similaires des récepteurs de chimiokines CXCR3, CCR6 et CCR4 (Figure 11D). Fait à noter, la prolifération des cellules T CD8⁺ est significativement plus élevée comparée à celle des cellules T CD4⁺, pour tous les sujets et pour chaque stimulation antigénique (Tableau 7 et Figure 12A), avec un ratio CD8/CD4 de 3.2, 2.3, 4.1, 5.6 et 2.8 respectivement pour les donneurs LTNP001, LTNP006, LTNP007 V1, LTNP011 et LTNP015 (résultats non présentés). Lorsque nous comparons le phénotype des cellules T CD4⁺ à celui des cellules T CD8⁺ proliférant en réponse aux peptides du VIH, les cellules T CD4⁺

expriment des niveaux plus faibles de l'intégrine $\beta 7$, des niveaux plus élevés de CCR6 et de CCR4 et des niveaux similaires de CXCR3 (Figure 12B). Une corrélation positive statistiquement significative a été observée pour l'expression de l'intégrine $\beta 7$, mais pas pour celle de CCR6 et CCR4, entre les cellules T $CD4^+$ et $CD8^+$ spécifiques au VIH (Figure 12C). En conclusion, malgré le fait que les cellules T $CD8^+$ spécifiques au VIH expriment faiblement CCR6 comparées aux cellules T $CD4^+$, ces résultats démontrent que les lymphocytes T $CD4^+$ et T $CD8^+$ spécifiques au VIH ont le potentiel de migrer vers les muqueuses intestinales grâce à leur forte expression de $\beta 7$ et de CXCR3. La co-localisation potentielle des cellules T $CD4^+$ et T $CD8^+$ spécifiques au VIH dans le GALT via l'intégrine $\beta 7$ et CXCR3, avec un excès de cellules T $CD8^+$ effectrices *versus* cellules T $CD4^+$ cibles de l'infection pourrait représenter un nouveau corrélat de protection immunitaire permettant de limiter la dissémination du VIH chez les LTNPs.

4.2.3. Analyse du profil cytokinique des cellules T $CD4^+$ et $CD8^+$ proliférant en réponse à des peptides du VIH

Des études précédentes ont démontré que les cellules T spécifiques au VIH produisant de l'IL-17 (Th17) pouvaient être détectées lors la phase aiguë de l'infection (95). Cependant, au cours de la maladie, de l'infection vers la phase chronique, les réponses Th17 disparaissent, et les cellules T spécifiques au VIH produisent majoritairement de l'IFN- γ (profil cytokinique Th1) (95, 115). Considérant le rôle important des cellules Th17 dans le contrôle de la progression de l'infection à VIH au niveau du GALT (156, 242), nous avons cherché à déterminer si les réponses Th17 étaient maintenues chez les LTNPs, ce qui représenterait un nouveau corrélat de protection immunitaire lors de l'infection au VIH. Afin d'atteindre cet objectif, la production de cytokines Th1 (IFN- γ et TNF- α) et Th17 (IL-17) a été quantifiée dans les cellules T $CD4^+$ ($CD3^+CD8^-$) et T $CD8^+$ ($CD3^+CD8^+$) proliférant en réponse aux peptides du VIH, à SEB, à CMV et aux hyphes de *Candida albicans*, en utilisant la technique de dilution de la CFSE et en restimulant les cellules avec PMA et Ionomycine pour 18 heures après 5 jours de stimulation antigénique (Figures 13A-B et 14A-B). Des expériences préliminaires effectuées au laboratoire ont pu confirmer que les cellules T $CD3^+CD8^+$ sont des cellules T $CD4^+$ (résultats non présentés). CMV et les hyphes de *Candida albicans* sont connus

pour leur capacité respective à induire des réponses Th1 et Th17 (192, 199). Les stimulations via CMV et les hyphes de *Candida albicans* ont donc été utilisées comme témoins positifs respectifs pour l'induction des cytokines de type Th1 (192) et Th17 (199) (Figure 13 et 14).

Malgré un degré de variabilité dans la fréquence des cellules produisant de l'IFN- γ observé parmi les différentes stimulations et les sujets, les cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH expriment de l'IFN- γ à des niveaux relativement élevés, de façon similaire aux cellules T spécifiques au SEB, CMV et *Candida*. Cependant, les cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH produisent avec des fréquences moyennes le TNF- α et des fréquences faibles l'IL-17 (Figure 13C-D). Les plus grandes fréquences de TNF- α et d'IL-17 sont détectées dans les cellules T CD4⁺ spécifiques au *Candida albicans* (Figure 13C-D). Des études similaires ont été effectuées sur les cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH (Figures 14A-B). Les cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH-1 ont la capacité de produire une fréquence élevée d'IFN- γ , mais expriment des fréquences relativement moyennes et faibles, respectivement à TNF- α et à IL-17 (Figure 14C-D). La fréquence des cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH, SEB et CMV produisant les cytokines IFN- γ , TNF- α et IL-17 était similaire. Les cellules T CD8⁺ spécifiques au *Candida albicans* produisent la plus grande fréquence d'IFN- γ et de TNF- α (Figure 14D). En conclusion, ces résultats démontrent que les réponses T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH ont en majorité un profil cytokinique de type Th1 chez les sujets LTNP, comme l'indique leur capacité de produire des niveaux élevés d'IFN- γ et modérés de TNF- α . Néanmoins, une petite fraction des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH ont un phénotype Th17, étant capable de produire de l'IL-17. Ces derniers résultats, couplés avec la découverte que les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au *Candida albicans* produisent à fréquence élevée l'IL-17, apportent un soutien en faveur de la maintenance des réponses Th17 chez les LTNPs.

4.2.4. Analyse de l'expression de CCL3, ligand de CCR5, dans les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ proliférant en réponse à des peptides du VIH.

Récemment, il a été rapporté que les cellules T CD4⁺ spécifiques au CMV se protégeaient de l'infection à VIH en sécrétant, de façon autocrine, la chimiokine ligand de CCR5, CCL3 (124). Afin de déterminer si les cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH des LTNPs

utilisent ce mécanisme de protection pour résister à l'infection *in vivo*, nous avons quantifié l'expression de CCL3 par cytométrie en flux dans les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH, au SEB, au CMV et à la forme hyphe de *Candida albicans* chez les LTNPs (Figure 15). Au sein des cinq donneurs, une grande hétérogénéité de la production de CCL3 a été observée dans les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques aux différents antigènes (Figure 15B et 15D); avec la fréquence la plus élevée des cellules CCL3⁺ au sein des cellules T spécifiques au *Candida albicans* (Figure 15B et 15D). Toutefois, l'analyse globale démontre que la fréquence des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au CMV exprimant CCL3 est élevée chez deux LTNPs et faible chez les deux autres LTNPs sur quatre (Figure 15E). Chez un sujet sur cinq, la fréquence des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺CCL3⁺ spécifiques au VIH a été similaire à celle des cellules spécifiques au *Candida albicans*, alors que chez les quatre autres LTNPs la fréquence des cellules spécifiques au VIH était modérée, voire faible (Figure 15B et 15D-E). Une corrélation positive statistiquement significative a été observée quant à l'expression de CCL3 par les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH (Figure 15F), indiquant qu'un antigène donné chez un sujet donné induit une production similaire de CCL3 sur les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ à la fois. En conclusion, chez les cinq LTNPs analysés, nous avons observé une grande hétérogénéité interindividuelle de l'expression de CCL3 par les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH, au SEB, et au CMV, mais une expression maximale de CCL3 par les cellules spécifiques au *Candida albicans*.

4.2.5. Analyse de la production de CCL3 dans les lymphocytes T CD8⁺β7⁺ et T CD8⁺β7⁻ chez les LTNP

Des nombreuses études précédentes ont démontré que les cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH ont la capacité de contrôler l'infection à VIH de façon non-cytotoxique en produisant et sécrétant, entre autres, les ligands de CCR5 (126). Les résultats que nous avons présentés jusqu'ici démontrent (i) le potentiel de co-localisation des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH dans les muqueuses intestinales, principalement par l'expression de l'intégrine β7 (Figure 12) et (ii) le potentiel des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH à produire la chimiokine CCL3 de manière similaire aux cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au CMV (Figure 15). Ces résultats nous ont poussés à déterminer si le niveau de production de CCL3 était différent dans les cellules T CD8⁺ mémoires (CD45RA⁻) exprimant

ou non l'intégrine $\beta 7$. Pour cela, les cellules T $CD8^+$ des sujets LTNP05 et LTNP07 (Tableau 1) ont été isolées par sélection négative en utilisant des billes magnétiques, puis les cellules T $CD8^+$ mémoires $\beta 7^+$ et $\beta 7^-$ ont été triées par cytométrie en flux. Pour les deux LTNPs, nos résultats démontrent que les cellules T $CD8^+$ mémoires $\beta 7^+$ produisent des niveaux significativement plus élevés de CCL3, comparées aux cellules $\beta 7^-$ (Figure 16). En conclusion, ce résultat démontre une association entre l'expression de l'intégrine $\beta 7$ et la production des niveaux élevés de CCL3 par les cellules T $CD8^+$ mémoires, suggérant ainsi le potentiel antiviral de ces cellules et le fait que leur recrutement dans le GALT pourrait représenter un mécanisme de contrôle de la dissémination de l'infection à VIH *in vivo*.

Tableaux et Figures - Section 4.2

Table 6: Criblage des réponses T CD4⁺ spécifiques au VIH-1 chez cinq sujets LTNP en mesurant l'expression de la molécule de costimulation CD154 (CD40L)

	LTNP05	LTNP07 Visite 1	LTNP11	LTNP15	LTNP07 visite 5
Medium	0.102 ^a	0.278	0.027	0.103	0.102
SEB	3.494	7.381	7.995	2.847	3.494
pp65 CMV	N ^b	0.458	N	0.890	1.12
VIH-p24	N	0.417	0,079	1.280	N
VIH-Nef 5139-5187	N	N	0,092	0.521	N
VIH-Nef 5139-5163	N	N	N	0.609	N
VIH-Nef 5164-5187	0.327	0.578	0,079	N	0.327
VIH-Gag 705-827	N	N	0,080	N	N
VIH-Gag 705-728	N	N	N	N	N
VIH-Gag 729-752	N	N	N	N	N
VIH-Gag 753-776	N	N	N	N	N
VIH-Gag 777-800	N	N	0.065	N	N
VIH-Gag 801-827	N	N	N	N	N
VIH-Pol 461-709	N	N	N	N	N
VIH-Pol 461-484	N	N	0.092	0.280	0.291
VIH-Pol 485-508	0.291	N	0.274	0.790	N
VIH-Pol 509-532	N	N	N	N	N
VIH-Pol 533-556	N	N	N	N	0.154
VIH-Pol 557-580	N	N	N	0.899	0.174
VIH-Pol 581-604	N	0.476	0.087	2.335	N
VIH-Pol 605-628	N	N	N	0.211	N
VIH-Pol 629-652	N	N	N	N	N
VIH-Pol 653-674	N	N	N	N	N
VIH-Pol 675-698	N	N	0.058	0.571	N

^a% de cellules T CD4⁺ CD154⁺; ^bN: Négatif. L'expression de CD154 est considérée négative lorsqu'elle est 1^{1/2} fois plus petite que le contrôle sans stimulation.

Note Tableau 6: L'analyse par cytométrie en flux a été faite après acquisition de 150 à 1,000 cellules T CD4⁺CD154⁺-spécifiques au VIH et de >1,000 cellules T CD4⁺CD154⁺ spécifiques au SEB. Il est à noter que la fréquence des cellules T CD4⁺-spécifiques au VIH est relativement faible et que 4x10⁶ PBMC ont été utilisées par test.

Note Tableau 7: L'analyse par cytométrie en flux a été faite après acquisition de 300 à 1,000 cellules T CD4⁺CFSE^{low}-spécifiques au VIH, 500 à 2,000 cellules T CD8⁺CFSE^{low}-spécifiques au VIH et de >2,000 cellules T CD4⁺ ou CD8⁺-spécifiques au SEB. Il est à noter que la fréquence des cellules T spécifiques au VIH est relativement faible et que 4x10⁶ PBMC ont été utilisées par test.

Table 7: Criblage des réponses prolifératives T CD4⁺ et T CD8⁺ aux peptides du VIH-1 chez les LTNP

	LTNP001		LTNP006		LTNP007		LTNP011		LTNP015	
	CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8
Medium	0.062 ^a	0.118	0.122	0.208	0.128	0.101	0.144	0.134	0.112	0.154
SEB	39.855	49.905	21.553	39.015	40.760	42.074	37.360	42.579	53.009	55.266
pp65 CMV	1.046	2.314	0.357	3.921	57.690	8.946	2.321	3.716	25.581	25.999
VIH-p24	N ^b	N	N	N	1.702	1.402	N	N	0.744	1.174
Nef 5139-5187	0.229	0.571	N	N	N	2.869	N	0.359	0.273	0.694
Nef 5139-5163	0.204	0.324	N	N	N	2.103	N	N	N	0.444
Nef 5164-5187	N	0.343	N	N	N	0.519	N	N	N	N
Gag 705-827	0.503	5.552	0.550	1.282	1.384	13.915	N	1.255	1.101	3.029
Gag 705-728	0.307	1.176	N	N	0.291	0.495	N	1.144	N	N
Gag 729-752	N	N	N	N	N	2.909	N	N	0.283	N
Gag 753-776	0.205	2.293	N	N	1.725	1.484	N	N	N	N
Gag 777-800	0.241	2.33	N	N	0.610	19.525	N	0.397	0.861	2.188
Gag 801-827	N	N	N	N	N	N	N	N	0.737	0.776
Pol 461-709	0.54	4.134	0.248	0.885	0.378	6.378	N	1.128	0.245	2.257
Pol 461-484	N	N	N	N	N	0.321	N	N	N	N
Pol 485-508	0.193	N	N	N	N	N	N	N	0.448	0.404
Pol 509-532	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Pol 533-556	0.220	0.227	N	N	N	N	N	N	0.291	4.748
Pol 557-580	N	N	N	N	N	3.89	N	N	N	0.377
Pol 581-604	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0.495
Pol 605-628	0.390	0.385	0.296	N	N	0.286	N	N	N	1.277
Pol 629-652	0.445	0.473	N	N	3.79	0.238	N	N	N	0.731
Pol 653-674	0.544	0.474	N	N	N	0.206	N	N	N	0.314
Pol 675-698	0.436	2.584	0.238	N	N	0.216	N	N	0.316	0.889
Pol 699-709	0.417	0.369	N	N	N	N	N	N	N	N
Nef/Gag/Pol	1.867	9.207	0.341	1.01	1.474	14.046	0.559	1.916	0.818	3.648

Tableau 7 : Compilation des résultats de prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ de 5 sujets LTNP, suite à la stimulation antigénique (SEB, CMV, pool de VIH), tel qu'illustré dans les Figures 10-15. ^a% de CFSE^{Low} des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques à l'antigène ^bN: négatif, La prolifération a été considérée négative lorsqu'elle était moins de 2 fois plus grande que le contrôle sans stimulation.

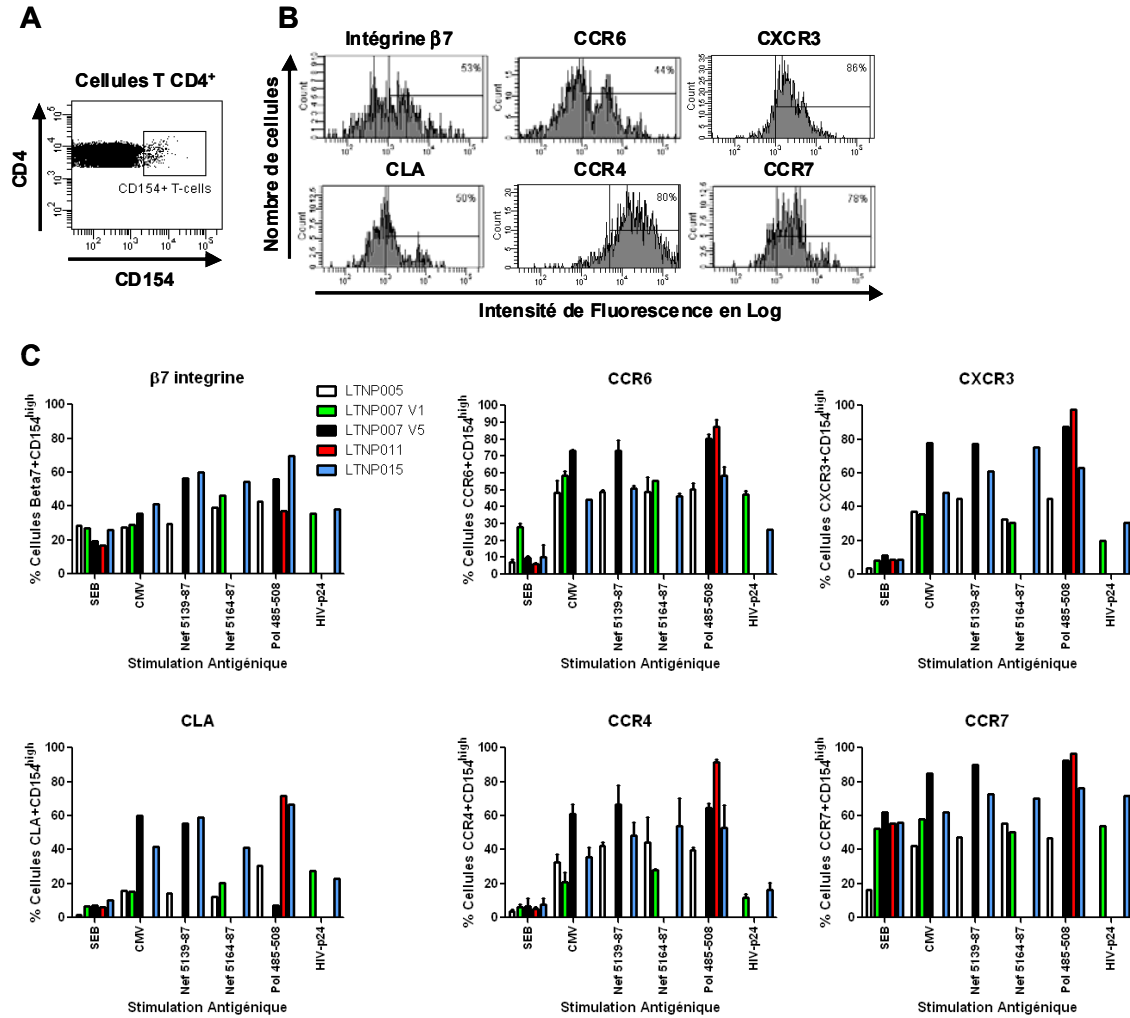


Figure 9: Les cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH expriment un large patron de molécules pour la migration dans l'intestin, la peau, et les ganglions lymphatiques chez les LTNPs. Les PBMCs de cinq LTNPs ont été stimulés avec SEB (1 $\mu\text{g/ml}$), la protéine pp65 du CMV recombinante (5 $\mu\text{g/ml}$), la protéine p24 du VIH recombinante 5 $\mu\text{g/ml}$, et divers pools de peptides de VIH: Nef (3 pools), Gag (6 pools) et Pol (12 pools) (10 $\mu\text{g/ml}$). Les cellules ont été cultivées en présence de Monensin (2 $\mu\text{g/ml}$) et des Ac anti-CD154 couplés au fluorochrome PE-Cy5 (20 $\mu\text{l}/0.2\text{ml}$) pendant 18 heures. Les cellules ont été ensuite marquées en surface avec des anticorps anti-CD3, -CD4, - $\beta 7$, -CCR6, -CXCR3, -CLA, -CCR4, and -CCR7 couplés à des fluorochromes. L'analyse a été effectuée par cytométrie en flux pour **(A)** l'expression de CD154 sur les cellules T CD3⁺CD4⁺ et **(B)** l'expression de l'intégrine $\beta 7$, CCR6, CXCR3, CLA, CCR4, et CCR7 sur les cellules T CD3⁺CD4⁺CD154⁺ spécifiques au VIH. **(A-B)** L'expression positive des molécules ciblées a été déterminée à l'aide des contrôles FMO (pour *fluorescence minus one*) **(C)** Le phénotype des cellules T CD4⁺CD154⁺ spécifiques au VIH a été comparé à celui des cellules spécifiques au SEB et de CMV chez chaque LTNP individuellement. Voir page suivante.

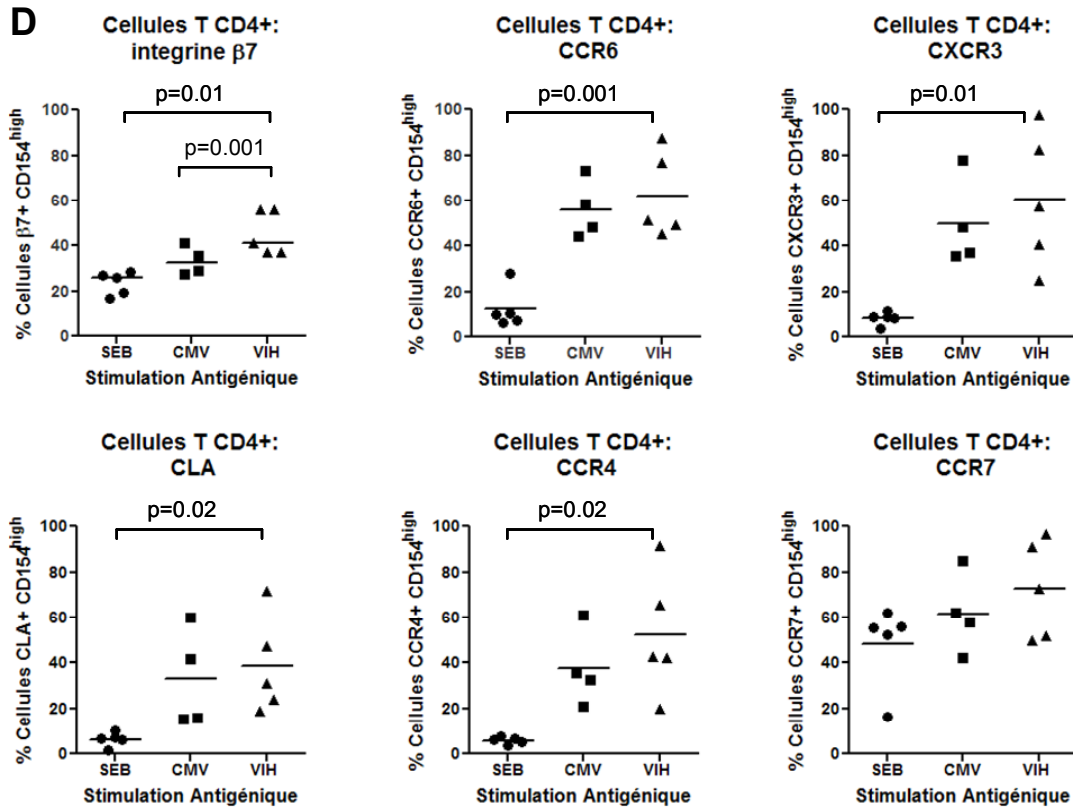


Figure 9 (suite): Les cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH expriment un large patron de molécules pour la migration dans l'intestin, la peau, et les ganglions lymphatiques chez les sujets LTNP. (D) La figure indique l'analyse globale du potentiel de migration des cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH, SEB et au CMV chez cinq sujets LTNP. Pour SEB et CMV chaque symbole représente un patient. Pour VIH, les symboles représentent la valeur moyenne d'expression de chaque molécule pour l'ensemble des cellules T spécifiques aux différents peptides de VIH pour un patient donné. Les valeurs p du test t de Student (valeurs appariées) de sont indiquées dans les figures. Les lignes horizontales indiquent les valeurs moyennes.

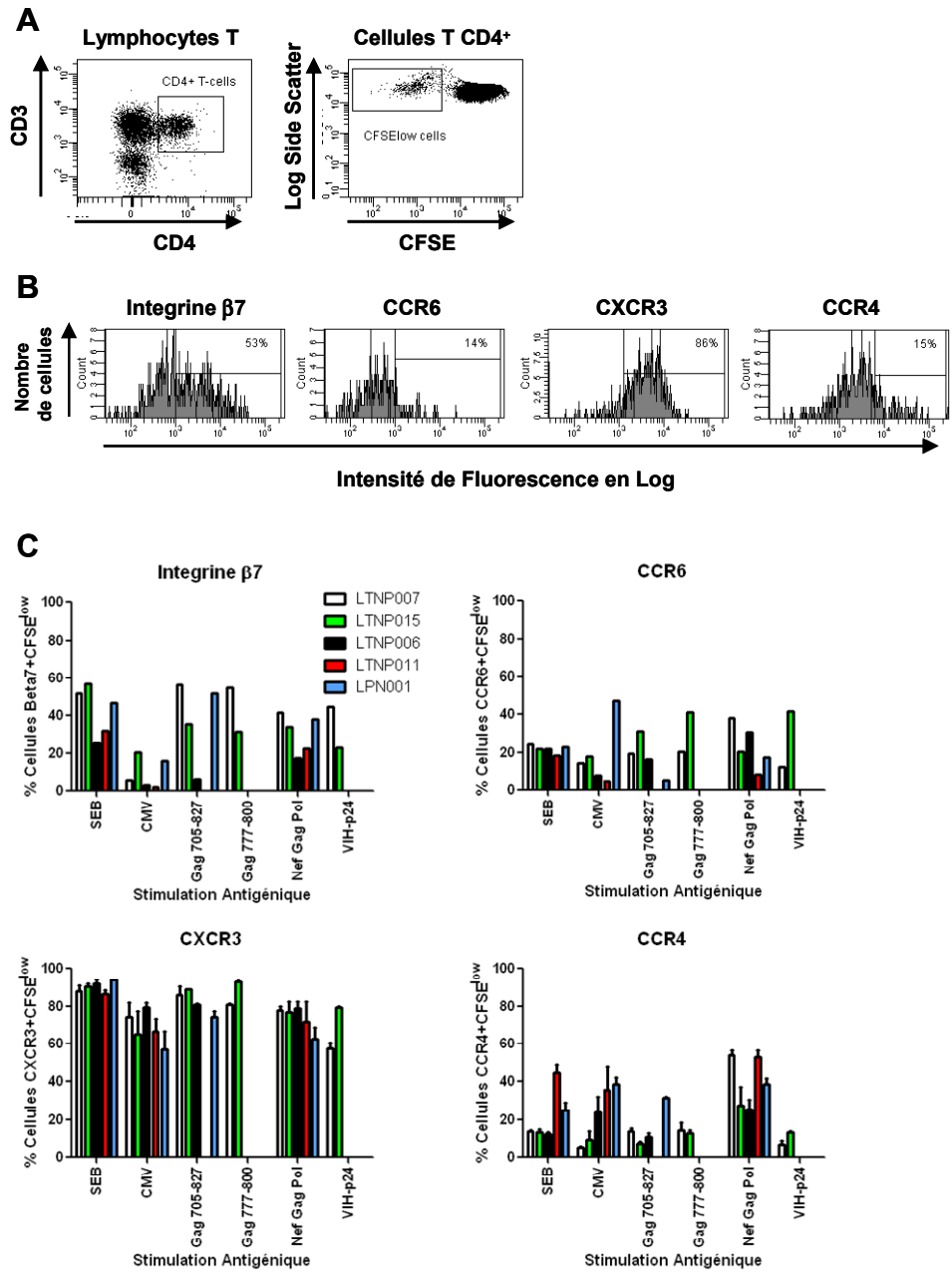


Figure 10 : Potentiel différentiel de migration vers l'intestin des cellules T CD4⁺ proliférant en réponse à la stimulation par des antigènes de VIH *versus* CMV chez les LTNPs. Voir page suivante

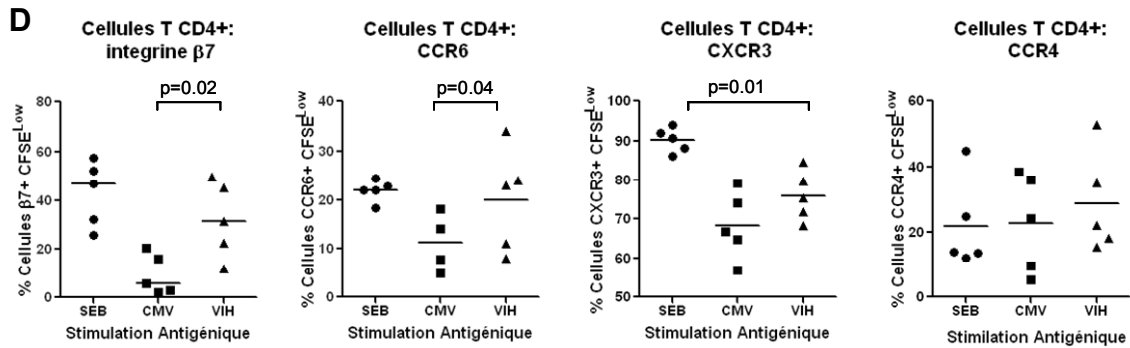


Figure 10 (suite): Potentiel différentiel de migration des cellules T CD4^{+} proliférant en réponse à la stimulation par des antigènes de VIH *versus* CMV chez les LTNPs. Les PBMCs des cinq LTNPs ont été chargées en CFSE (0.5 μM) et cultivées pendant 6 jours à 37°C en présence ou l'absence de la p24 recombinante (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et divers pools de peptides Nef (3 pools), Gag (6 pools) et Pol (12 pools) du VIH-1 (500 ng/ml). Le SEB (25 ng/ml) et la protéine pp65 du CMV recombinante (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ont été utilisés comme contrôles positifs. Les cellules ont été marquées avec des Ac anti- CD3 , - CD4 , - $\beta 7$, - CCR6 , - CXCR3 , et - CCR4 couplés à des fluorochromes. L'analyse par cytométrie en flux a été réalisée pour (A) déterminer la fréquence des cellules T CD4^{+} proliférant en réponse à un antigène donné ($\text{CD3}^{+} \text{CD4}^{+} \text{CFSE}^{\text{Low}}$) et (B) pour quantifier l'expression de l'intégrine $\beta 7$, CCR6, CXCR3, et CCR4 sur les cellules T $\text{CD3}^{+} \text{CD4}^{+} \text{CFSE}^{\text{Low}}$. (C) Le phénotype des cellules T CD4^{+} spécifiques au VIH a été comparé à celui des cellules spécifiques au SEB et CMV chez chaque LTNP individuellement. (D) La figure indique l'analyse globale du potentiel de migration des cellules T CD4^{+} spécifiques au VIH, au SEB et au CMV chez cinq LTNPs. Pour SEB et CMV, chaque symbole représente un patient. Pour VIH, les symboles représentent la valeur moyenne d'expression de chaque molécule pour l'ensemble des cellules T spécifiques aux différents peptides de VIH pour un patient donné. Les valeurs p du test t de Student (valeurs appariées) de sont indiquées dans les figures. Les lignes horizontales indiquent les valeurs moyennes.

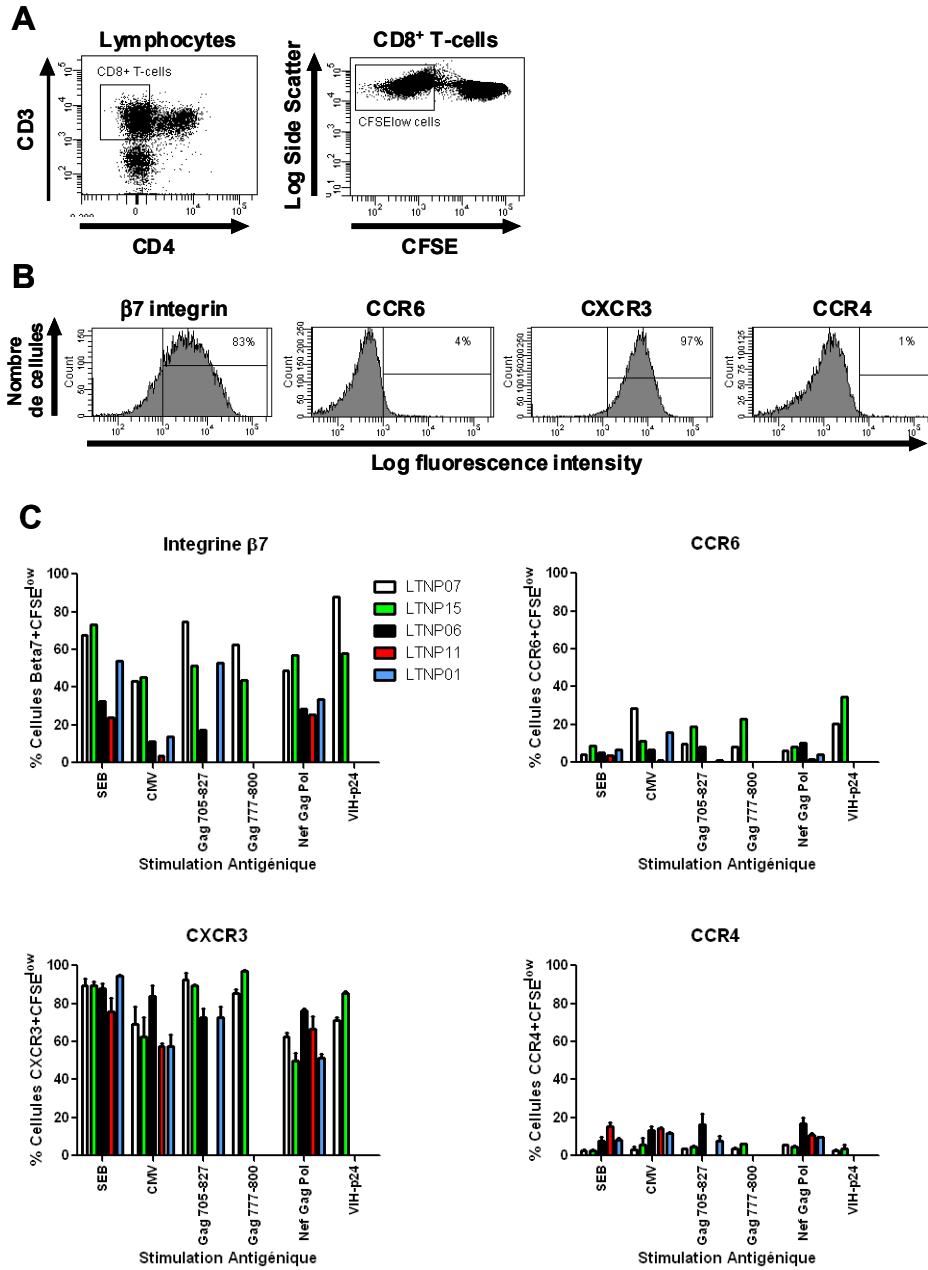


Figure 11: Potentiel différentiel de migration des cellules T CD8⁺ proliférant en réponse à la stimulation par des antigènes au VIH *versus* CMV chez les sujets LTNP. Voir page suivante

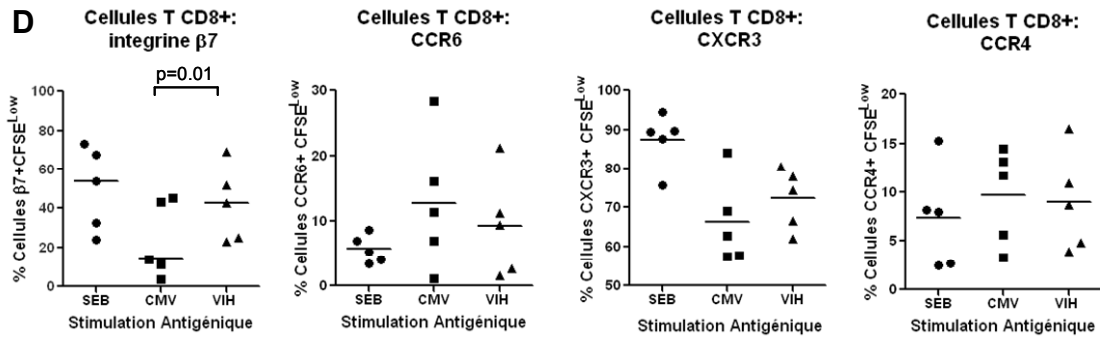


Figure 11 (suite): Potentiel différentiel de migration des cellules T CD8⁺ proliférant en réponse à la stimulation par des antigènes du VIH *versus* CMV chez les sujets LTNP. Les PBMCs des cinq LTNP (identiques à ceux utilisés pour la figure 10) ont été chargées en CFSE, stimulées et marquées avec des Ac comme décrit dans la Figure précédente. L'analyse par cytométrie en flux a été réalisée pour (A) déterminer la fréquence des cellules T CD8⁺ proliférant en réponse à un antigène donné (CD3⁺CD4⁻CFSE^{Low}) et (B) quantifier l'expression de l'intégrine $\beta 7$, CCR6, CXCR3, et CCR4 sur les cellules T CD3⁺CD4⁻CFSE^{Low}. (C) Le phénotype des cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH a été comparé à celui des cellules spécifiques au SEB et au CMV chez chaque LTNP individuellement. (D) La figure indique l'analyse globale du potentiel de migration des cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH, au SEB et au CMV chez cinq LTNPs. Pour SEB et CMV chaque symbole représente un patient. Pour VIH, les symboles représentent la valeur moyenne d'expression de chaque molécule pour l'ensemble des cellules T spécifiques aux différents peptides de VIH pour un patient donné. Les valeurs p du test t de Student (valeurs appariées) de sont indiquées dans les figures. Les lignes horizontales indiquent les valeurs moyennes.

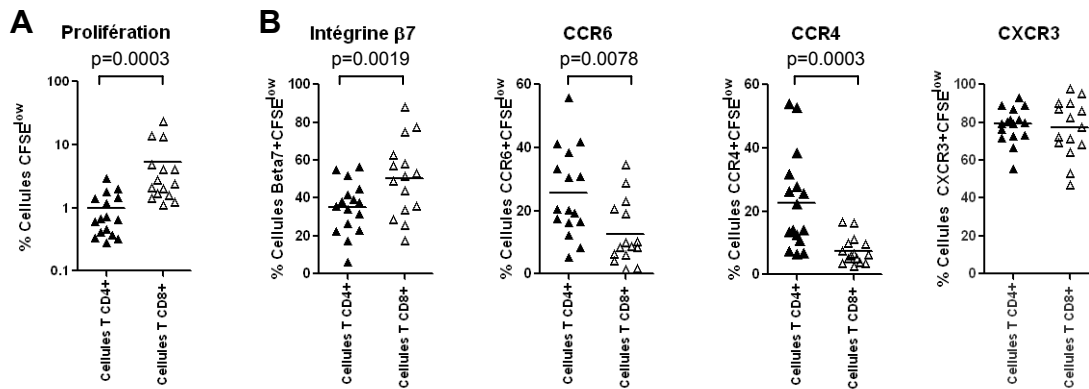
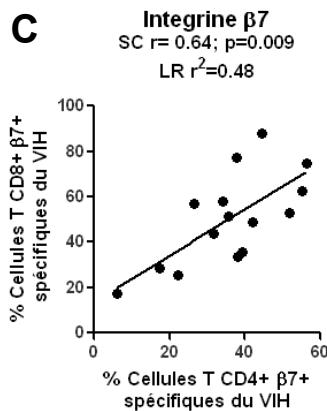


Figure 12: Potentiel relatif de prolifération et de co-localisation dans les muqueuses intestinales des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques au VIH. Les PBMCs de cinq sujets LTNP ont été stimulées et marquées avec des anticorps comme décrit dans les légendes des Figure 11 et 12. Les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH ont été analysées par cytométrie en flux pour (A) le potentiel relatif de prolifération suite à la stimulation avec les peptides du VIH et (B) pour l'expression des molécules β7, CCR6, CXCR3, et CCR4. Les lignes horizontales indiquent les valeurs moyennes. Les valeurs p du test de Mann-Whitney sont indiquées dans les figures.



(C) La corrélation positive entre l'expression de l'intégrine β7 sur les cellules T CD8⁺ et T CD4⁺ spécifiques au VIH a été démontrée par le test de Spearman (valeurs p et r) et la régression linéaire (valeurs r²).

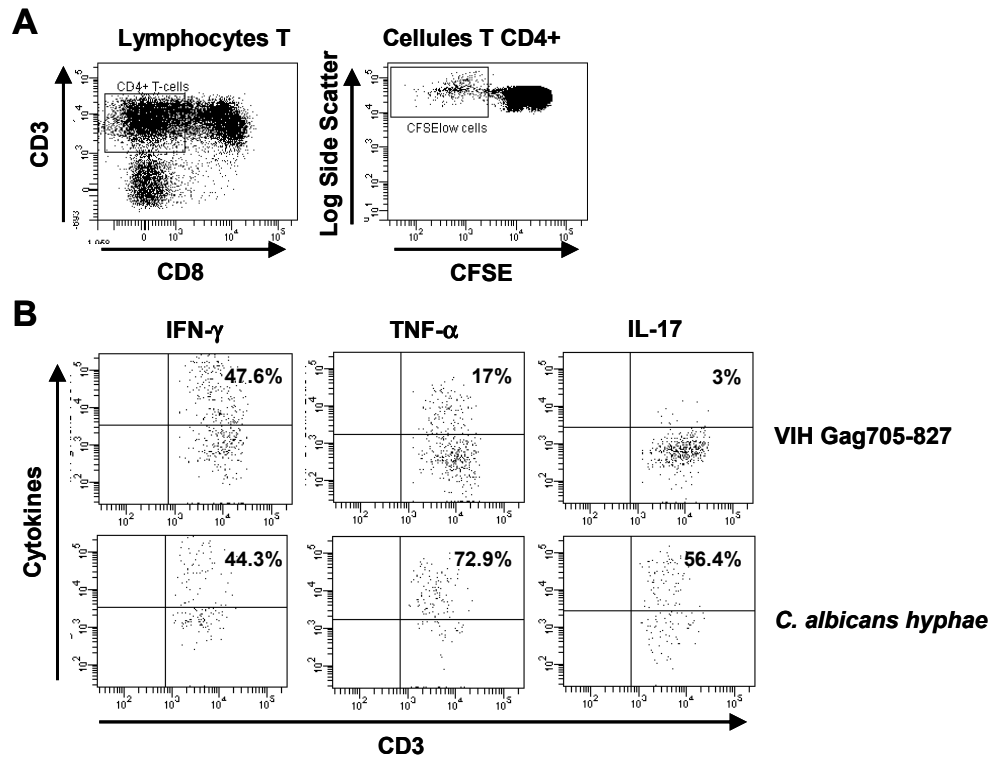


Figure 13: Expression des cytokines de type Th1 et Th17 par les lymphocytes T CD4⁺ spécifiques au VIH chez les LTNP. Les PBMCs des cinq LTNP (identiques à ceux utilisés dans les figures 10, 11 et 12) ont été chargées en CFSE (0.5 μ M) et cultivées pendant 5 jours, à 37°C, en présence ou l'absence de la p24 recombinante (5 ug/ml) et divers pools de peptides Nef (3 pools), Gag (6 pools) et Pol (12 pools) du VIH-1 (500 ng/ml). La SEB (25 ng/ml), la protéine pp65 du CMV recombinante (1 μ g/ml), et le lysat de *Candida albicans* (25 μ l lysat, équivalent à 25x10⁴ hyphes) ont été utilisés comme contrôles positifs. Les cellules ont été ensuite restimulées avec de la PMA (50 ng/ml) et de ionomycine (1 μ g/ml), en présence de Brefeldin A (10 μ g/ml) pendant 18 heures à 37°C. Les cellules ont été marquées en surface avec des Ac anti-CD3 et anti-CD8 couplés à des fluorochromes. **(A-B)** L'expression des cytokines par les cellules T CD4⁺ (CD3⁺CD8⁻) a été mesurée par marquage intracellulaire avec des Ac anti-IFN- γ , -TNF- α , et -IL-17 et analysée par cytométrie en flux. Voir page suivante.

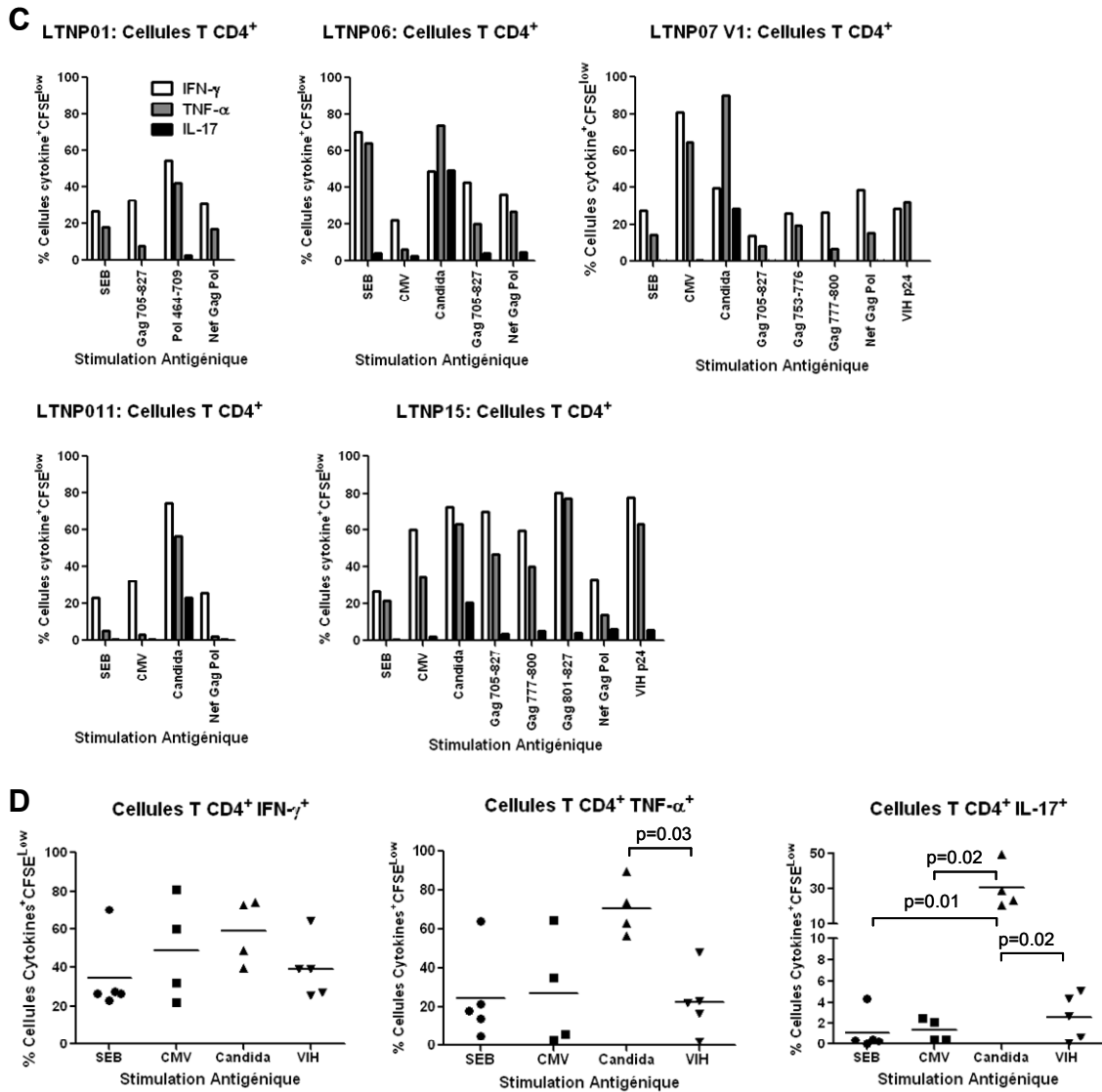


Figure 13 (suite): Expression des cytokines de type Th1 et Th17 par les lymphocytes T CD4⁺ spécifiques au VIH chez les LTNPs. (C) La production de cytokines par les cellules T CD4⁺ spécifiques aux différents antigènes a été analysée chez chaque LTNPs séparément. **(D)** L'analyse statistique de la production de cytokines par les cellules T CD4⁺ des cinq LTNP a été comparée entre les différentes spécificités antigéniques. Pour SEB et CMV, chaque symbole représente un patient. Pour VIH, les symboles représentent la valeur moyenne d'expression de chaque molécule pour l'ensemble des cellules T spécifiques aux différents peptides de VIH pour un patient donné. Les valeurs p du test t de Student (valeurs appariées) de sont indiquées dans les figures. Les lignes horizontales indiquent les valeurs moyennes.

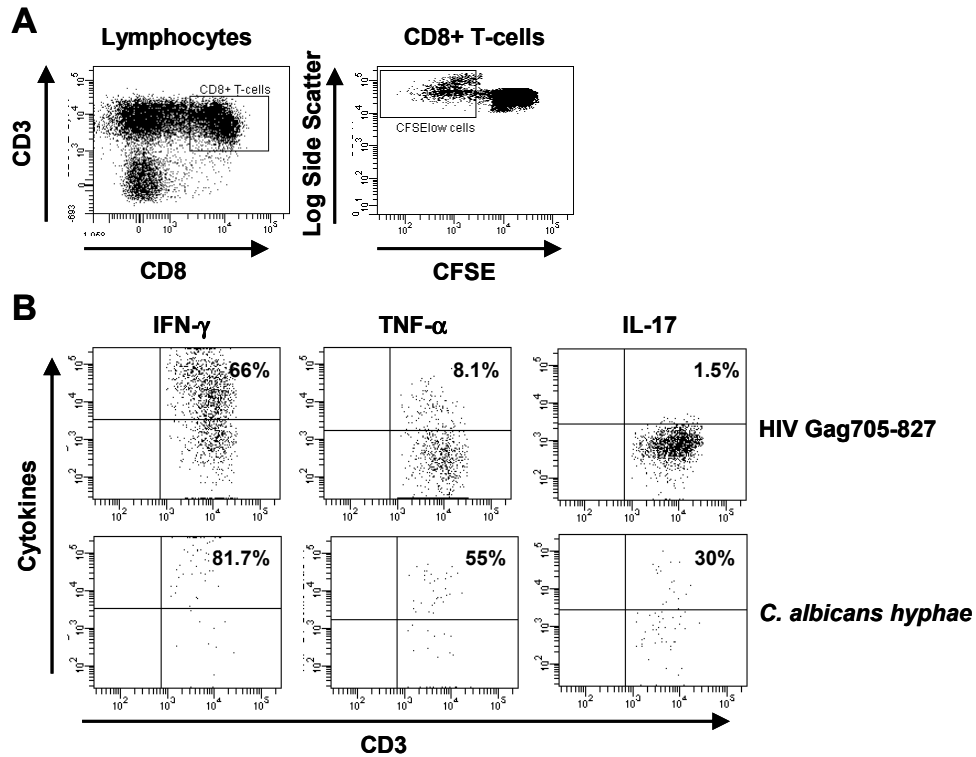


Figure 14: Expression des cytokines de type Th1 et Th17 par les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VIH chez les LTNP. Les PBMCs des cinq LTNP ont été chargées en CFSE (0.5 μM) et cultivées pendant 5 jours, à 37°C, en présence ou l'absence de la p24 recombinante (5 ug/ml) et divers pools de peptides Nef (3 pools), Gag (6 pools) et Pol (12 pools) du VIH-1 (500 ng/ml). La SEB (25 ng/ml), la protéine pp65 du CMV recombinante (1 μg/ml), et le lysat de *Candida albicans* (25 μl lysat, équivalent à 25x10⁴ hyphes) ont été utilisés comme contrôles positifs. Les cellules ont été ensuite restimulées avec de la PMA (50 ng/ml) et de l'Ionomycine (1 μg/ml), en présence de Brefeldin A (10 μg/ml) pendant 18 heures à 37°C. Les cellules ont été marquées en surface avec des Ac anti-CD3 et anti-CD8 couplés à des fluorochromes. **(A-B)** L'expression des cytokines par les cellules T CD8⁺ (CD3⁺CD8⁺) a été mesurée par marquage intracellulaire avec des Ac anti-IFN-γ, -TNF-α, et -IL-17 et analysée par cytométrie en flux. Voir page suivante.

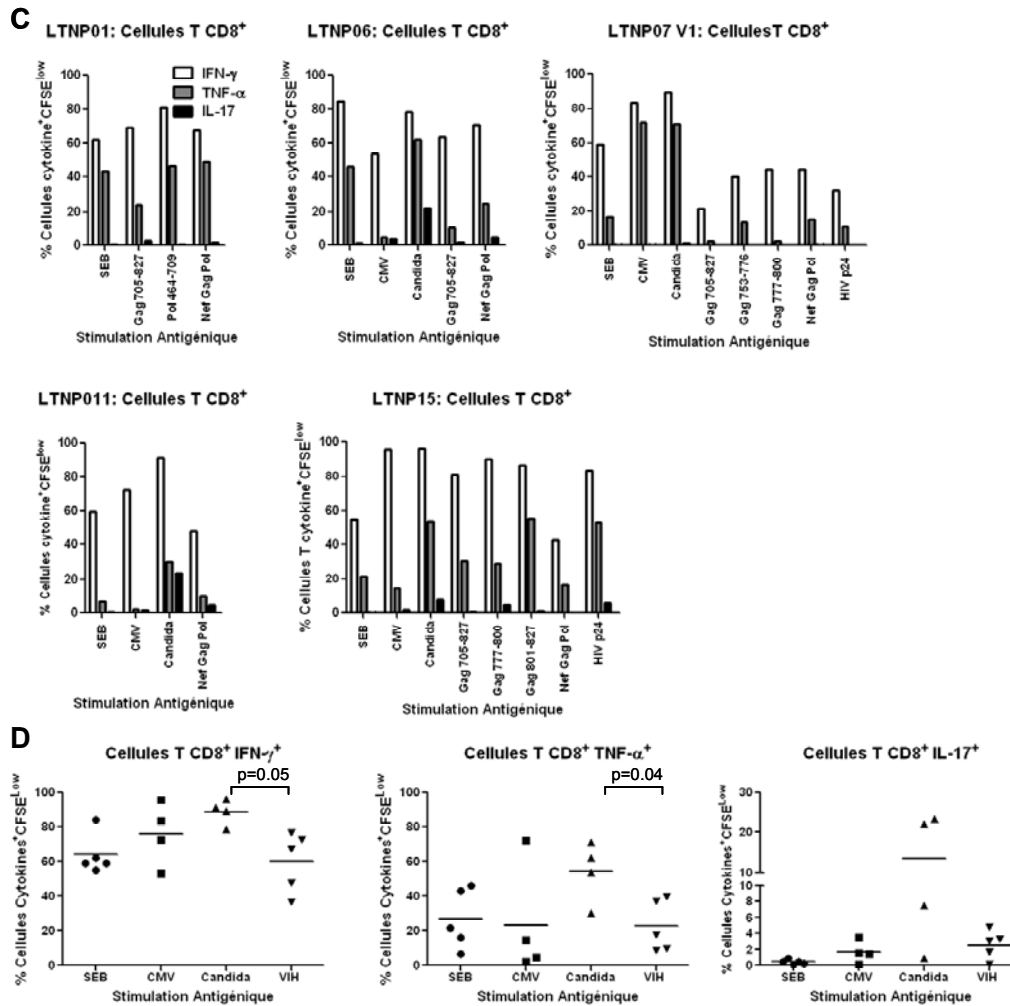


Figure 14 (suite): Expression des cytokines de type Th1 et Th17 par les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VIH chez les sujets LTNP. (C) La production de cytokines par les cellules T CD8⁺ spécifiques aux différents antigènes a été analysée chez chaque LTNP séparément. (D) L'analyse statistique de la production de cytokines par les cellules T CD8⁺ des cinq LTNPs a été comparée entre les différentes spécificités antigéniques. Pour SEB et CMV, chaque symbole représente un patient. Pour VIH, les symboles représentent la valeur moyenne d'expression de chaque molécule pour l'ensemble des cellules T spécifiques aux différents peptides de VIH pour un patient donné. Les valeurs p du test t de Student (valeurs appariées) de sont indiquées dans les figures. Les lignes horizontales indiquent les valeurs moyennes.

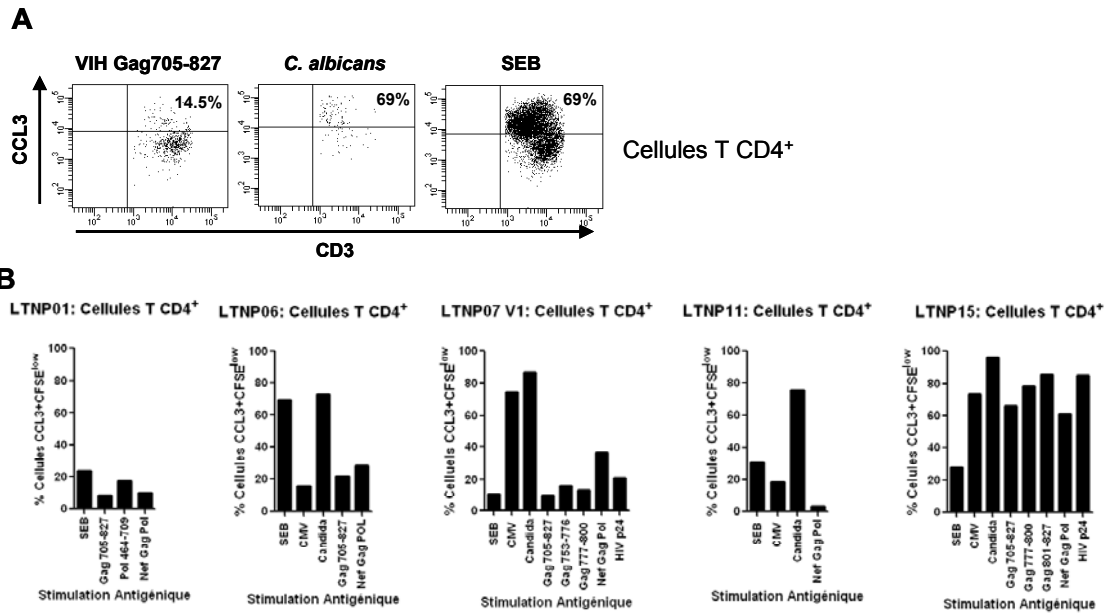


Figure 15: Expression de la chimiokine CCL3 par les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques au VIH. Les PBMCs des cinq LTNPs ont été chargées en CFSE (0.5 μM) et cultivées pendant 5 jours, à 37°C, en présence ou l'absence de la p24 recombinante (5 μg/ml) et divers pools de peptides Nef (3 pools), Gag (6 pools) et Pol (12 pools) du VIH-1 (500 ng/ml). La SEB (25 ng/ml), la protéine pp65 du CMV recombinante (1 μg/ml), et le lysat de *Candida albicans* (25μl) ont été utilisés comme contrôles positifs. Les cellules ont été ensuite restimulées avec de la PMA (50 ng/ml) et de l'Ionomycine (1 μg/ml), en présence de Brefeldin A (10 μg/ml) pendant 18 heures à 37°C. Les cellules ont été marquées en surface avec des Ac anti-CD3 et anti-CD8 couplés à des fluorochromes. L'expression de CCL3 par les cellules T CD4⁺ (CD3⁺CD8⁻) et T CD8⁺ (CD3⁺CD8⁺) a été mesurée par marquage intracellulaire avec des Ac anti-CCL3 et analysée par cytométrie en flux. Voir la page suivante.

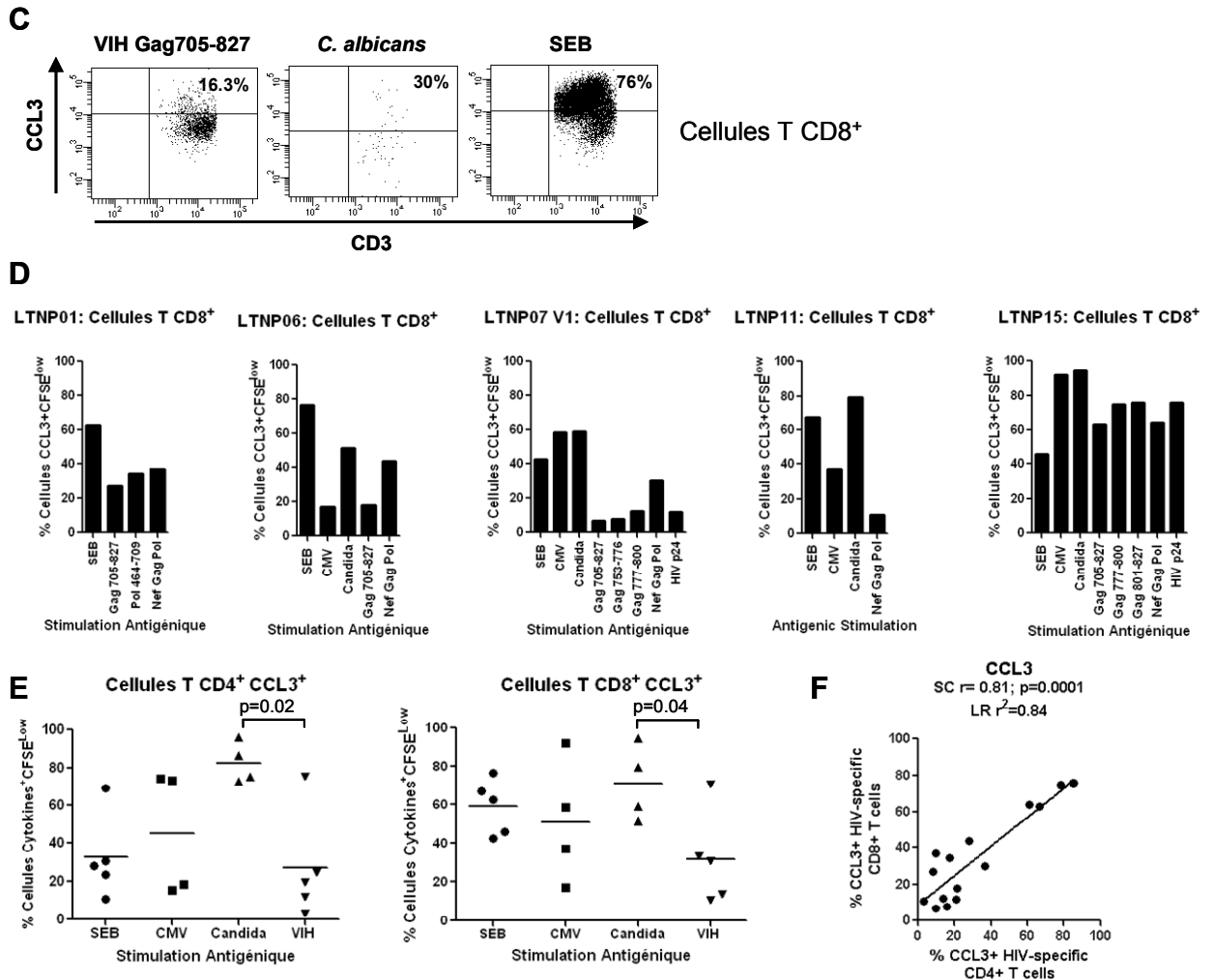


Figure 15 (suite) : Expression de la chimiokine CCL3 par les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques au VIH. (A et C) Des images représentatives de cytométrie en flux démontrent la stratégie d'analyse de la production de CCL3 par les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques aux différents antigènes. (B et D) La production de CCL3 par les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques aux différents antigènes a été analysée chez chaque LTNP séparément. (C et E) L'analyse statistique de la production de CCL3 par les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ des cinq LNTPs a été comparée entre les différentes spécificités antigéniques. Pour SEB et CMV chaque symbole représente un patient. Pour VIH, les symboles représentent la valeur moyenne d'expression de chaque molécule pour l'ensemble des cellules T spécifiques aux différents peptides de VIH pour un patient donné. Les valeurs p du test t de Student (valeurs appariées) de sont indiquées dans les figures. Les lignes horizontales indiquent les valeurs moyennes. (F) La corrélation positive entre l'expression de la CCL3 par les cellules T CD8⁺ et T CD4⁺ spécifiques au VIH a été démontrée par le test de Spearman (valeurs p et r) et la régression linéaire (valeurs r²).

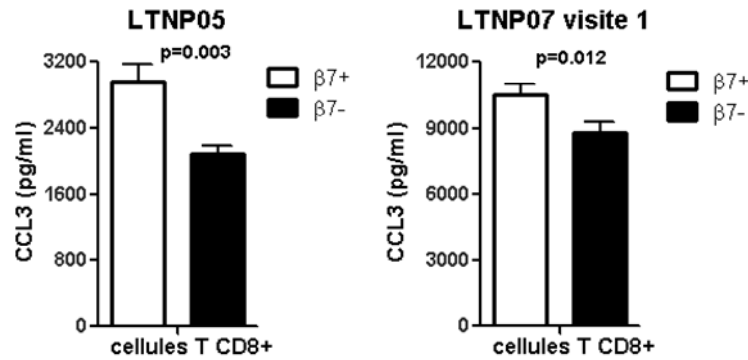


Figure 16: Production de CCL3 par les lymphocytes T CD8⁺β7⁺ et T CD8⁺β7⁻. (A) Les lymphocytes T CD8⁺ ont été d'abord purifiés à partir de PBMCs (500×10^6) de deux sujets LTNPs (LTNP005 & LTNP007 v1) par sélection négative en utilisant des billes magnétiques. Les cellules ont ensuite été marquées avec des Ac anti-CD3, -CD8, -CD45RA, et -intégrine β7 couplés à des fluorochromes. Les cellules mémoires CD8⁺CD45RA⁻β7⁺ et CD8⁺CD45RA⁻β7⁻ ont été triées par cytométrie en flux. Les cellules ont été stimulées avec de la PMA (50 ng/ml) et de l'Ionomycine (1 μg/ml) pendant 18 heures à 37°C. Les niveaux de CCL3 ont été mesurés dans les surnageants de cellules par ELISA (moyenne ± déviation standard des *triplicata* pour chaque type cellulaire et chaque donneur). Les valeurs p du test t de Student, échantillons non appariés sont indiquées dans la figure (β7⁺ versus β7⁻).

4.3. Rôle des chimiokines ligands de CCR4, CCR6 et CXCR3 dans l'activation des cellules T et la réplication du VIH

4.3.1. Effet des chimiokines «dominantes» et «subordonnées» sur la prolifération polyclonale des cellules T CD4⁺

Des études précédentes, utilisant des cellules T CD4⁺ murines, ont proposé la classification des chimiokines en « dominantes » ou « immunosuppressives » (e.g., ligands de CCR7 et de CXCR3) et « subordonnées » ou « immunostimulatrices » (e.g., ligands de CCR4, CCR5 et CXCR4) sur la base de leurs capacités respectives à contrecarrer ou renforcer le signal stop induit par la stimulation du RCT lors du processus de présentation antigénique (223). Cette classification semblait très intéressante dans la mesure où les chimiokines auraient pu avoir des fonctions suppressives *versus* stimulatrices sur les réponses immunitaires (223). Ainsi, dans la dernière partie de ce travail nous avons étudié l'effet immuno-modulateur des chimiokines « subordonnées » (CCL2/MCP-1, ligand de CCR4; CCL5/RANTES, ligand de CCR5; et CXCL12/SDF-1, ligand de CXCR4) et « dominantes » (CCL19/MIP-3 β , ligand de CCR7; CXCL9/MIG, CXCL11/IP-10, CXCL10/ITAC, tous les 3 ligands de CXCR3) dans le contexte de l'infection à VIH. Pour ce faire, les cellules ont été isolées à partir de PBMCs par sélection négative à l'aide de billes magnétiques, puis chargées en CFSE. Les cellules ont ensuite été stimulées avec des Ac anti-CD3 immobilisés et anti-CD28 solubles en présence ou en l'absence de chimiokines ligands de CCR4 (CCL2), de CXCR4 (CXCL12) et de CXCR3 (CXCL9), pendant 5 jours. Le comptage des cellules ayant proliféré a été réalisé par cytométrie en flux à l'aide de billes fluorescentes de nombre connu (Figure 17). Nos résultats démontrent que les trois chimiokines, subordonnées (CCL2, CXCL12) et dominantes (CXCL9), augmentent la prolifération cellulaire en terme de % de cellules CFSE^{low} (Figure 17B) et aussi le nombre de cellules CFSE^{low} (Figure 17C). En effet, l'ajout des chimiokines subordonnées CCL2 et CXCL12 double approximativement la prolifération des lymphocytes T CD4⁺, tandis que la chimiokine dominante MIG triple cette prolifération comparée au contrôle sans chimiokines. L'analyse statistique démontre une augmentation significative de la prolifération cellulaire induite par CXCL12 (p=0.018) et CXCL9 (p=0.04) mais pas par CCL2 (Figure 17C). En conclusion, ces résultats démontrent que les chimiokines subordonnées et dominantes

augmentent de façon similaire la prolifération polyclonale (via des Ac anti-CD3 et anti-CD28) des cellules T CD4⁺.

4.3.2. Effet des chimiokines «dominantes» et «subordonnées» sur la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques au CMV

Afin d'investiguer d'avantage l'effet des chimiokines dominantes et subordonnées sur la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques d'antigènes, les PBMCs de sujets séropositifs pour CMV mais négatifs pour le VIH ont été chargées en CFSE, puis stimulées avec les peptides recouvrant la séquence intégrale de la protéine pp65 du CMV en présence ou l'absence de chimiokines subordonnées ligands de CCR4 (MCP-1), de CCR5 (RANTES) et de chimiokines dominantes ligands de CCR7 (MIP-3 β) et de CXCR3 (IP-10, ITAC), pendant 5 jours (Figure 18A). SEB a été utilisée comme contrôle positif. On sait que les ligands de CCR5 produits par les cellules dendritiques au sein de la synapse immunologique, délivrent des signaux de costimulation aux cellules T consécutivement à l'engagement du RCT (225). De plus, il a été démontré antérieurement que les chimiokines ligands de CCR7 augmentent le potentiel immunogène des cellules dendritiques (228). En accord avec ces résultats, nous démontrons une augmentation significative de la prolifération des cellules T CD4⁺ spécifiques au CMV par l'ajout de RANTES et MIP-3 β ($p < 0.0001$ pour les deux donneurs) (Figure 18B). En outre, les chimiokines MCP-1, IP-10 et ITAC augmentent le nombre de cellules T CD4⁺ proliférant en réponse au CMV chez deux donneurs différents. Il est à noter qu'il n'y a pas de grandes différences concernant le nombre de cellules CFSE^{low} induits par l'ajout de ces trois chimiokines. Malgré l'hétérogénéité constatée entre les deux donneurs en réponse aux diverses stimulations; et bien que le nombre de cellules proliférant soit faible pour le donneur #654 comparé au donneur #553, il est clair que les cinq chimiokines mentionnées ont un impact significatif sur la prolifération cellulaire.

À l'instar des lymphocytes T CD4⁺, l'ajout de RANTES et MIP-3 β augmente la prolifération spécifique des cellules T CD8⁺ (Figure 18C). De plus, le MCP-1, l'IP-10 et l'ITAC ont un impact majeur ($p < 0.0001$) sur l'augmentation de la prolifération des cellules spécifiques au CMV (Figure 18). Cependant, contrairement aux cellules T CD4⁺, l'augmentation du nombre de lymphocytes T CD8⁺ proliférant à l'ajout des chimiokines est

similaire pour les deux sujets. Encore une fois, il n'y a pas de différence de prolifération induite par les chimiokines subordonnées et dominantes testées. En conclusion, ces résultats démontrent que les chimiokines subordonnées et dominantes peuvent induire de façon similaire la prolifération spécifique d'antigène. Conformément aux résultats sur l'activation cellulaire et la prolifération polyclonale induite par CD3/CD28, nos résultats dénoncent la classification des chimiokines dominantes et subordonnées chez l'homme et supportent le rôle immunostimulateur des chimiokines en général, de concert avec les démonstrations faites par d'autres groupes (224). Il reste toutefois à déterminer si différentes catégories de chimiokines modulent de façon différentielle les propriétés fonctionnelles des cellules T spécifiques d'antigènes, tel que le VIH.

4.3.3. Les chimiokines ligands de CCR4 et CCR6 augmentent la réplication du VIH dans les lymphocytes T CD4⁺

Les résultats présentés dans cette section démontrent que CCL2 augmente la prolifération des cellules T CD4⁺ induite par la stimulation polyclonale *via* CD3/CD28 (Figure 17) et la prolifération des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au CMV (Figure 18). De même, dans la première section, nos résultats démontrent que les cellules T CCR4⁺CCR6⁺ sont très permissives à l'infection par le VIH, suggérant, entre autres, la possibilité que ces deux récepteurs de chimiokines et leurs ligands respectifs, CCL2 et CCL20, jouent un rôle important dans la régulation de l'activation des cellules T CD4⁺. Considérant le fait que la réplication du VIH est favorisée par l'environnement des lymphocytes T CD4⁺ activés (19), nous voulions déterminer l'effet des chimiokines ligands de CCR4 et CCR6 sur la réplication virale *in vitro*. Les lymphocytes T CD4⁺ ont été isolés à partir de PBMCs par sélection négative à l'aide de billes magnétiques, puis ont été stimulés avec des Ac anti-CD3 immobilisés et anti-CD28 solubles. Les cellules T ont été infectées avec la souche R5 NL4.3BaL du VIH-1 et cultivées en présence ou l'absence des chimiokines CCL2 (100 ng/ml) et CCL20 (100 ng/ml et 1,000 ng/ml) pendant une période de deux semaines. Le surnageant des cellules infectées a été récupéré tous les trois ou quatre jours suivant l'infection. Afin de mesurer la réplication virale, la p24 a été quantifiée par ELISA dans les surnageants. Comparés au contrôle sans ajout de chimiokine, les résultats montrent que la concentration de la p24 observée à partir du jour 7 est significativement plus élevée en présence de CCL2, indiquant que cette chimiokine augmente

la réplication virale de la souche R5. À l'opposé, à une concentration identique à celle de CCL2, l'ajout de CCL20 induit une diminution de l'expression de la p24, observée au jour 7 et maintenue pour les jours 10 et 14, indiquant donc une inhibition de la réplication virale. Cette inhibition, modérée par CCL20, est observée aussi à une concentration dix fois plus élevée (1,000 ng/ml). En conclusion, ces résultats démontrent l'effet différent et unique que diverses chimiokines ont sur la réplication virale *in vitro*. De façon importante, nous avons identifié le rôle inhibiteur de CCL20 sur la réplication du VIH.

Figures - Section 4.3

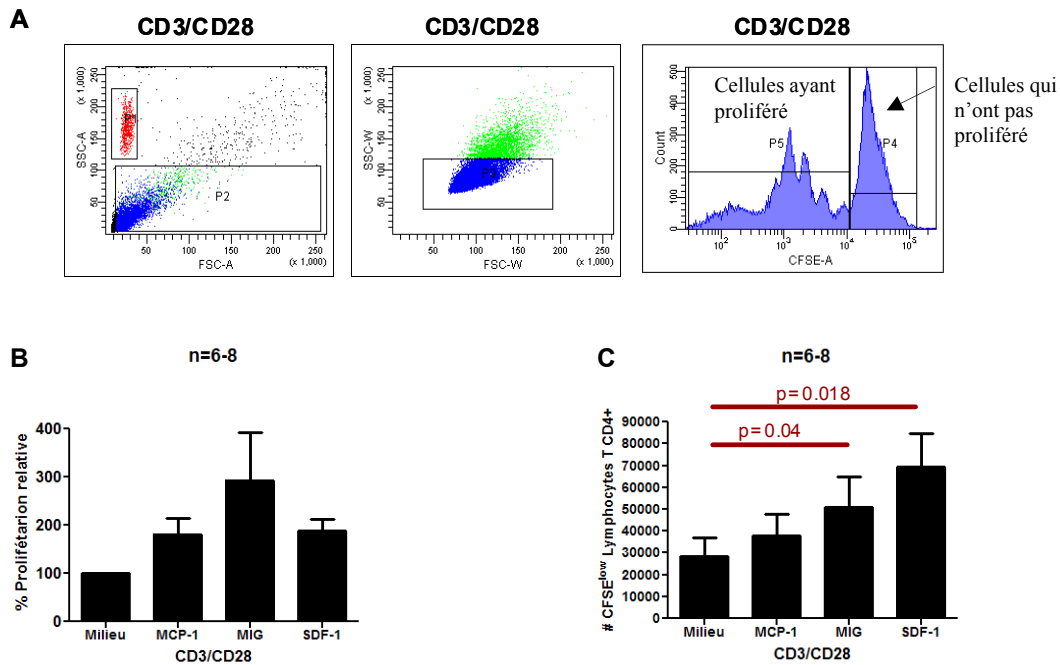


Figure 17: Rôle des chimiokines dominantes (MIG/CXCL9) et subordonnées (MCP-1/CCL2 et SDF-1/CXCL12) dans l'induction de la prolifération poly-clonale des cellules T CD4⁺. (A-C) Les lymphocytes T CD4⁺ ont été isolés à partir de PBMCs de sujets non-infectés par le VIH ou le CMV; les cellules ont été isolées par sélection négative à l'aide de billes magnétiques. Les cellules ont été chargées en CFSE (2.5 μ M) et stimulées avec des Ac anti-CD3 immobilisés (1 μ g/ml) et anti-CD28 solubles (1 μ g/ml) en présence ou l'absence des ligands de CCR4 (MCP-1), de CXCR3 (MIG) et de CXCR4 (SDF-1) (100 ng/ml), pendant 5 jours. (B) Le pourcentage de prolifération (CFSE^{low}) a été déterminé par cytométrie en flux. (C) Le nombre de cellules proliférant (CFSE^{low}) a été déterminé par cytométrie en flux à l'aide des billes fluorescentes de nombre connu. (B-C) Ces résultats ont été générés avec des groupes de huit (pour MCP-1 et MIG) et de six (pour SDF-1) sujets différents (moyenne \pm déviation standard). (C) Les valeurs p du test t de Student apparié sont indiquées dans les figures.

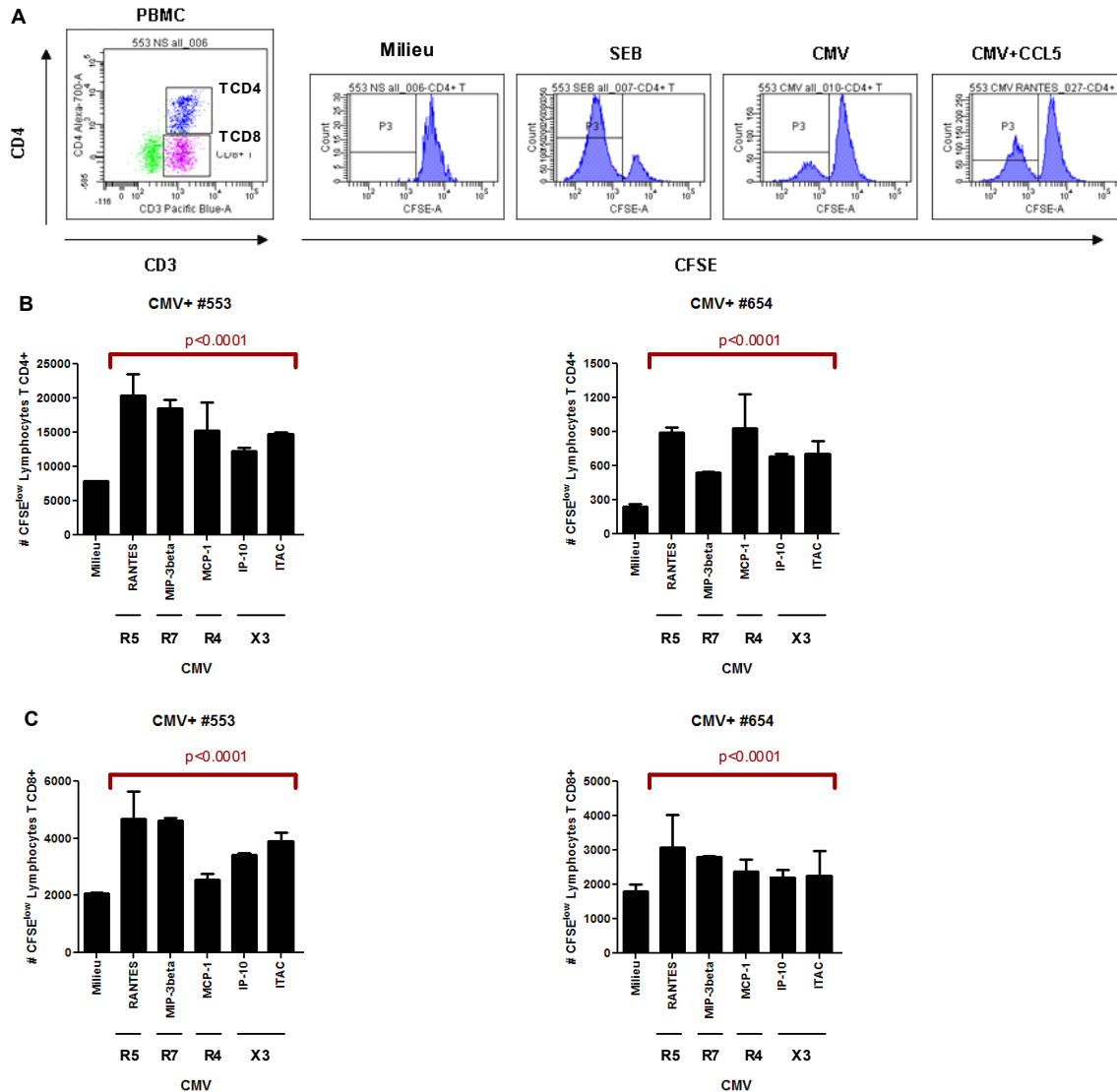


Figure 18: Les chimiokines ligands de CCR5, de CCR7, de CCR4, de CXCR3 augmentent la prolifération des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques au CMV. Les PBMCs de sujets séropositifs pour le CMV ont été chargées en CFSE (2.5 μ M) puis stimulées pendant 5 jours avec SEB (1 μ g/ml) et des peptides de la protéine pp65 du CMV (1 μ g/ml) en présence ou en l'absence des chimiokines ligands de CCR5 (RANTES), CCR7 (MIP-3 β), CCR4 (MCP-1), CXCR3 (IP-10, ITAC) et CCR6 (MIP-3 α). **(A)** Les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ ont été identifiés par marquage de surface en utilisant des Ac anti-CD3 et -CD4 et analyse par cytométrie en flux. **(B-C)** Le nombre de lymphocytes T CD4⁺ **(B)** et T CD8⁺ **(C)** proliférant (CFSE^{low}) dans différentes conditions expérimentales a été estimé par cytométrie en flux, à l'aide de billes fluorescentes de nombre connu. Les résultats sont représentatifs de deux expériences (moyenne \pm déviation standard) réalisées avec des cellules de sujets différents. Les valeurs p du test de Mann-Whitney sont indiquées dans les figures (milieu *versus* chimiokines).

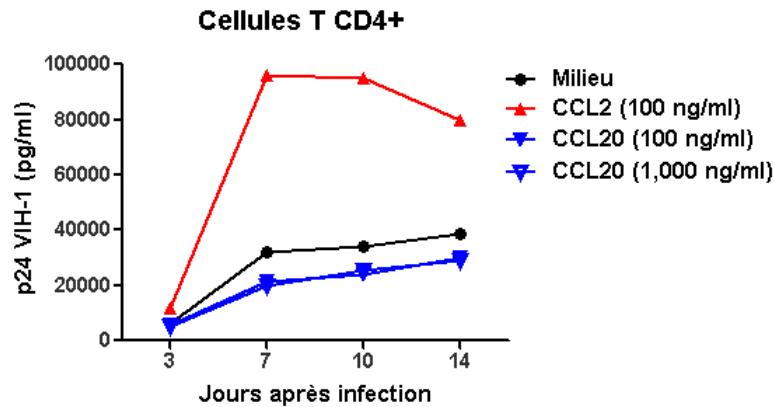


Figure 19: Effet des ligands de CCR4 (MCP-1/CCL2) et de CCR6 (MIP-3 β /CCL20 sur la réplication du VIH dans les cellules T CD4⁺. Les lymphocytes T CD4⁺ ont été isolés à partir de PBMCs de sujets non-infectés par le VIH et séronégatifs pour du CMV par sélection négative à l'aide de billes magnétiques. Les cellules ont ensuite été stimulées pendant 3 jours *via* CD3/CD28 en présence ou en l'absence de CCL2 et CCL20 (voir concentrations indiquées dans la figure), puis infectées avec la souche R5 du VIH (NL4.3 BaL, 50 ng p24 de VIH/10⁶ cellules). La réplication du VIH a été mesurée par quantification de la protéine p24 du VIH-1 par ÉLISA dans les surnageants de culture cellulaire récoltés à différents jours après infection. Les résultats sont représentatifs de ceux obtenus avec des cellules de deux donneurs différents.

5. DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

5.1. Sommaire des résultats

Ce projet de maîtrise est divisé en trois sections portant sur: (i) l'identification des récepteurs de chimiokines comme biomarqueurs à la surface des sous-populations de cellules T CD4⁺ ayant une fonctionnalité distincte du point de vue de la production de cytokines et de la susceptibilité à l'infection par le VIH, (ii) la caractérisation phénotypique et fonctionnelle des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH-1 chez les LTNPs et (iii) l'étude de l'effet des chimiokines sur la prolifération des cellules T CD4⁺ et la réplication du VIH.

En ce qui concerne la première section, nous avons démontré que les récepteurs des chimiokines CCR4, CXCR3 et CCR6 sont des marqueurs de surface, identifiant des sous-populations des cellules T CD4⁺ avec un profil cytokinique distinct. En effet, les cellules T CXCR3⁺CCR6⁻, CCR4⁺CCR6⁻, CXCR3⁺CCR6⁺ et CCR4⁺CCR6⁺ identifient, respectivement, les lymphocytes T CD4⁺ de type Th1, Th2, Th1/Th17 et Th17. Nous avons également démontré que chaque sous-population présente différents degrés de permissivité à la réplication du VIH-1. En effet, les cellules T CD4⁺ CCR4⁺CCR6⁺ et CXCR3⁺CCR6⁺ sont très permissives à la réplication des souches de type R5 et X4, tandis que les cellules T CD4⁺CCR4⁺CCR6⁻ sont uniquement susceptibles à la réplication des souches de type X4. Les cellules T CD4⁺CXCR3⁺CCR6⁻ sont relativement résistantes à l'infection par des souches de type R5 et X4 du VIH-1 *in vitro*.

Portant sur la caractérisation approfondie des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH chez les LTNPs, les résultats de la deuxième section révèlent, entre autres, que les cellules T CD4⁺CD154⁺ spécifiques au VIH expriment fortement les marqueurs de migration vers les muqueuses intestinales (intégrine β7, CCR6 et CXCR3), vers la peau (CCR4 et CLA) ainsi que vers les ganglions lymphatiques (CCR7) et, par conséquent, ont le potentiel de migrer respectivement vers ces lieux. Également, les cellules T CD4⁺ proliférant en réponse aux peptides du VIH-1 expriment grandement l'intégrine β7 et le CXCR3 mais des niveaux plus faibles des récepteurs de chimiokines CCR4 et CCR6. Des résultats similaires sont observés pour les cellules T CD8⁺ proliférant en réponse à des peptides du VIH. Toutefois, comparées aux cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH, les cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH prolifèrent

plus fortement en réponse aux peptides du VIH, expriment des niveaux plus élevés de l'intégrine $\beta 7$, des niveaux plus faibles de CCR6 et CCR4 et des niveaux similaires de CXCR3. Une étude de corrélation démontre que les cellules T $CD4^+$ et T $CD8^+$ spécifiques au VIH ont le potentiel de co-localiser dans les muqueuses intestinales, par l'expression de l'intégrine $\beta 7$. L'étude sur le profil de la production des cytokines révèle que les cellules T $CD4^+$ et T $CD8^+$ spécifiques au VIH expriment majoritairement un profil cytokinique Th1 (forte expression d'IFN- γ). Cependant, une fraction des populations T $CD3^+$ spécifiques au VIH produisent des niveaux faibles d'IL-17, suggérant ainsi la présence de réponses de type Th17 spécifiques au VIH chez les LTNPs. Les lymphocytes T $CD4^+$ et T $CD8^+$ spécifiques au VIH ou au CMV produisent de façon similaire la chimiokine CCL3. De plus, les cellules mémoires T $CD8^+$ exprimant l'intégrine $\beta 7$ produisent des niveaux plus élevés de CCL3 comparativement aux cellules mémoires T $CD8^+\beta 7^-$.

Quant à la troisième section, nous avons démontré que les chimiokines ligands de CCR4 et CXCR3 augmentent la prolifération polyclonale des cellules T $CD4^+$ induite par l'activation du RTC. En outre, dans un contexte de prolifération spécifique à des antigènes, nos résultats démontrent que les chimiokines ligands de CXCR3, CCR4 et CCR6 augmentent la prolifération des cellules T $CD4^+$ et T $CD8^+$ spécifiques au CMV. De plus, la CCL2, ligand du CCR4, augmente la réplication du VIH tandis que la CCL20, ligand du CCR6, inhibe la réplication virale *in vitro*.

5.2. Étude des récepteurs de chimiokines identifiant des sous-populations de cellules T $CD4^+$ distinctes : profil cytokinique et susceptibilité à l'infection par le VIH-1

L'hypothèse reliée à cette section énonce que les lymphocytes T $CD4^+$ infectés par le VIH expriment des récepteurs de chimiokines responsables de la migration cellulaire vers les muqueuses intestinales ainsi que cervicales et sont associés au profil fonctionnel de type Th17. Des études récentes identifient CCR4, CXCR3 et CCR6 comme marqueurs de surface des sous-populations de cellules T $CD4^+$ avec un profil cytokinique distinct et une expression des facteurs de restriction spécifiques et respectifs pour différentes populations cellulaires (192, 199, 240, 248). Ces études ont donc pu établir un lien entre le potentiel de migration et la fonction immunitaire des lymphocytes T $CD4^+$. Nos résultats confirment que: (i) les cellules T

CD4⁺ CXCR3⁺CCR6⁻ produisent de l'IFN- γ et expriment le facteur de transcription T-bet, spécifique aux cellules de type Th1 ; (ii) les cellules T CD4⁺CCR4⁺CCR6⁻ produisent de l'IL-5 et expriment le facteur de transcription spécifique aux cellules de type Th2, GATA3; (iii) les cellules T CD4⁺ CXCR3⁺CCR6⁺ produisent à la fois de l'IL-17 et de l'IFN- γ et expriment RORC, facteur de transcription des Th17 et le facteur de transcription T-bet; et (iv) les cellules T CD4⁺ CCR4⁺CCR6⁺ produisent de l'IL-17 et expriment RORC. Donc, nous avons démontré que les cellules T CD4⁺ CXCR3⁺CCR6⁻, CCR4⁺CCR6⁻, CXCR3⁺CCR6⁺ et CCR4⁺CCR6⁺ identifient respectivement les sous-populations cellulaires de types Th1, Th2, Th1/Th17 et Th17. Tout comme d'autres groupes (199, 240, 248), ces résultats appuient le concept selon lequel CCR4, CXCR3 et CCR6 sont des biomarqueurs des sous-populations de cellules T CD4⁺ avec des programmes de transcriptions spécifiques pour chaque lignée cellulaire (55).

Nous avons démontré que les cellules T CD4⁺ CCR4⁺CCR6⁺ et CXCR3⁺CCR6⁺ sont les sous-populations les plus permissives à la réplication des souches de types R5 et X4 du VIH-1. Les cellules T CCR4⁺CCR6⁻ ne sont permissives qu'au virus X4 tandis que les cellules T CXCR3⁺CCR6⁻ sont relativement résistantes à l'infection par les deux souches virales. Des études effectuées dans notre laboratoire, non mentionnées dans ce mémoire mais publiées dans *The Journal of Immunology*, pour lesquelles je suis co-auteure, ont démontré que l'expression de CCR5 est élevée dans les cellules T CD4⁺ CXCR3⁺CCR6⁺, modérée dans les cellules T CD4⁺ CCR4⁺CCR6⁺ ainsi que les cellules T CD4⁺ CXCR3⁺CCR6⁻, et faible, voire indétectable dans les cellules T CCR4⁺CCR6⁻ (52, 55). Le deuxième corécepteur majeur du VIH, le CXCR4, est exprimé de façon similaire dans les quatre sous-populations de cellules T CD4⁺. La permissivité des cellules T CD4⁺ CCR4⁺CCR6⁺ et CXCR3⁺CCR6⁺ est donc associée à l'expression de CCR5 et CXCR4. Par ailleurs, des études ont démontré que les cellules T CD4⁺CXCR3⁺ exprimaient fortement le CCR5 (192), justifiant également la susceptibilité des cellules T CD4⁺ CXCR3⁺CCR6⁺ à l'infection des souches de type R5. De plus, l'expression du CXCR4 et non celle du CCR5 à la surface des cellules T CD4⁺ CCR4⁺CCR6⁻ explique la permissivité de ces cellules aux virus X4 et non pas aux virus R5. Ce résultat appuie certaines études antérieures démontrant que l'infection des cellules T CD4⁺ par les souches de type X4 est associée à l'expression élevée du CCR4 (237, 249) et que les cellules de type Th2 sont plus susceptibles à la réplication des virus de souches X4 (250, 251). D'un intérêt particulier,

malgré leur expression de CCR5 à la surface, les cellules T CD4⁺ CXCR3⁺CCR6⁻ sont résistantes à la réplication des souches de types R5 et X4 de VIH-1. Il a été auparavant rapporté qu'une population des cellules T CD4⁺ CCR5⁺CCR7⁻CD45RO⁻CD45RA⁺ était résistante à la réplication de la souche R5, mais non à la souche X4, suggérant un mécanisme post-entrée protégeant ces cellules contre l'infection (252). Toutefois, une protection autocrine de ces cellules par la production de chimiokines ligands du CCR5 ne peut pas être exclue (124). Cette suggestion peut être appliquée aux cellules T CD4⁺ CXCR3⁺CCR6⁻. D'ailleurs, notre équipe a démontré (55) que les cellules T CD4⁺ CXCR3⁺CCR6⁻ produisaient des niveaux élevés de d'IL-10, une cytokine impliquée dans l'inhibition de la réplication virale (253-255). Des études plus approfondies sur cette sous-population cellulaire Th1 doivent être effectuées afin de trouver le mécanisme post-entrée de restriction de l'infection. À notre connaissance, nous sommes les premiers à caractériser une sous-population des cellules T CD4⁺ co-exprimant CCR5 et CXCR4 qui résiste aux deux types de souches virales. L'infection par les souches de type R5 du VIH-1 est une étape primordiale dans la phase aiguë de la pathogénèse du VIH (256) tandis que les souches de type X4 apparaissent tardivement au cours de la progression vers le SIDA (43). Les cellules T CD4⁺ CXCR3⁺CCR6⁺ et CCR4⁺CCR6⁺ seraient donc les cibles préférentielles des souches de type R5 et X4 du VIH-1 *in vivo*, alors que l'infection des cellules T CD4⁺ CCR4⁺CCR6⁻ serait associée à l'émergence des souches de type X4 du VIH-1 lors de la progression de l'infection. De plus, la susceptibilité accrue à l'infection des cellules T CD4⁺ CCR6⁺ produisant de l'IL-17 pourrait expliquer la disparition des réponses de type Th17 au niveau des muqueuses intestinales chez les sujets infectés par le VIH (115).

L'ensemble de ces résultats suggère que les cellules T CD4⁺ CCR6⁺, comparativement aux cellules T CD4⁺CCR6⁻, sont plus susceptibles à l'infection par le VIH. Ainsi, le CCR6 peut être considéré comme un marqueur de permissivité relié à la pathogénèse du VIH. Ces résultats corrént avec la diminution de la fréquence des cellules T CD4⁺ CCR6⁺ chez les sujets infectés par le VIH par un mécanisme impliquant leur apoptose dans la rate (257). La perte des cellules T CD4⁺ CCR6⁺ peut refléter la réduction dramatique des capacités du système immunitaire à fournir une réponse appropriée contre les infections opportunistiques intestinales et le développement des cancers. Le mécanisme responsable de l'élimination

préférentielle des cellules T CD4⁺ CCR6⁺ du GALT reste inconnu. Toutefois, il a été démontré que le CCR6 et son ligand le CCL20 sont importants pour la maintenance de l'homéostasie des tissus muqueux et contribuent à la pathogénèse du VIH et du VIS (134, 258). Dans un modèle d'infection au VIS, il a été découvert que le microbicide glycérol monolaurate bloquait le recrutement des cellules T CD4⁺ dans la muqueuse cervicale en interférant avec la migration cellulaire induite par le CCL20, limitant ainsi la dissémination systémique et la pathogénèse virale (134). Ces récentes découvertes suggèrent que les cellules T CD4⁺ CCR6⁺ sont des cibles préférentielles de l'infection par le VIS *in vivo et in vitro*. Conformément à cette hypothèse, nous avons démontré que les cellules T CD4⁺ CCR6⁺ sont des cibles préférentielles de l'infection par le VIH *in vitro*. Le CCR6 pourrait également servir de médiateur dans la migration des cellules T CD4⁺ CCR4⁺CCR6⁺ et CXCR3⁺CCR6⁺ dans différents tissus en périphérie qui expriment le CCL20, incluant les muqueuses intestinales et cervicales, deux sites majeurs de la réplication du VIH-1 *in vivo*. Très récemment, il a été démontré que le CCL20 inhibait la réplication du VIH-1 *in vitro* en induisant l'expression d'APOBEC3G (259). Ainsi, la diminution de l'expression du CCL20 dans les muqueuses intestinales suite à l'infection par le VIS (258, 260) suggère mécanisme potentiel pour la réplication active du VIS dans ce compartiment. De nouvelles thérapies protégeant les cellules T CD4⁺CCR6⁺ doivent être développées afin de contrer la progression de l'infection au VIH-1.

5.3. Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH-1

L'hypothèse de la deuxième section porte sur la co-localisation des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH dans les muqueuses intestinales, représentant un nouveau corrélat de la protection immunitaire anti-VIH-1 chez les LTNPs. Les cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH de LTNPs ont été identifiées de deux manières; par mesure de l'expression du CD154 (la co-culture) ou de la prolifération cellulaire (dilution de la CFSE) suite à la stimulation avec des peptides au VIH, alors que les cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH ont été identifiées seulement par mesure de la prolifération en réponse aux peptides.

5.3.1. L'analyse phénotypique des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH-1

Le VIH-1 se réplique principalement dans les cellules T CD4⁺ du tractus gastro-intestinal et/ou reproductif où l'on observe une diminution massive de la fréquence de ces cellules (43); toutefois, nous ne savions pas si les cellules T spécifiques au VIH exprimaient préférentiellement des molécules pour la migration dans l'intestin et si elles étaient générées dans ce site anatomique. Nos résultats démontrent pour la première fois que les cellules T CD4⁺CD154⁺ spécifiques au VIH expriment fortement l'intégrine β 7 (140), le CCR6 (234) et le CXCR3 (233), qui sont des marqueurs de migration vers les muqueuses intestinales. Le CXCR3 est responsable de la migration des leucocytes dans différents sites d'inflammations, incluant l'intestin (261). Ainsi, le CXCR3 est considéré comme un marqueur de migration vers les muqueuses intestinales (146). Il est à noter que la stimulation induisant l'expression de la CD154 est de courte durée (18h), insuffisante pour induire une prolifération. Donc, les cellules exprimant CD154 sont les toutes premières cellules précoces répondant à l'antigène. La forte expression des marqueurs de migration vers la peau tels que la CLA et le CCR4, à la surface des cellules T CD4⁺CD154⁺ spécifiques au VIH, est surprenante, car la peau n'est pas un site de répllication du ou d'infection par VIH. Ceci pourrait néanmoins permettre au système immunitaire de déployer une protection adéquate contre le pathogène, via la circulation des cellules spécifiques à l'antigène vers différents sites anatomiques, indépendamment du lieu de stimulation, suite à la reconnaissance antigénique (262). De plus, l'expression de CCR4, CCR6 et CXCR3 peut faciliter le recrutement des cellules T spécifiques au VIH dans d'autres sites anatomiques comme par exemple le cerveau qui exprime des niveaux élevés de ligands de CCR4 (CCL2 (263), de CCR6 (CCL20 (264) et de CXCR3 (CXCL10, (265-267). Ceci revêt une pertinence particulière pour la neuropathogenèse de l'infection à VIH, qui s'associe à l'inflammation délétère au niveau du système nerveux central (263, 268). De ce fait, la majorité des cellules T spécifiques à l'antigène seront dirigées vers le lieu d'infection par des mécanismes favorisant le recrutement de ces lymphocytes (261). En accord avec ce paradigme, nous démontrons que les cellules T CD4⁺CD154⁺ spécifiques au CMV expriment des niveaux plus faibles de l'intégrine β 7; ce qui n'est pas surprenant car CMV infecte principalement les cellules endothéliales de différents sites anatomiques sans exprimer un tropisme pour l'intestin (269). Finalement, la forte expression du CCR7 des lymphocytes T spécifiques aux différentes stimulations utilisées indique le potentiel de ces cellules de migrer vers les ganglions

lymphatiques où elles rencontreront des cellules présentatrices d'antigène afin de continuer leur différenciation et de remplir leurs fonctions dans l'immunité (230 , 231).

Après 6 jours de stimulation, les cellules T CD4⁺ proliférant en réponse à des peptides spécifiques au VIH maintiennent une expression élevée de l'intégrine β7 et du CXCR3 observée à la surface des cellules T CD4⁺CD154⁺ spécifiques au VIH. Cependant, l'expression du CCR6 est diminuée dans les cellules T CD4⁺ proliférant au VIH. À l'instar des cellules T CD4⁺CD154⁺ spécifiques au VIH, les cellules T CD4⁺ proliférant aux peptides spécifiques au VIH expriment des niveaux plus élevés de l'intégrine β7 comparées aux cellules T CD4⁺ spécifiques au CMV. Par ailleurs, les cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH expriment des niveaux plus importants de CCR6 que les cellules T CD4⁺ spécifiques au CMV, suite à 6 jours de stimulation. Ces différences de phénotype confirment le potentiel des cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH à migrer vers le site de réplication virale, le GALT, par l'expression de surface de l'intégrine β7, de CCR6 et de CXCR3.

Le fait que les cellules T proliférant en réponse au SEB aient un potentiel de migration semblable à celui des cellules T spécifiques au VIH n'est pas surprenant puisque cette toxine, sécrétée par la bactérie *Staphylococcus aureus*, provoque une inflammation dans le GALT suite à une intoxication alimentaire ou une inhalation (270, 271). Il est donc logique d'affirmer que les cellules T CD4⁺ proliférant au SEB ont le potentiel de se diriger vers le lieu d'inflammation qu'est l'intestin, comme les cellules T spécifiques au VIH. Il est à noter que les cellules T CD4⁺CD154⁺ répondant au SEB expriment des niveaux faibles de l'intégrine β7 en comparaison avec les cellules T CD4⁺CD154⁺ spécifiques au VIH. Par conséquent, ces résultats indiquent la possibilité que les cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH soient originaires d'un pool de cellules mémoires exprimant l'intégrine β7. Des études par d'autres groupes ont démontré que l'infection à VIH induit une augmentation de l'expression de l'intégrine β7 à la surface des cellules T CD4⁺ (272). La proportion des cellules T CD4⁺β7⁺ des LTNPs étudiés dans ce projet est de 20% comparée à 5% observée à la surface des sujets VIH- (résultats non présentés). Il est important de souligner que malgré la similitude phénotypique des cellules T CD4⁺ proliférant au SEB et celles proliférant au VIH, les lymphocytes T répondant au SEB sont une population polyclonale. En effet, SEB en se fixant aux complexes CMH des cellules

présentatrices, va interagir avec certaines régions V β du RCT, et non dans la cavité de liaison de l'antigène (273). Donc, les cellules T répondant au SEB ne sont pas considérées comme un contrôle spécifique à l'antigène tel que CMV, mais plutôt un contrôle de prolifération.

À l'instar des cellules T CD4⁺, les cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH expriment des niveaux plus élevés de l'intégrine β 7 que les cellules T CD8⁺ spécifiques au CMV. Bien que le niveau d'expression de CCR6 soit similaire pour les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VIH et au CMV, les cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH ont le potentiel de migration vers les muqueuses intestinales de par leur forte expression de l'intégrine β 7. De même, la faible expression du marqueur de migration vers la peau CCR4 et les niveaux élevés de CXCR3 permettent tirer des conclusions sur le potentiel de migration des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VIH vers la muqueuse intestinale. Les cellules T CD8⁺ proliférant en réponse au SEB affichent un phénotype similaire aux cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH probablement pour la même raison que celle mentionnée plus haut, puisque le SEB induit également de la prolifération de ces lymphocytes (273, 274).

Ce travail est le premier à caractériser de façon comparative le potentiel de migration des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH, au SEB et au CMV par mesure de l'expression des marqueurs de migration sur les cellules proliférant. Il serait intéressant de poursuivre ces études afin de déterminer le mécanisme moléculaire responsable de l'expression de l'intégrine β 7, observée dans les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ répondant aux peptides du VIH et à SEB, par contraste avec les lymphocytes T spécifiques au CMV. Il est possible que la réponse soit directement liée à la présentation d'antigène et à l'environnement cellulaire. Il est connu que les acides rétinoïques, principalement produits à partir de la vitamine A par les cellules dendritiques intestinales (275), induisent l'augmentation de l'expression de l'intégrine β 7 à la surface des cellules T en les imprégnant avec la capacité de migrer dans l'intestin (276). Il est possible que les peptides du VIH et non pas de CMV, présentés par les cellules dendritiques, induisent une réaction entraînant la production des acides rétinoïques. Cette hypothèse pourrait également expliquer l'hétérogénéité observée pour l'expression de cette molécule parmi les 5 LTNPs, stimulés avec le même pool de peptides (*e.g.*, l'expression de

l'intégrine $\beta 7$ sur les cellules T CD4⁺ spécifiques au pool Gag705-827). Ces études seront poursuivies pendant ma formation doctorale.

Concernant ce projet, il est à noter que les cellules utilisées proviennent du sang périphérique. Les résultats obtenus ne démontrent que le potentiel des réponses spécifiques au VIH. Il serait intéressant de reproduire cette étude sur des cellules intestinales provenant de biopsies afin de mieux caractériser la migration des cellules T spécifiques au VIH et de déterminer si elle est similaire à celle des cellules du sang périphérique. De plus, il faudrait réaliser cette même étude sur des cellules des sujets VIH⁺ à progression rapide afin de déterminer si ces résultats sont exclusifs à ceux des LTNPs.

5.3.2. Les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH ont le potentiel de co-localisation dans le GALT via l'intégrine $\beta 7$

Des études récentes effectuées dans la muqueuse cervicale démontrent qu'un ratio élevé des cellules T CD8⁺ effectrices *versus* des cellules T CD4⁺ cibles spécifiques au VIS détermine la progression de l'infection à VIS limitant ainsi la dissémination virale (134). Dans ce projet, nous avons démontré que chez tous les LTNPs, le ratio des cellules T CD8⁺ *versus* T CD4⁺ spécifiques au VIH est élevé (plus grand que 2). De plus, les résultats démontrent qu'un potentiel existe de co-localisation des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH dans les muqueuses intestinales, principalement *via* l'expression de l'intégrine $\beta 7$. Nous sommes les premiers à générer ces résultats, démontrant la forte expression de cette molécule dans les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques en réponse aux peptides du VIH et leurs potentiels de migration vers l'intestin via l'intégrine $\beta 7$. Les résultats de ce travail rejoignent les études effectuées par plusieurs groupes démontrant que les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ répondant à des vecteurs vaccinaux exprimant la séquence génomique de Gag (e.g. Ad5-gag/pol/nef de l'adénovirus et VV-Gag du virus de la vaccine) expriment des niveaux élevés de l'intégrine $\beta 7$, et ont donc un potentiel de migration vers les intestins (277, 278). La co-localisation des lymphocytes T spécifiques au VIH, avec un ratio élevé de cellules T CD8⁺ effectrices *versus* les cellules T CD4⁺, susceptibles à l'infection au VIH, pourrait représenter un nouveau corrélat d'immuno-protection, contrôlant la dissémination et ainsi la réplication virale chez les LTNPs, tel que démontré dans un modèle de macaque (134). Il est connu que les cellules T CD8⁺

spécifiques au VIH des sujets à progression lente sont très efficaces pour contrôler la réplication virale en produisant des enzymes cytolytiques telles que la perforine et la granzyme B, entraînant ainsi la lyse des cellules cibles (118, 120). Donc, le recrutement des cellules T CD8⁺ avec des fonctions antivirales dans l'intestin, lieu de réplication virale, pourrait être la raison principale expliquant le bon contrôle de la réplication virale observée chez les LTNPs. Il est à souligner que la majorité des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ des 5 LTNPs prolifèrent à des peptides de VIH gag, conformément à la démonstration précédente selon laquelle les réponses des cellules T spécifiques à la protéine Gag sont conservées chez les sujets à progression lente (118). Il serait intéressant de déterminer si les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques aux autres peptides du VIH, tels que Nef et Pol, expriment également des niveaux élevés de ces molécules et contrôlent la réplication virale aussi efficacement que les cellules T spécifiques à Gag. L'importance relative des réponses spécifiques aux divers antigènes du VIH-1 (par exemple les peptides gag, nef et pol) reste un sujet d'étude à explorer plus profondément. Une étude sur deux sujets VIH⁺ démontre une corrélation négative entre la charge virale plasmatique et les réponses T CD8⁺ spécifiques aux peptides gag et pol (279). De plus, il a été démontré que la prolifération des cellules T CD4⁺ spécifiques au gag est inversement corrélée à la charge virale plasmatique (110). Par contraste avec ces deux dernières études mentionnées, les résultats des études d'un autre groupe montrent une corrélation positive entre la charge virale et la fréquence des réponses T CD8⁺ spécifiques aux peptides de nef (116). Les réponses T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques à divers antigènes du VIH-1 identifiées comme étant directement responsable de la diminution de la charge virale restent à élucider.

Il est à remarquer que les cellules T CD4⁺ expriment des niveaux de CCR6 modérés, mais plus élevés que les cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH. Des études non incluses dans ce manuscrit, effectuées par notre laboratoire ainsi que par d'autres groupes, ont démontré que les cellules T CD8⁺ de sujet VIH⁻ et VIH⁺ expriment des niveaux plus faibles de CCR6 comparées aux cellules T CD4⁺ (257), les cellules T CD8⁺CCR6⁺ spécifiques à la p24 produisant beaucoup plus de cytokines comparativement aux cellules T CD8⁺CCR6⁻ spécifiques au même antigène (257). La proportion des cellules T CD8⁺CCR6⁺ observée dans les 5 LTNPs est trop faible pour conclure que CCR6 et son ligand CCL20 sont responsables de leur recrutement dans les muqueuses intestinales. Dans ce contexte, le rôle de CCR6 dans la régulation du trafic

des cellules T CD8⁺ reste mineur. De façon importante, une fraction significative des cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH expriment CCR6 et pourraient migrer en réponse au CCL20. Compte tenu du fait que les cellules CCR6⁺ sont hautement permissives à l'infection par le VIH et que très peu de cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH expriment CCR6, il est possible que les régions muqueuses riches en CCL20 puissent représenter des sites importants de réplication virale *in vivo*. Néanmoins, il reste à déterminer si les ligands de CCR6 comme CCL20 ont vraiment des propriétés antivirales, comme cela a été suggéré (259).

L'ensemble des résultats portant sur la caractérisation du potentiel de migration des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH indique que leur recrutement est associé à l'expression de l'intégrine β 7. Les lymphocytes T spécifiques au VIH circulant dans le sang périphérique pourraient donc interagir avec le ligand de l'intégrine β 7, MAdCAM-1 (pour *mucosal addressin cell adhesion molecule-1*) exprimé à la surface des cellules épithéliales intestinales (261). L'interaction entre le ligand et son récepteur enclencherait le mécanisme de transmigration cellulaire permettant aux cellules de traverser la paroi des vaisseaux sanguins et de se retrouver dans le GALT. Nos résultats suggèrent que les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH exprimant l'intégrine β 7 traversent l'endothélium intestinal et peuvent colocaliser dans un site spécifique au niveau du GALT par leur expression de CXCR3. Il serait intéressant d'effectuer des études de visualisation *in situ* sur des biopsies d'intestins de LTNPs afin d'observer s'il y a bien une co-localisation des cellules T CD8⁺ et T CD4⁺ avec un ratio élevé de cellules effectrices *versus* cellules cibles et de les comparer à des biopsies provenant de sujets à progression rapide non traités.

5.3.3. Une fraction mineure des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH-1 produit de l'IL-17

Le profil cytokinique Th17 des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH, chez différentes catégories de sujets VIH⁺ reste à élucider. Des études précédentes ont démontré que les cellules T spécifiques au VIH ont la capacité de produire de l'IL-17 uniquement durant la phase aiguë (95). En revanche, les cellules T spécifiques produisant de l'IFN- γ sont observées durant les phases aiguë et chronique (95, 115, 116, 117). La majorité des sujets examinés dans

les études mentionnées ne sont pas des LTNPs, mais des sujets à progression rapide. Les résultats inclus dans ce mémoire démontrent que les cellules T CD4⁺ des LTNPs ont un profil cytokinique majoritairement de type Th1, démontré par leur forte production de l'IFN- γ , confirmant ainsi les résultats des études pré-citées. Néanmoins, une fraction des cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH produisent de l'IL-17. Nous sommes les premiers à observer des réponses Th17 chez les LTNPs et nous proposons que le maintien des réponses Th17 spécifiques au VIH ou à *Candida albicans* représente un nouveau corrélât de protection immunitaire contre le VIH. Ce travail va à l'encontre des études performedes par Yue et al., qui n'ont pas détecté de l'IL-17 chez les LTNPs (85). Ceci peut s'expliquer par les différentes méthodes utilisées pour la détection de cette cytokine. Le groupe de Yue et al. a stimulé les PBMCs de LTNPs, sur une courte période de temps, tandis que la détection de l'IL-17, dans ce travail, a été observée dans les lymphocytes T proliférant aux peptides du VIH pendant 5 jours. Il est à noter que la détection de l'IL-17 a été observée principalement dans les cellules T spécifiques au VIH (CFSE^{Low}) et non dans les cellules T non spécifiques (CFSE^{high}) et cette production est donc propre aux cellules T proliférant en réponse aux peptides du VIH (données non présentées). D'autre part, ce travail démontre qu'une fraction des cellules T CD8⁺ a la capacité de produire de l'IL-17, malgré la forte production de l'IFN- γ observée. Tout comme pour les cellules T CD4⁺ spécifiques au VIH, nous sommes les premiers à détecter des cellules Tc-17, cellules T CD8⁺ produisant de l'IL-17 (280) au sein des cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH de LTNPs. Les lymphocytes produisant de l'IL-17 sont très importants dans l'immunité de l'intestin contre les infections bactériennes et fongiques (281). Les cellules Th17/Tc-17 jouent un rôle important lors de la progression de l'infection à VIH au niveau du GALT, caractérisée par une translocation microbienne et une activation immunitaire chronique. En effet, la déplétion des cellules Th17 dans le GALT, observée dans les sujets VIH⁺, est considérée comme un pronostic délétère, associé au processus de translocation microbienne et à la progression de l'infection (115, 156). En outre, la progression de l'infection SIV chez les macaques infectés est associée à un défaut de régulation des cellules Th17/Tc-17 (282). La préservation des réponses Th17 et Tc-17, observée dans les LTNPs peut, entre autres, expliquer la raison pour laquelle ces sujets démontrent une immunité contre le VIH beaucoup plus efficace que les sujets à progression rapide. Par ailleurs, il a été démontré que les singes

verts d'Afrique, infectés par le SIV mais ne progressant pas vers le stade SIDA, préservent leurs réponses Th17 (115).

Il n'est pas surprenant de détecter de l'IL-17 chez les LTNPs puisque ces sujets démontrent une grande poly-fonctionnalité dans leurs réponses T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH (166, 167). Bien qu'aucun groupe n'ait rapporté d'études sur les Th17 provenant de l'intestin des LTNPs, il a été toutefois noté que les sujets traités aux antiviraux avec une charge virale faible et un taux de CD4⁺ relativement normal, caractéristiques similaires aux LTNPs, démontrent une restauration des cellules Th17 et une plus grande poly-fonctionnalité des réponses T CD4 comparativement aux sujets à progression rapide non traités (156).

Ces résultats indiquent qu'il n'y a pas de défaut intracellulaire dans les signaux de transduction responsables de l'induction de l'expression de l'IL-17, malgré la faible fréquence de production des cellules produisant cette cytokine, chez les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH. En effet, l'IL-17 est exprimée fortement par les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au *Candida albicans*. Il serait intéressant d'effectuer cette étude sur des cellules de sujets à progression rapide non traités pour démontrer que ces résultats sont propres aux LTNPs. Il serait également intéressant de répéter cette étude sur des cellules provenant de biopsies intestinales afin d'observer les réponses Th17 induites dans les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH dans tous les groupes de sujets VIH⁺.

5.3.4. Une fraction des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ produisent la chimiokine CCL3: rôle de l'intégrine $\beta 7$ comme marqueur de cellules T CD8⁺CCL3^{high}

Il est connu que la sécrétion de CCL3, ligand de CCR5, empêche l'entrée virale et protège les cellules de l'infection par le VIH (126). Dans ce manuscrit, nous avons démontré que les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ ont la capacité de produire cette chimiokine à des niveaux similaires à ceux des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au CMV, malgré l'hétérogénéité observée. Les cellules T CD4⁺ spécifiques au CMV ont la réputation de se protéger contre l'infection à VIH par la sécrétion de CCL3 (124). Nous avons observé la plus grande production de CCL3 dans les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au *Candida albicans*. La permissivité à la réplication du VIH dans les cellules T CD4⁺ spécifiques au *Candida albicans*

n'a pas encore été démontrée. Il serait intéressant de déterminer si la forte production de CCL3 protège ces cellules tel que démontré pour les cellules T CD4⁺ spécifiques au CMV (124).

L'hétérogénéité observée dans les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH indique que certains peptides sont plus efficaces que d'autres à induire l'expression de CCL3 et que certains LTNPs ont un défaut de production de CCL3 comparés à d'autres. En outre, l'hétérogénéité des allèles du CMH de classe I et II portées par les 5 différents sujets peut également influencer la variabilité des fréquences de CCL3 observées. Certaines molécules de HLA, se liant aux peptides et interagissant avec le TCR peuvent induire une forte production de cytokines et de chimiokines, protégeant ainsi la cellule du pathogène (283). De façon intéressante, il a été rapporté que la production de CCL3 peut-être liée à l'expression de certaines molécules de CMH de classe II telles que l'HLA-DR (284). Dans cette étude, compte tenu du nombre réduit des patients inclus, nous n'avons pas pris en compte le polymorphisme HLA. Des études futures devraient étudier les corrélations potentielles entre le polymorphisme HLA et la production de CCL3. La corrélation positive entre les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH produisant du CCL3, en plus du potentiel de co-localisation de ces lymphocytes dans les muqueuses intestinales par l'intégrine $\beta 7$, indique que ces cellules migreraient dans le site de réplication virale et seraient capables d'empêcher l'infection des cellules cibles lorsque la production de CCL3 est suffisante. Ceci peut représenter un nouveau corrélat de protection observé chez les LTNPs. Il serait intéressant d'effectuer cette même étude sur des cellules de sujets à progression rapide non traités pour démontrer que ces résultats sont propres aux LTNPs.

Nos résultats démontrent un lien direct entre l'expression de l'intégrine $\beta 7$ et la production de CCL3 chez deux LTNPs. Ces résultats préliminaires suggèrent que les cellules T CD8⁺ $\beta 7$ ⁺ ayant le potentiel de migrer vers les intestins ont la capacité de produire des niveaux plus élevés de CCL3 comparées aux cellules T CD8⁺ $\beta 7$ ⁻. Le lien entre l'intégrine $\beta 7$ et CCL3 pourrait représenter un nouveau corrélat de protection contre le VIH. Il serait important de refaire ces études sur d'autres LTNPs pour confirmer ces résultats. De plus, il serait important d'observer la différence de production de CCL3 dans les cellules T CD8⁺ $\beta 7$ ⁺ et T CD8⁺ $\beta 7$ ⁻ spécifiques au VIH des LTNPs. Enfin, il serait intéressant de refaire ces études sur des sujets à

progression rapide afin de déterminer si les résultats inclus dans ce manuscrit sont propres aux LTNPs.

5.4. Étude de l'effet des chimiokines sur la prolifération cellulaire et la réplication du VIH dans les cellules T CD4⁺

L'hypothèse de la troisième section porte sur les chimiokines ligands de CCR4 (MCP-1/CCL2), CXCR3 (MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, ITAC/CXCL11) et CCR6 (MIP-3 β /CCL20) régulant la prolifération des cellules CD4⁺ spécifiques d'antigène et la réplication du VIH-1. Des études sur un modèle de souris démontrent que les chimiokines peuvent être classifiées en deux catégories, « dominantes ou immunosuppressives » ou « subordonnées ou immuno activatrices », selon leur capacité à entrer en compétition avec le signal induisant l'arrêt de la cellule T sur la cellule présentatrice d'antigène lors de la formation de la synapse immunologique (223). Premièrement, nous avons démontré que certaines chimiokines subordonnées (SDF-1/CXCL12) et dominantes (CXCL11/ITAC) induisent la migration des cellules T CD4⁺ de sujets VIH⁻ de façon relativement similaire (résultats non présentés). Le niveau d'expression des récepteurs de chimiokines à la surface est peut-être responsable de l'absence de gradient chimiotactique induit par MCP-1/CCL2 et RANTES/CCL5. Il est à noter que ITAC/CXCL11 a une plus forte avidité pour son récepteur CXCR3 que les autres ligands MIG/CXCL9 et IP-10/CXCL10 (285), ce qui explique la raison pour laquelle ITAC/CXCL11 favorise davantage la migration cellulaire que les autres ligands.

Deuxièmement, nous avons démontré que les ligands de CXCR3 (MIG/CXCL9), et CCR4 (MCP-1/CCL2) et CXCR4 (SDF-1/CXCL12) augmentent la prolifération des cellules T CD4⁺ suite à l'engagement du CD3 et du CD28. Les résultats démontrent donc que la classification des chimiokines en « dominantes » ou « subordonnées » attribuée dans un modèle de souris n'est pas reproductible chez l'homme. Nous confirmons les effets immunostimulateurs des ligands de CXCR4, démontrés par d'autres groupes (226), qui induisent une augmentation du niveau de l'activation cellulaire. Ces résultats démontrent qu'au cours d'une stimulation polyclonale, les chimiokines en général ont un rôle co-stimulateur.

L'augmentation de la prolifération des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au CMV chez les sujets VIH- confirme le rôle immunostimulateur des chimiokines. Il n'y a donc pas de classification valide des chimiokines en dominantes et subordonnées chez l'humain. Nos résultats confirment les études d'autres groupes démontrant que les ligands de CCR5 délivrent des signaux de co-stimulation (224). Il serait important d'observer les effets des chimiokines sur la prolifération des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques au VIH, et de déterminer quelle chimiokine augmente le potentiel de migration vers l'intestin et le potentiel antiviral des cellules T.

Finalement, compte tenu de nos résultats démontrant l'expression de CCR4 et CCR6 sur les cellules T CD4⁺ produisant l'IL-17 et la permissivité de ces cellules à l'infection par le VIH (55), nous avons testé l'effet des ligands de CCR4 (MCP-1/CCL2) et CCR6 (MIP-3β/CCL20) sur la réplication du VIH dans les cellules T CD4⁺. Des études précédentes ont démontré l'effet stimulateur de CCL2 sur la réplication du VIH (236, 237). Nous avons confirmé ce résultat et nous proposons que l'effet co-stimulateur de CCL2 sur l'activation cellulaire puisse avoir un impact sur la réplication du VIH. Ceci corrèle avec le fait que la réplication virale se fait plus efficacement dans les cellules activées (19). Il serait important d'observer l'effet des autres chimiokines étudiées sur la réplication virale. Également, il serait intéressant de déterminer si l'infection à VIH induit une accumulation des chimiokines et de leurs ligands à la synapse immunologique afin d'augmenter l'activité cellulaire, favorable à la réplication virale. Nous savons déjà que le VIH utilise la communication entre les cellules présentatrices d'antigènes et les cellules T CD4⁺ afin de promouvoir sa dissémination (202, 212). Nous avons démontré que CCL20, au contraire de CCL2, a un effet inhibiteur sur la réplication du VIH. Ce résultat est en accord avec une étude précédente démontrant la capacité de CCL20 à augmenter l'expression du facteur de restriction contre le VIH, APOBEC3G (259). Dans notre étude les concentrations de CCR2 et CCL20 ont été similaires à celles utilisées par d'autres auteurs (259). Ainsi, il est raisonnable d'émettre l'hypothèse que les cellules T CCR6⁺ sont permissives à l'infection par le VIH seulement dans des sites anatomiques avec faible expression de CCL20 mais riches en CCL2 et autres chimiokines pro-inflammatoires.

En conclusion, cet ensemble de résultats met en lumière le rôle essentiel du réseau des chimiokines dans la régulation du trafic des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques au VIH et la modulation de la perméabilité des cellules T CD4⁺ à l'infection par le VIH. La confirmation du rôle inhibiteur de CCL20 sur la réplication du VIH (259) suggère que cette chimiokine puisse être utilisée en clinique pour limiter la perméabilité des cellules au VIH. Aussi, compte tenu du rôle essentiel de CCR6 et de ses ligands dans le bon fonctionnement du système immunitaire associé à l'intestin (286), mais aussi de la diminution de l'expression de CCL20 après infection par le VIH (134), il est raisonnable de prévoir l'utilisation de stratégies thérapeutiques visant à stimuler la production de CCL20 au niveau des cellules épithéliales intestinales et par conséquent à augmenter le recrutement des cellules T dans les sites muqueux.

6. BIBLIOGRAPHIE

1. Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 220:868-871.
2. Popovic, M., M. G. Sarngadharan, E. Read, and R. C. Gallo. 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224:497-500.
3. Coffin, J., A. Haase, J. A. Levy, L. Montagnier, S. Oroszlan, N. Teich, H. Temin, K. Toyoshima, H. Varmus, P. Vogt, and et al. 1986. Human immunodeficiency viruses. *Science* 232:697.
4. Murray, P. R., K. S. Rosenthal, and M. Pfaller. 2009. *Medical Microbiology*. Elsevier, Philadelphia.
5. Peeters, M., and P. M. Sharp. 2000. Genetic diversity of HIV-1: the moving target. *Aids* 14 Suppl 3:S129-140.
6. Charneau, P., A. M. Borman, C. Quillent, D. Guetard, S. Chamaret, J. Cohen, G. Remy, L. Montagnier, and F. Clavel. 1994. Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolate: definition of a new HIV-1 group. *Virology* 205:247-253.
7. Wainberg, M. A. 2004. HIV-1 subtype distribution and the problem of drug resistance. *Aids* 18 Suppl 3:S63-68.
8. Greene, W. C., and B. M. Peterlin. 2002. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* 8:673-680.
9. Gabuzda, D. H., K. Lawrence, E. Langhoff, E. Terwilliger, T. Dorfman, W. A. Haseltine, and J. Sodroski. 1992. Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *J Virol* 66:6489-6495.
10. Marin, M., K. M. Rose, S. L. Kozak, and D. Kabat. 2003. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med* 9:1398-1403.
11. Romani, B., and S. Engelbrecht. 2009. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr: functions and molecular interactions. *J Gen Virol* 90:1795-1805.
12. Schrofelbauer, B., Q. Yu, S. G. Zeitlin, and N. R. Landau. 2005. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces the degradation of the UNG and SMUG uracil-DNA glycosylases. *J Virol* 79:10978-10987.
13. Fisher, A. G., M. B. Feinberg, S. F. Josephs, M. E. Harper, L. M. Marselle, G. Reyes, M. A. Gonda, A. Aldovini, C. Debouk, R. C. Gallo, and et al. 1986. The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature* 320:367-371.
14. Berkhout, B., R. H. Silverman, and K. T. Jeang. 1989. Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell* 59:273-282.
15. Malim, M. H., J. Hauber, R. Fenrick, and B. R. Cullen. 1988. Immunodeficiency virus rev trans-activator modulates the expression of the viral regulatory genes. *Nature* 335:181-183.
16. Malim, M. H., J. Hauber, S. Y. Le, J. V. Maizel, and B. R. Cullen. 1989. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 338:254-257.
17. Foster, J. L., and J. V. Garcia. 2008. HIV-1 Nef: at the crossroads. *Retrovirology* 5:84.

18. Nomaguchi, M., M. Fujita, and A. Adachi. 2008. Role of HIV-1 Vpu protein for virus spread and pathogenesis. *Microbes Infect* 10:960-967.
19. Stevenson, M. 2003. HIV-1 pathogenesis. *Nat Med* 9:853-860.
20. Paul, W. E. 2003. *Fundamental Immunology*, Philadelphia.
21. Klatzmann, D., E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, J. C. Gluckman, and L. Montagnier. 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312:767-768.
22. Janeway, C. A., P. Travers, W. Mark, and S. Mark. 2001. *Immunobiology*. Garland Science, New York and London.
23. Tozser, J. 2003. Stages of HIV replication and targets for therapeutic intervention. *Curr Top Med Chem* 3:1447-1457.
24. Dalgleish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, and R. A. Weiss. 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312:763-767.
25. Wu, L., N. P. Gerard, R. Wyatt, H. Choe, C. Parolin, N. Ruffing, A. Borsetti, A. A. Cardoso, E. Desjardin, W. Newman, C. Gerard, and J. Sodroski. 1996. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* 384:179-183.
26. Alkhatib, G., C. Combadiere, C. C. Broder, Y. Feng, P. E. Kennedy, P. M. Murphy, and E. A. Berger. 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272:1955-1958.
27. Bleul, C. C., M. Farzan, H. Choe, C. Parolin, I. Clark-Lewis, J. Sodroski, and T. A. Springer. 1996. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382:829-833.
28. Zhang, L., Y. Huang, T. He, Y. Cao, and D. D. Ho. 1996. HIV-1 subtype and second-receptor use. *Nature* 383:768.
29. Berger, E. A., R. W. Doms, E. M. Fenyo, B. T. Korber, D. R. Littman, J. P. Moore, Q. J. Sattentau, H. Schuitemaker, J. Sodroski, and R. A. Weiss. 1998. A new classification for HIV-1. *Nature* 391:240.
30. Furuta, R. A., C. T. Wild, Y. Weng, and C. D. Weiss. 1998. Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41. *Nat Struct Biol* 5:276-279.
31. Si, Z., N. Madani, J. M. Cox, J. J. Chruma, J. C. Klein, A. Schon, N. Phan, L. Wang, A. C. Biorn, S. Cocklin, I. Chaiken, E. Freire, A. B. Smith, 3rd, and J. G. Sodroski. 2004. Small-molecule inhibitors of HIV-1 entry block receptor-induced conformational changes in the viral envelope glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5036-5041.
32. Lu, M., S. C. Blacklow, and P. S. Kim. 1995. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat Struct Biol* 2:1075-1082.
33. Weissenhorn, W., A. Dessen, S. C. Harrison, J. J. Skehel, and D. C. Wiley. 1997. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 387:426-430.
34. Farnet, C. M., and F. D. Bushman. 1996. HIV cDNA integration: molecular biology and inhibitor development. *Aids* 10 Suppl A:S3-11.
35. Basu, V. P., M. Song, L. Gao, S. T. Rigby, M. N. Hanson, and R. A. Bambara. 2008. Strand transfer events during HIV-1 reverse transcription. *Virus Res* 134:19-38.
36. Miller, M. D., C. M. Farnet, and F. D. Bushman. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol* 71:5382-5390.

37. Zheng, Y. H., N. Lovsin, and B. M. Peterlin. 2005. Newly identified host factors modulate HIV replication. *Immunol Lett* 97:225-234.
38. Weiss, R. A. 2003. HIV and AIDS in relation to other pandemics. Among the viruses plaguing humans, HIV is a recent acquisition. Its outstanding success as an infection poses immense scientific challenges to human health and raises the question "What comes next?" *EMBO Rep* 4 Spec No:S10-14.
39. Bofill, M., G. Janossy, C. A. Lee, D. MacDonald-Burns, A. N. Phillips, C. Sabin, A. Timms, M. A. Johnson, and P. B. Kernoff. 1992. Laboratory control values for CD4 and CD8 T lymphocytes. Implications for HIV-1 diagnosis. *Clin Exp Immunol* 88:243-252.
40. Grossman, Z., M. Meier-Schellersheim, W. E. Paul, and L. J. Picker. 2006. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med*. 12:289-295.
41. Doms, R. W. 2001. Chemokine receptors and HIV entry. *Aids* 15 Suppl 1:S34-35.
42. Scarlatti, G., E. Tresoldi, A. Bjorndal, R. Fredriksson, C. Colognesi, H. K. Deng, M. S. Malnati, A. Plebani, A. G. Siccardi, D. R. Littman, E. M. Fenyo, and P. Lusso. 1997. In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat Med* 3:1259-1265.
43. Douek, D. C., L. J. Picker, and R. A. Koup. 2003. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol* 21:265-304.
44. Stahl-Hennig, C., R. M. Steinman, K. Tenner-Racz, M. Pope, N. Stolte, K. Matz-Rensing, G. Grobschupff, B. Raschdorff, G. Hunsmann, and P. Racz. 1999. Rapid infection of oral mucosal-associated lymphoid tissue with simian immunodeficiency virus. *Science* 285:1261-1265.
45. Veazey, R. S., K. G. Mansfield, I. C. Tham, A. C. Carville, D. E. Shvetz, A. E. Forand, and A. A. Lackner. 2000. Dynamics of CCR5 expression by CD4(+) T cells in lymphoid tissues during simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 74:11001-11007.
46. Vieillard, V., J. L. Strominger, and P. Debre. 2005. NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:10981-10986.
47. Kunkel, E. J., J. Boisvert, K. Murphy, M. A. Vierra, M. C. Genovese, A. J. Wardlaw, H. B. Greenberg, M. R. Hodge, L. Wu, E. C. Butcher, and J. J. Campbell. 2002. Expression of the Chemokine Receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by Human Tissue-Infiltrating Lymphocytes. *Am J Pathol* 160:347-355.
48. Chun, T. W., D. Engel, S. B. Mizell, L. A. Ehler, and A. S. Fauci. 1998. Induction of HIV-1 replication in latently infected CD4+ T cells using a combination of cytokines. *J Exp Med* 188:83-91.
49. Unutmaz, D., V. N. KewalRamani, S. Marmon, and D. R. Littman. 1999. Cytokine signals are sufficient for HIV-1 infection of resting human T lymphocytes. *J Exp Med* 189:1735-1746.
50. Pierson, T., J. McArthur, and R. F. Siliciano. 2000. Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. *Annu Rev Immunol* 18:665-708.
51. Blankson, J. N., D. Persaud, and R. F. Siliciano. 2002. The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu Rev Med* 53:557-593.

52. Chomont, N., M. El-Far, P. Ancuta, L. Trautmann, F. A. Procopio, B. Yassine-Diab, G. Boucher, M. R. Boulassel, G. Ghattas, J. M. Brenchley, T. W. Schacker, B. J. Hill, D. C. Douek, J. P. Routy, E. K. Haddad, and R. P. Sekaly. 2009. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med* 15:893-900.
53. Sousa, A. E., J. Carneiro, M. Meier-Schellersheim, Z. Grossman, and R. M. Victorino. 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.* 169:3400-3406.
54. Douek, D. C., M. Roederer, and R. A. Koup. 2009. Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annu Rev Med* 60:471-484.
55. Gosselin, A., P. Monteiro, N. Chomont, F. Diaz-Griffero, E. A. Said, S. Fonseca, V. Wacleche, M. El-Far, M. R. Boulassel, J. P. Routy, R. P. Sekaly, and P. Ancuta. 2010. Peripheral blood CCR4+ CCR6+ and CXCR3+ CCR6+ CD4+ T cells are highly permissive to HIV-1 infection. *J Immunol* 184:1604-1616.
56. Ford, E. S., C. E. Puroenen, and I. Sereti. 2009. Immunopathogenesis of asymptomatic chronic HIV Infection: the calm before the storm. *Curr Opin HIV AIDS* 4:206-214.
57. Brenchley, J. M., D. A. Price, T. W. Schacker, T. E. Asher, G. Silvestri, S. Rao, Z. Kazzaz, E. Bornstein, O. Lambotte, D. Altmann, B. R. Blazar, B. Rodriguez, L. Teixeira-Johnson, A. Landay, J. N. Martin, F. M. Hecht, L. J. Picker, M. M. Lederman, S. G. Deeks, and D. C. Douek. 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med.* 12:1365-1371.
58. Dion, M. L., J. F. Poulin, R. Bordi, M. Sylvestre, R. Corsini, N. Kettaf, A. Dalloul, M. R. Boulassel, P. Debre, J. P. Routy, Z. Grossman, R. P. Sekaly, and R. Cheynier. 2004. HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation. *Immunity.* 21:757-768.
59. Brenchley, J. M., T. W. Schacker, L. E. Ruff, D. A. Price, J. H. Taylor, G. J. Beilman, P. L. Nguyen, A. Khoruts, M. Larson, A. T. Haase, and D. C. Douek. 2004. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 200:749-759.
60. van Grevenynghe, J., R. Halwani, N. Chomont, P. Ancuta, Y. Peretz, A. Tanel, F. A. Procopio, Y. Shi, E. A. Said, E. K. Haddad, and R. P. Sekaly. 2008. Lymph node architecture collapse and consequent modulation of FOXO3a pathway on memory T- and B-cells during HIV infection. *Semin Immunol* 20:196-203.
61. Haase, A. T. 1999. Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annu Rev Immunol* 17:625-656.
62. Eger, K. A., and D. Unutmaz. 2005. The innate immune system and HIV pathogenesis. *Curr HIV/AIDS Rep* 2:10-15.
63. Beattie, T., S. Rowland-Jones, and R. Kaul. 2002. HIV-1 and AIDS: what are protective immune responses? *J HIV Ther* 7:35-39.
64. Rowland-Jones, S. L., and H. C. Whittle. 2007. Out of Africa: what can we learn from HIV-2 about protective immunity to HIV-1? *Nat Immunol* 8:329-331.
65. Ganz, T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3:710-720.
66. Ganz, T., M. E. Selsted, D. Szklarek, S. S. Harwig, K. Daher, D. F. Bainton, and R. I. Lehrer. 1985. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 76:1427-1435.

67. Klotman, M. E., and T. L. Chang. 2006. Defensins in innate antiviral immunity. *Nat Rev Immunol* 6:447-456.
68. Mackewicz, C. E., J. Yuan, P. Tran, L. Diaz, E. Mack, M. E. Selsted, and J. A. Levy. 2003. alpha-Defensins can have anti-HIV activity but are not CD8 cell anti-HIV factors. *Aids* 17:F23-32.
69. Wang, W., S. M. Owen, D. L. Rudolph, A. M. Cole, T. Hong, A. J. Waring, R. B. Lal, and R. I. Lehrer. 2004. Activity of alpha- and theta-defensins against primary isolates of HIV-1. *J Immunol* 173:515-520.
70. Alter, G., and M. Altfeld. 2009. NK cells in HIV-1 infection: evidence for their role in the control of HIV-1 infection. *J Intern Med* 265:29-42.
71. Mavilio, D., J. Benjamin, M. Daucher, G. Lombardo, S. Kottlilil, M. A. Planta, E. Marcenaro, C. Bottino, L. Moretta, A. Moretta, and A. S. Fauci. 2003. Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15011-15016.
72. Biron, C. A., and L. Brossay. 2001. NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Curr Opin Immunol* 13:458-464.
73. Levy, J. A. 2001. The importance of the innate immune system in controlling HIV infection and disease. *Trends Immunol* 22:312-316.
74. Van Dommelen, S. L., and M. A. Degli-Esposti. 2004. NKT cells and viral immunity. *Immunol Cell Biol* 82:332-341.
75. Cui, Y., L. Cui, and W. He. 2005. Unraveling the mystery of gammadelta T cell recognizing lipid A. *Cell Mol Immunol* 2:359-364.
76. McMichael, A. J., P. Borrow, G. D. Tomaras, N. Goonetilleke, and B. F. Haynes. 2010. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 10:11-23.
77. Stacey, A. R., P. J. Norris, L. Qin, E. A. Haygreen, E. Taylor, J. Heitman, M. Lebedeva, A. DeCamp, D. Li, D. Grove, S. G. Self, and P. Borrow. 2009. Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *J Virol* 83:3719-3733.
78. Duddy, M. E., A. Alter, and A. Bar-Or. 2004. Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation? *J Immunol* 172:3422-3427.
79. Lindell, D. M., A. A. Berlin, M. A. Schaller, and N. W. Lukacs. 2008. B cell antigen presentation promotes Th2 responses and immunopathology during chronic allergic lung disease. *PLoS One* 3:e3129.
80. Stamatatos, L., L. Morris, D. R. Burton, and J. R. Mascola. 2009. Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? *Nat Med* 15:866-870.
81. Tomaras, G. D., N. L. Yates, P. Liu, L. Qin, G. G. Fouda, L. L. Chavez, A. C. Decamp, R. J. Parks, V. C. Ashley, J. T. Lucas, M. Cohen, J. Eron, C. B. Hicks, H. X. Liao, S. G. Self, G. Landucci, D. N. Forthal, K. J. Weinhold, B. F. Keele, B. H. Hahn, M. L. Greenberg, L. Morris, S. S. Karim, W. A. Blattner, D. C. Montefiori, G. M. Shaw, A. S. Perelson, and B. F. Haynes. 2008. Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. *J Virol* 82:12449-12463.

82. Gray, E. S., P. L. Moore, I. A. Choge, J. M. Decker, F. Bibollet-Ruche, H. Li, N. Leseke, F. Treurnicht, K. Mlisana, G. M. Shaw, S. S. Karim, C. Williamson, and L. Morris. 2007. Neutralizing antibody responses in acute human immunodeficiency virus type 1 subtype C infection. *J Virol* 81:6187-6196.
83. Derdeyn, C. A., J. M. Decker, F. Bibollet-Ruche, J. L. Mokili, M. Muldoon, S. A. Denham, M. L. Heil, F. Kasolo, R. Musonda, B. H. Hahn, G. M. Shaw, B. T. Korber, S. Allen, and E. Hunter. 2004. Envelope-constrained neutralization-sensitive HIV-1 after heterosexual transmission. *Science* 303:2019-2022.
84. Gray, E. S., M. C. Madiga, P. L. Moore, K. Mlisana, S. S. Abdool Karim, J. M. Binley, G. M. Shaw, J. R. Mascola, and L. Morris. 2009. Broad neutralization of human immunodeficiency virus type 1 mediated by plasma antibodies against the gp41 membrane proximal external region. *J Virol* 83:11265-11274.
85. Wei, X., J. M. Decker, S. Wang, H. Hui, J. C. Kappes, X. Wu, J. F. Salazar-Gonzalez, M. G. Salazar, J. M. Kilby, M. S. Saag, N. L. Komarova, M. A. Nowak, B. H. Hahn, P. D. Kwong, and G. M. Shaw. 2003. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422:307-312.
86. Sekaly, R. P. 2008. The failed HIV Merck vaccine study: a step back or a launching point for future vaccine development? *J Exp Med* 205:7-12.
87. Virgin, H. W., and B. D. Walker. Immunology and the elusive AIDS vaccine. *Nature* 464:224-231.
88. Younes, S. A., B. Yassine-Diab, A. R. Dumont, M. R. Boulassel, Z. Grossman, J. P. Routy, and R. P. Sekaly. 2003. HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity. *J Exp Med* 198:1909-1922.
89. Chattopadhyay, P. K., J. Yu, and M. Roederer. 2005. A live-cell assay to detect antigen-specific CD4+ T cells with diverse cytokine profiles. *Nat Med* 11:1113-1117.
90. 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.
91. Daniels, M. A., and S. C. Jameson. 2000. Critical role for CD8 in T cell receptor binding and activation by peptide/major histocompatibility complex multimers. *J Exp Med* 191:335-346.
92. Trautmann, L., L. Janbazian, N. Chomont, E. A. Said, S. Gimmig, B. Bessette, M. R. Boulassel, E. Delwart, H. Sepulveda, R. S. Balderas, J. P. Routy, E. K. Haddad, and R. P. Sekaly. 2006. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* 12:1198-1202.
93. Kaufmann, D. E., D. G. Kavanagh, F. Pereyra, J. J. Zaunders, E. W. Mackey, T. Miura, S. Palmer, M. Brockman, A. Rathod, A. Piechocka-Trocha, B. Baker, B. Zhu, S. Le Gall, M. T. Waring, R. Ahern, K. Moss, A. D. Kelleher, J. M. Coffin, G. J. Freeman, E. S. Rosenberg, and B. D. Walker. 2007. Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat Immunol* 8:1246-1254.
94. Zaunders, J. J., S. Ip, M. L. Munier, D. E. Kaufmann, K. Suzuki, C. Brereton, S. C. Sasson, N. Seddiki, K. Koelsch, A. Landay, P. Grey, R. Finlayson, J. Kaldor, E. S. Rosenberg, B. D. Walker, B. Fazekas de St Groth, D. A. Cooper, and A. D. Kelleher. 2006. Infection of CD127+ (interleukin-7 receptor+) CD4+ cells and overexpression of

- CTLA-4 are linked to loss of antigen-specific CD4 T cells during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 80:10162-10172.
95. Yue, F. Y., A. Merchant, C. M. Kovacs, M. Loutfy, D. Persad, and M. A. Ostrowski. 2008. Viral specific IL-17 producing CD4+ T cells are detectable in early HIV-1 infection. *J Virol*.
 96. Munier, M. L., and A. D. Kelleher. 2007. Acutely dysregulated, chronically disabled by the enemy within: T-cell responses to HIV-1 infection. *Immunol Cell Biol* 85:6-15.
 97. Oxenius, A., D. A. Price, P. J. Easterbrook, C. A. O'Callaghan, A. D. Kelleher, J. A. Whelan, G. Sontag, A. K. Sewell, and R. E. Phillips. 2000. Early highly active antiretroviral therapy for acute HIV-1 infection preserves immune function of CD8+ and CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3382-3387.
 98. Rosenberg, E. S., M. Altfeld, S. H. Poon, M. N. Phillips, B. M. Wilkes, R. L. Eldridge, G. K. Robbins, R. T. D'Aquila, P. J. Goulder, and B. D. Walker. 2000. Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature*. 407:523-526.
 99. Douek, D. C., J. M. Brenchley, M. R. Betts, D. R. Ambrozak, B. J. Hill, Y. Okamoto, J. P. Casazza, J. Kuruppu, K. Kunstman, S. Wolinsky, Z. Grossman, M. Dybul, A. Oxenius, D. A. Price, M. Connors, and R. A. Koup. 2002. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature* 417:95-98.
 100. Zaunders, J. J., M. L. Munier, D. E. Kaufmann, S. Ip, P. Grey, D. Smith, T. Ramacciotti, D. Quan, R. Finlayson, J. Kaldor, E. S. Rosenberg, B. D. Walker, D. A. Cooper, and A. D. Kelleher. 2005. Early proliferation of CCR5(+) CD38(+++) antigen-specific CD4(+) Th1 effector cells during primary HIV-1 infection. *Blood*. 106:1660-1667.
 101. Kaufmann, D. E., and B. D. Walker. 2009. PD-1 and CTLA-4 inhibitory cosignaling pathways in HIV infection and the potential for therapeutic intervention. *J Immunol* 182:5891-5897.
 102. Day, C. L., D. E. Kaufmann, P. Kiepiela, J. A. Brown, E. S. Moodley, S. Reddy, E. W. Mackey, J. D. Miller, A. J. Leslie, C. DePierres, Z. Mncube, J. Duraiswamy, B. Zhu, Q. Eichbaum, M. Altfeld, E. J. Wherry, H. M. Coovadia, P. J. Goulder, P. Klenerman, R. Ahmed, G. J. Freeman, and B. D. Walker. 2006. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443:350-354.
 103. Petrovas, C., J. P. Casazza, J. M. Brenchley, D. A. Price, E. Gostick, W. C. Adams, M. L. Precopio, T. Schacker, M. Roederer, D. C. Douek, and R. A. Koup. 2006. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med* 203:2281-2292.
 104. Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22:531-562.
 105. Weiss, L., V. Donkova-Petrini, L. Caccavelli, M. Balbo, C. Carbonneil, and Y. Levy. 2004. Human immunodeficiency virus-driven expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells, which suppress HIV-specific CD4 T-cell responses in HIV-infected patients. *Blood* 104:3249-3256.
 106. Nilsson, J., A. Boasso, P. A. Velilla, R. Zhang, M. Vaccari, G. Franchini, G. M. Shearer, J. Andersson, and C. Chougnnet. 2006. HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS. *Blood* 108:3808-3817.

107. Moreno-Fernandez, M. E., W. Zapata, J. T. Blackard, G. Franchini, and C. A. Chougnet. 2009. Human regulatory T cells are targets for human immunodeficiency Virus (HIV) infection, and their susceptibility differs depending on the HIV type 1 strain. *J Virol* 83:12925-12933.
108. Autran, B., G. Carcelain, T. S. Li, C. Blanc, D. Mathez, R. Tubiana, C. Katlama, P. Debre, and J. Leibowitch. 1997. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* 277:112-116.
109. Weiss, L., P. Ancuta, P. M. Girard, H. Bouhlal, A. Roux, N. H. Cavaillon, and M. D. Kazatchkine. 1999. Restoration of normal interleukin-2 production by CD4+ T cells of human immunodeficiency virus-infected patients after 9 months of highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 180:1057-1063.
110. Boritz, E., B. E. Palmer, and C. C. Wilson. 2004. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD4+ T cells that proliferate in vitro detected in samples from most viremic subjects and inversely associated with plasma HIV-1 levels. *J Virol* 78:12638-12646.
111. Alexander, T. H., G. M. Ortiz, M. F. Wellons, A. Allen, E. J. Grace, 2nd, B. Schweighardt, J. Brancato, J. K. Sandberg, S. N. Furlan, G. D. Miralles, D. F. Nixon, and J. A. Bartlett. 2003. Changes in CD4+ T-cell differentiation phenotype during structured treatment interruption in patients with chronic HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 34:475-481.
112. Scriba, T. J., H. T. Zhang, H. L. Brown, A. Oxenius, N. Tamm, S. Fidler, J. Fox, J. N. Weber, P. Klenerman, C. L. Day, M. Lucas, and R. E. Phillips. 2005. HIV-1-specific CD4+ T lymphocyte turnover and activation increase upon viral rebound. *J Clin Invest* 115:443-450.
113. Malhotra, U., S. Holte, T. Zhu, E. Delpit, C. Huntsberry, A. Sette, R. Shankarappa, J. Maenza, L. Corey, and M. J. McElrath. 2003. Early induction and maintenance of Env-specific T-helper cells following human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 77:2663-2674.
114. Hladik, F., and M. J. McElrath. 2008. Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat Rev Immunol* 8:447-457.
115. Brenchley, J. M., M. Paiardini, K. S. Knox, A. I. Asher, B. Cervasi, T. E. Asher, P. Scheinberg, D. A. Price, C. A. Hage, L. M. Kholi, A. Khoruts, I. Frank, J. Else, T. Schacker, G. Silvestri, and D. C. Douek. 2008. Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood* 112:2826-2835.
116. Betts, M. R., D. R. Ambrozak, D. C. Douek, S. Bonhoeffer, J. M. Brenchley, J. P. Casazza, R. A. Koup, and L. J. Picker. 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* 75:11983-11991.
117. Pitcher, C. J., C. Quittner, D. M. Peterson, M. Connors, R. A. Koup, V. C. Maino, and L. J. Picker. 1999. HIV-1-specific CD4+ T cells are detectable in most individuals with active HIV-1 infection, but decline with prolonged viral suppression. *Nat Med* 5:518-525.
118. Deeks, S. G., and B. D. Walker. 2007. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity* 27:406-416.

119. Mackewicz, C. E., J. Lieberman, C. Froelich, and J. A. Levy. 2000. HIV virions and HIV infection in vitro are unaffected by human granzymes A and B. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:367-372.
120. Migueles, S. A., C. M. Osborne, C. Royce, A. A. Compton, R. P. Joshi, K. A. Weeks, J. E. Rood, A. M. Berkley, J. B. Sacha, N. A. Cogliano-Shutta, M. Lloyd, G. Roby, R. Kwan, M. McLaughlin, S. Stallings, C. Rehm, M. A. O'Shea, J. Mican, B. Z. Packard, A. Komoriya, S. Palmer, A. P. Wiegand, F. Maldarelli, J. M. Coffin, J. W. Mellors, C. W. Hallahan, D. A. Follman, and M. Connors. 2008. Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity* 29:1009-1021.
121. Migueles, S. A., A. C. Laborico, W. L. Shupert, M. S. Sabbaghian, R. Rabin, C. W. Hallahan, D. Van Baarle, S. Kostense, F. Miedema, M. McLaughlin, L. Ehler, J. Metcalf, S. Liu, and M. Connors. 2002. HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat Immunol* 3:1061-1068.
122. Appay, V., D. F. Nixon, S. M. Donahoe, G. M. Gillespie, T. Dong, A. King, G. S. Ogg, H. M. Spiegel, C. Conlon, C. A. Spina, D. V. Havlir, D. D. Richman, A. Waters, P. Easterbrook, A. J. McMichael, and S. L. Rowland-Jones. 2000. HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* 192:63-75.
123. Halwani, R., M. Doroudchi, B. Yassine-Diab, L. Janbazian, Y. Shi, E. A. Said, E. K. Haddad, and R. P. Sekaly. 2006. Generation and maintenance of human memory cells during viral infection. *Springer Semin Immunopathol* 28:197-208.
124. Casazza, J. P., J. M. Brenchley, B. J. Hill, R. Ayana, D. Ambrozak, M. Roederer, D. C. Douek, M. R. Betts, and R. A. Koup. 2009. Autocrine production of beta-chemokines protects CMV-Specific CD4 T cells from HIV infection. *PLoS Pathog* 5:e1000646.
125. Champagne, P., G. S. Ogg, A. S. King, C. Knabenhans, K. Ellefsen, M. Nobile, V. Appay, G. P. Rizzardi, S. Fleury, M. Lipp, R. Forster, S. Rowland-Jones, R. P. Sekaly, A. J. McMichael, and G. Pantaleo. 2001. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature*. 410:106-111.
126. Cocchi, F., A. L. DeVico, A. Garzino-Demo, S. K. Arya, R. C. Gallo, and P. Lusso. 1995. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 270:1811-1815.
127. Walker, C. M., D. J. Moody, D. P. Stites, and J. A. Levy. 1986. CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. *Science* 234:1563-1566.
128. Lacey, S. F., K. J. Weinhold, C. H. Chen, C. McDanal, C. Oei, and M. L. Greenberg. 1998. Herpesvirus saimiri transformation of HIV type 1 suppressive CD8+ lymphocytes from an HIV type 1-infected asymptomatic individual. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14:521-531.
129. Levy, J. A., C. E. Mackewicz, and E. Barker. 1996. Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8+ T cells. *Immunol Today* 17:217-224.
130. Levy, J. A. 2003. The search for the CD8+ cell anti-HIV factor (CAF). *Trends Immunol* 24:628-632.
131. Zhang, L., W. Yu, T. He, J. Yu, R. E. Caffrey, E. A. Dalmasso, S. Fu, T. Pham, J. Mei, J. J. Ho, W. Zhang, P. Lopez, and D. D. Ho. 2002. Contribution of human alpha-

- defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. *Science* 298:995-1000.
132. Walker, B. D., S. Chakrabarti, B. Moss, T. J. Paradis, T. Flynn, A. G. Durno, R. S. Blumberg, J. C. Kaplan, M. S. Hirsch, and R. T. Schooley. 1987. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature* 328:345-348.
 133. Koup, R. A., J. T. Safrit, Y. Cao, C. A. Andrews, G. McLeod, W. Borkowsky, C. Farthing, and D. D. Ho. 1994. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 68:4650-4655.
 134. Li, Q., J. D. Estes, P. M. Schlievert, L. Duan, A. J. Brosnahan, P. J. Southern, C. S. Reilly, M. L. Peterson, N. Schultz-Darken, K. G. Brunner, K. R. Nephew, S. Pambuccian, J. D. Lifson, J. V. Carlis, and A. T. Haase. 2009. Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV transmission. *Nature* 458:1034-1038.
 135. Goonetilleke, N., M. K. Liu, J. F. Salazar-Gonzalez, G. Ferrari, E. Giorgi, V. V. Ganusov, B. F. Keele, G. H. Learn, E. L. Turnbull, M. G. Salazar, K. J. Weinhold, S. Moore, N. Letvin, B. F. Haynes, M. S. Cohen, P. Hraber, T. Bhattacharya, P. Borrow, A. S. Perelson, B. H. Hahn, G. M. Shaw, B. T. Korber, and A. J. McMichael. 2009. The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *J Exp Med* 206:1253-1272.
 136. Turnbull, E. L., M. Wong, S. Wang, X. Wei, N. A. Jones, K. E. Conrod, D. Aldam, J. Turner, P. Pellegrino, B. F. Keele, I. Williams, G. M. Shaw, and P. Borrow. 2009. Kinetics of expansion of epitope-specific T cell responses during primary HIV-1 infection. *J Immunol* 182:7131-7145.
 137. McMichael, A. J., and S. L. Rowland-Jones. 2001. Cellular immune responses to HIV. *Nature* 410:980-987.
 138. Nowak, M. A., R. M. May, R. E. Phillips, S. Rowland-Jones, D. G. Lalloo, S. McAdam, P. Klenerman, B. Koppe, K. Sigmund, C. R. Bangham, and et al. 1995. Antigenic oscillations and shifting immunodominance in HIV-1 infections. *Nature* 375:606-611.
 139. Koenig, S., A. J. Conley, Y. A. Brewah, G. M. Jones, S. Leath, L. J. Boots, V. Davey, G. Pantaleo, J. F. Demarest, C. Carter, and et al. 1995. Transfer of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes to an AIDS patient leads to selection for mutant HIV variants and subsequent disease progression. *Nat Med* 1:330-336.
 140. Berlin, C., E. L. Berg, M. J. Briskin, D. P. Andrew, P. J. Kilshaw, B. Holzmann, I. L. Weissman, A. Hamann, and E. C. Butcher. 1993. Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 74:185-185.
 141. Agace, W. W., J. M. Higgins, B. Sadasivan, M. B. Brenner, and C. M. Parker. 2000. T-lymphocyte-epithelial-cell interactions: integrin alpha(E)(CD103)beta(7), LEEP-CAM and chemokines. *Curr Opin Cell Biol* 12:563-568.
 142. Shacklett, B. L., C. J. Weber, K. E. Shaw, E. M. Keddie, M. B. Gardner, P. Sonigo, and P. A. Luciw. 2000. The intracytoplasmic domain of the Env transmembrane protein is a locus for attenuation of simian immunodeficiency virus SIVmac in rhesus macaques. *J Virol* 74:5836-5844.
 143. Shacklett, B. L., C. A. Cox, J. K. Sandberg, N. H. Stollman, M. A. Jacobson, and D. F. Nixon. 2003. Trafficking of human immunodeficiency virus type 1-specific CD8+ T cells to gut-associated lymphoid tissue during chronic infection. *J Virol* 77:5621-5631.

144. Olsson, J., M. Poles, A. L. Spetz, J. Elliott, L. Hultin, J. Giorgi, J. Andersson, and P. Anton. 2000. Human immunodeficiency virus type 1 infection is associated with significant mucosal inflammation characterized by increased expression of CCR5, CXCR4, and beta-chemokines. *J Infect Dis* 182:1625-1635.
145. Luster, A. D., R. Alon, and U. H. von Andrian. 2005. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 6:1182-1190.
146. Brainard, D. M., A. M. Tager, J. Misdraji, N. Frahm, M. Lichterfeld, R. Draenert, C. Brander, B. D. Walker, and A. D. Luster. 2007. Decreased CXCR3+ CD8 T cells in advanced human immunodeficiency virus infection suggest that a homing defect contributes to cytotoxic T-lymphocyte dysfunction. *J Virol* 81:8439-8450.
147. Sayana, S., and H. Khanlou. 2009. Maraviroc: a new CCR5 antagonist. *Expert Rev Anti Infect Ther* 7:9-19.
148. Buzon, M. J., M. Massanella, J. M. Llibre, A. Esteve, V. Dahl, M. C. Puertas, J. M. Gatell, P. Domingo, R. Paredes, M. Sharkey, S. Palmer, M. Stevenson, B. Clotet, J. Blanco, and J. Martinez-Picado. HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects. *Nat Med* 16:460-465.
149. Kostense, S., F. M. Raaphorst, J. Joling, D. W. Notermans, J. M. Prins, S. A. Danner, P. Reiss, J. M. Lange, J. M. Teale, and F. Miedema. 2001. T cell expansions in lymph nodes and peripheral blood in HIV-1-infected individuals: effect of antiretroviral therapy. *Aids* 15:1097-1107.
150. Tenner-Racz, K., H. J. Stellbrink, J. van Lunzen, C. Schneider, J. P. Jacobs, B. Raschdorff, G. Grosschupff, R. M. Steinman, and P. Racz. 1998. The unenlarged lymph nodes of HIV-1-infected, asymptomatic patients with high CD4 T cell counts are sites for virus replication and CD4 T cell proliferation. The impact of highly active antiretroviral therapy. *J Exp Med* 187:949-959.
151. Bucy, R. P., R. D. Hockett, C. A. Derdeyn, M. S. Saag, K. Squires, M. Sillers, R. T. Mitsuyasu, and J. M. Kilby. 1999. Initial increase in blood CD4(+) lymphocytes after HIV antiretroviral therapy reflects redistribution from lymphoid tissues. *J Clin Invest* 103:1391-1398.
152. Sachsenberg, N., A. S. Perelson, S. Yerly, G. A. Schockmel, D. Leduc, B. Hirschel, and L. Perrin. 1998. Turnover of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in HIV-1 infection as measured by Ki-67 antigen. *J Exp Med* 187:1295-1303.
153. Lederman, M. M., E. Connick, A. Landay, D. R. Kuritzkes, J. Spritzler, M. St Clair, B. L. Kotzin, L. Fox, M. H. Chiozzi, J. M. Leonard, F. Rousseau, M. Wade, J. D. Roe, A. Martinez, and H. Kessler. 1998. Immunologic responses associated with 12 weeks of combination antiretroviral therapy consisting of zidovudine, lamivudine, and zalcitabine: results of AIDS Clinical Trials Group Protocol 315. *J Infect Dis*. 178:70-79.
154. Markert, M. L., A. P. Alvarez-McLeod, G. D. Sempowski, L. P. Hale, J. M. Horvatinovich, K. J. Weinhold, J. A. Bartlett, T. A. D'Amico, and B. F. Haynes. 2001. Thymopoiesis in HIV-infected adults after highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17:1635-1643.
155. Malhotra, U., M. M. Berrey, Y. Huang, J. Markee, D. J. Brown, S. Ap, L. Musey, T. Schacker, L. Corey, and M. J. McElrath. 2000. Effect of combination antiretroviral therapy on T-cell immunity in acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 181:121-131.

156. Macal, M., S. Sankaran, T. W. Chun, E. Reay, J. Flamm, T. J. Prindiville, and S. Dandekar. 2008. Effective CD4+ T-cell restoration in gut-associated lymphoid tissue of HIV-infected patients is associated with enhanced Th17 cells and polyfunctional HIV-specific T-cell responses. *Mucosal Immunol* 1:475-488.
157. Deacon, N. J., A. Tsykin, A. Solomon, K. Smith, M. Ludford-Menting, D. J. Hooker, D. A. McPhee, A. L. Greenway, A. Ellett, C. Chatfield, V. A. Lawson, S. Crowe, A. Maerz, S. Sonza, J. Learmont, J. S. Sullivan, A. Cunningham, D. Dwyer, D. Dowton, and J. Mills. 1995. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 270:988-991.
158. Kiepiela, P., A. J. Leslie, I. Honeyborne, D. Ramduth, C. Thobakgale, S. Chetty, P. Rathnavalu, C. Moore, K. J. Pfafferott, L. Hilton, P. Zimbwa, S. Moore, T. Allen, C. Brander, M. M. Addo, M. Altfeld, I. James, S. Mallal, M. Bunce, L. D. Barber, J. Szinger, C. Day, P. Klenerman, J. Mullins, B. Korber, H. M. Coovadia, B. D. Walker, and P. J. Goulder. 2004. Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature* 432:769-775.
159. Liu, R., W. A. Paxton, S. Choe, D. Ceradini, S. R. Martin, R. Horuk, M. E. MacDonald, H. Stuhlmann, R. A. Koup, and N. R. Landau. 1996. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86:367-377.
160. Dean, M., M. Carrington, C. Winkler, G. A. Huttley, M. W. Smith, R. Allikmets, J. J. Goedert, S. P. Buchbinder, E. Vittinghoff, E. Gomperts, S. Donfield, D. Vlahov, R. Kaslow, A. Saah, C. Rinaldo, R. Detels, and S. J. O'Brien. 1996. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 273:1856-1862.
161. Gonzalez, E., H. Kulkarni, H. Bolivar, A. Mangano, R. Sanchez, G. Catano, R. J. Nibbs, B. I. Freedman, M. P. Quinones, M. J. Bamshad, K. K. Murthy, B. H. Rovin, W. Bradley, R. A. Clark, S. A. Anderson, J. O'Connell R, B. K. Agan, S. S. Ahuja, R. Bologna, L. Sen, M. J. Dolan, and S. K. Ahuja. 2005. The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science* 307:1434-1440.
162. Dolan, M. J., H. Kulkarni, J. F. Camargo, W. He, A. Smith, J. M. Anaya, T. Miura, F. M. Hecht, M. Mamtani, F. Pereyra, V. Marconi, A. Mangano, L. Sen, R. Bologna, R. A. Clark, S. A. Anderson, J. Delmar, R. J. O'Connell, A. Lloyd, J. Martin, S. S. Ahuja, B. K. Agan, B. D. Walker, S. G. Deeks, and S. K. Ahuja. 2007. CCL3L1 and CCR5 influence cell-mediated immunity and affect HIV-AIDS pathogenesis via viral entry-independent mechanisms. *Nat Immunol* 8:1324-1336.
163. Martin, M. P., X. Gao, J. H. Lee, G. W. Nelson, R. Detels, J. J. Goedert, S. Buchbinder, K. Hoots, D. Vlahov, J. Trowsdale, M. Wilson, S. J. O'Brien, and M. Carrington. 2002. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* 31:429-434.
164. Qi, Y., M. P. Martin, X. Gao, L. Jacobson, J. J. Goedert, S. Buchbinder, G. D. Kirk, S. J. O'Brien, J. Trowsdale, and M. Carrington. 2006. KIR/HLA pleiotropism: protection against both HIV and opportunistic infections. *PLoS Pathog* 2:e79.

165. Soumelis, V., I. Scott, F. Gheyas, D. Bouhour, G. Cozon, L. Cotte, L. Huang, J. A. Levy, and Y. J. Liu. 2001. Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood* 98:906-912.
166. Emu, B., E. Sinclair, D. Favre, W. J. Moretto, P. Hsue, R. Hoh, J. N. Martin, D. F. Nixon, J. M. McCune, and S. G. Deeks. 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* 79:14169-14178.
167. Pereyra, F., M. M. Addo, D. E. Kaufmann, Y. Liu, T. Miura, A. Rathod, B. Baker, A. Trocha, R. Rosenberg, E. Mackey, P. Ueda, Z. Lu, D. Cohen, T. Wrin, C. J. Petropoulos, E. S. Rosenberg, and B. D. Walker. 2008. Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *J Infect Dis* 197:563-571.
168. Martinez, V., D. Costagliola, O. Bonduelle, N. N'go, A. Schnuriger, I. Theodorou, J. P. Clauvel, D. Sicard, H. Agut, P. Debre, C. Rouzioux, and B. Autran. 2005. Combination of HIV-1-specific CD4 Th1 cell responses and IgG2 antibodies is the best predictor for persistence of long-term nonprogression. *J Infect Dis* 191:2053-2063.
169. Pontesilli, O., P. Carotenuto, S. R. Kerkhof-Garde, M. T. Roos, I. P. Keet, R. A. Coutinho, J. Goudsmit, and F. Miedema. 1999. Lymphoproliferative response to HIV type 1 p24 in long-term survivors of HIV type 1 infection is predictive of persistent AIDS-free infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 15:973-981.
170. Betts, M. R., M. C. Nason, S. M. West, S. C. De Rosa, S. A. Migueles, J. Abraham, M. M. Lederman, J. M. Benito, P. A. Goepfert, M. Connors, M. Roederer, and R. A. Koup. 2006. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* 107:4781-4789.
171. Saez-Cirion, A., C. Lacabaratz, O. Lambotte, P. Versmisse, A. Urrutia, F. Boufassa, F. Barre-Sinoussi, J. F. Delfraissy, M. Sinet, G. Pancino, and A. Venet. 2007. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:6776-6781.
172. Sankaran, S., M. Guadalupe, E. Reay, M. D. George, J. Flamm, T. Prindiville, and S. Dandekar. 2005. Gut mucosal T cell responses and gene expression correlate with protection against disease in long-term HIV-1-infected nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:9860-9865.
173. Pantaleo, G., S. Menzo, M. Vaccarezza, C. Graziosi, O. J. Cohen, J. F. Demarest, D. Montefiori, J. M. Orenstein, C. Fox, L. K. Schrager, and et al. 1995. Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 332:209-216.
174. van der Graaf, C. A., M. G. Netea, I. Verschuere, J. W. van der Meer, and B. J. Kullberg. 2005. Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae. *Infect Immun* 73:7458-7464.
175. Yewdell, J. W., E. Reits, and J. Neefjes. 2003. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 3:952-961.
176. Honey, K., and A. Y. Rudensky. 2003. Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 3:472-482.

177. Vyas, J. M., A. G. Van der Veen, and H. L. Ploegh. 2008. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol* 8:607-618.
178. Jensen, P. E. 2007. Recent advances in antigen processing and presentation. *Nat Immunol* 8:1041-1048.
179. Roitt, I., J. Brostoff, and D. K. Male. 2001. *Immunology*. Elsevier Science
180. Blanchard, N., V. Di Bartolo, and C. Hivroz. 2002. In the immune synapse, ZAP-70 controls T cell polarization and recruitment of signaling proteins but not formation of the synaptic pattern. *Immunity* 17:389-399.
181. Sharpe, A. H., and A. K. Abbas. 2006. T-cell costimulation--biology, therapeutic potential, and challenges. *N Engl J Med* 355:973-975.
182. Dustin, M. L. 2008. T-cell activation through immunological synapses and kinapses. *Immunol Rev* 221:77-89.
183. Cullinan, P., A. I. Sperling, and J. K. Burkhardt. 2002. The distal pole complex: a novel membrane domain distal to the immunological synapse. *Immunol Rev* 189:111-122.
184. Pentcheva-Hoang, T., L. Chen, D. M. Pardoll, and J. P. Allison. 2007. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17765-17770.
185. Acosta-Rodriguez, E. V., G. Napolitani, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2007. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 8:942-949.
186. Eyerich, S., K. Eyerich, D. Pennino, T. Carbone, F. Nasorri, S. Pallotta, F. Cianfarani, T. Odorisio, C. Traidl-Hoffmann, H. Behrendt, S. R. Durham, C. B. Schmidt-Weber, and A. Cavani. 2009. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* 119:3573-3585.
187. Silva-Campa, E., L. Flores-Mendoza, M. Resendiz, A. Pinelli-Saavedra, V. Mata-Haro, W. Mwangi, and J. Hernandez. 2009. Induction of T helper 3 regulatory cells by dendritic cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 387:373-379.
188. Wong, M. T., J. J. Ye, M. N. Alonso, A. Landrigan, R. K. Cheung, E. Engleman, and P. J. Utz. 2010. Regulation of human Th9 differentiation by type I interferons and IL-21. *Immunol Cell Biol*.
189. Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy, and C. T. Weaver. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6:1123-1132.
190. Szabo, S. J., B. M. Sullivan, C. Stemann, A. R. Satoskar, B. P. Sleckman, and L. H. Glimcher. 2002. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* 295:338-342.
191. Zhu, J., H. Yamane, J. Cote-Sierra, L. Guo, and W. E. Paul. 2006. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res* 16:3-10.
192. Rivino, L., M. Messi, D. Jarrossay, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, and J. Geginat. 2004. Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and

- nonpolarized cells among human CD4⁺ central memory T cells. *J Exp Med* 200:725-735.
193. Jankovic, D., M. C. Kullberg, C. G. Feng, R. S. Goldszmid, C. M. Collazo, M. Wilson, T. A. Wynn, M. Kamanaka, R. A. Flavell, and A. Sher. 2007. Conventional Tbet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med* 204:273-283.
 194. Whelan, M., M. M. Harnett, K. M. Houston, V. Patel, W. Harnett, and K. P. Rigley. 2000. A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. *J Immunol* 164:6453-6460.
 195. Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 27:485-517.
 196. Zhou, L., and D. R. Littman. 2009. Transcriptional regulatory networks in Th17 cell differentiation. *Curr Opin Immunol* 21:146-152.
 197. Wilson, N. J., K. Boniface, J. R. Chan, B. S. McKenzie, W. M. Blumenschein, J. D. Mattson, B. Basham, K. Smith, T. Chen, F. Morel, J. C. Lecron, R. A. Kastelein, D. J. Cua, T. K. McClanahan, E. P. Bowman, and R. de Waal Malefyt. 2007. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 8:950-957.
 198. Manel, N., D. Unutmaz, and D. R. Littman. 2008. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat. *Nat Immunol* 9:641-649.
 199. Acosta-Rodriguez, E. V., L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, and G. Napolitani. 2007. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 8:639-646.
 200. Jolly, C., K. Kashefi, M. Hollinshead, and Q. J. Sattentau. 2004. HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse. *J Exp Med* 199:283-293.
 201. Piguet, V., and Q. Sattentau. 2004. Dangerous liaisons at the virological synapse. *J Clin Invest* 114:605-610.
 202. McDonald, D., L. Wu, S. M. Bohks, V. N. KewalRamani, D. Unutmaz, and T. J. Hope. 2003. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* 300:1295-1297.
 203. Turville, S. G., J. J. Santos, I. Frank, P. U. Cameron, J. Wilkinson, M. Miranda-Saksena, J. Dable, H. Stossel, N. Romani, M. Piatak, Jr., J. D. Lifson, M. Pope, and A. L. Cunningham. 2004. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* 103:2170-2179.
 204. Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor, and Y. van Kooyk. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100:587-597.
 205. Turville, S. G., P. U. Cameron, A. Handley, G. Lin, S. Pohlmann, R. W. Doms, and A. L. Cunningham. 2002. Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat Immunol* 3:975-983.
 206. de Witte, L., A. Nabatov, M. Pion, D. Fluitsma, M. A. de Jong, T. de Gruijl, V. Piguet, Y. van Kooyk, and T. B. Geijtenbeek. 2007. Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat Med* 13:367-371.

207. 2010. In *Keystone Symposia*, Banff, Alberta, Canada.
208. Hodges, A., K. Sharrocks, M. Edelmann, D. Baban, A. Moris, O. Schwartz, H. Drakesmith, K. Davies, B. Kessler, A. McMichael, and A. Simmons. 2007. Activation of the lectin DC-SIGN induces an immature dendritic cell phenotype triggering Rho-GTPase activity required for HIV-1 replication. *Nat Immunol* 8:569-577.
209. Burleigh, L., P. Y. Lozach, C. Schiffer, I. Staropoli, V. Pezo, F. Porrot, B. Canque, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, and A. Amara. 2006. Infection of dendritic cells (DCs), not DC-SIGN-mediated internalization of human immunodeficiency virus, is required for long-term transfer of virus to T cells. *J Virol* 80:2949-2957.
210. Lee, B., G. Leslie, E. Soilleux, U. O'Doherty, S. Baik, E. Levroney, K. Flummerfelt, W. Swiggard, N. Coleman, M. Malim, and R. W. Doms. 2001. cis Expression of DC-SIGN allows for more efficient entry of human and simian immunodeficiency viruses via CD4 and a coreceptor. *J Virol* 75:12028-12038.
211. Sol-Foulon, N., M. Sourisseau, F. Porrot, M. I. Thoulouze, C. Trouillet, C. Nobile, F. Blanchet, V. di Bartolo, N. Noraz, N. Taylor, A. Alcover, C. Hivroz, and O. Schwartz. 2007. ZAP-70 kinase regulates HIV cell-to-cell spread and virological synapse formation. *Embo J* 26:516-526.
212. Thoulouze, M. I., N. Sol-Foulon, F. Blanchet, A. Dautry-Varsat, O. Schwartz, and A. Alcover. 2006. Human immunodeficiency virus type-1 infection impairs the formation of the immunological synapse. *Immunity* 24:547-561.
213. Lehmann, M. J., N. M. Sherer, C. B. Marks, M. Pypaert, and W. Mothes. 2005. Actin- and myosin-driven movement of viruses along filopodia precedes their entry into cells. *J Cell Biol* 170:317-325.
214. Nobile, C., D. Rudnicka, M. Hasan, N. Aulner, F. Porrot, C. Machu, O. Renaud, M. C. Prevost, C. Hivroz, O. Schwartz, and N. Sol-Foulon. 2010. HIV-1 Nef inhibits ruffles, induces filopodia, and modulates migration of infected lymphocytes. *J Virol* 84:2282-2293.
215. Eugenin, E. A., P. J. Gaskill, and J. W. Berman. 2009. Tunneling nanotubes (TNT) are induced by HIV-infection of macrophages: a potential mechanism for intercellular HIV trafficking. *Cell Immunol* 254:142-148.
216. Sowinski, S., C. Jolly, O. Berninghausen, M. A. Purbhoo, A. Chauveau, K. Kohler, S. Oddos, P. Eissmann, F. M. Brodsky, C. Hopkins, B. Onfelt, Q. Sattentau, and D. M. Davis. 2008. Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nat Cell Biol* 10:211-219.
217. Rudnicka, D., J. Feldmann, F. Porrot, S. Wietgreffe, S. Guadagnini, M. C. Prevost, J. Estaquier, A. T. Haase, N. Sol-Foulon, and O. Schwartz. 2009. Simultaneous cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus to multiple targets through polysynapses. *J Virol* 83:6234-6246.
218. Pope, M., and A. T. Haase. 2003. Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. *Nat Med* 9:847-852.
219. Bobardt, M. D., A. C. Saphire, H. C. Hung, X. Yu, B. Van der Schueren, Z. Zhang, G. David, and P. A. Gallay. 2003. Syndecan captures, protects, and transmits HIV to T lymphocytes. *Immunity* 18:27-39.
220. Sallusto, F., C. R. Mackay, and A. Lanzavecchia. 2000. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 18:593-620.

221. Allen, S. J., S. E. Crown, and T. M. Handel. 2007. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 25:787-820.
222. Boudry, C., N. Markine-Goriaynoff, C. Delforge, J. Y. Springael, L. de Leval, P. Drion, G. Russell, D. M. Haig, A. F. Vanderplasschen, and B. Dewals. 2007. The A5 gene of alcelaphine herpesvirus 1 encodes a constitutively active G-protein-coupled receptor that is non-essential for the induction of malignant catarrhal fever in rabbits. *J Gen Virol* 88:3224-3233.
223. Bromley, S. K., D. A. Peterson, M. D. Gunn, and M. L. Dustin. 2000. Cutting edge: hierarchy of chemokine receptor and TCR signals regulating T cell migration and proliferation. *J Immunol* 165:15-19.
224. Trautmann, A. 2005. Chemokines as immunotransmitters? *Nat Immunol* 6:427-428.
225. Molon, B., G. Gri, M. Bettella, C. Gomez-Mouton, A. Lanzavecchia, A. C. Martinez, S. Manes, and A. Viola. 2005. T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat Immunol* 6:465-471.
226. Kumar, A., T. D. Humphreys, K. N. Kremer, P. S. Bramati, L. Bradfield, C. E. Edgar, and K. E. Hedin. 2006. CXCR4 physically associates with the T cell receptor to signal in T cells. *Immunity*. 25:213-224.
227. Trampont, P. C., A. C. Tosello-Trampont, Y. Shen, A. K. Duley, A. E. Sutherland, T. P. Bender, D. R. Littman, and K. S. Ravichandran. 2010. CXCR4 acts as a costimulator during thymic beta-selection. *Nat Immunol* 11:162-170.
228. Marsland, B. J., P. Battig, M. Bauer, C. Ruedl, U. Lassing, R. R. Beerli, K. Dietmeier, L. Ivanova, T. Pfister, L. Vogt, H. Nakano, C. Nembrini, P. Saudan, M. Kopf, and M. F. Bachmann. 2005. CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells. *Immunity* 22:493-505.
229. Friedman, R. S., J. Jacobelli, and M. F. Krummel. 2006. Surface-bound chemokines capture and prime T cells for synapse formation. *Nat Immunol* 7:1101-1108.
230. Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-712.
231. Butcher, E. C., and L. J. Picker. 1996. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272:60-66.
232. Sallusto, F., C. R. Mackay, and A. Lanzavecchia. 1997. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* 277:2005-2007.
233. Dwinell, M. B., N. Lugerling, L. Eckmann, and M. F. Kagnoff. 2001. Regulated production of interferon-inducible T-cell chemoattractants by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 120:49-59.
234. Wang, C., S. G. Kang, J. Lee, Z. Sun, and C. H. Kim. 2009. The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. *Mucosal Immunol* 2:173-183.
235. Reiss, Y., A. E. Proudfoot, C. A. Power, J. J. Campbell, and E. C. Butcher. 2001. CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J Exp Med* 194:1541-1547.
236. Kinter, A., A. Catanzaro, J. Monaco, M. Ruiz, J. Justement, S. Moir, J. Arthos, A. Oliva, L. Ehler, S. Mizell, R. Jackson, M. Ostrowski, J. Hoxie, R. Offord, and A. S.

- Fauci. 1998. CC-chemokines enhance the replication of T-tropic strains of HIV-1 in CD4(+) T cells: role of signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11880-11885.
237. Ancuta, P., P. Autissier, A. Wurcel, T. Zaman, D. Stone, and D. Gabuzda. 2006. CD16+ Monocyte-Derived Macrophages Activate Resting T Cells for HIV Infection by Producing CCR3 and CCR4 Ligands. *J Immunol.* 176:5760-5771.
238. Boulassel, M. R., G. Spurrll, D. Rouleau, C. Tremblay, M. Edwardes, R. P. Sekaly, R. Lalonde, and J. P. Routy. 2003. Changes in immunological and virological parameters in HIV-1 infected subjects following leukapheresis. *J Clin Apher* 18:55-60.
239. Ancuta, P., J. Wang, and D. Gabuzda. 2006. CD16+ monocytes produce IL-6, CCL2, and matrix metalloproteinase-9 upon interaction with CX3CL1-expressing endothelial cells. *J Leukoc Biol.* 80:1156-1164.
240. Annunziato, F., L. Cosmi, V. Santarlasci, L. Maggi, F. Liotta, B. Mazzinghi, E. Parente, L. Fili, S. Ferri, F. Frosali, F. Giudici, P. Romagnani, P. Parronchi, F. Tonelli, E. Maggi, and S. Romagnani. 2007. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 204:1849-1861.
241. Veazey, R. S., and A. A. Lackner. 2004. Getting to the guts of HIV pathogenesis. *J Exp Med* 200:697-700.
242. Brenchley, J. M., and D. C. Douek. 2008. HIV infection and the gastrointestinal immune system. *Mucosal Immunol* 1:23-30.
243. Berg, E. L., T. Yoshino, L. S. Rott, M. K. Robinson, R. A. Warnock, T. K. Kishimoto, L. J. Picker, and E. C. Butcher. 1991. The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. *J Exp Med* 174:1461-1466.
244. Mora, J. R., and U. H. von Andrian. 2004. Retinoic acid: an educational "vitamin elixir" for gut-seeking T cells. *Immunity* 21:458-460.
245. Manicassamy, S., and B. Pulendran. 2009. Retinoic acid-dependent regulation of immune responses by dendritic cells and macrophages. *Semin Immunol* 21:22-27.
246. Li, Q., P. J. Skinner, S. J. Ha, L. Duan, T. L. Mattila, A. Hage, C. White, D. L. Barber, L. O'Mara, P. J. Southern, C. S. Reilly, J. V. Carlis, C. J. Miller, R. Ahmed, and A. T. Haase. 2009. Visualizing antigen-specific and infected cells in situ predicts outcomes in early viral infection. *Science* 323:1726-1729.
247. Saez-Cirion, A., M. Sinet, S. Y. Shin, A. Urrutia, P. Versmisse, C. Lacabartz, F. Boufassa, V. Avettand-Fenoel, C. Rouzioux, J. F. Delfraissy, F. Barre-Sinoussi, O. Lambotte, A. Venet, and G. Pancino. 2009. Heterogeneity in HIV suppression by CD8 T cells from HIV controllers: association with Gag-specific CD8 T cell responses. *J Immunol* 182:7828-7837.
248. Duhon, T., R. Geiger, D. Jarrossay, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2009. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* 10:857-863.
249. Reinhardt, R. L., A. Khoruts, R. Merica, T. Zell, and M. K. Jenkins. 2001. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* 410:101-105.
250. Moonis, M., B. Lee, R. T. Bailer, Q. Luo, and L. J. Montaner. 2001. CCR5 and CXCR4 expression correlated with X4 and R5 HIV-1 infection yet not sustained replication in Th1 and Th2 cells. *Aids* 15:1941-1949.

251. Vicenzi, E., P. Panina-Bodignon, G. Vallanti, P. Di Lucia, and G. Poli. 2002. Restricted replication of primary HIV-1 isolates using both CCR5 and CXCR4 in Th2 but not in Th1 CD4(+) T cells. *J Leukoc Biol* 72:913-920.
252. Oswald-Richter, K., S. M. Grill, M. Leelawong, M. Tseng, S. A. Kalams, T. Hulgan, D. W. Haas, and D. Unutmaz. 2007. Identification of a CCR5-expressing T cell subset that is resistant to R5-tropic HIV infection. *PLoS Pathog* 3:e58.
253. Jinquan, T., S. Quan, H. H. Jacobi, H. O. Madsen, C. Glue, P. S. Skov, H. J. Mallng, and L. K. Poulsen. 2000. CXC chemokine receptor 4 expression and stromal cell-derived factor-1alpha-induced chemotaxis in CD4+ T lymphocytes are regulated by interleukin-4 and interleukin-10. *Immunology* 99:402-410.
254. Kumar, A., J. B. Angel, M. P. Daftarian, K. Parato, W. D. Cameron, L. Filion, and F. Diaz-Mitoma. 1998. Differential production of IL-10 by T cells and monocytes of HIV-infected individuals: association of IL-10 production with CD28-mediated immune responsiveness. *Clin Exp Immunol* 114:78-86.
255. Patterson, B. K., M. Czerniewski, J. Andersson, Y. Sullivan, F. Su, D. Jiyamapa, Z. Burki, and A. Landay. 1999. Regulation of CCR5 and CXCR4 expression by type 1 and type 2 cytokines: CCR5 expression is downregulated by IL-10 in CD4-positive lymphocytes. *Clin Immunol* 91:254-262.
256. Lackner, A. A., and R. S. Veazey. 2007. Current concepts in AIDS pathogenesis: insights from the SIV/maaque model. *Annu Rev Med* 58:461-476.
257. Lecureuil, C., B. Combadiere, E. Mazoyer, O. Bonduelle, A. Samri, B. Autran, P. Debre, and C. Combadiere. 2007. Trapping and apoptosis of novel subsets of memory T lymphocytes expressing CCR6 in the spleen of HIV-infected patients. *Blood* 109:3649-3657.
258. Favre, D., S. Lederer, B. Kanwar, Z. M. Ma, S. Proll, Z. Kasakow, J. Mold, L. Swainson, J. D. Barbour, C. R. Baskin, R. Palermo, I. Pandrea, C. J. Miller, M. G. Katze, and J. M. McCune. 2009. Critical loss of the balance between Th17 and T regulatory cell populations in pathogenic SIV infection. *PLoS Pathog* 5:e1000295.
259. Lafferty, M. K., L. Sun, L. DeMasi, W. Lu, and A. Garzino-Demo. CCR6 ligands inhibit HIV by inducing APOBEC3G. *Blood* 115:1564-1571.
260. Raffatellu, M., R. L. Santos, D. E. Verhoeven, M. D. George, R. P. Wilson, S. E. Winter, I. Godinez, S. Sankaran, T. A. Paixao, M. A. Gordon, J. K. Kolls, S. Dandekar, and A. J. Baumler. 2008. Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes Salmonella dissemination from the gut. *Nat Med* 14:421-428.
261. Woodland, D. L., and J. E. Kohlmeier. 2009. Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol* 9:153-161.
262. Masopust, D., D. Choo, V. Vezys, E. J. Wherry, J. Duraiswamy, R. Akondy, J. Wang, K. A. Casey, D. L. Barber, K. S. Kawamura, K. A. Fraser, R. J. Webby, V. Brinkmann, E. C. Butcher, K. A. Newell, and R. Ahmed. Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium. *J Exp Med* 207:553-564.
263. Gonzalez-Scarano, F., and J. Martin-Garcia. 2005. The neuropathogenesis of AIDS. *Nat Rev Immunol* 5:69-81.
264. Reboldi, A., C. Coisne, D. Baumjohann, F. Benvenuto, D. Bottinelli, S. Lira, A. Uccelli, A. Lanzavecchia, B. Engelhardt, and F. Sallusto. 2009. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol* 10:514-523.

265. Asensio, V. C., J. Maier, R. Milner, K. Boztug, C. Kincaid, M. Moulard, C. Phillipson, K. Lindsley, T. Krucker, H. S. Fox, and I. L. Campbell. 2001. Interferon-independent, human immunodeficiency virus type 1 gp120-mediated induction of CXCL10/IP-10 gene expression by astrocytes in vivo and in vitro. *J Virol* 75:7067-7077.
266. Boven, L. A., J. Middel, E. C. Breij, D. Schotte, J. Verhoef, C. Soderland, and H. S. Nottet. 2000. Interactions between HIV-infected monocyte-derived macrophages and human brain microvascular endothelial cells result in increased expression of CC chemokines. *J Neurovirol* 6:382-389.
267. Dhillon, N., X. Zhu, F. Peng, H. Yao, R. Williams, J. Qiu, S. Callen, A. O. Ladner, and S. Buch. 2008. Molecular mechanism(s) involved in the synergistic induction of CXCL10 by human immunodeficiency virus type 1 Tat and interferon-gamma in macrophages. *J Neurovirol* 14:196-204.
268. Gartner, S. 2000. HIV infection and dementia. *Science* 287:602-604.
269. Pass, R. F. 1985. Epidemiology and transmission of cytomegalovirus. *J Infect Dis* 152:243-248.
270. Derzelle, S., F. Dilasser, M. Duquenne, and V. Deperrois. 2009. Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. *Food Microbiol* 26:896-904.
271. LeClaire, R. D., R. E. Hunt, S. Bavari, J. E. Estep, G. O. Nelson, and C. L. Wilhelmsen. 1996. Potentiation of inhaled staphylococcal enterotoxin B-induced toxicity by lipopolysaccharide in mice. *Toxicol Pathol* 24:619-626.
272. Cummins, J. E., Jr., W. J. Bunn, S. D. Hall, H. H. Donze, J. Mestecky, and S. Jackson. 2001. In vitro exposure to highly cytopathic HIV-1 X4 strains increases expression of mucosa-associated integrins on CD4(+) T cells. *Virology* 280:262-272.
273. Nagashima T, Aranami T, Iclozan C, and O. K. 2004. Analysis of T cell Responses to a Superantigen, Staphylococcal Enterotoxin-B. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology* 44:25-32.
274. Kubo, M., T. Ohashi, M. Fujii, S. Oka, A. Iwamoto, S. Harada, and M. Kannagi. 1997. Abrogation of in vitro suppression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication mediated by CD8+ T lymphocytes of asymptomatic HIV-1 carriers by staphylococcal enterotoxin B and phorbol esters through induction of tumor necrosis factor alpha. *J Virol* 71:7560-7566.
275. Pulendran, B., H. Tang, and T. L. Denning. 2008. Division of labor, plasticity, and crosstalk between dendritic cell subsets. *Curr Opin Immunol* 20:61-67.
276. Iwata, M., A. Hirakiyama, Y. Eshima, H. Kagechika, C. Kato, and S. Y. Song. 2004. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* 21:527-538.
277. Gupta, S., R. Janani, Q. Bin, P. Luciw, C. Greer, S. Perri, H. Legg, J. Donnelly, S. Barnett, D. O'Hagan, J. M. Polo, and M. Vajdy. 2005. Characterization of human immunodeficiency virus Gag-specific gamma interferon-expressing cells following protective mucosal immunization with alphavirus replicon particles. *J Virol* 79:7135-7145.
278. Chakupurakal, G., D. Onion, M. Cobbold, V. Mautner, and P. A. Moss. Adenovirus vector-specific T cells demonstrate a unique memory phenotype with high proliferative potential and coexpression of CCR5 and integrin alpha4beta7. *Aids* 24:205-210.
279. Ogg, G. S., X. Jin, S. Bonhoeffer, P. R. Dunbar, M. A. Nowak, S. Monard, J. P. Segal, Y. Cao, S. L. Rowland-Jones, V. Cerundolo, A. Hurley, M. Markowitz, D. D. Ho, D. F.

- Nixon, and A. J. McMichael. 1998. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* 279:2103-2106.
280. Yen, H. R., T. J. Harris, S. Wada, J. F. Grosso, D. Getnet, M. V. Goldberg, K. L. Liang, T. C. Bruno, K. J. Pyle, S. L. Chan, R. A. Anders, C. L. Trimble, A. J. Adler, T. Y. Lin, D. M. Pardoll, C. T. Huang, and C. G. Drake. 2009. Tc17 CD8 T cells: functional plasticity and subset diversity. *J Immunol* 183:7161-7168.
281. Steinman, L. 2007. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 13:139-145.
282. Kader, M., S. Bixler, M. Piatak, J. Lifson, and J. J. Mattapallil. 2009. Anti-retroviral therapy fails to restore the severe Th-17: Tc-17 imbalance observed in peripheral blood during simian immunodeficiency virus infection. *J Med Primatol* 38 Suppl 1:32-38.
283. Trachtenberg, E., B. Korber, C. Sollars, T. B. Kepler, P. T. Hraber, E. Hayes, R. Funkhouser, M. Fugate, J. Theiler, Y. S. Hsu, K. Kunstman, S. Wu, J. Phair, H. Erlich, and S. Wolinsky. 2003. Advantage of rare HLA supertype in HIV disease progression. *Nat Med* 9:928-935.
284. Canque, B., M. Rosenzweig, A. Gey, E. Tartour, W. H. Fridman, and J. C. Gluckman. 1996. Macrophage inflammatory protein-1alpha is induced by human immunodeficiency virus infection of monocyte-derived macrophages. *Blood* 87:2011-2019.
285. Clark-Lewis, I., I. Mattioli, J. H. Gong, and P. Loetscher. 2003. Structure-function relationship between the human chemokine receptor CXCR3 and its ligands. *J Biol Chem* 278:289-295.
286. Williams, I. R. 2006. CCR6 and CCL20: partners in intestinal immunity and lymphorganogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1072:52-61.

7. ANNEXE – FIGURES SUPPLEMENTAIRES

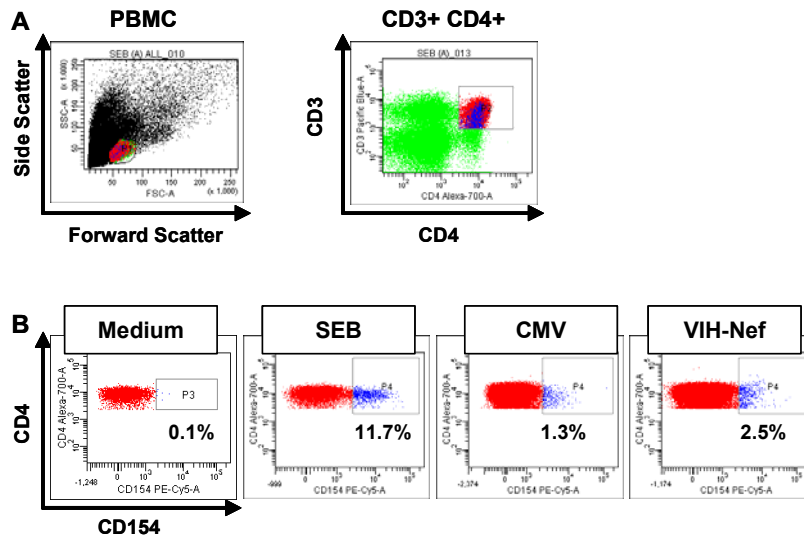


Figure supplémentaire 1 : Analyse par cytométrie en flux des cellules T CD4⁺CD154⁺ spécifiques à l'antigène. Les PBMCs des cinq LTNP ont été stimulées avec le SEB (1 µg/ml), la protéine pp65 du CMV recombinante (5 µg/ml), et divers pools de peptides de VIH: Nef (3 pools), Gag (6 pools) et Pol (12 pools) (10 µg/ml). Les cellules ont été cultivées en présence de Monensin (2 µg/ml) et des Ac anti-CD154 couplé au fluorochrome PE-Cy5 (20µl/0.2ml) pendant 18 heures. Les cellules ont été ensuite marquées en surface avec des anticorps anti-CD3, anti-CD4, anti-β7, anti-CCR6, anti-CXCR3, anti-CLA, anti-CCR4, and anti-CCR7 couplés à des fluorochromes. L'analyse a été effectuée par cytométrie en flux pour l'expression de CD154 sur les cellules T CD3⁺CD4⁺. Les cellules T CD4⁺ ont été identifiées sur la base des critères de granularité (SSC) et de taille (FSC) (**A, panneau de gauche**) et sur la base de la coexpression des molécules CD3 et CD4 (**A, panneau de droite**). L'expression de CD154 a été ensuite analysée sur les cellules T CD3⁺CD4⁺ (**B**). Ceci est un exemple typique de la stratégie d'analyse par cytométrie en flux des cellules T CD4⁺CD154⁺ spécifiques à l'antigène (voir la Figure 9).

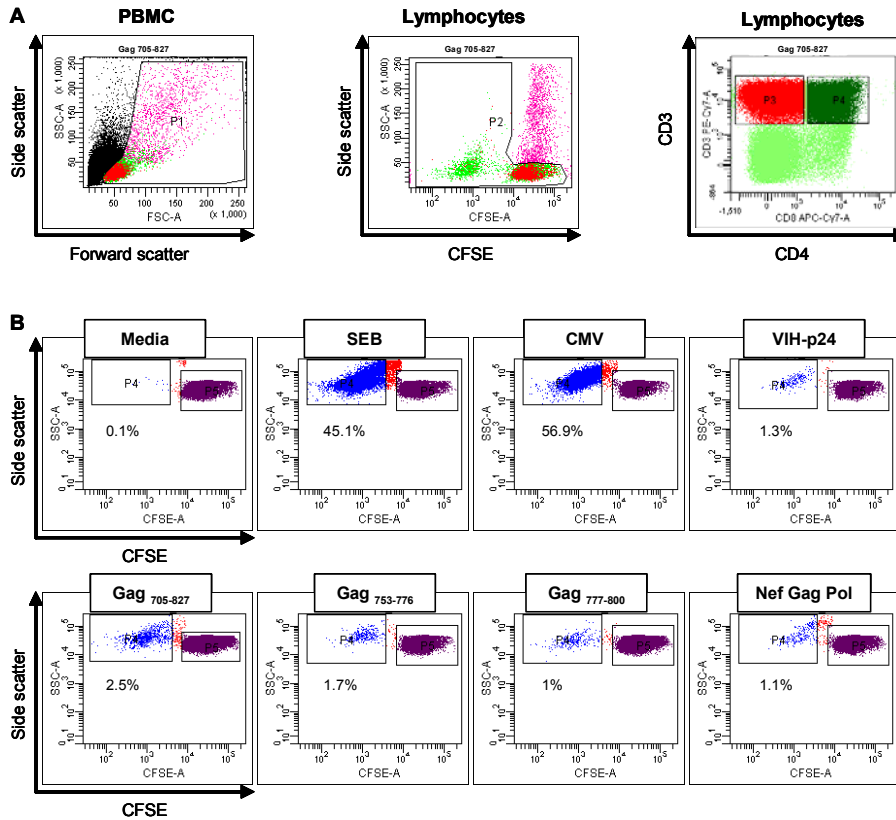


Figure supplémentaire 2: Profil d'analyse par cytométrie en flux des cellules T CD4⁺ proliférant en réponse à l'antigène – la méthode de la dilution CFSE. Les PBMCs des cinq LTNP ont été chargées en CFSE (0.5 µM) et cultivées pendant 6 jours à 37° C en présence ou l'absence de la p24 recombinante (5µg/ml) et divers pools de peptides Nef (3 pools), Gag (6 pools) et Pol (12 pools) du VIH-1 (500 ng/ml). Le SEB (25 ng/ml) et la protéine pp65 du CMV recombinante (1 µg/ml) ont été utilisés comme contrôles positifs. Les cellules ont été marquées avec des Ac anti-CD3, anti-CD4, anti-β7, anti-CCR6, anti-CXCR3, et anti-CCR4 couplés à des fluorochromes. L'analyse par cytométrie en flux a été réalisée pour **(A)** déterminer la fréquence des cellules T CD4⁺ proliférant en réponse à un antigène donné (CD3⁺CD4⁺CFSE^{Low}) et **(B)** pour quantifier l'expression de l'intégrine β7, CCR6, CXCR3, et CCR4 sur les cellules T CD3⁺CD4⁺CFSE^{Low}. Ceci est un exemple typique sur le profil des cellules de sujets LTNP observée en cytométrie en flux, lors de la détection des cellules T CD4⁺ proliférant à l'antigène (voir la Figure 10).

8. ANNEXE - ARTICLE

Article #1: Gosselin/Monteiro et al., J Immunol, 2010

Peripheral Blood CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ CD4⁺ T Cells Are Highly Permissive to HIV-1 Infection

Annie Gosselin,^{*,†,1} Patricia Monteiro,^{*,†,‡,1} Nicolas Chomont,^{*,†} Felipe Diaz-Griffero,[§] Elias A. Said,^{*,†} Simone Fonseca,^{*,†} Vanessa Wacleche,^{*,†,‡} Mohamed El-Far,^{*,†} Mohamed-Rachid Boulassel,[¶] Jean-Pierre Routy,^{‡,¶,||} Rafick-Pierre Sekaly,^{*,†,‡} and Petronela Ancuta^{*,†,‡}

There is limited knowledge on the identity of primary CD4⁺ T cell subsets selectively targeted by HIV-1 in vivo. In this study, we established a link between HIV permissiveness, phenotype/homing potential, and lineage commitment in primary CD4⁺ T cells. CCR4⁺CCR6⁺, CCR4⁺CCR6⁻, CXCR3⁺CCR6⁺, and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells expressed cytokines and transcription factors specific for Th17, Th2, Th1Th17, and Th1 lineages, respectively. CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cells expressed the HIV coreceptors CCR5 and CXCR4 and were permissive to R5 and X4 HIV replication. CCR4⁺CCR6⁻ T cells expressed CXCR4 but not CCR5 and were permissive to X4 HIV only. CXCR3⁺CCR6⁻ T cells expressed CCR5 and CXCR4 but were relatively resistant to R5 and X4 HIV in vitro. Total CCR6⁺ T cells compared with CCR6⁻ T cells harbored higher levels of integrated HIV DNA in treatment-naïve HIV-infected subjects. The frequency of total CCR6⁺ T cells and those of CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cells were diminished in chronically infected HIV-positive subjects, despite viral-suppressive therapy. A high-throughput analysis of cytokine profiles identified CXCR3⁺CCR6⁺ T cells as a major source of TNF- α and CCL20 and demonstrated a decreased TNF- α /IL-10 ratio in CXCR3⁺CCR6⁻ T cells. Finally, CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cells exhibited gut- and lymph node-homing potential. Thus, we identified CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cells as highly permissive to HIV replication, with potential to infiltrate and recruit more CCR6⁺ T cells into anatomic sites of viral replication. It is necessary that new therapeutic strategies against HIV interfere with viral replication/persistence in discrete CCR6⁺ T cell subsets. *The Journal of Immunology*, 2010, 184: 1604–1616.

Persistence of HIV-1 in discrete uncharacterized fractions of CD4⁺ T cells is a major barrier in HIV eradication despite viral-suppressive antiretroviral therapy (ART) (1–3). Previous studies demonstrated that HIV infects CD4⁺ T cells specific

for different Ags, including HIV (4), producing IFN- γ and IL-17 (5) and carrying markers of resting memory T cells (6, 7). Most recently, studies by Chomont et al. (8) identified central memory (CD45RA⁻CCR7⁺CD27⁺) and transitional memory (CD45RA⁻CCR7⁻CD27⁺) T cells as the main viral reservoirs in HIV-infected subjects with preserved and decreased CD4 counts, respectively, under viral-suppressive ART. Despite these recent advances, the phenotypic and functional characteristics of CD4⁺ T cells permissive versus resistant to HIV infection remain elusive.

Chemokine receptors were initially discovered because of their role in immune cell trafficking regulation (9). Recently, the imprinting for homing was linked to the state of activation, differentiation, and lineage commitment of CD4⁺ T cells (10). The chemokine receptor CCR7 identifies central memory T cells that exhibit a lymph node-homing potential and ability to differentiate into effector CCR7⁻ T cells subsequently recruited into peripheral tissues (11). The chemokine receptor CXCR3 identifies pre-Th1 central memory T cells that produce IFN- γ and proliferate in response to CMV peptides (12). The chemokine receptor CCR4 identifies pre-Th2 central memory T cells that produce IL-4 and are specific for extracellular pathogens (12). More recent studies demonstrated that CCR6 (the receptor for CCL20 and β -defensins (13)) in combination with CCR4 and CXCR3 identifies two distinct subsets of T cells (14): Th17 (CCR4⁺CXCR3⁻CCR6⁺) producing IL-17 and specific for *Candida albicans* and Th1Th17 (CCR4⁻CXCR3⁺CCR6⁺) producing IL-17 and IFN- γ and specific for *Mycobacterium tuberculosis* (14). These studies linked the expression of CXCR3, CCR4, and CCR6 to the lineage commitment profile and the antigenic specificity of memory T cells. Of particular relevance for HIV pathogenesis, the HIV coreceptor CCR5 is highly expressed on central memory CXCR3⁺ T cells (12). Also, a subset of CCR6⁺

*Department of Microbiology and Immunology, Université de Montréal; †Centre de Recherche du Research Centre, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Saint-Luc Hospital; ‡The French National Institute of Health and Medical Research Unit 743; ¶Division of Hematology and ||Immunodeficiency Service, Montreal Chest Institute, McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, Canada; and §Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, MA 02115

¹A.G. and P.M. contributed equally to this work.

Received for publication September 16, 2009. Accepted for publication November 30, 2009.

This work was supported in part by grants to P.A. from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (MOP-82849), Fondation du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Fonds de la Recherche en Santé Québec (FRSQ), the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM), National Agency for AIDS Research (ANRS), Agence Nationale de Recherche sur le SIDA, and Fondation de France. P.A. was supported by New Investigator awards from FRSQ and INSERM. P.M., N.C., E.A.S., and M.E.F. were supported by postdoctoral fellowships from ANRS, Fondation de France, FRSQ, The Foundation for AIDS Research, and CIHR, respectively. Core facilities were supported by the Fondation du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal and the FRSQ AIDS-Infectious Diseases Network.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Petronela Ancuta, Centre de Recherche du Research Centre, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Saint-Luc Hospital, Pavillon Edouard Asselin, Room 411, 264 Boulevard René-Lévesque East, Montreal, QC H2X 1P1, Canada. E-mail address [REDACTED]

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this paper: ART, antiretroviral therapy; CI on ART, chronically infected under long-term antiretroviral therapy; LTR, long terminal repeat; NA, not available; RI w/o ART, recently HIV-infected treatment-naïve; T-bet, T-box expressed in T cells; Treg, regulatory T cell.

Copyright © 2010 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/10/\$16.00

T cells is HIV-specific, depleted, or both during HIV disease progression (15). Furthermore, CCR6⁺ T cells likely contribute to HIV dissemination from the portal site of entry, as demonstrated by the use of microbicides interfering with the CCL20-mediated recruitment of T cells into vaginal mucosal sites (16). Together, these lines of evidence suggest that the chemokine receptors CXCR3, CCR4, and CCR6, which are differentially expressed on CD4⁺ T cells with Th1, Th2, Th17, and Th1Th17 profiles (12, 14), might also identify subsets with distinct susceptibility to HIV infection and contribution to viral pathogenesis.

To gain insights into the phenotypic and functional characteristics of CD4⁺ T cell subsets permissive versus resistant to HIV, we investigated the susceptibility to HIV infection of T cell subsets with differential expression of the chemokine receptors CCR4, CXCR3, and CCR6. We demonstrated that CCR4⁺CCR6⁺, CCR4⁺CCR6⁻, CXCR3⁺CCR6⁺, and CXCR3⁺CCR6⁻ T cell subsets expressed cytokines and transcription factors specific for Th17, Th2, Th1Th17, and Th1 lineages, respectively, and exhibited distinct susceptibility to R5 and X4 HIV replication *in vitro*. We further demonstrated that circulating CCR6⁺ T cells harbored the highest levels of integrated HIV DNA in treatment-naïve HIV-infected subjects. Moreover, the frequency of CCR4⁺CCR6⁺, CXCR3⁺CCR6⁺, and CCR4⁺CCR6⁻ but not CXCR3⁺CCR6⁻ T cells was significantly diminished in the peripheral blood of HIV-infected individuals despite an efficient control of HIV replication and preserved CD4 counts under ART. In conclusion, we demonstrate a profound and previously unrecognized alteration of CD4⁺ T cell functional heterogeneity in the context of HIV pathogenesis and emphasize the need for the design of new therapeutic strategies to eradicate HIV by interfering with viral replication in discrete CCR6⁺ T cell subsets.

Materials and Methods

Subjects

Subjects infected with HIV-1 ($n = 42$) and uninfected donors ($n = 19$) were recruited at the McGill University Health Centre, Royal Victoria Hospital, and the Saint-Luc Hospital, Montréal, Québec, Canada, through the Fonds de la Recherche en Santé Québec/AIDS-Infectious Diseases Network (Québec, Canada). Informed consent and Internal Review Board approval were obtained for all of the participants. Tables I and II summarize immunological, virological, and clinical data for recently HIV-infected treatment-naïve (RI w/o ART) and chronically infected under long-term ART (CI on ART) subjects, respectively. Subjects treated with ART received various antiviral regimens containing a protease inhibitor, a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, or three nucleoside reverse transcriptase inhibitors. Plasma viral load was measured using the Amplicor HIV-1 monitor ultrasensitive method (Roche, Basel, Switzerland). PBMCs (10^9 – 10^{10} cells) were collected from HIV-infected and uninfected individuals by leukapheresis, as previously reported (17). For specific experiments, 10 ml fresh blood was collected from uninfected donors.

Abs and polychromatic flow cytometry analysis

Fluorochrome-conjugated Abs used for polychromatic flow cytometry analysis were CD3-Pacific blue (UCHT1), CD4-Alexa Fluor 700 (RPA-T4), CD45RA-allophycocyanin/Cy7 (HI100), CCR4-PE/Cy7 (1G1), CXCR3-PE/Cy5 (1C6), CCR5-FITC (2D7), CCR5-PE (2D7), CCR6-PE (11A9), and CXCR4-PE (12G5) (BD Pharmingen, San Diego, CA), CXCR4-FITC (12G5) and CCR7-FITC (150503) (R&D Systems, Minneapolis, MN), α 4-FITC (44H6), β 7-FITC (FIB504), CD56-FITC (MEM188), and IL-17 PE (64DEC17) (eBioscience, San Diego, CA), CD14-FITC (My4) and HIV-p24-FITC (FH190-1-1) (Beckman Coulter, Fullerton, CA), CD8-FITC (BW135/80), CD19-FITC (LT19), and IFN- γ -PE (45-15) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Cells were analyzed by FACS using the BD LSR II cytometer and BD Diva software (BD Biosciences, San Jose, CA).

MACS and FACS cell sorting

The PBMCs were isolated from fresh blood or leukapheresis by Ficoll-Paque centrifugation (18, 19). The CD4⁺ T cells were sorted from PBMCs by negative selection using magnetic beads (MACS; Miltenyi Biotec), with

a purity >95%, as determined by triple staining with CD3, CD4, and CD8 Abs and FACS analysis. Then, CCR4⁺CCR6⁺, CCR4⁺CCR6⁻, CXCR3⁺CCR6⁺, and CXCR3⁺CCR6⁻ T cell subsets were sorted by FACS (BD FACS Aria; BD Biosciences) upon staining with two different mixtures: 1) CD4-FITC, CD45RA-allophycocyanin/Cy7, CCR4-PE/Cy7, CXCR3-PE/Cy5, and CCR6-PE for HIV-infected subjects where the sorting gate was set on CD4⁺CD45RA⁻ T cells and 2) CD8-FITC, CD14-FITC, CD56-FITC, CD19-FITC, CD45RA-allophycocyanin/Cy7, CCR4-PE/Cy7, CXCR3-PE/Cy5, and CCR6-PE for uninfected controls, where the sorting gate was set on FITC⁻CD45RA⁻ T cells to exclude CD8⁺ T cells, monocytes, NK cells, and B cells, respectively. Sorted T cell subsets were on average >95% pure as determined by postsorting FACS analysis (Supplemental Fig. 1).

Quantitative SYBR Green real-time RT-PCR

Total RNA was isolated from sorted T cell subsets by RNeasy columns (Qiagen, Valencia, CA). The quality of RNA was assessed by Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA), and the quantity was measured by Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE). One step SYBR Green real-time RT-PCR (Qiagen) was carried out in a LightCycler (Roche) according to the manufacturer's recommendations. Primers spanning one or multiple exons were purchased from Qiagen (i.e., *rorc*, *gata3*, T-box expressed in T cells (*t-bet*), and *foxp3* QuantiTect primer sets). Briefly, 5 ng total RNA was reverse-transcribed in 20 μ l 1 \times SYBR Green mix (Qiagen) containing 0.5 μ M primers. Agarose gel electrophoresis was used to determine the size of the amplification products (100–200 bp) and allowed cDNA purification (QIAquick Gel Extraction Kit; Qiagen) for standard curve preparation. The absolute quantification of target gene expression was performed using a 10-fold serial dilution of purified RT-PCR products (i.e., 200, 20, 2, 0.2, and 0.02 fg cDNA), as previously described by us and others (20, 21). Melting curve analysis was performed after each real-time amplification and revealed the uniformity of thermal dissociation profile per amplification product. Samples without template or without reverse transcriptase were used as negative controls. The concentration of each gene was normalized to the 28S rRNA levels (RRN28S: forward, 5'-CGAGATTCCTACTGTCCTA-3'; reverse, 5'-GGGGCTCCCACTTATTCTA-3') as an internal control (21). Each RT-PCR reaction was performed in duplicate.

HIV infection and quantification of viral replication

R5 (NL4.3BaL) and X4 (NL4.3) HIV stocks were produced by transfection of 293 T cells with the appropriate plasmids using Fugene6 (Roche) (22). Viral stocks were quantified by a HIV p24 ELISA assay (8) and titrated for infectiousness on CD4⁺CCR5⁺CXCR4⁺ MAGI cells and primary CD3/CD28-activated CD4⁺ T cells. Sorted CD4⁺ T cell subsets were activated for 3 d with immobilized CD3 and soluble CD28 Abs (1 μ g/ml) and then exposed to HIV (50 ng HIV p24 for 10^6 cells corresponding to a multiplicity of infection of \sim 0.01 for 10^6 cells) for 3 h at 37°C. Unbound HIV was removed by extensive washing, and cells were cultured at a concentration of 10^6 cells per milliliter in RPMI 1640 with 10% FBS and IL-2 (5 ng/ml; R&D Systems). Cell culture supernatants were harvested every 3 d, and HIV replication was measured by HIV p24 ELISA. In parallel, cells were harvested at days 3 or 12 postinfection, or both, and cell lysates were used for real-time RT-PCR quantification of HIV DNA.

Real-time RT-PCR quantification of HIV DNA

The quantification of integrated and total HIV DNA was performed, as previously described (8, 23). Briefly, T cells were digested in a proteinase K buffer (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada), and 10^5 cells/15 μ l lysate were used per amplification. Integrated HIV DNA was amplified first (12 cycles) using two outward-facing *Alu* primers and one HIV long terminal repeat (LTR) primer tagged with a λ sequence, and the CD3 gene was amplified in the same reaction (8). The HIV and CD3 amplicons were then amplified in separate reactions (LightCycler; Roche). The HIV DNA was amplified using a λ -specific primer and an inner LTR primer in the presence of two fluorescent probes specific for HIV LTR (23). The CD3 DNA was amplified using inner primers and two fluorescent probes specific for CD3 (8). Amplification reactions were carried out with Jumpstart Taq Ready Mix (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and Taq Polymerase (Invitrogen). The ACH2 cells carrying one copy of integrated HIV DNA per cell (The National Institutes of Health AIDS reagent program) were used as a standard curve (8). A similar method was used to quantify total HIV DNA with the appropriate primers for HIV Gag and LTR (8).

Cytokine screening and quantification

Culture supernatants were screened for the expression of 120 soluble factors using the Cytokine Antibody Arrays VI and VII (RayBiotech, Norcross, GA). Cytokine levels were further quantified by ELISA assays specific for IL-2,

Table I. Clinical parameters of RI w/o ART subjects

Patient ID	CD4 (cells/ μ l)	CD8 (cells/ μ l)	Viral Load ^a	Treatment	Time Since Infection (mo)	Time of Aviremia (mo)
1	704	1,081	68,412	None	9	0
2	310	350	200,363	None	46	0
3	522	366	2,021	None	5	0
4	691	1,122	8,714	None	12	0
5	341	372	16,883	None	5	0
6	483	930	366,646	None	2	0
7	857	1,499	93,223	None	3	0
8	475	640	56,838	None	2	0
14	338	1,829	81,984	None	4	0
15	378	779	93,706	None	2	0
16	443	736	176,557	None	5	0
17	442	538	36,349	None	5	0
29	571	1,266	5,897	None	7	0
30	824	626	1,167,770	None	6	0
36	494	1,055	15,703	None	16	0
37	730	1,310	97,044	None	6	0
50	255	988	52,835	None	6	0
51	316	376	57,154	None	8	0
52	200	320	4,389	None	25	0
64	600	1,140	3,909	None	8	0
65	378	779	93,706	None	4	0
Median	475	779	56,996	–	6	–

^aHIV RNA copies per milliliter of plasma.

IL-10 (BD Pharmingen), TNF- α , CCL3, CCL20 (R&D Systems), IL-5, IL-17, and IFN- γ (eBioscience). CCL5 levels were quantified by Cytometric Bead Array (BD Pharmingen).

Statistical analysis

Statistical significance between groups (p values < 0.05 were considered significant) was calculated using the Mann-Whitney U test (comparison of unpaired samples) and Wilcoxon signed-rank test or paired t test (comparison of paired samples) as specified in the figure legends. Associations among study variables were assessed by Spearman correlation and linear regression. All of the statistical analyses were performed using Prism 5 software (GraphPad, San Diego, CA).

Results

CCR4, CXCR3, and CCR6 identify CD4⁺ T cell subsets with distinct lineage commitment and expression of the HIV coreceptor CCR5

Previous studies demonstrated that CCR4 (R4), CXCR3 (X3), and CCR6 (R6) are surface markers for functionally distinct memory CD4⁺ T cell subsets: Th17 (CCR4⁺CCR6⁺), Th2 (CCR4⁺CCR6⁻), Th1Th17 (CXCR3⁺CCR6⁺), and Th1 (CXCR3⁺CCR6⁻) (14). Whether CCR4, CXCR3, and CCR6 identify subsets with distinct susceptibility to HIV infection remains unknown. Memory T cells were identified as cells lacking the expression of naive T cell CD45RA, as previously described (11, 14, 24). In this study, we used polychromatic flow cytometry to sort memory (CD45RA⁻) CD4⁺ T cell subsets with differential expression of CCR4, CXCR3, and CCR6 using a gating strategy depicted in Fig. 1A and 1B. The CCR4 and CXCR3 expression distinguished four memory subsets, including CCR4⁺CXCR3⁻ and CCR4⁻CXCR3⁺ subsets (Fig. 1A). The expression of CCR6 further identified CCR4⁺CCR6⁺, CCR4⁺CCR6⁻, CXCR3⁺CCR6⁺, and CXCR3⁺CCR6⁻ T cell subsets (Fig. 1B). Highly pure T cell subsets (Supplemental Fig. 1) were assessed for the expression of lineage-specific cytokines and transcription factors upon CD3/CD28 triggering in vitro. The CCR4⁺CCR6⁺ T cells produced IL-17 and expressed the mRNA for the Th17-specific transcription factor RORC. The CCR4⁺CCR6⁻ T cells produced IL-5 and expressed the mRNA for the Th2-specific transcription factor GATA3. The CXCR3⁺

CCR6⁺ T cells produced IFN- γ and IL-17 and the mRNA for the Th1- and Th17-specific transcription factors T-bet and RORC, respectively. The CXCR3⁺CCR6⁻ T cells produced IFN- γ and expressed the mRNA for the Th1-specific transcription factor T-bet (Fig. 1C, 1D). These results are consistent with previous reports (12, 14). The expression of the mRNA for the regulatory T cell (Treg)-specific transcription factor FoxP3 was relatively low in the four T cell subsets compared with that in the CD25^{high} Tregs (Fig. 1D). Thus, CCR4⁺CCR6⁺, CCR4⁺CCR6⁻, CXCR3⁺CCR6⁺, and CXCR3⁺CCR6⁻ T cell subsets were enriched in markers specific for Th17, Th2, Th1Th17, and Th1 lineages, respectively, but did not express the Treg marker FoxP3.

To determine whether CCR4, CXCR3, and CCR6 identify subsets with distinct susceptibility to HIV infection, the expression of the HIV coreceptors CCR5 and CXCR4 (25–27) was quantified on T cells from the fresh blood of uninfected individuals. The expression of CCR5 was the highest on CXCR3⁺CCR6⁺ T cells, moderate on CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells, and low to undetectable on CCR4⁺CCR6⁻ T cells (Fig. 2A, 2B). In contrast, the HIV coreceptor CXCR4 was expressed at similar levels on the four T cell subsets (Fig. 2C). Thus, CCR4⁺CCR6⁺, CCR4⁺CCR6⁻, CXCR3⁺CCR6⁺, and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells differentially expressed the HIV coreceptor CCR5 and similarly expressed CXCR4, thereby suggesting a distinct susceptibility of these T cell subsets to R5 HIV infection.

CCR4⁺CCR6⁺, CCR4⁺CCR6⁻, CXCR3⁺CCR6⁺, and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells differentially replicate R5 and X4 HIV

We investigated the susceptibility of these four T cell subsets to R5 and X4 HIV replication in vitro. High levels of R5 HIV replication were detected in CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cells, whereas R5 HIV replication was low to undetectable in CCR4⁺CCR6⁻ and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells up to 12 d postinfection (Fig. 3A). Levels of integrated and total R5 HIV DNA were relatively high in CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cells but low in CCR4⁺CCR6⁻ and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells at day 3 postinfection (Fig. 3B). X4 HIV replicated at relatively high levels in CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cells and at low to undetectable levels in CXCR3⁺CCR6⁻ T cells (Fig. 3C). Levels of integrated and total X4 HIV

Table II. Clinical parameters of CI on ART subjects

Patient ID	CD4 (cells/ μ l)	CD8 (cells/ μ l)	Viral Load ^a	Treatment Regimen	Time Since Infection (mo)	Time of Aviremia (mo)
18	890	673	<50	AZT; 3TC; NEV	57	42
19	463	757	<50	3TC; EFV; ABA	152	20
20	602	767	<50	3TC; ABA; SAQ	158	53
21	563	613	<50	IND; 3TC; AZT	86	71
22	424	461	<50	3TC; D4T; DEL	84	46
23	731	413	<50	EFV; AZT; 3TC	51	22
24	834	527	<50	NEV; ATA; TENO; RIT	38	25
25	552	715	<50	D4T; ATA	139	56
26	671	1,120	<50	3TC; ABA; LOP; RIT	242	64
27	510	765	<50	AZT; 3TC; RIT	61	52
28	799	1,727	<50	3TC; D4T; NEV	62	33
42	501	278	<50	D4T; 3TC; IND	90	87
43	344	642	<50	3TC; D4T; NEV	59	44
44	604	1,281	<50	IND; AZT; 3TC	53	35
47	443	322	<50	RIT; AZT; 3TC; KAL	18	12
56	599	923	<50	AZT; 3TC; EFV	86	46
57	688	1,273	<50	AZT; 3TC; EFV	100	59
58	434	583	<50	3TC; EFV; ABA	165	34
59	492	582	<50	RIT; ABC; 3TC; ATA	170	66
60	529	690	<50	3TC; D4T; DEL	49	11
61	888	942	<50	NA	NA	NA
62	836	1236	267	NA	NA	NA
63	883	333	<50	EFV; IND	89	78
Median	599	690	–	–	86	46

^aHIV RNA copies per milliliter of plasma.

3TC, Lamivudine; ABA/ABC, Abacavir; ATA, Atazanavir; AZT, Zidovudine; D4T, Stavudine; DEL, Delavirdine; EFV, Efavirenz; IND, Indinavir; KAL, Kaletra; LOP, Lopinavir; NA, not available; NEV, Nevirapine; RIT, Ritonavir; SAQ, Saquinavir; TENO, Tenofovir.

DNA were higher in CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cells compared with those in CXCR3⁺CCR6⁻ T cells at day 3 post-infection (Fig. 3D). Consistent with their expression of CXCR4, CCR4⁺CCR6⁻ T cells were highly permissive to infection with X4 HIV (Fig. 3C, 3D). Of particular interest, CXCR3⁺CCR6⁻ T cells were relatively resistant to both R5 and X4 HIV replication (Fig. 3A–D), and levels of integrated R5 and X4 HIV DNA were significantly lower compared with those of CXCR3⁺CCR6⁺ T cells at days 3 and 12 postinfection (Fig. 3E, 3F) (paired *t* test *p* values < 0.05, CXCR3⁺CCR6⁺ versus CXCR3⁺CCR6⁻ T cells). This difference was observed despite the fact that CXCR3⁺CCR6⁻ T cells expressed moderate levels of CCR5 and CXCR4 *ex vivo* (Fig. 2). Also, there was no difference in CCR5 and CXCR4 expression between CXCR3⁺CCR6⁻ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cells at day 3 post-stimulation (Supplemental Fig. 2). Moreover, T cell proliferation in culture was similar in the four T cell subsets as shown by a CFSE proliferation assay (Supplemental Fig. 3). In other studies, CXCR3⁺CCR6⁻ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cells were infected with two other HIV molecular clones (i.e., R5 YU2 and X4 NDK strains) and results confirmed preferential HIV replication in CXCR3⁺CCR6⁺ T cells (data not shown). These results demonstrate the following: 1) CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cells are highly permissive to R5 and X4 HIV replication, 2) CCR4⁺CCR6⁻ T cells are permissive to X4 but not R5 HIV strains, and 3) CXCR3⁺CCR6⁻ T cells are relatively resistant to both R5 and X4 HIV replication *in vitro*. Considering the critical role of R5 HIV strains during natural HIV transmission (1), CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cells may contribute significantly to HIV disease pathogenesis *in vivo*.

CCR6⁺ T cells harbor high levels of integrated HIV DNA, and their frequency is diminished in HIV-infected subjects under ART

Previous studies demonstrated that CCR6⁺ T cells disappeared from the peripheral blood of HIV-infected patients as the disease progressed (15). Depletion of CCR6⁺ T cells in HIV-infected

subjects (15) may be a consequence of their selective infection by HIV *in vivo*. To test this hypothesis, we quantified integrated HIV DNA levels in memory CCR6⁺ and CCR6⁻ T cells and analyzed the frequency of these cells in HIV-infected and uninfected individuals. Two HIV-infected patient cohorts were available for this study: 1) RI w/o ART (*n* = 19) (Table I) and 2) CI on ART (*n* = 23) (Table II). Levels of integrated HIV DNA were quantified by real-time PCR in matched naive (CD45RA⁺) and memory (CD45RA⁻) CCR6⁺ and CCR6⁻ CD4⁺ T cell subsets from six RI w/o ART subjects (Fig. 4A, 4B). In six out of six HIV-infected subjects tested, levels of integrated HIV DNA were higher in memory CCR6⁺ compared with those in CCR6⁻ T cells (Fig. 4A). Moreover, integrated HIV DNA levels were significantly higher in memory CCR6⁺ compared with those in naive CD4⁺ T cells (Fig. 4B). Increased levels of integrated HIV DNA in memory CCR6⁺ T cells coincided with a significant decrease in the frequency of CCR6⁺ T cells in the peripheral blood of HIV-infected patients, both RI w/o ART and CI on ART, as compared with that in uninfected controls (Fig. 4C). These results demonstrate for the first time that circulating memory CCR6⁺ T cells are notable cellular sites for HIV integration *in vivo* and suggest that depletion of these cells may be related in part to their increased susceptibility to HIV replication.

Frequency of CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cells is diminished in HIV-infected subjects under viral-suppressive therapy

To investigate a potential link between HIV infection *in vitro* and depletion *in vivo*, the frequencies of CCR4⁺CCR6⁺, CCR4⁺CCR6⁻, CXCR3⁺CCR6⁺, and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells were analyzed in RI w/o ART and CI on ART HIV-infected subjects (Tables I, II) and uninfected controls. The frequencies of CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cell subsets were slightly but significantly decreased in CI on ART but not

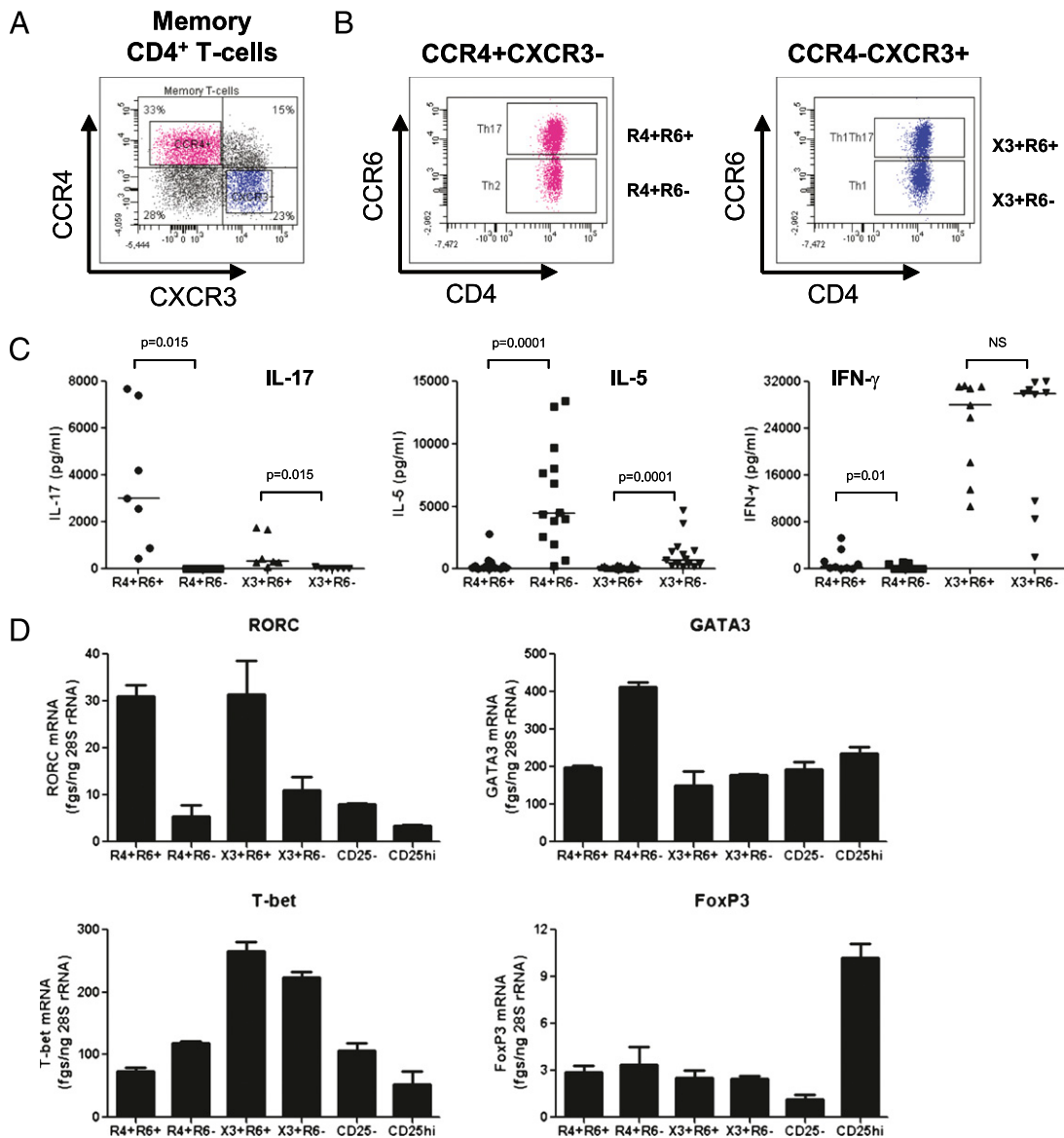


FIGURE 1. The chemokine receptors CCR4, CXCR3, and CCR6 identify CD4⁺ T cells with distinct Th17, Th2, Th1Th17, and Th1 profiles. PBMCs from uninfected individuals were stained with CD3, CD4, CD45RA, CCR4, CXCR3, and CCR6 Abs and then analyzed by polychromatic flow cytometry. *A*, CCR4 and CXCR3 expression identified four subsets of memory (CD45RA⁻) CD4⁺ T cells, including CCR4⁺CXCR3⁻ and CCR4⁻CXCR3⁺ subsets. *B*, CCR6 expression distinguished four cell subsets within the CCR4⁺CXCR3⁻ and CCR4⁻CXCR3⁺ T cell subsets. Results in *A* and *B* are representative of experiments performed with cells from >10 different donors. *C*, *D*, T cells identified in *B* were sorted by flow cytometry and then stimulated via CD3/CD28 for 3 d. *C*, Cytokine production in culture supernatants was quantified by ELISA. *D*, Shown is real-time RT-PCR quantification of lineage-specific transcription factors. Results in *C* were obtained with cells from $n = 7$ (IL-17), $n = 14$ (IL-5), and $n = 9$ (IFN- γ) different donors. Wilcoxon signed-rank test p values are indicated in the figure. Horizontal lines indicate median values. Results in *D* are from one experiment representative of experiments performed with cells from $n = 4$ (for Th17, Th2, Th1Th17, and Th1) and $n = 2$ different donors (for CD25⁺ and CD25⁻ CD4⁺ T cells) (mean \pm SD of duplicate wells).

RI w/o ART HIV-infected subjects compared with those in controls (Fig. 5A), indicating that this frequency alteration occurs only later during disease progression despite viral-suppressive therapy. In addition, a longitudinal follow-up in four CI on ART subjects demonstrated persistent reduced frequencies of circulating CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cell subsets despite efficient control of HIV replication and CD4 counts within a normal range (≥ 500 cells per microliter) under ART (Supplemental Fig. 4). However, the frequency of CXCR3⁺CCR6⁻ T cells was significantly increased in both RI w/o ART and CI on ART HIV-infected subjects compared with those in controls (Fig. 5A) and the four CI on ART subjects followed up longitudinally (Supplemental Fig. 4), which was consistent with the relative resistance of these cells to HIV infection in vitro (Fig. 3).

Unexpectedly, the frequency of CCR4⁺CCR6⁻ T cells was significantly decreased in RI w/o ART HIV-infected subjects compared with that in controls but increased compared with that in CI on ART subjects (Fig. 5A). CCR4⁺CCR6⁻ and CXCR3⁺CCR6⁻ T cell counts positively correlated with CD4 counts in CI on ART HIV-positive subjects, whereas there was a weak or not significant correlation between CD4 counts and the number of circulating CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cells (Fig. 5B). Thus, ART is associated with a tendency for normalization in the frequencies of CCR4⁺CCR6⁻ and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells but not CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cells.

Very recent studies reported a Th17/Th1 switch during HIV/SIV infection (5, 28). Consistent with these studies, the ratios between CCR4⁺CCR6⁺ (Th17 profile) and CXCR3⁺CCR6⁻ (Th1 profile)

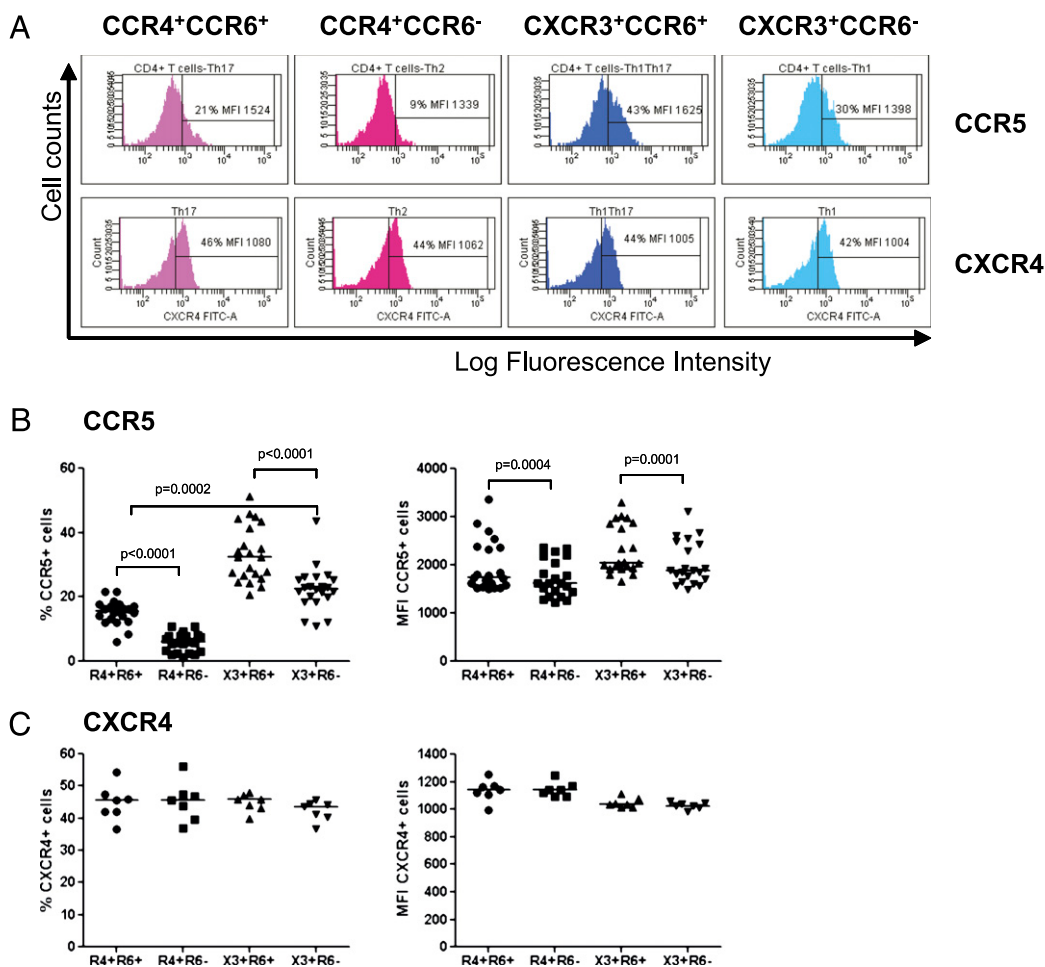


FIGURE 2. The HIV coreceptor CCR5 is differentially expressed on CCR4⁺CCR6⁺, CCR4⁺CCR6⁻, CXCR3⁺CCR6⁺, and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells. *A–C*, The expression of the HIV coreceptors CCR5 and CXCR4 was analyzed in CCR4⁺CCR6⁺, CCR4⁺CCR6⁻, CXCR3⁺CCR6⁺, and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells gated as in Fig. 1*A* and 1*B*. *A*, Shown are histograms of CCR5 and CXCR4 expression in T cell subsets from one representative donor; *B*, statistical analysis of CCR5 expression (percentage and mean fluorescence intensity) in T cell subsets from *n* = 13 different donors; and *C*, statistical analysis of CXCR4 expression (percentage and mean fluorescence intensity) in T cells from *n* = 7 different donors. Wilcoxon signed-rank test *p* values are indicated in the figure. Horizontal lines indicate median values.

T cells and between CXCR3⁺CCR6⁺ (Th1Th17 profile) and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells demonstrated a preponderance of the Th1 profile in both RI w/o ART and CI on ART HIV-infected subjects compared with that in controls (Fig. 5*B*). Together, these results demonstrate that the frequency of circulating CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cell subsets is diminished in the peripheral blood of CI subjects, despite an efficient control of HIV replication and preservation of CD4 counts under ART. Depletion of CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cell subsets is likely due to their increased susceptibility to HIV infection. In contrast, depletion of CCR4⁺CCR6⁻ T cells, which are infected with X4 but not R5 HIV in vitro, might be the consequence of a bystander mechanism of CD4⁺ T cell depletion in HIV-infected subjects, as previously documented (1, 29, 30).

CCR4⁺CCR6⁺, CCR4⁺CCR6⁻, CXCR3⁺CCR6⁺, and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells exhibit differential cytokine/chemokine profiles

To further characterize the potential roles of these four T cell subsets in HIV pathogenesis, cytokine/chemokine profiles were investigated. Culture supernatants were screened for the expression of 60 soluble factors using the Cytokine Antibody Array VI (RayBiotech) and demonstrated differential expression of IL-10, IL-5, CCL20/MIP-3α, CCL5/RANTES, and TNF-α (Fig. 6*A*). IL-10 was highly produced by

CXCR3⁺CCR6⁻ T cells, IL-5 was selectively produced by the CCR4⁺CCR6⁻ T cells, and TNF-α and CCL20 were produced at higher levels in CXCR3⁺CCR6⁺ T cells compared with those in the other three T cell subsets (Fig. 6*A*). The CCR5 binding chemokine CCL5 was expressed at high levels in CXCR3⁺CCR6⁻ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cells and low levels in CCR4⁺CCR6⁺ and CCR4⁺CCR6⁻ T cells. Screening for 60 other soluble factors using the Cytokine Antibody Array VII demonstrated high production of the CCR5 ligands CCL3 and CCL4 by CXCR3⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells, whereas IL-8 was preferentially expressed by CCR4⁺CCR6⁺ T cells (data not shown). Levels of IL-10, TNF-α, CCL20, IL-2, CCL3, and CCL5 were further quantified by ELISA or Cytometric Bead Array (Fig. 6*B*).

The production of IL-10 (a cytokine produced by different cells subsets including effector CD4⁺ T cells (31, 32) and a potent inhibitor of HIV replication (33–37)) was higher in CXCR3⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells compared with that in CCR4⁺CCR6⁺ and CCR4⁺CCR6⁻ T cells (Fig. 6*B*). Only in 5 out of 11 donors IL-10 levels were significantly higher in CXCR3⁺CCR6⁻ T cells compared with those in CXCR3⁺CCR6⁺ T cells (Supplemental Fig. 5). The production of TNF-α [a proinflammatory cytokine that enhances HIV replication (38)] was the highest in CXCR3⁺CCR6⁺ T cells (Fig. 6*B*). Of interest, the TNF-α/IL-10 ratio was significantly higher in CXCR3⁺CCR6⁺ T cells compared with that in CXCR3⁺CCR6⁻

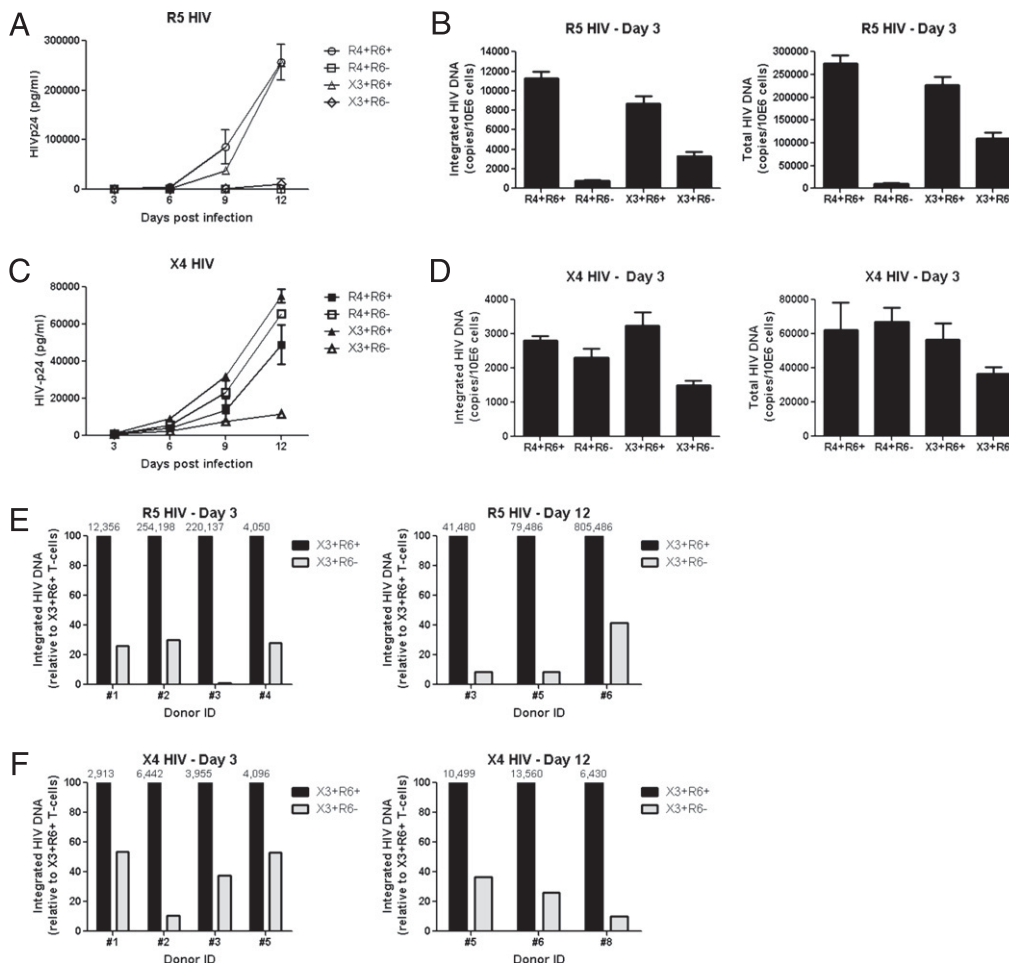


FIGURE 3. CCR4⁺CCR6⁺, CCR4⁺CCR6⁻, CXCR3⁺CCR6⁺, and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells exhibit differential susceptibility to R5 and X4 HIV replication. FACS sorted T cell subsets were stimulated via CD3/CD28 for 3 d and exposed to R5 (NL4.3BaL) or X4 (NL4.3) HIV strains for 3 h at 37°C. Unbound virus was removed by extensive washing, and cells were cultured at a concentration of 10⁶ cells per milliliter in RPMI 1640 with 10% FBS and IL-2 (5 ng/ml). *A, C*, Supernatants were harvested every 3 d postinfection, and levels of HIV p24 were quantified by ELISA. *B, D, E, F*, Integrated and total HIV DNA levels were quantified by real-time PCR at days 3 and 12 postinfection. Shown are (*A–D*) HIV-p24 levels or HIV DNA copy numbers from one experiment representative of results obtained with cells from more than three different donors (mean ± SD of triplicate wells) and (*E, F*) relative integrated HIV DNA levels in CXCR3⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁻ T cell subsets from three or four different donors. (*E, F*) Values above bars are integrated HIV DNA copy numbers per 10⁶ cells in CXCR3⁺CCR6⁺ T cells.

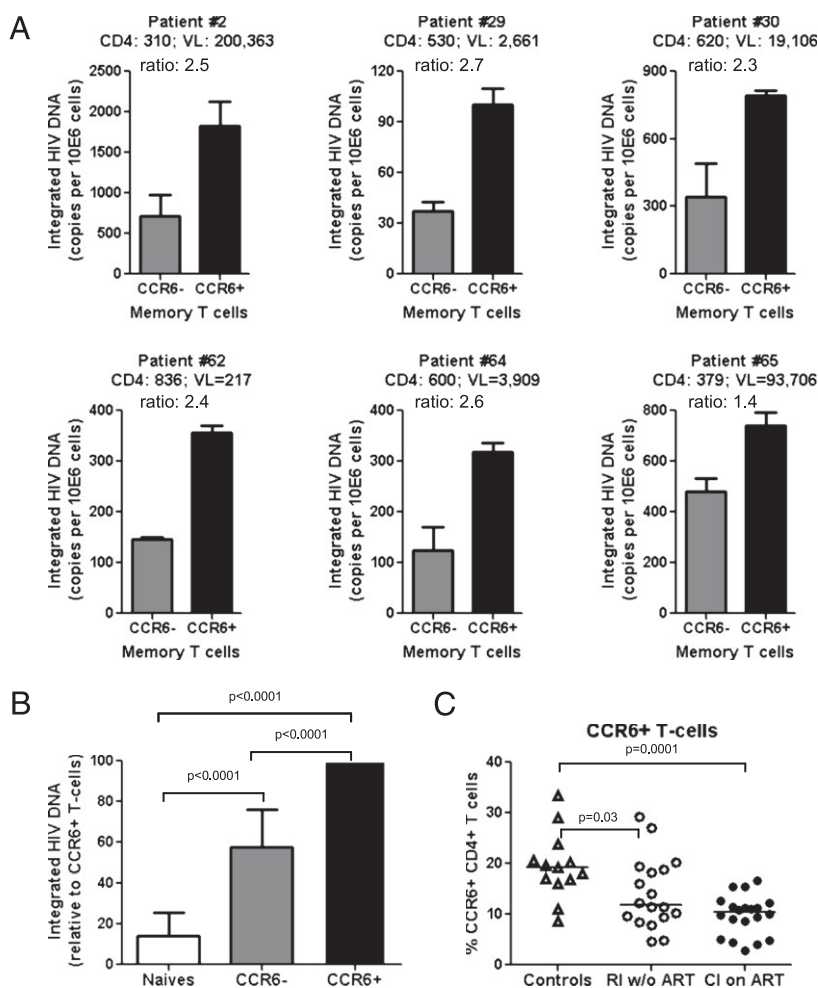
T cells (Fig. 6C), suggesting that the balance between TNF- α and IL-10 may control the degree of permissiveness to HIV replication in these cells. CCL20 (a Th17 marker (39) and a CCR6 ligand (16, 40)) was produced at high and moderate levels by CXCR3⁺CCR6⁺ and CCR4⁺CCR6⁺ T cells, respectively, but not by CCR4⁺CCR6⁻ and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells (Fig. 6B), suggesting the ability of CXCR3⁺CCR6⁺ and CCR4⁺CCR6⁺ T cells to attract other CCR6⁺ T cells to sites of inflammation. CCR5 binding chemokines CCL3, CCL4, and CCL5 were produced at similarly high levels by CXCR3⁺CCR6⁻ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cells but at low to undetectable levels by CCR4⁺CCR6⁺ and CCR4⁺CCR6⁻ T cells (Fig. 6B; data not shown). Finally, IL-2 production was similarly high in CXCR3⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells, moderate in CCR4⁺CCR6⁻ T cells, and low to undetectable in CCR4⁺CCR6⁺ T cells (Fig. 6B). Together, these results demonstrate distinct cytokine profiles in T cells with differential expression of CCR4, CXCR3, and CCR6 (Supplemental Fig. 5) with relevance for their role in HIV pathogenesis. These results suggest that high levels of TNF- α , CCL20, or both by CXCR3⁺CCR6⁺ and CCR4⁺CCR6⁺ T cells may contribute to the increased ability of these cells to support HIV replication and to attract other CCR6⁺ T cells at sites of HIV replication in vivo. In contrast, the relative resistance of CXCR3⁺CCR6⁻ T cells to HIV replication might be linked to a de-

creased TNF- α /IL-10 ratio, a “self protection” mechanism against R5 HIV entry via autocrine production of CCR5 ligands, or both (41, 42).

CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ subsets exhibit gut- and lymph node-homing potential

The gut and vaginal mucosa are major sites for HIV replication (43, 44). The CCR6⁺ T cells are attracted to these sites (40, 45) and play a critical role in HIV mucosal transmission (16, 46). In addition, recruitment of T cells into lymph nodes via CCR7 (47) significantly contributes to HIV pathogenesis (48). To further characterize the trafficking potential of CCR4⁺CCR6⁺, CCR4⁺CCR6⁻, CXCR3⁺CCR6⁺, and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells, the expression of the gut-homing α 4 β 7 integrin (49) and the lymph node-homing chemokine receptor CCR7 (47) was analyzed on CD4⁺ T cell subsets from uninfected individuals. The α 4 chain was similarly expressed at >95% on the four cell subsets (data not shown), whereas the β 7 chain was expressed at relatively high levels on CXCR3⁺CCR6⁺ T cells, moderate levels on CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells, and low levels on CCR4⁺CCR6⁻ T cells (Fig. 7A). CCR7 was expressed on the four cell subsets, with the highest levels detected on CCR4⁺CCR6⁻ and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells (Fig. 7B). Collectively these results

FIGURE 4. CCR6⁺ T cells harbor relatively high levels of integrated HIV DNA, and their frequency is diminished in HIV-infected subjects. *A, B*, Matched naive (CD45RA⁺) and memory (CD45RA⁻) CCR6⁺ and CCR6⁻ T cell subsets were sorted by MACS and FACS from PBMCs of viremic treatment-naive HIV-infected subjects (Table I). Levels of integrated HIV DNA were quantified by real-time nested PCR. Shown are (*A*) integrated HIV DNA copy numbers per 10⁶ CCR6⁺ and CCR6⁻ T cells (mean ± SD of triplicate wells) and (*B*) relative integrated HIV DNA levels in naive and memory CCR6⁺ and CCR6⁻ T cells (mean ± SD, *n* = 6). CD4 counts (cells per microliter), plasma viral loads (HIV RNA copies per milliliter), and paired *t* test *p* values are indicated in the figure. *C*, The frequency of memory CCR6⁺ T cells was analyzed in recently RI w/o ART (*n* = 18) and CI on ART (*n* = 20) individuals (Tables I and II) as compared with that in uninfected subjects (*n* = 13). Mann-Whitney *U* test *p* values are indicated in the figures. Horizontal lines indicate median values.



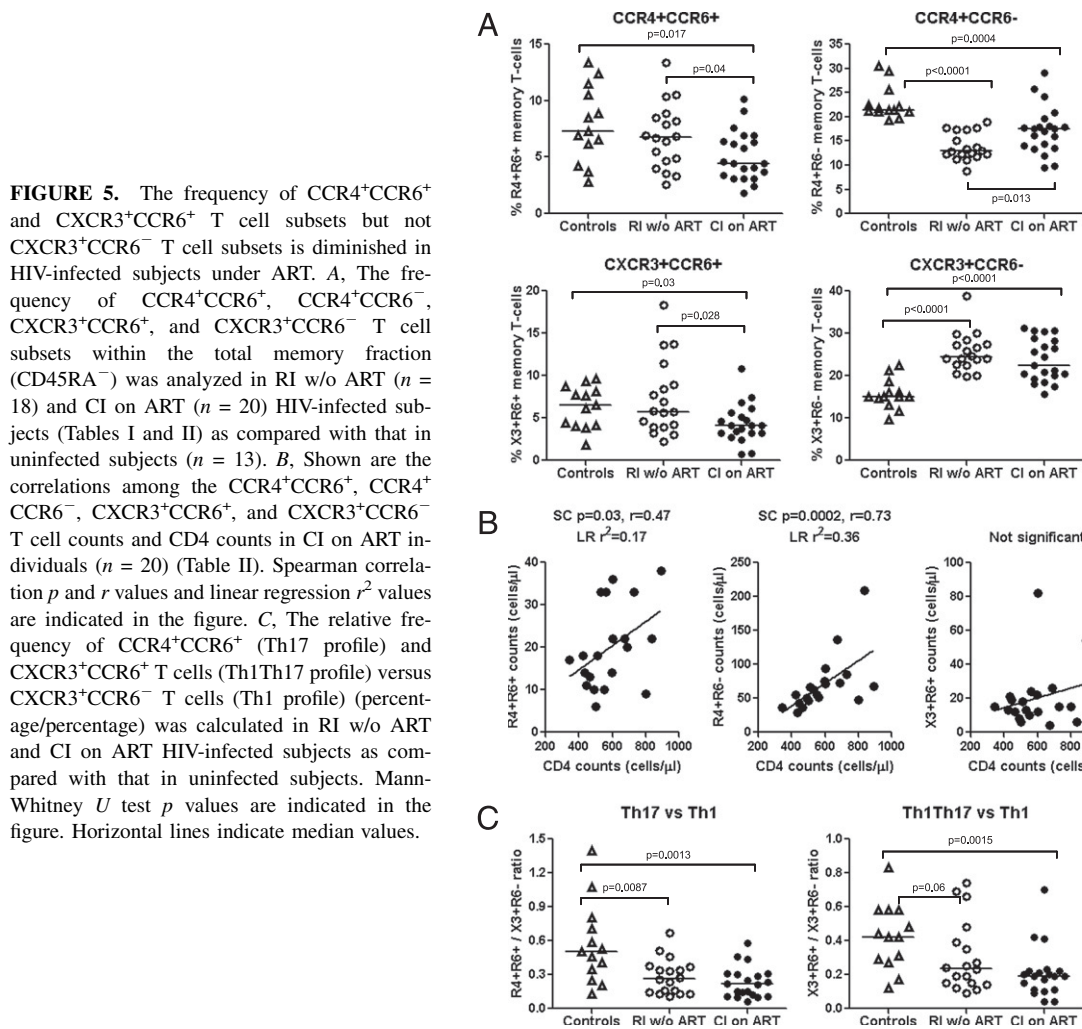
suggest that a large fraction of CXCR3⁺CCR6⁺ T cells (median of 20%) have the potential to be recruited into the gut and vaginal mucosa via $\alpha 4\beta 7$ and that a considerable fraction of each of the four subsets (median >37%) are CCR7⁺ central memory T cells with the potential be recruited into lymph nodes, which are major sites for HIV replication in vivo (43, 46).

Discussion

In this study, we revealed the distinct susceptibility to HIV infection of four CD4⁺ T cell subsets recently identified based on their differential expression of the homing receptors CCR4, CXCR3, and CCR6 and lineage-specific markers (Fig. 8). We demonstrated that CCR4⁺CCR6⁺ (Th17 profile) and CXCR3⁺CCR6⁺ T cells (Th1Th17 profile) were highly permissive to R5 and X4 HIV infection, that CCR4⁺CCR6⁻ T cells (Th2 profile) were susceptible to X4 HIV replication only, and that CXCR3⁺CCR6⁻ T cells (Th1 profile) were relatively resistant to both R5 and X4 HIV replication in vitro. Circulating CCR6⁺ T cells harbored the highest levels of integrated HIV DNA in treatment-naive HIV-infected subjects. A high-throughput analysis of cytokine profiles identified CXCR3⁺CCR6⁺ T cells as a major source of TNF- α and CCL20 and demonstrated a low TNF- α /IL-10 ratio in CXCR3⁺CCR6⁻ T cells. Finally, we showed that CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cells exhibited gut- and lymph node-homing potential. Collectively, our study identified circulating CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cells as highly permissive and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells as relatively resistant to HIV infection and demonstrated that the frequency of these subsets was significantly altered in HIV-infected subjects despite viral-suppressive ART.

Recent studies identified the chemokine receptors CCR4, CXCR3, and CCR6 as surface markers for CD4⁺ T cells with distinct cytokine profiles and lineage-specific transcription factor expression (12, 14, 50–52) and so established a link between CD4⁺ T cell trafficking potential and immunologic function. In the current study, we confirmed first that 1) CCR4⁺CCR6⁺ T cells produced IL-17 and expressed the Th17-specific transcription factor RORC, 2) CCR4⁺CCR6⁻ T cells produced IL-5 and expressed the Th2-specific transcription factor GATA3, 3) CXCR3⁺CCR6⁻ T cells produced IFN- γ and expressed the Th1-specific transcription factor T-bet, and 4) CXCR3⁺CCR6⁺ T cells produced IL-17 and IFN- γ and expressed the transcription factors T-bet and RORC. Our findings, together with those published by other groups (14, 50–52), support the idea that chemokine receptors are surface markers for CD4⁺ T cell subsets with distinct lineage-specific transcriptional programs.

Studies by us and others demonstrated that CCR4 expression is relatively high on T cells infected with X4 HIV in vitro (22) and that CXCR3⁺ T cells preferentially express the HIV coreceptor CCR5 (12). In this study, we report that CCR5 is expressed at high levels on CXCR3⁺CCR6⁺ T cells, moderate levels on CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells, and low to undetectable levels on CCR4⁺CCR6⁻ T cells. In contrast, CXCR4, the second major HIV coreceptor (25–27), was similarly expressed on these four subsets. Expression of CCR5 and CXCR4 on CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cells was associated with permissiveness of these cells to R5 and X4 HIV replication in vitro, whereas CXCR4 but not CCR5 expression on CCR4⁺CCR6⁻ T cells was in line with their permissiveness to X4 but not R5 HIV strains. These



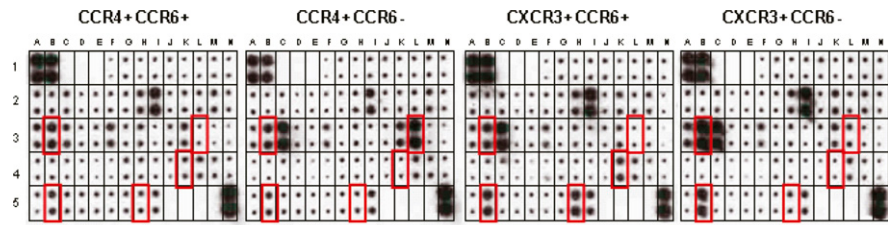
results are consistent with some but not all of the previous studies performed on Th2 clones (42, 53). Of particular interest, we identified CXCR3⁺CCR6⁻ T cells as relatively resistant to R5 and X4 HIV replication in vitro despite expression of both HIV coreceptors. A report identified a CCR5⁺CCR7⁻CD45RO⁻CD45RA⁺ T cell subset resistant to R5 but not to X4 HIV replication due to a postentry restriction mechanism (54). CCR5⁺CCR7⁻CD45RO⁻CD45RA⁺ T cells are phenotypically distinct from CXCR3⁺CCR6⁻ T cells, and to our best knowledge, our work is the first characterization of a primary CCR5⁺CXCR4⁺ T cell subset resistant to both R5 and X4 HIV infection. Infection by R5 HIV strains is a critical step in primary infection (44, 48, 55), whereas X4 strains emerge later during disease progression (1). Thus, CCR4⁺CCR6⁻ T cells may contribute to the emergence of X4 HIV strains, whereas CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cells may be major players during HIV infection in vivo because they are permissive to both R5 and X4 HIV strains.

The CCR6-CCL20 axis is essential for the maintenance of mucosal homeostasis (40, 56) and contributes to HIV/SIV pathogenesis (16, 28, 40, 45, 56–58). CCR6 might also mediate migration of the CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cells into different peripheral tissues expressing CCL20, including the gut and vaginal mucosa, which are major sites for HIV replication in vivo (43, 59). In addition to expressing CCR6, we found that CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cells selectively produce the CCR6 ligand CCL20, previously identified as a Th17 marker

(39). Furthermore, we showed that CXCR3⁺CCR6⁺, CCR4⁺CCR6⁺, and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells expressed high to moderate levels of the α 4 β 7 integrin, which in addition to mediating gut-trafficking (60) binds R5 HIV gp120 (61). The expression of CCR5 and α 4 β 7 integrin on CXCR3⁺CCR6⁺ T cells, and to a lesser extent on CCR4⁺CCR6⁺ T cells, may render these cells extremely prone to R5 HIV binding and subsequent replication. Thus, CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cells, by their permissiveness to HIV infection and ability to produce CCL20, have the potential to recruit more CCR6⁺ T cells at anatomic sites of HIV replication (Fig. 8).

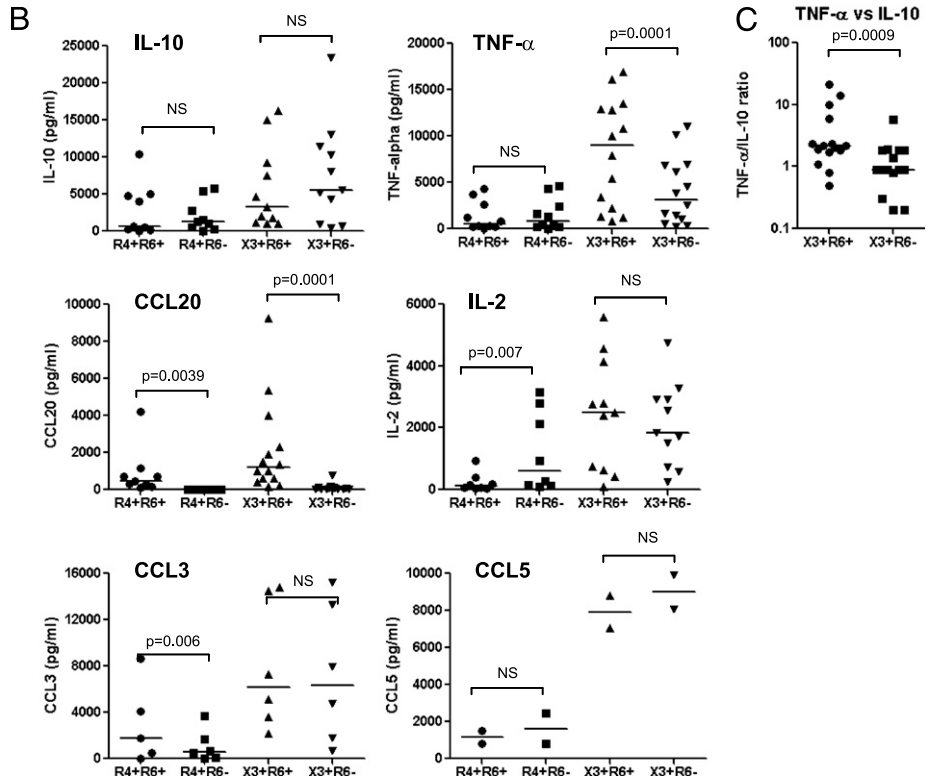
We demonstrated that CCR6⁺ T cells compared with CCR6⁻ T cells harbored higher levels of integrated HIV DNA in HIV-infected subjects. In addition, we found that the frequency of CCR6⁺ T cells was significantly reduced in HIV-infected subjects, RI w/o ART and CI on ART subjects compared with uninfected individuals. This is consistent with a previous report that CCR6⁺ T cells disappeared from the peripheral blood of HIV-infected patients as HIV disease progressed and underwent apoptosis in the spleen (15). The observation that CCL20 levels in the gut mucosa diminish significantly upon SIV infection (28, 58) suggests that CCR6⁺ T cells may not infiltrate these sites via CCR6-CCL20 interaction in HIV-infected subjects. However, we cannot exclude the possibility that CCR6⁺ T cells infiltrate in other tissues via CCL20-independent mechanisms. The finding that total CCR6⁺ T cells but not CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cell subsets

A Cytokine Antibody Array VI – screening for 60 soluble factors



Positive controls: A1, B1, and N5
Negative controls: C1, D1, E1, J1, K1, and L1
Positive cytokines: GDNF (H2), GM-CSF (I2), IL-2 (I3), IFN- γ (K2), IGF-1 (A3), **IL-10 (B3)**, IL-13 (C3), IL-4 (K3), **IL-5 (L3)**, **CCL20/MIP-3alpha (K4)**, **CCL5/RANTES (B5)**, **TNF- α (H5)**, and TNF-beta (I5)

FIGURE 6. CCR4⁺CCR6⁺, CCR4⁺CCR6⁻, CXCR3⁺CCR6⁺, and CXCR3⁺CCR6⁻ T cell subsets exhibit differential cytokine/chemokine profiles. Memory CCR4⁺CCR6⁺, CCR4⁺CCR6⁻, CXCR3⁺CCR6⁺, and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells were stimulated via CD3/CD28 for 3 d. *A*, Culture supernatants were screened for 60 soluble factors using the Cytokine Antibody Array VI (RayBiotech). Shown are results from one experiment representative of experiments performed with cells from two different donors. *B*, Levels of IL-10 ($n = 11$), TNF- α ($n = 14$), CCL20/MIP-3 α ($n = 14$), CCL3/MIP-1 α ($n = 6$), and IL-2 ($n = 12$) were quantified by ELISA, whereas levels of CCL5/RANTES ($n = 2$) were quantified in cell supernatants by Cytometric Bead Array (mean \pm SD). *C*, Shown are TNF- α /IL-10 ratios in CXCR3⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁻ T cell subsets. Wilcoxon signed-rank test p values are indicated in the figure. Horizontal lines indicate median values.



were decreased in frequency in RI w/o ART patients compared with controls highlights the possibility that other CCR6⁺ T cell subsets (i.e., the yet uncharacterized CCR4⁻CXCR3⁻CCR6⁺ or CCR4⁺CXCR3⁺CCR6⁺ T cell subsets) are subject to depletion during HIV primary infection. However, a decreased frequency of

circulating CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cells is observed in CI subjects as reflected by our transversal and a longitudinal study. This may explain deficient immunity against *M. tuberculosis* (62) and *C. albicans* during HIV infection (63), because these T cell subsets are specific for these two pathogens (14). Also, both RI and CI HIV-positive subjects express significantly lower CCR4⁺CCR6⁺ (Th17 profile) versus CXCR3⁺CCR6⁻ (Th1 profile) and CXCR3⁺CCR6⁺ (Th1/Th17 profile) versus CXCR3⁺CCR6⁻ (Th1 profile) ratios when compared with controls, thus supporting earlier findings that CD4⁺ T cells in HIV-infected patients are skewed toward a Th1 phenotype to the detriment of Th17 cells (5, 28). A skewed Th17/Th1 response may lead to microbial translocation, which is a cause of chronic immune activation in HIV-infected patients (43, 59, 64).

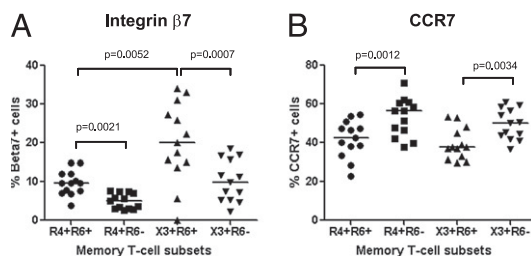


FIGURE 7. CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cell subsets exhibit gut- and lymph node-homing potential. Memory CCR4⁺CCR6⁺, CCR4⁺CCR6⁻, CXCR3⁺CCR6⁺, and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells from uninfected individuals were analyzed for the expression of (A) the integrin β 7 and (B) CCR7. Shown are expression values in $n = 13$ HIV-uninfected subjects. Wilcoxon signed-rank test p values are indicated in the figure. Horizontal lines indicate median values.

The frequency of circulating CCR4⁺CCR6⁻ T cells was rapidly and notably decreased in HIV-infected subjects despite the fact that these cells were only permissive to X4 HIV strains that emerge later during disease progression (65). This phenomenon might be explained by either a bystander killing of CD4⁺ T cells in HIV-infected subjects (1, 29, 30) or a redistribution of these cells in peripheral tissues. Finally, we found an increased frequency of CXCR3⁺CCR6⁻ T cells in HIV-infected subjects compared with controls;

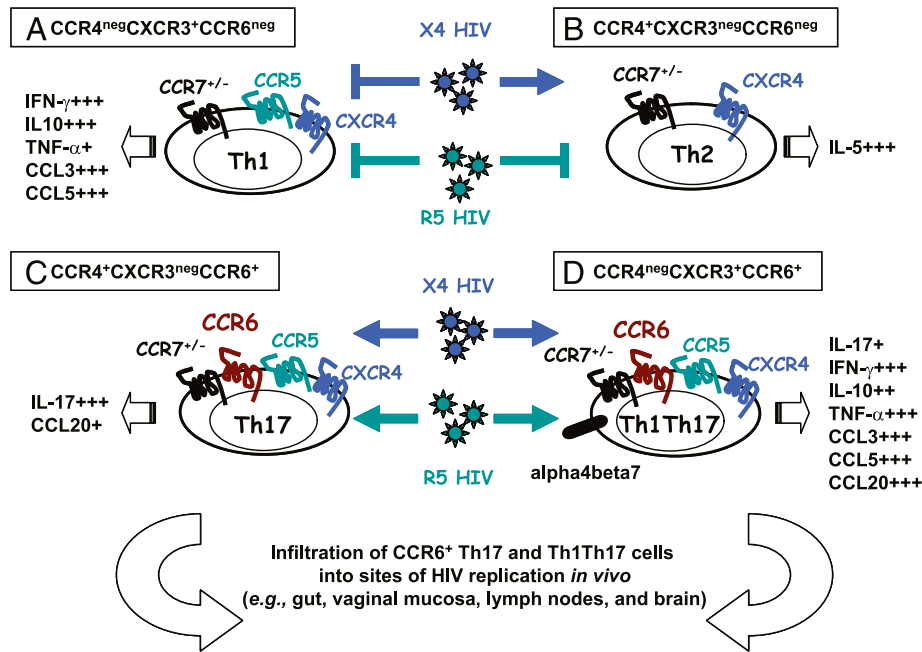


FIGURE 8. Proposed model for the contribution of CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cell subsets to HIV pathogenesis. A, CXCR3⁺CCR6⁻ T cells (Th1 profile) are resistant to R5 and X4 HIV replication. B, CCR4⁺CCR6⁻ T cells (Th2 profile) are permissive to X4 HIV only. C, CCR4⁺CCR6⁺ (Th17 profile) and (D) CXCR3⁺CCR6⁺ T cell subsets (Th1Th17 profile) are highly permissive to R5 and X4 HIV strains and have the potential to be recruited to the gut via the $\alpha 4\beta 7$ integrin (49) and CCR6 (45), the lymph nodes via CCR7 (47), and the brain via CCR6 (71). They produce the CCR6 ligand CCL20, a chemokine critical for HIV dissemination from the site of portal entry (16). In addition, CXCR3⁺CCR6⁺ T cells are a major source of TNF- α , a proinflammatory cytokine previously linked to the positive regulation of HIV replication (38). We propose a model in which CCR4⁺CCR6⁺ Th17 and CXCR3⁺CCR6⁺ Th1Th17 T cells significantly contribute to HIV-1 pathogenesis by their ability to promote viral replication and attract more CCR6⁺ T cells at sites of HIV replication *in vivo*.

this is consistent with their resistance to R5 and X4 HIV replication *in vitro*. Whether CXCR3⁺CCR6⁻ T cells play a beneficial or a deleterious role in HIV pathogenesis remains unknown. Overall, our findings reveal a profound alteration of CD4⁺ T cell heterogeneity in HIV-infected subjects despite viral-suppressive ART that might impact on the quality of T cell responses against HIV.

Successful HIV replication requires a large number of host genes (66), with cytokines and chemokines regulating the state of T cell susceptibility to HIV infection. Proinflammatory cytokines such as TNF- α trigger nuclear translocation of NF- κ B, which is critical for the initiation of HIV LTR transcription (38, 67). In contrast, the immunosuppressive cytokine IL-10 negatively regulates HIV replication by interfering with CCR5 and CXCR4 expression and cell responsiveness to TCR triggering (33–36). The present study demonstrated that IFN- γ , IL-10, TNF- α , IL-2, CCL3, and CCL5 were mainly produced by CXCR3⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells, whereas CCR4⁺CCR6⁺ and CCR4⁺CCR6⁻ T cells were sources of IL-17 and IL-5, respectively (Supplemental Fig. 5). Of particular interest, CXCR3⁺CCR6⁺ T cells were identified in this study as a major source of TNF- α , with a TNF- α /IL-10 ratio significantly higher compared with that of CXCR3⁺CCR6⁻ T cells. Thus, permissiveness to HIV replication in CXCR3⁺CCR6⁺ versus CXCR3⁺CCR6⁻ T cells might be controlled at least in part by the TNF- α /IL-10 balance. Other studies described a synergy between TNF- α and IL-10 (68), but its relevance for HIV replication *in vivo* remains unknown. Originally considered a Th2 cytokine, IL-10 is produced by a large number of cells, including Tregs (69) and Th1 and Th17 cells (31, 32, 69). The CXCR3⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells lacked the expression of FoxP3 (14, 70), a transcription factor specific for Tregs. Therefore CXCR3⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells resemble recently described Th1/IL-10 cells (31, 32, 69).

The CCR5 binding chemokines prevent R5 HIV gp120 binding on CCR5, therefore limiting subsequent HIV entry and replication in T cells (25, 41). Although both CXCR3⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells produce CCR5 ligands, the existence of a preferential block in CCR5-mediated HIV entry (41) in CXCR3⁺CCR6⁻ T cells cannot be excluded and needs to be investigated at the single-cell level. Of particular interest, CXCR3⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁻ T cells produced similar levels of IL-2 and exhibited a similar ability to proliferate, thus excluding the possibility that limited HIV replication in CXCR3⁺CCR6⁻ T cells is related to deficient TCR engagement.

In summary, by using CCR4, CXCR3, and CCR6 as surface markers, we identified four primary CD4⁺ T cell subsets as either permissive or resistant to HIV infection (Fig. 8) and revealed a profound and previously unrecognized alteration in CD4⁺ T cell heterogeneity in HIV-infected subjects despite undetectable viral loads and preserved CD4 cell counts under viral-suppressive ART. The CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cells have the potential to be recruited into the gut and vaginal mucosa as well as the brain via a CCR6-CCL20-dependent mechanism (16, 45, 71) and thus might significantly contribute to HIV dissemination and persistence by attracting other CCR6⁺ T cells at sites of viral replication *in vivo*. Our results open the path for future studies on the identification of new molecular determinants of HIV restriction in CXCR3⁺CCR6⁻ T cells and may suggest new therapeutic strategies aimed at HIV eradication by interfering with HIV replication in CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ T cells.

Acknowledgments

We thank Sylvain Gimmig and Laurence Lejeune (Flow Cytometry Core Facility, Research Centre, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Saint-Luc Hospital, Montréal, Quebec, Canada) for expert technical

support with polychromatic flow cytometry analysis and sorting, Anne Vassal for help with ethical approvals and informed consents, Mario Le-gault, Maryse Lainesse, and Véronique Lafontaine for the management of HIV-infected patient cohorts, and Dr. Aiken and Dr. Gabuzda for their gift of HIV plasmids. We also thank Dr. Gabuzda, Dr. Hocini, Dr. Shoukry, Dr. Landry, Heather Wilson, and Heather Yampolsky for critical reading of the manuscript and valuable discussions. Finally, we acknowledge HIV-infected and uninfected donors for their gift of leukapheresis.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Douek, D. C., L. J. Picker, and R. A. Koup. 2003. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 265–304.
- Blankson, J. N., D. Persaud, and R. F. Siliciano. 2002. The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu. Rev. Med.* 53: 557–593.
- Geeraert, L., G. Kraus, and R. J. Pomerantz. 2008. Hide-and-seek: the challenge of viral persistence in HIV-1 infection. *Annu. Rev. Med.* 59: 487–501.
- Douek, D. C., J. M. Brechley, M. R. Betts, D. R. Ambrozak, B. J. Hill, Y. Okamoto, J. P. Casazza, J. Kuruppu, K. Kunstman, S. Wolinsky, et al. 2002. HIV preferentially infects HIV-specific CD4⁺ T cells. *Nature* 417: 95–98.
- Brechley, J. M., M. Paiardini, K. S. Knox, A. I. Asher, B. Cervasi, T. E. Asher, P. Scheinberg, D. A. Price, C. A. Hage, L. M. Kholi, et al. 2008. Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood* 112: 2826–2835.
- Chun, T. W., L. Carruth, D. Finzi, X. Shen, J. A. DiGiuseppe, H. Taylor, M. Hermankova, K. Chadwick, J. Margolick, T. C. Quinn, et al. 1997. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 387: 183–188.
- Brechley, J. M., B. J. Hill, D. R. Ambrozak, D. A. Price, F. J. Guenaga, J. P. Casazza, J. Kuruppu, J. Yazdani, S. A. Migueles, M. Connors, et al. 2004. T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis. *J. Virol.* 78: 1160–1168.
- Chomont, N., M. El-Far, P. Ancuta, L. Trautmann, F. A. Procopio, B. Yassine-Diab, G. Boucher, M. R. Boulassel, G. Ghattas, J. M. Brechley, et al. 2009. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat. Med.* 15: 893–900.
- Campbell, J. J., and E. C. Butcher. 2000. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr. Opin. Immunol.* 12: 336–341.
- Luther, S. A., and J. G. Cyster. 2001. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat. Immunol.* 2: 102–107.
- Sallusto, F., D. Lenig, R. Förster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401: 708–712.
- Rivino, L., M. Messi, D. Jarrossay, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, and J. Geginat. 2004. Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4⁺ central memory T cells. *J. Exp. Med.* 200: 725–735.
- Yang, D., O. Chertov, S. N. Bykovskaia, Q. Chen, M. J. Buffo, J. Shogan, M. Anderson, J. M. Schröder, J. M. Wang, O. M. Howard, and J. J. Oppenheim. 1999. β -defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286: 525–528.
- Acosta-Rodriguez, E. V., L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, and G. Napolitani. 2007. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat. Immunol.* 8: 639–646.
- Lécureuil, C., B. Combadière, E. Mazoyer, O. Bonduelle, A. Samri, B. Autran, P. Debré, and C. Combadière. 2007. Trapping and apoptosis of novel subsets of memory T lymphocytes expressing CCR6 in the spleen of HIV-infected patients. *Blood* 109: 3649–3657.
- Li, Q., J. D. Estes, P. M. Schlievert, L. Duan, A. J. Brosnahan, P. J. Southern, C. S. Reilly, M. L. Peterson, N. Schultz-Darken, K. G. Brunner, et al. 2009. Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV transmission. *Nature* 458: 1034–1038.
- Boulassel, M. R., G. Spurril, D. Rouleau, C. Tremblay, M. Edwardes, R. P. Sekaly, R. Lalonde, and J. P. Routy. 2003. Changes in immunological and virological parameters in HIV-1 infected subjects following leukapheresis. *J. Clin. Apher.* 18: 55–60.
- Ancuta, P., R. Rao, A. Moses, A. Mehle, S. K. Shaw, F. W. Luscinskas, and D. Gabuzda. 2003. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16⁺ monocytes. *J. Exp. Med.* 197: 1701–1707.
- Ancuta, P., K. J. Kunstman, P. Autissier, T. Zaman, D. Stone, S. M. Wolinsky, and D. Gabuzda. 2006. CD16⁺ monocytes exposed to HIV promote highly efficient viral replication upon differentiation into macrophages and interaction with T cells. *Virology* 344: 267–276.
- Ancuta, P., K. Y. Liu, V. Misra, V. S. Wacleche, A. Gosselin, X. Zhou, and D. Gabuzda. 2009. Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16⁺ and CD16⁻ monocyte subsets. *BMC Genomics* 10: 403.
- Lu, T., Y. Pan, S. Y. Kao, C. Li, I. Kohane, J. Chan, and B. A. Yankner. 2004. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature* 429: 883–891.
- Ancuta, P., P. Autissier, A. Wurcel, T. Zaman, D. Stone, and D. Gabuzda. 2006. CD16⁺ monocyte-derived macrophages activate resting T cells for HIV infection by producing CCR3 and CCR4 ligands. *J. Immunol.* 176: 5760–5771.
- Brussel, A., and P. Sonigo. 2003. Analysis of early human immunodeficiency virus type 1 DNA synthesis by use of a new sensitive assay for quantifying integrated provirus. *J. Virol.* 77: 10119–10124.
- Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia. 2004. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* 22: 745–763.
- Alkhatib, G., C. Combadière, C. C. Broder, Y. Feng, P. E. Kennedy, P. M. Murphy, and E. A. Berger. 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272: 1955–1958.
- Bleul, C. C., M. Farzan, H. Choe, C. Parolin, I. Clark-Lewis, J. Sodroski, and T. A. Springer. 1996. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382: 829–833.
- Berger, E. A., R. W. Doms, E. M. Fenyö, B. T. Korber, D. R. Littman, J. P. Moore, Q. J. Sattentau, H. Schuitemaker, J. Sodroski, and R. A. Weiss. 1998. A new classification for HIV-1. *Nature* 391: 240.
- Favre, D., S. Lederer, B. Kanwar, Z. M. Ma, S. Proll, Z. Kasakow, J. Mold, L. Swainson, J. D. Barbour, C. R. Baskin, et al. 2009. Critical loss of the balance between Th17 and T regulatory cell populations in pathogenic SIV infection. *PLoS Pathog.* 5: e1000295.
- Vieillard, V., R. E. Habib, P. Brochard, B. Delache, H. F. Bovendo, J. Calvo, J. Morin, I. Picq, F. Martinon, B. Vaslin, et al. 2008. CCR5 or CXCR4 use influences the relationship between CD4 cell depletion, NKP44L expression and NK cytotoxicity in SHIV-infected macaques. *AIDS* 22: 185–192.
- Li, Q., L. Duan, J. D. Estes, Z. M. Ma, T. Rourke, Y. Wang, C. Reilly, J. Carlis, C. J. Miller, and A. T. Haase. 2005. Peak SIV replication in resting memory CD4⁺ T cells depletes gut lamina propria CD4⁺ T cells. *Nature* 434: 1148–1152.
- Häringer, B., L. Lozza, B. Steckel, and J. Geginat. 2009. Identification and characterization of IL-10/IFN- γ -producing effector-like T cells with regulatory function in human blood. *J. Exp. Med.* 206: 1009–1017.
- Trinchieri, G. 2007. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J. Exp. Med.* 204: 239–243.
- Patterson, B. K., M. Czerniewski, J. Andersson, Y. Sullivan, F. Su, D. Jiyamapa, Z. Burki, and A. Landay. 1999. Regulation of CCR5 and CXCR4 expression by type 1 and type 2 cytokines: CCR5 expression is downregulated by IL-10 in CD4-positive lymphocytes. *Clin. Immunol.* 91: 254–262.
- Kumar, A., J. B. Angel, M. P. Daftarian, K. Parato, W. D. Cameron, L. Filion, and F. Diaz-Mitoma. 1998. Differential production of IL-10 by T cells and monocytes of HIV-infected individuals: association of IL-10 production with CD28-mediated immune responsiveness. *Clin. Exp. Immunol.* 114: 78–86.
- Jinquan, T., S. Quan, H. H. Jacobi, H. O. Madsen, C. Glue, P. S. Skov, H. J. Malling, and L. K. Poulsen. 2000. CXC chemokine receptor 4 expression and stromal cell-derived factor-1 α -induced chemotaxis in CD4⁺ T lymphocytes are regulated by interleukin-4 and interleukin-10. *Immunology* 99: 402–410.
- Bento, C. A., J. Hygino, R. M. Andrade, C. S. Saramago, R. G. Silva, A. A. Silva, U. C. Linhares, R. Brindeiro, A. Tanuri, M. Rosenzweig, et al. 2009. IL-10-secreting T cells from HIV-infected pregnant women downregulate HIV-1 replication: effect enhanced by antiretroviral treatment. *AIDS* 23: 9–18.
- Weissman, D., G. Poli, and A. S. Fauci. 1994. Interleukin 10 blocks HIV replication in macrophages by inhibiting the autocrine loop of tumor necrosis factor α and interleukin 6 induction of virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10: 1199–1206.
- Herbein, G., and K. A. Khan. 2008. Is HIV infection a TNF receptor signalling-driven disease? *Trends Immunol.* 29: 61–67.
- Wilson, N. J., K. Boniface, J. R. Chan, B. S. McKenzie, W. M. Blumenschein, J. D. Mattson, B. Basham, K. Smith, T. Chen, F. Morel, et al. 2007. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat. Immunol.* 8: 950–957.
- Williams, I. R. 2006. CCR6 and CCL20: partners in intestinal immunity and lymphorganogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1072: 52–61.
- Guan, Y., S. Abdelwahab, R. Kamin-Lewis, A. L. DeVico, and G. K. Lewis. 2008. Self-protection of individual CD4⁺ T cells against R5 HIV-1 infection by the synthesis of anti-viral CCR5 ligands. *PLoS One* 3: e3481.
- Moonis, M., B. Lee, R. T. Bailer, Q. Luo, and L. J. Montaner. 2001. CCR5 and CXCR4 expression correlated with X4 and R5 HIV-1 infection yet not sustained replication in Th1 and Th2 cells. *AIDS* 15: 1941–1949.
- Brechley, J. M., and D. C. Douek. 2008. HIV infection and the gastrointestinal immune system. *Mucosal Immunol* 1: 23–30.
- Lackner, A. A., and R. S. Veazey. 2007. Current concepts in AIDS pathogenesis: insights from the SIV/macaque model. *Annu. Rev. Med.* 58: 461–476.
- Wang, C., S. G. Kang, J. Lee, Z. Sun, and C. H. Kim. 2009. The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. *Mucosal Immunol* 2: 173–183.
- Veazey, R. S., and A. A. Lackner. 2004. Getting to the guts of HIV pathogenesis. *J. Exp. Med.* 200: 697–700.
- Sallusto, F., and C. R. Mackay. 2004. Chemoattractants and their receptors in homeostasis and inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* 16: 724–731.
- Brechley, J. M., T. W. Schacker, L. E. Ruff, D. A. Price, J. H. Taylor, G. J. Beilman, P. L. Nguyen, A. Khoruts, M. Larson, A. T. Haase, and D. C. Douek. 2004. CD4⁺ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* 200: 749–759.

49. Berlin, C., E. L. Berg, M. J. Briskin, D. P. Andrew, P. J. Kilshaw, B. Holzmann, I. L. Weissman, A. Hamann, and E. C. Butcher. 1993. $\alpha 4\beta 7$ integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 74: 185–195.
50. Annunziato, F., L. Cosmi, V. Santarlasci, L. Maggi, F. Liotta, B. Mazzinghi, E. Parente, L. Fili, S. Ferri, F. Frosali, et al. 2007. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.* 204: 1849–1861.
51. Duhon, T., R. Geiger, D. Jarrossay, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2009. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.* 10: 857–863.
52. Trifari, S., C. D. Kaplan, E. H. Tran, N. K. Crellin, and H. Spits. 2009. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T_H17, T_H1 and T_H2 cells. *Nat. Immunol.* 10: 864–871.
53. Vicenzi, E., P. Panina-Bodignon, G. Vallanti, P. Di Lucia, and G. Poli. 2002. Restricted replication of primary HIV-1 isolates using both CCR5 and CXCR4 in Th2 but not in Th1 CD4⁺ T cells. *J. Leukoc. Biol.* 72: 913–920.
54. Oswald-Richter, K., S. M. Grill, M. Leelawong, M. Tseng, S. A. Kalams, T. Hulgand, D. W. Haas, and D. Unutmaz. 2007. Identification of a CCR5-expressing T cell subset that is resistant to R5-tropic HIV infection. *PLoS Pathog.* 3: e58.
55. Mehandru, S., M. A. Poles, K. Tenner-Racz, A. Horowitz, A. Hurley, C. Hogan, D. Boden, P. Racz, and M. Markowitz. 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: 761–770.
56. Westphal, S., A. Lügering, J. von Wedel, C. von Eiff, C. Maaser, T. Spahn, G. Heuschipp, M. A. Schmidt, H. Herbst, I. R. Williams, et al. 2008. Resistance of chemokine receptor 6-deficient mice to *Yersinia enterocolitica* infection: evidence of defective M-cell formation in vivo. *Am. J. Pathol.* 172: 671–680.
57. Kao, C. Y., F. Huang, Y. Chen, P. Thai, S. Wachi, C. Kim, L. Tam, and R. Wu. 2005. Up-regulation of CC chemokine ligand 20 expression in human airway epithelium by IL-17 through a JAK-independent but MEK/NF- κ B-dependent signaling pathway. *J. Immunol.* 175: 6676–6685.
58. Raffatellu, M., R. L. Santos, D. E. Verhoeven, M. D. George, R. P. Wilson, S. E. Winter, I. Godinez, S. Sankaran, T. A. Paixao, M. A. Gordon, et al. 2008. Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes *Salmonella* dissemination from the gut. *Nat. Med.* 14: 421–428.
59. Brenchley, J. M., D. A. Price, and D. C. Douek. 2006. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat. Immunol.* 7: 235–239.
60. Mora, J. R., and U. H. von Andrian. 2004. Retinoic acid: an educational “vitamin elixir” for gut-seeking T cells. *Immunity* 21: 458–460.
61. Arthos, J., C. Cicala, E. Martinelli, K. Macleod, D. Van Ryk, D. Wei, Z. Xiao, T. D. Veenstra, T. P. Conrad, R. A. Lempicki, et al. 2008. HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin $\alpha 4\beta 7$, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat. Immunol.* 9: 301–309.
62. Geldmacher, C., A. Schuetz, N. Ngwenyama, J. P. Casazza, E. Sanga, E. Saathoff, C. Boehme, S. Geis, L. Maboko, M. Singh, et al. 2008. Early depletion of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T helper 1 cell responses after HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* 198: 1590–1598.
63. de Repentigny, L., D. Lewandowski, and P. Jolicoeur. 2004. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 729–759.
64. Brenchley, J. M., D. A. Price, T. W. Schacker, T. E. Asher, G. Silvestri, S. Rao, Z. Kazzaz, E. Bornstein, O. Lambotte, D. Altmann, et al. 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat. Med.* 12: 1365–1371.
65. Connor, R. I., K. E. Sheridan, D. Ceradini, S. Choe, and N. R. Landau. 1997. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals. *J. Exp. Med.* 185: 621–628.
66. Goff, S. P. 2008. Knockdown screens to knockout HIV-1. *Cell* 135: 417–420.
67. Poli, G., and A. S. Fauci. 1992. The effect of cytokines and pharmacologic agents on chronic HIV infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8: 191–197.
68. Rabbi, M. F., A. Finnegan, L. Al-Harthy, S. Song, and K. A. Roebuck. 1998. Interleukin-10 enhances tumor necrosis factor- α activation of HIV-1 transcription in latently infected T cells. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 19: 321–331.
69. Jankovic, D., and G. Trinchieri. 2007. IL-10 or not IL-10: that is the question. *Nat. Immunol.* 8: 1281–1283.
70. Zhou, L., and D. R. Littman. 2009. Transcriptional regulatory networks in Th17 cell differentiation. *Curr. Opin. Immunol.* 21: 146–152.
71. Reboldi, A., C. Coisne, D. Baumjohann, F. Benvenuto, D. Bottinelli, S. Lira, A. Uccelli, A. Lanzavecchia, B. Engelhardt, and F. Sallusto. 2009. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of T_H17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat. Immunol.* 10: 514–523.