



Études de la dynamique des cellules Tfh et T CD4 mémoires au cours de l'infection au VIH

Thèse

Félicien Moukambi

Doctorat en microbiologie-immunologie

Philosophiae doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

© Félicien Moukambi, 2017

**Études de la dynamique des cellules Tfh et T CD4
mémoires au cours de l'infection au VIH**

Thèse

Félicien Moukambi

Sous la direction de :

Jérôme Estaquier, directeur de recherche

Résumé

Depuis sa découverte, le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) a causé la mort de 33 millions de personnes, et 36,7 millions sont actuellement infectées. Malgré l'existence des thérapies antirétrovirales, celles-ci ne conduisent pas à d'éradiquer le virus. En outre, il n'existe pas de vaccin. Les lymphocytes B, dont la fonction est de produire les anticorps sont dysfonctionnels au cours du VIH-1. Or la majorité des stratégies vaccinales se basent sur la production d'anticorps dépendante des cellules T CD4. Ainsi, la première partie de mon doctorat a été consacré à la compréhension de l'impact du VIH-1 sur les cellules T CD4 folliculaires auxiliaires (Tfh) essentielles à l'activation des lymphocytes B et à la production d'anticorps spécifiques, dans la rate l'organe majeur de la réponse des lymphocytes B. Dans la deuxième partie, j'ai analysé les cellules T CD4 mémoires, Tfh et les lymphocytes B dans les ganglions mésentériques: un site inducteur de la réponse immunitaire intestinale, qui alimente la lamina propria (site effecteur) de la muqueuse intestinale en cellules mémoires. Étant donné l'impossibilité d'étudier ces organes profonds en particulier en phase aiguë chez l'homme, j'ai utilisé le modèle du macaque rhésus infecté par le virus de l'immunodéficience simienne (VIS). Les résultats de ces études montrent que l'évolution vers le SIDA est associée à une déplétion précoce des cellules Tfh et T CD4 mémoires dans la rate et les ganglions mésentériques. Concomitant à cela, je rapporte une déplétion des lymphocytes B mémoires dans la rate et un faible titre d'IgG anti-VIS dans le sérum. En plus, les cellules Tfh commutent leur phénotype d'effecteur mémoire vers celui de centrale mémoire associé à l'expriment de CD127 (récepteur de l'IL-7) et de T-bet (marqueur de cellules Th1). De plus, je montre que la déstructuration des organes lymphoïdes secondaires, ainsi que les cytokines environnementales comme l'IL-7 ou l'IL-27 peuvent contribuer au dysfonctionnement des cellules Tfh puisque ces dernières induisant les facteurs de transcription inhibiteurs des cellules Tfh tels que T-bet, Foxo1, Stat5 et KLF2. En conclusion, mes résultats permettent de mieux comprendre que le dysfonctionnement des lymphocytes B et l'immunodéficience dans la muqueuse intestinale sont associés à la déplétion soudaine des lymphocytes T CD4 mémoires et Tfh dans la rate et les ganglions mésentériques. Par conséquent, prévenir la perte de ces cellules pourrait être une approche thérapeutique et vaccinale prometteuse pour la neutralisation du virus et pour une meilleure immunité intestinale, afin d'empêcher la translocation bactérienne.

Abstract

Since its discovery, HIV-1 has caused the death of 35 million people, and 36.9 million are living infected. Although researches have led to the development of antiretroviral therapies, which not only improve life expectation but also life quality of infected individuals, these therapies are not capable of eradicating the virus, and unfortunately there is no vaccine. The pathogenesis of HIV-1 is linked to a dysfunction of CD4 T cells that favors progression to AIDS. Therefore, given that most vaccines are based on T cell-dependent antibody production, the first part of my PhD research is devoted to understanding the impact of HIV-1 on CD4 T Follicular helper (Tfh) cells, which are essential for B cell activation and the production of specific antibodies. These cells are particularly crucial in the spleen, which is the major organ for B cell response. In the second part, I have analyzed the dynamics of memory CD4 T, Tfh and of B cells in mesenteric lymph nodes: an inductive site of the immune response that provides memory cells to the lamina propria (effector site) of the intestinal mucosa. Given the difficulties to study these deep organs, particularly during the acute phase in humans, I have used rhesus macaques infected with the simian immunodeficiency virus (SIV) to study the dynamics of Tfh cells. My results show an early depletion of splenic Tfh cells during the acute phase; a depletion that persists during the chronic phase within macaques in which the infection rapidly progresses to AIDS. Concomitantly, we report a depletion of memory B cells and low titers of anti-SIV IgG titers in these macaques. Furthermore, I observed a massive depletion of memory CD4 T, Tfh and B cells in mesenteric lymph nodes, as well as a phenotypic change of Tfh cells that become central memory cells associated with the upregulation of the expression of CD127 (IL-7 receptor). My results also show that environmental cytokines such as IL-7 and IL-27 contribute to their dysfunction as support the expression of transcription factors that inhibit Tfh cells such as T-bet, Foxo1 and Stat5. In conclusion, my results provide a better understanding of B cell dysfunction related to the early loss of the Tfh cells during HIV/SIV infection. Moreover, I hypothesize that the loss of immunity in the intestinal mucosa is due to the sudden depletion of memory CD4 T, Tfh and B cells in the mesenteric lymph nodes. Therefore, maintaining Tfh and memory CD4 T cells during the early phase of infection could be a promising therapeutic and vaccine approach for neutralizing HIV/SIV, as well as preventing bacterial translocation.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations	x
Avant-propos	xii
CHAPITRE 1	1
1. Introduction	1
Partie I	1
1.1. Le Virus de l'immunodéficience humaine (VIH).....	1
1.2. La découverte du VIH.....	2
1.3. Épidémiologie du VIH.....	3
1.4. La diversité des souches VIH	5
1.5. Le Virus de l'immunodéficience simienne (VIS).....	5
1.6. La théorie de la zoonose comme origine du VIH	6
1.7. Structure du VIH-1 et VIS	7
1.7.1. Le génome	7
1.7.2. Les protéines virales.....	8
1.8. Le récepteur et les corécepteurs du VIH-1 et VIS	11
1.8.1. Le corécepteur CCR5	11
1.8.2. Le corécepteur CXCR4	12
1.8.3. Les autres corécepteurs	12
1.9. Le cycle viral du VIH-1	13
1.10. La pathogenèse du VIH.....	14
1.10.1. La phase aiguë.....	14
1.10.2. La phase asymptomatique et SIDA	16
1.11. Préventions et traitements contre le VIH-1	17
1.11.1. Préventions.....	17
1.11.2. Traitements.....	18

1.12.	Les modèles expérimentaux pour l'étude de la pathogenèse du Sida	19
1.12.1.	Le modèle du chimpanzé.....	19
1.12.2.	Le modèle du macaque.....	19
Partie II.	21
1.13.	Le système lymphatique.....	21
1.14.	Le tractus gastro-intestinal durant l'infection par le VIH-1/VIS	24
1.15.	Les lymphocytes T CD4 dans la réponse immunitaire	25
1.16.	Les cellules Tfh	27
1.16.1.	Caractéristiques des cellules Tfh.....	27
1.16.2.	La fonction des cellules Tfh et la réaction des GCs	29
1.16.3.	La rate: Le site majeur des cellules Tfh	32
1.16.4.	Les Tfh et les cellules B au cours de l'infection au VIH-1/VIS.....	32
CHAPITRE 2	34
2.1.	Hypothèse de recherche	34
2.2.	Objectifs de recherche	35
CHAPITRE 3	36
LA PERTE PRÉCOCE DES CELLULES Tfh DANS LA RATE DES MACAQUES INFECTÉS PAR LE VIS	36
3.1.	Résumé.....	37
3.2.	Abstract	38
3.3.	Introduction.....	39
3.4.	Results.....	41
3.5.	Discussion	51
3.6.	Materials and Methods.....	57
3.7.	Acknowledgments	61
3.8.	Figure legends.....	62
3.9.	References.....	66
CHAPITRE 4	98
DÉPLÉTION DES CELLULES Tfh ET TCD4 MÉMOIRES DANS LES GANGLIONS MÉSÉNTÉRIQUES DES MACAQUES INFECTÉS PAR LE VIS	98
4.1.	Introduction.....	99
4.2.	Résultats.....	101
4.3.	Discussion	105

4.4. Matériel et Méthodes	107
4.5. Figures et légendes.....	109
4.6. Bibliographie	115
CHAPITRE 5	121
5.1. Discussion générale	121
5.2. Conclusion générale.....	126
5.3. Perspectives	127
Bibliographie	131
Annexe	150
LES CELLULES T _{fh} ET L'INFECTION PAR À VIH : DES AMIES OU DES ENNEMIES ?	150

Liste des tableaux

Tableau 1: Les corécepteurs du VIH-1 et VIS	12
Tableau 2: Les différentes classes des antirétroviraux	18

Liste des figures

Figure 1: Carte de prévalence du VIH-1 en 2015.....	3
Figure 2: Phylogénie du VIS et VIH-1	7
Figure 3: Comparaison des génomes du VIH-1 et VIS	8
Figure 4: Structure protéique du VIH et VIS.....	9
Figure 5: Cycle viral du VIH-1.....	13
Figure 6: Phases de l'infection du VIH-1	15
Figure 7: Les espèces simiennes et le Sida.....	20
Figure 8: La survie de différents modèles du macaque infectés par le VIS.	20
Figure 9: Le système lymphatique.....	21
Figure 10: Structure d'un ganglion	22
Figure 11: Structure de la rate	23
Figure 12: Anatomie du tractus gastro-intestinal.....	24
Figure 13: Différenciation et profils des lymphocytes T CD4	25
Figure 14: Caractéristiques de la cellule Tfh.....	28
Figure 15: Activation des lymphocytes B par les Tfh	29
Figure 16: Interaction des Tfh et lymphocytes B dans les organes lymphoïdes secondaires	31
Figure 17: Pourcentages des Tfh dans les organes lymphoïdes secondaires et le sang.....	32
Figure 18: Pourcentages des Tfh dans les organes lymphoïdes secondaires et le sang.....	122
Figure 19: Activation des centres germinatifs (GC) dans les ganglions des macaques indien, chinois et singe vert d'Afrique (AGM) infectés par le VIS	128

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AID	Cytidine désaminase induite par activation
AGM	Singe vert d'Afrique
APC	Cellule présentatrice d'antigène
ARN	Acide ribonucléique
ARN_m	Acide ribonucléique messager
ARN_t	Acide ribonucléique de transfert
ART	Thérapie antirétrovirale
ARV	Rétrovirus associés au SIDA
BAFF	Facteur d'activation des lymphocytes B
Bcl-6	Protéine 6 du lymphome à lymphocytes B
CD	Cluster de différenciation
CDC	Centres de contrôle des maladies
CI	Commutation isotypique
CMH-I	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CTL	Lymphocyte T CD8 cytotoxique
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing
Non-integrin	
Env	Enveloppe
FDC	Cellule dendritique folliculaire
FasL	Ligand du récepteur Fas
FOXP3	Boîte de fourche P3
FOXO1	Protéine de boîte de fourche O1
Gag	Antigène spécifique au groupe
GPRC	Récepteur couplé à la protéine G
Gmes	Ganglions mésentériques
HMS	Hypermutation Somatique
HTLV	Virus T-lymphotropique humain
ICOS	Co-stimulateur inductible des cellules T
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KLF-2	Facteur-2 semblable à la molécule Krüppel
IL-6	Interleukine-21
IL-21	Interleukine-21
LAV	Virus associé à la lymphadénopathie
LTR	Séquence terminale longue répétée
MAF	Fibrosarcome musculo-aponévrotique
MPLA	Lipide A monophosphoryl
MST	Maladies Sexuellement Transmissibles
Nef	Facteur de régulation négative
OMS	Organisation mondiale de la Santé
P27	Protéine virale 27
PBS	Site de liaison de l'amorce
PD-1	Protéine-1 de mort cellulaire programmée

PEP	Prophylaxie post-exposition
PIC	Complexe de préintégration
Pol	Polymérase
PrEP	Prophylaxie préexposition
RE	Réticulum endoplasmique
RRE	Élément de réponse à Rev
Rev	Régulatrice de virion
SDF1	Facteur 1 dérivé des cellules stromales
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
TAR	Élément de réponse de transactivation
Tat	Transactivateur de transcription
TCF-1	Facteur de transcription-1 spécifique aux lymphocytes T
Tfh	T folliculaire auxiliaire
TGF-β	Facteur de croissance bêta 1
TLR4	Récepteur toll 4
Vif	Facteur d'infectiosité du virus
VIH-1	Virus de l'immunodéficience humaine de type 1
Vpr	Protéine virale R
Vpx	Protéine virale X
Vpu	Protéine virale unique

Avant-propos

Durant mon séjour de 5 mois en Tanzanie dans le cadre des recherches scientifiques. En voyant des enfants d'environ 6 ans orphelins dans la rue après avoir perdu leurs parents par le VIH. J'ai eu ce fort désir de contribuer à l'avancée des connaissances dans ce domaine.

Ainsi, je remercie le Dr Jérôme Estaquier pour l'opportunité qu'il m'a donnée, de faire partie de son groupe de recherche ici au Centre des Recherches du CHU de Québec. Ça été une occasion unique de ma vie, qui m'a permis non seulement d'apprendre à être un scientifique, mais aussi par mes résultats et mes efforts, à donner quelque chose en retour à la communauté scientifique et à l'humanité. Le Dr Estaquier, par son savoir-faire dans ce domaine et ses conseils, a pu me canaliser, de manière à rendre mes efforts productifs.

Je remercie également Lynda Robitaille, qui a joué un rôle primordial dans l'étude et la sélection de mon dossier, afin que je fasse partie du groupe du Dr Estaquier. Elle a aussi été une personne essentielle par ses conseils et sa grande capacité de gérer un laboratoire.

Je souhaite remercier Gina Racine, pour tout son travail administratif, tel que la commande des réactifs, dont j'avais besoin pour mes expériences. Même lorsque je faisais certaines commandes à la dernière minute, Gina a su faire preuve de patience et de compréhension, bien qu'elle soit elle-même très occupée.

Un grand merci à Guadalupe Andreani, pour ses connaissances scientifiques et techniques, qui m'ont aidé et canalisé, ainsi que son aide pour analyser certaines données de cryométrie. En outre, Guadalupe a aussi su nous faire rire avec des taquineries, qui permettent bien évidemment de détendre l'atmosphère au laboratoire.

Merci à Henintsoa Rabezahary, pour la bonne coordination du travail au laboratoire de niveau 3 (P3), notamment le comptage des cellules, afin que je continue avec mes manip. Ces journées d'euthanasie ne sont pas évidentes. Mais par son travail fort et assidu, elle a contribué à rendre faisables ces jours d'euthanasie.

Enfin, à toutes et à tous, je dis merci pour les nuits blanches passées au P3 lors des euthanasies.

CHAPITRE 1

1. Introduction

Partie I

1.1. Le Virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

Le virus de l'immunodéficience humaine aussi connu comme le VIH est l'agent étiologique du syndrome de l'immunodéficience acquise ou SIDA. Initialement, l'infection par le VIH fut décrite comme une nouvelle maladie à la suite de l'accumulation de cas de décès parmi les jeunes hommes homosexuels, qui souffraient d'infections opportunistes inhabituelles et des tumeurs malignes rares [1]. Depuis lors, le VIH est devenu une pandémie qui, selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), a infecté plus de 70 millions de personnes à travers le monde, parmi lesquelles 35 millions sont morts, et 36,7 millions vivaient avec le virus à la fin de l'année 2015 [2]. En dépit de plus de 30 années de recherches intenses et d'innovations en matière de thérapies, cela n'a pas suffi, puisque le VIH demeure un grand défi pour l'humanité, en se classant à la sixième place parmi les premières causes mondiales de décès, et à la première place des maladies sexuellement transmissibles [3]. Malheureusement, il n'existe toujours pas de vaccin à ce jour. Par conséquent, il faudrait fournir plus d'efforts, afin d'aboutir à de meilleures perspectives en matière de traitements curatifs ou d'un vaccin contre le VIH. Dans cette thèse, je souligne les défis que présente la recherche sur le VIH chez les patients humains, justifiant ainsi notre choix des primates non humains comme modèle alternatif d'étude du VIH. Par ailleurs, ce modèle permet l'étude des tissus profonds tels que la rate et les ganglions mésentériques. Il est ainsi possible de répondre à certaines questions essentielles (mentionnées dans la partie résultat de cette thèse), afin d'ouvrir le chemin vers de nouvelles perspectives sur des stratégies d'élaboration de thérapies ou d'un vaccin contre le VIH.

1.2. La découverte du VIH

Bien que l'utilisation récente des échantillons archivés du code génétique du VIH ait permis de retracer ses origines remontant aux années 1920 à Kinshasa (actuelle République Démocratique du Congo) [4], ce n'est qu'en 1981 que la pathologie du VIH attira l'attention mondiale. En fait, Micheal Gottlieb, professeur adjoint spécialisé en immunologie à l'Université de Californie à Los Angeles (UCLA) observa pour la première fois que certains de ses patients, des hommes homosexuels souffraient de candidose, de lymphadénopathie et d'infections pulmonaires (*Pneumocystis carinii*), et que ceux-ci avaient également un déficit du nombre et de la fonction des lymphocytes T CD4 [5]. Dans le même temps, plusieurs rapports à New York et en Californie mirent en évidence chez ces patients la présence d'un cancer agressif rare appelé le Sarcome de Kaposi. Cependant, la présence récurrente du cytomégalovirus (CMV) chez certains patients conduisit Gottlieb à émettre l'hypothèse, selon laquelle le syndrome de l'immunodéficience observée chez ces patients était provoqué par une nouvelle souche émergente de CMV. Cependant, les auteurs considérèrent aussi la possibilité que le CMV puisse plutôt être la conséquence et non la cause de l'immunodéficience, comme le souligna aussi Durack DT, *et al* [6]. En 1980, le Dr Robert Gallo et son groupe aux États-Unis font la découverte pour la première fois d'un rétrovirus humain en isolant le virus T-lymphotropique humain ou HTLV-I chez un patient ayant un lymphome cutané à lymphocytes T [7], et en 1981 le HTLV-II [8]. Toutes fois, ce n'est qu'en 1983, que Jean-Claude Chermann et Françoise Barré-Sinoussi, chercheurs à l'Institut Pasteur à Paris, sous la direction du Dr Luc Montagnier isolèrent pour la première fois un rétrovirus différent du HTLV-I et du HTLV-II chez un patient homosexuel avec une lymphadénopathie. Un virus qu'ils appelèrent LAV (*Lymphadenopathy Associated Virus*) [9]. Un an plus tard, en mai 1984 le groupe du Dr Robert Gallo isola un rétrovirus, qu'ils appelèrent HTLV-III chez des patients à risque et en phase de maladie [10]. Trois mois plus tard en août 1984, Levy *et al* [11] publie l'isolation des rétrovirus, qu'il appelle plutôt ARV (*AIDS Associated Viruses*) chez des patients ayant le SIDA à San Francisco. Vu qu'il s'agit du même virus, le Comité international de taxonomie des virus, présidé par Harold Varmus recommanda en mai 1986 que ce pathogène, à plusieurs noms, soit appelé le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [12]. Cette découverte par l'équipe de l'Institut Pasteur a été valorisée par

l'attribution du Prix Nobel de médecine au Dr Luc Montagnier et Françoise Barré-Sinoussi en 2008.

1.3. Épidémiologie du VIH

La pandémie causée par le VIH-1 affecte principalement le continent africain avec la plus forte prévalence de l'ordre de 4,4% par rapport aux Amériques 0,5 %, l'Europe 0,4% et l'Asie du Sud-Est 0,3% (**Figure 1**).

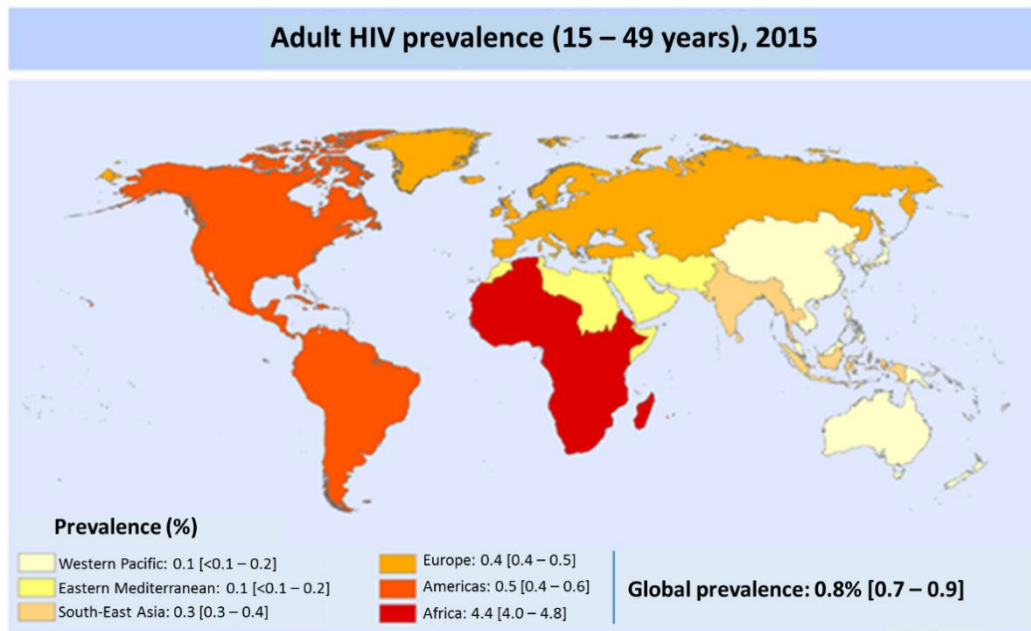


Figure 1: Carte de prévalence du VIH-1 en 2015
D'après [13]

Parmi les 36,9 millions de personnes vivant avec le VIH dans le monde, trois quarts vivent en Afrique subsaharienne (25,8 millions) [13]. Selon l'ONUSIDA, 2 millions de nouvelles infections ont été enregistrées en 2014 dans le monde, dont 1,4 million en Afrique subsaharienne [14]. Le SIDA est la maladie sexuellement transmissible la plus mortelle dans le monde [15], si bien que les cas de décès se comptent par milliers. La voie la plus fréquente de transmission du VIH-1 est la voie sexuelle, par la muqueuse génitale avec une fréquence de 75% à 85% [16]. Le VIH-1 se transmet par des liquides corporels, tels que le sang, le sperme, les sécrétions vaginales, le lait maternel, etc. Les groupes les plus à risque d'infection

par le VIH-1 sont composés de personnes pratiquant la prostitution, les hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes ou des personnes consommant de la drogue par injection. Rien qu'en 2014, on estime à 1,2 million de morts dans le monde, dont 790 000 ont été enregistrés en Afrique subsaharienne. Les enfants sont les victimes les plus vulnérables, qui majoritairement s'infectent lors de l'accouchement à travers une mère séropositive. Même s'il y a une claire amélioration dans le traitement des femmes enceintes, ce qui a permis de baisser de 58% le taux d'infection chez les enfants entre 2002 et 2013 [17], environ 2,6 millions d'enfants de moins de 15 ans vivaient encore avec le VIH-1, dont 2,3 millions (88%) en Afrique subsaharienne [18]. En dépit de tous les efforts et les progrès dans la mise en place de traitements antirétroviraux (ART) contre le VIH-1, seulement 40%, soit 14.9 millions parmi 36.9 millions de personnes séropositives ont reçu un traitement ART en 2014 [19].

Le déséquilibre entre la forte prévalence du VIH-1 et le faible pourcentage de personnes recevant un traitement ART en Afrique est lié à de nombreux facteurs. Premiers sur la liste sont la pauvreté et le manque d'éducation adéquate. Ceci conduit à une faible prise de conscience sur les effets dévastateurs du VIH-1, et les comportements préventifs appropriés à adopter. Suite à la pauvreté, un sujet séropositif se retrouve face à un dilemme : financer la ART et mourir de famine. Ou inversement, se nourrir et éviter la famine, mais mourir du SIDA. C'est la seconde situation qui est la plus fréquemment observée. Ensuite, accéder aux installations qui fournissent la ART représente un défi en raison du manque d'infrastructures et de transports adéquats [20]. En outre, le manque d'informations entraîne non seulement un manque de soutien social, mais aussi une stigmatisation de ceux qui dévoilent leur séropositivité. Ainsi, les personnes infectées préfèrent mourir plutôt que de chercher de l'aide. Et ce manque d'informations sur le VIH-1 apporte aussi un état d'ignorance en ce qui concerne les méthodes de préventions et de la transmission. Enfin, le déni de l'existence du SIDA dans certaines cultures à travers l'Afrique contribue fortement au fort taux de prévalence et d'incidence comparé aux pays industrialisés comme le Canada. Cependant, malgré la bonne éducation et l'accès aux thérapies antivirales, le fléau du SIDA représente également un défi sérieux au Canada. Ainsi, on estime que 75.500 personnes vivaient avec le VIH-1 en 2014, et cela représente une augmentation de 6700 depuis 2011 [21]. Contrairement aux pays pauvres, où la plupart de nouveaux cas d'infection sont hétérosexuels

et travailleuses du sexe, la population homosexuelle est la plus touchée au Canada. En outre 21% des personnes vivant avec le VIH-1 au Canada ne connaissaient pas leur statut [22].

1.4. La diversité des souches VIH

Les deux souches du VIH sont le VIH-1 et le VIH-2. Si le VIH-2 cause une pathologie plus lente, le VIH-1 par contre est plus virulent et est l'agent étiologique de la pandémie mondiale. Ainsi, dans cette thèse, je me focalise sur le VIH-1. Le VIH-1 est divisé en quatre groupes : M, N, O et P. Le groupe M est le groupe principal et responsable de la pandémie mondiale de SIDA, alors que les groupes O, N et P ont été retrouvés chez des personnes en Afrique de l'Ouest et du Centre [23-26]. Le VIH est caractérisé par son énorme variabilité génétique et son évolution rapide résultante du taux élevé de mutations et de recombinaisons de l'enzyme transcriptase inverse du virus, qui ne dispose pas d'un mécanisme de vérification. Les insertions et les délétions dans le génome viral sont également fréquentes. Ainsi, la diversité est telle que le groupe M est composé de neuf sous-types A-D, F-H, J et K. Dans un sous-type, la variation au niveau des acides aminés est de l'ordre de 8-17%, alors que la variation entre les sous-types est généralement comprise entre 17% et 35% [27]. Des recombinaisons sont fréquentes entre les souches de différents groupes (par exemple entre M et O) ou entre les sous-types du même groupe (exemple entre les souches A et F du groupe M). Les souches hybrides issues de la recombinaison des sous-types du groupe M sont appelées CRFs (*Circulating Recombinant Forms*) [28]. Ces mécanismes aboutissent à des souches virales génétiquement différentes au sein de chaque individu infecté, si bien que les séquences virales au sein du même individu peuvent différer jusqu'à 10% [28].

1.5. Le Virus de l'immunodéficience simienne (VIS)

En mai et décembre 1983, des symptômes de l'immunodéficience similaires à ceux des sujets humains tels que la lymphadénopathie, la neutropénie, la déplétion des lymphocytes T CD4 dans le sang sont décrits chez des macaques d'une colonie du Centre des Recherches de Primatologie de la Nouvelle-Angleterre (*The New England Regional Primates Research Center*) aux États-Unis [29,30]. Ces animaux présentent également des infections opportunistes comme la pneumocystose (*Pneumocystis carinii*), CMV, et des lymphomes. C'est en juin 1985 que le groupe de recherche mené par le Dr Desrosiers isola et identifia

pour la première fois le rétrovirus responsable du SIDA chez ces macaques, et l'appela STLV-III (*Simian T-lymphotropic virus Type III*) apparenté au HTLV-III ou LAV chez l'homme [31,32]. Enfin, en mai 1986, suite au changement de nom de HTLV-III, LAV et ARV en VIH-1 par le Comité international de taxonomie des virus, le STLV-III fut aussi changé en VIS (*Simian Immunodeficiency Virus*).

1.6. La théorie de la zoonose comme origine du VIH

En date il a été reporté chez 36 espèces différentes de primates l'existence du VIS, et chez 30 de ces espèces, le génome partiel ou complet du virus a été caractérisé [33]. Ces lentivirus ont été détectés dans la plupart des singes africains (**Figure 2**) du genre *Cercopithecus*, des singes verts d'Afrique (*Chlorocebus*), des mandrills (*Mandrillus*), des mangabeys (*Cercocebus*), une variété de singes colobus (*Colobus*, *Ptilocolobus*) et des grands singes, dont les chimpanzés (*Pan troglodytes*) et les gorilles (*Gorilla*) [34]. Ces singes d'origine africaine représentent des hôtes naturels du VIS, et par conséquent ne développent pas de SIDA en général, suite à l'infection naturelle. Cette restriction du VIS aux singes africains suggère qu'il s'agit d'un virus ancien qui a coévolué avec son hôte primate. Ainsi, suite à la découverte du virus de l'immunodéficience simienne chez le chimpanzé (SIVcpz) en 1989 par Peeters *et al* [35], et le séquençage de son génome, par Huet *et al* [36] que des spéculations sur une zoonose éventuelle apparaissent. Celle-ci stipule que le SIVcpz provenant du chimpanzé serait à l'origine du VIH-1 chez l'homme et que le SIVsmm du Sooty mangabey serait à l'origine du VIH-2 (**Figure 2**). Puis, il a été proposé que les souches M, N et O du VIH-1 viendraient du chimpanzé [37,38], alors que la souche O aurait pour origine le gorille [25]. Cette théorie de la zoonose renforce encore plus l'utilisation du primate comme modèle de recherche sur le VIH-1.

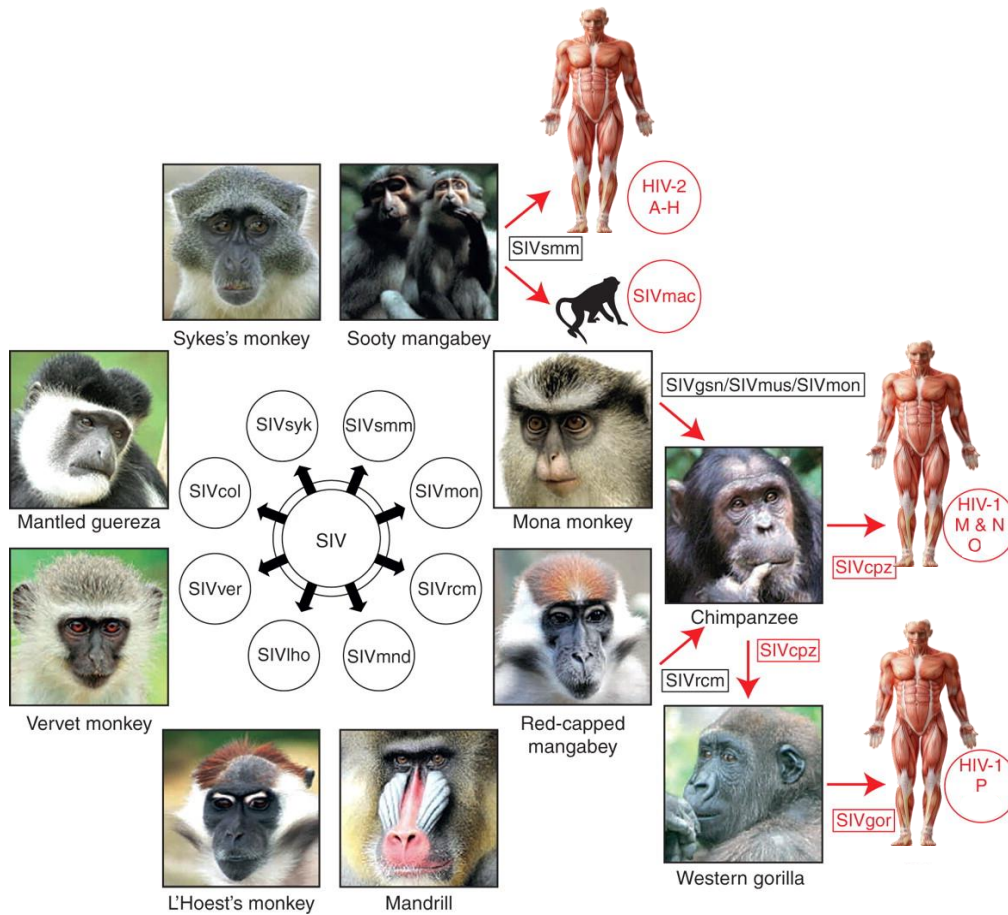


Figure 2: Phylogénie du VIS et VIH-1
Adapté de [39]

1.7. Structure du VIH-1 et VIS

1.7.1. Le génome

Le VIH-1 et le VIS sont des virus équivalents appartenant tous deux à la famille des *Rétrovirus*, et possèdent deux copies d'ARN monocaténares de polarité positive. Cette polarité positive rend possible la transcription de l'ARN directement en ADN viral. Ensuite, le VIH-1 et le VIS appartiennent au genre des *lentivirus*. La particule virale a une forme sphérique et fait environ 120 nm de diamètre, soit 60 fois plus petite qu'un globule rouge. La similarité du VIS et du VIH-1 se voit dans leur structure génomique presque identique (**Figure 3**).

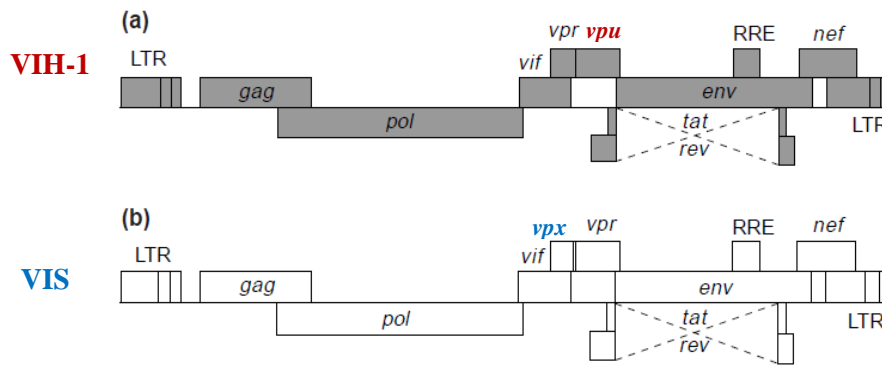


Figure 3: Comparaison des génomes du VIH-1 et VIS
Adapté de [40]

Le génome fait 9.8 Kilobases (kb) [41]. Les deux extrémités 5' et 3' sont flanquées par des séquences longues répétitives (LTR). Les exons, c'est-à-dire les régions codantes du génome, sont localisés au centre et codent au moins 9 protéines. Le génome est constitué des gènes Gag, Pol et Env, ainsi que tat, rev, nef, vpr, vpu/vpx et vif. La différence entre le VIH-1 et le VIS est marquée par le fait que le génome du VIH-1 contient le gène *vpu*, alors que celui du VIS contient le gène *vpx*.

1.7.2. Les protéines virales

La protéine Gag aussi connue comme Pr55^{Gag} a une masse moléculaire de 55 Kilodaltons (kDa). Elle est issue de la translation de l'ARN non épissé dans le cytosol de la cellule hôte. Le clivage enzymatique de Gag produit les protéines de la matrice (p17), la capsid (p24) et la nucléocapsid (p7) (**Figure 4**), de p6 et des peptides SP1 et SP2. Celles-ci sont essentielles à l'architecture de la particule virale [42].

La protéine Pol quant à elle donne les enzymes nécessaires au fonctionnement du virus, dont la protéase (PR), la transcriptase inverse (RT), l'intégrase (IN) et la RNase H. L'activité protéase est nécessaire pour le clivage des précurseurs polyprotéiques Gag et Gag-Pol pendant la maturation du virion [43].

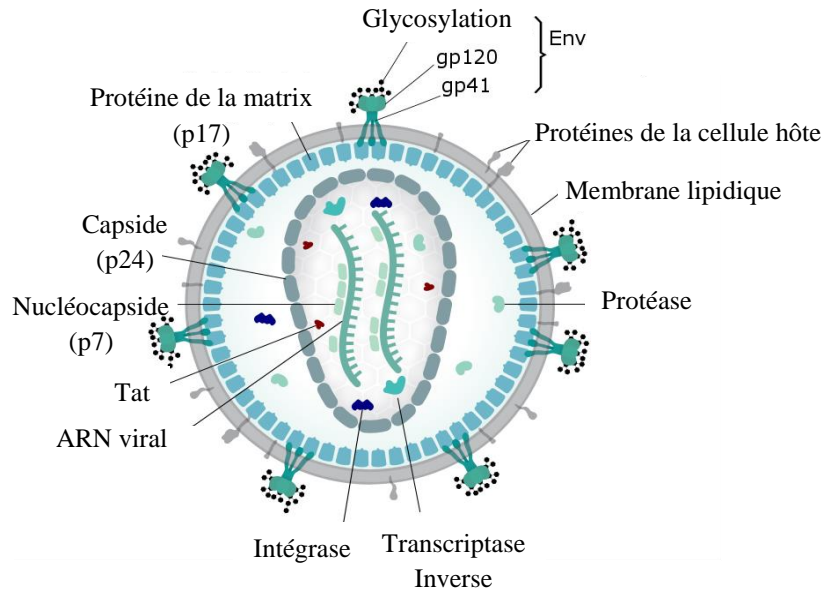


Figure 4: Structure protéique du VIH et VIS
Adapté de [44,45]

La protéine d'enveloppe Env a une masse moléculaire de 160 kDa et est d'abord synthétisée dans le réticulum endoplasmique. Env migre ensuite à travers le complexe de Golgi où il subit une glycosylation au niveau des résidus d'asparagine. La glycosylation d'Env est requise pour l'infectiosité de la particule virale [46]. Une protéase cellulaire clive le env pour générer les protéines gp41 et gp120 [47].

Tat (Trans-activator of transcription), est un transactivateur de transcription, qui est essentiel à la réplication du VIH-1/VIS. Tat se lie à la structure TAR, l'élément de réponse à la transactivation, situé à l'extrémité 5' de l'ARN [48].

Rev est une protéine qui se lie spécifiquement à l'ARN viral [49]. Une fois dans le noyau, Rev qui contient aussi un signal d'exportation, se lie spécifiquement à la séquence RRE (*Rev Responsive Element*) exprimée sur l'ARN viral et permet son transport vers le cytoplasme pour la translation des protéines virales [50,51].

Nef agit pour diminuer l'expression de la molécule CD4, récepteur primaire du VIH-1 et du VIS à la surface de la cellule infectée [52]. Nef augmente la vitesse d'endocytose de la molécule CD4 et sa dégradation lysosomale [53]. La régulation négative de CD4 semble

avantageuse pour la production virale, car un excès de CD4 à la surface de la cellule empêche l'incorporation de Env dans le nouveau virion et le bourgeonnement de celui-ci [54,55]. Nef diminue également l'expression du CMH-I à la surface cellulaire [56].

Vpr joue un rôle dans la capacité du VIH-1 à infecter des cellules quiescentes en facilitant la localisation nucléaire du complexe de préintégration (PIC). Vpr est présent dans le complexe PIC et agit comme un facteur de transport nucléocytoplasmique en attachant directement le génome viral au pore nucléaire de la cellule hôte [57].

Vif est une protéine, qui permet de maintenir l'infectiosité du virion nouvellement assemblé. En effet, APOBEC3G est une protéine de la cellule hôte qui, en l'absence de Vif, est incorporée dans le virion, et qui a pour fonction de perturber la transcription inverse ultérieure du virus, en générant des mutations létales pour le virus, et rendant ainsi le virus non infectieux. Vif cible APOBEC3G pour la polyubiquitination et la dégradation protéasomale. Ceci empêche l'incorporation de APOBEC3G dans les virions et ceci maintient le caractère infectieux virion [58].

Vpu (du VIH-1) est une protéine accessoire exprimée par le VIH-1, mais non par le VIS. Elle joue un rôle dans la libération du précurseur Env dans le réticulum endoplasmique (RE). En effet, lors de l'expression des protéines virales, les molécules CD4 et Env forment un complexe dans le RE, et provoquent ainsi le piégeage des deux protéines à l'intérieur de ce compartiment [59]. Cette formation de complexes Env-CD4 intracellulaires interfère ainsi avec l'assemblage de virions. Le rôle de vpu est de libérer l'enveloppe Env en déclenchant la dégradation de CD4. En l'absence de vpu, un grand nombre de virions demeure attaché à la surface des cellules infectées [60].

Vpx (du VIS) est une protéine accessoire synthétisée par le VIS, mais pas par le VIH-1. Il a été mis en évidence que vpx cible SAMHD1, un facteur de restriction des lentivirus, pour l'ubiquitiner et le dégrader [61]. En outre, vpx est également impliqué dans l'importation nucléaire du génome du VIS et des protéines associées [62].

1.8. Le récepteur et les corécepteurs du VIH-1 et VIS

La molécule CD4 fut identifiée comme récepteur principal du VIH-1 en 1984 [63]. Une dizaine d'années après, il fut rapporté que l'utilisation d'un corécepteur notamment CCR5 et CXCR4 serait primordiale pour faciliter l'entrée du VIH-1 dans la cellule cible [64,65]. Ainsi *in vivo*, le VIH et VIS infectent principalement les cellules hématopoïétiques qui expriment la molécule CD4 et les corécepteurs CCR5 et CXCR4. Ceux-ci comprennent principalement les lymphocytes T auxiliaires, les macrophages, les cellules de Langerhans, les cellules dendritiques et les microglies [66-68]. Certaines souches du VIH-1 peuvent infecter préférentiellement un type cellulaire par rapport à l'autre. Ainsi, les souches M-tropiques (R5) infectent aussi bien les macrophages que les lymphocytes T mémoires exprimant CCR5 à leur surface, tandis que les souches T-tropiques (X4) n'infectent pas les macrophages, mais les lymphocytes T mémoires et naïves [69-73].

1.8.1. Le corécepteur CCR5

CCR5, aussi connu comme CD195 est un récepteur de type 5 des chimiokines de la catégorie C-C. Il est formé de sept hélices- α transmembranaires, d'une extrémité amino-terminale extracellulaire, et d'une extrémité carboxy-terminale intracellulaire couplée à la protéine G et fait donc partie de la famille des GPCR (*G Protein Coupled Receptor*) [74]. Les chimiokines sont des petites cytokines chimiotactiques sécrétées dans l'organisme par les cellules du système immunitaire. Elles jouent un rôle clé dans la défense immunitaire en contrôlant la migration, l'activation, la différenciation et la survie des cellules immunitaires [75]. Les ligands du récepteur CCR5 sont les chimiokines CCL3 et CCL4 (aussi connu comme MIP-1 α et MIP-1 β) et CCL3L1 [76,77]. En plus CCR5 interagit avec CCL5 aussi connu comme RANTES [78], exprimé sur les lymphocytes mémoires T CD4 et T CD8, les NK, macrophages, éosinophiles et microglie, et est nécessaire pour la migration de ces cellules [79]. Ce corécepteur est utilisé par le VIH-1 et le VIS.

1.8.2. Le corécepteur CXCR4

CXCR4 est un récepteur de type 4 des chimiokines de la catégorie C-X-C, qui appartient à la grande famille des GPCR et est composé de sept hélices α . Il est directement impliqué dans l'organogenèse, l'hématopoïèse et la réponse immunitaire [80]. Son ligand est SDF1 (Cell-Derived Factor 1) aussi connu comme CXCL12 [81,82]. Dans le contexte du VIH-1, l'utilisation de CXCR4 est associée à une progression rapide et plus agressive vers le SIDA [83]. En outre, il est connu que les virus isolés chez des individus nouvellement infectés utilisent principalement le CCR5 (virus R5) comme corécepteur. Mais au cours de l'infection, le tropisme passe de R5 à X4 chez ~50% des individus infectés [84]. Ce corécepteur est principalement utilisé par le VIH-1 et non par le VIS.

1.8.3. Les autres corécepteurs

Outre ces corécepteurs, de nombreuses autres molécules ont été identifiées qui pourraient jouer le rôle de corécepteurs du VIH-1, VIH-2, ainsi que du VIS [85-90] (**Table 1**). Parmi ceux-ci, GPR15 a été proposé comme plus efficacement utilisé par le VIS comme corécepteur, comparé au VIH-1 qui l'utilise rarement et de manière inefficace [91].

Corécepteurs	Virus
CCR1	VIH-2
CCR2b	VIH-1, VIH-2, VIS
CCR3	VIH-1, VIH-2
CCR4	VIH-2
CCR8	VIH-1, VIH-2, VIS
CCR9	VIH-1
CCR6	VIH-2
CXCR5	VIH-2
CX3CR1	VIH-1, VIH-2
ChemR23	VIH-1, VIH-2
RDC1	VIH-1, VIH-2, VIS

Tableau 1: Les corécepteurs du VIH-1 et VIS

Adapté de [89]

1.9. Le cycle viral du VIH-1

Suite à l'adhésion de la particule virale à la cellule hôte par la liaison de la gp120 au récepteur CD4 (**Figure 5**), cela permet un changement de conformation de la gp120 favorisant l'interaction avec le corécepteur, et une fusion de la gp41 avec la membrane de la cellule cible. La décapsidation qui s'ensuit permet la libération du matériel génétique (ARN) viral, ainsi que les enzymes comme la transcriptase inverse et l'intégrase dans le cytoplasme de la cellule hôte.

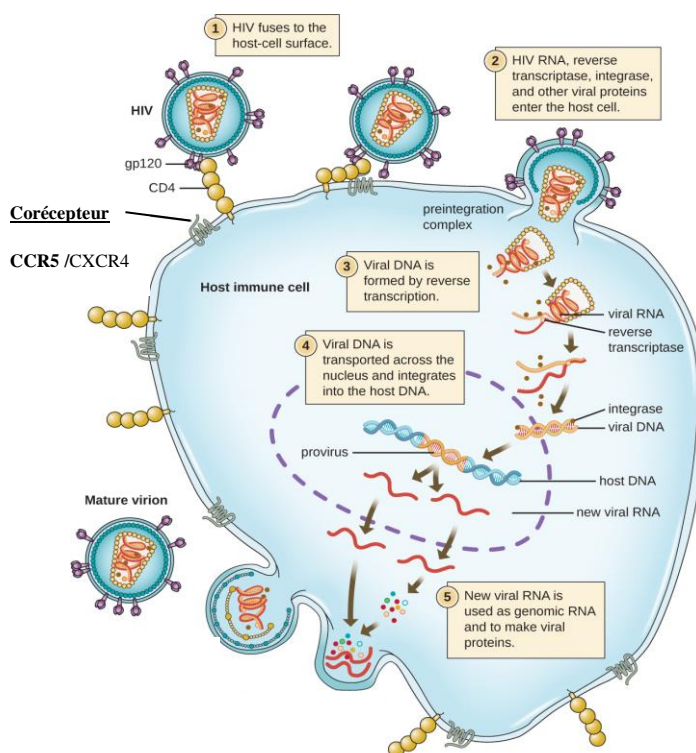


Figure 5: Cycle viral du VIH-1

Adapté de [92]

Ensuite, la transcription de l'ARN viral en ADN est accomplie par la transcriptase inverse (RT), qui génère un duplex d'ADN linéaire. La transcription inverse crée des duplications des régions U5 et U3 de l'ARN de sorte que le produit d'ADN résultant soit plus long que l'ARN aux deux extrémités. C'est l'origine des régions LTR (*long terminal repeats*), chacune

constituée de régions U3 / R / U5 qui sont caractéristiques de la forme d'ADN du génome viral [93].

Suite à la rétrotranscription de l'ARN viral, l'ADN viral double-brin nouvellement synthétisé doit s'intégrer dans le génome de la cellule hôte, afin de pouvoir passer à l'étape de la réplication. Ce processus d'intégration du matériel génétique viral est assuré par l'enzyme appelée intégrase (IN). Cette enzyme comprend deux sites de liaisons : l'un pour lier l'ADN viral et l'autre pour lier l'ADN de la cellule hôte. Après la migration du complexe de préintégration ou PIC (*Pre-integration complex*) dans le noyau, l'intégrase catalyse l'insertion des deux extrémités d'ADN viral dans un chromosome de la cellule hôte. Une fois l'ADN viral intégré, sa transcription peut avoir lieu en utilisant la machinerie de transcription de la cellule hôte (**Figure 5**). Pour cette transcription, un promoteur est nécessaire. Et celui-ci est localisé dans la région 5' du LTR de l'ADN viral. L'ARN polymérase II de la cellule hôte se lie à ce promoteur, et se sert de cet ADN viral comme matrice pour synthétiser des ARN messager. Ce processus est contrôlé par la protéine virale régulatrice Tat [94,95].

Enfin, l'assemblage des virions nouvellement synthétisés se produit au niveau de la membrane plasmique de la cellule hôte (**Figure 5**), avec le concours de la polyprotéine Gag du VIH-1 qui sert de médiation à tous les événements essentiels de l'assemblage du virion, y compris la liaison à la membrane plasmique [96].

1.10. La pathogenèse du VIH

La pathogenèse du VIH-1 se caractérise par trois phases, dont la phase aiguë la phase asymptomatique et la phase SIDA (**Figure 6B**). Selon les estimations, chez les adultes une période moyenne de 10 à 11 ans s'écoule à partir de l'infection jusqu'à l'apparition du stade SIDA [97]. Il est à noter qu'il existe des progresseurs rapides (environ 20%), qui développent le SIDA en seulement 5 ans d'infection [98].

1.10.1. La phase aiguë

Cette phase aiguë survient 1 à 2 semaines post exposition au VIH-1 et dure 2 à 4 semaines [99]. Elle ne se manifeste pas par des symptômes particuliers, mais plutôt par des symptômes similaires à ceux d'une forte grippe. Parmi lesquels on note la fièvre, les sueurs nocturnes,

maux de gorge, ganglions lymphatiques fortement enflés, éruption cutanée, nausée, vomissement, etc. (**Figure 6A**). Ces symptômes disparaissent ensuite d'eux-mêmes. Il a été estimé que 40 à 90% d'individus infectés manifestent ces symptômes [100].

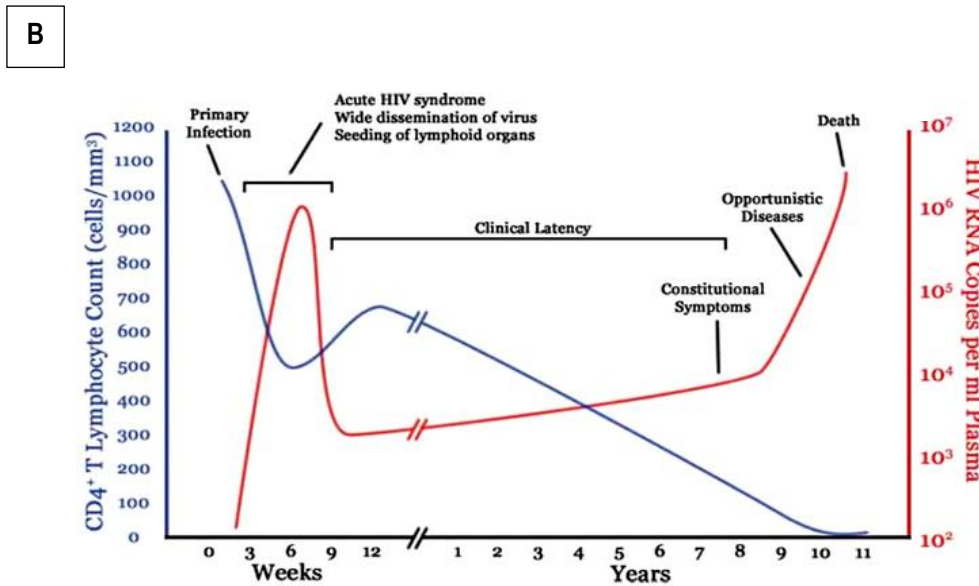
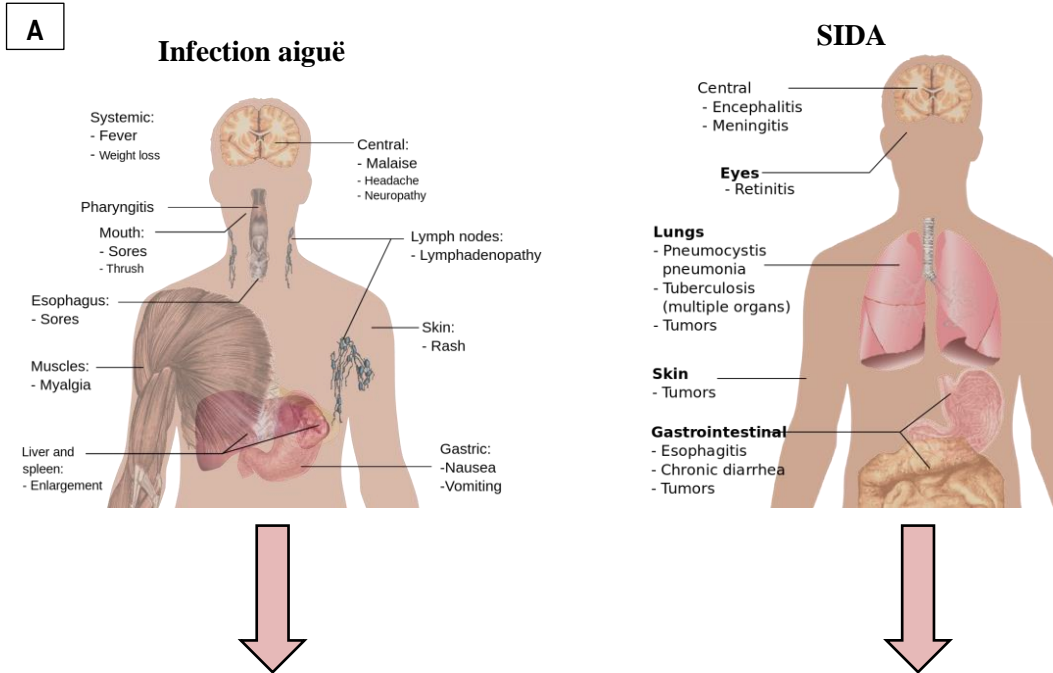


Figure 6: Phases de l'infection du VIH-1
D'après [101,102]

Ainsi, une infection aiguë par le VIH-1 est difficile à diagnostiquer parce que les symptômes sont transitoires et non spécifiques, et surtout n'apparaissent pas chez tous les sujets. Pourtant, il est essentiel de faire le diagnostic correct le plus tôt possible, car non seulement un traitement précoce peut apporter des bénéfices, mais aussi parce que les patients en infection aiguë présentent un risque accru de transmission plus élevé que lors d'une infection chronique [103], en raison des charges virales plasmatiques élevées, souvent supérieures à un million de copies d'ARN par ml [104] (**Figure 6B**, *courbe rouge*). Durant cette phase, les niveaux d'antigène p24 plasmatique et d'ARN du VIH-1 sont détectables, mais pas les anticorps anti-VIH [99]. Ce qui rend encore plus difficile le diagnostic du VIH-1 au cours de cette phase. Le système immunitaire de l'hôte est pris par surprise, et donc ne peut s'imposer à ce stade contre la réplication virale. Ceci est associé à une dissémination rapide du virus dans l'organisme accompagné de l'établissement des réservoirs viraux, par exemple dans les ganglions, la rate, les testicules, le cerveau, etc. La forte réplication virale contribue au fort taux de mort cellulaire des lymphocytes auxiliaires T CD4, dont le nombre dans le sang baisse brusquement (**Figure 6B**, *courbe bleue*). De ce fait, le nombre de lymphocytes T CD4 dans le sang et la charge virale plasmatique sont deux marqueurs de pronostic de l'évolution de la pathogenèse du VIH-1 [105,106]. La phase aiguë est aussi marquée par une forte déplétion des lymphocytes T CD4 dans le tractus gastro-intestinal [107-109] et surtout dans les sites effecteurs de la muqueuse intestinale, c'est-à-dire la lamina propria [110-112].

1.10.2. La phase asymptomatique et SIDA

Suite à cette phase de primo-infection, le système immunitaire de l'hôte établit une réponse immune antivirale. Cette réponse immune est temporairement associée à une diminution de la charge virale plasmatique du VIH-1 [113]. Ce qui conduit à la phase chronique asymptomatique, qui peut durer plusieurs années. Cette phase au cours de laquelle le patient ne présente pas de symptômes est aussi qualifiée de latence clinique. Cependant, une déplétion progressive des lymphocytes T CD4 dans le sang périphérique est observée. Et lorsque la quantité de ces cellules atteint la valeur seuil de 300-200 cellules/mm³ de sang, il y a une augmentation de la charge virale plasmatique associée à l'apparition des maladies opportunistes. C'est la phase SIDA. Parmi les maladies opportunistes les plus fréquentes, on compte la tuberculose et la candidose, qui apparaissent très souvent comme premières

infections opportunistes. La tuberculose à elle seule a causé la mort de plus de 320 000 personnes séropositives en 2012. De plus, on peut observer l'apparition des lymphomes comme le sarcome de Kaposi. À un stade plus avancé, on peut observer la pneumocystose pulmonaire, la toxoplasmose et des infections à CMV. Ce sont ces infections opportunistes qui sont à l'origine du décès des personnes infectées par le VIH-1 en phase SIDA.

1.11. Préventions et traitements contre le VIH-1

1.11.1. Préventions

Le combat contre le VIH-1 commence par la prévention. Ainsi, il existe plusieurs moyens permettant d'éviter les comportements à risque d'exposition au VIH.

- **L'éducation.** L'une des méthodes de prévention contre le VIH est l'éducation des personnes. Il s'agit d'un éclairage sur les différentes voies de transmission, les comportements à risque et les méthodes de protection.

- **L'abstinence.** Cette pratique est le seul moyen qui procure une protection plus sûre d'une transmission du VIH par la voie sexuelle et d'autres maladies sexuellement transmissibles.

- **Utilisation des préservatifs.** Il est recommandé de se protéger lors de chaque rapport sexuel.

- **Test de dépistage du VIH.** Connaître son statut VIH permet en cas d'infection de se faire traiter très tôt, et de prendre des mesures évitant de propager le virus. En outre, il est nécessaire que les partenaires soient aussi testés et traités.

- **PrEP.** La prophylaxie préexposition peut aider à prévenir l'infection par le VIH chez les personnes qui n'ont pas de VIH, mais qui courent un risque élevé de le contracter. PrEP implique de prendre un médicament spécifique comme le Truvada contre le VIH tous les jours. Si une personne est exposée au VIH, la présence du médicament PrEP dans le sang peut aider à empêcher l'infection [114].

- **Éviter l'usage de drogue par injection.** Si un individu le fait, alors n'utiliser que du matériel stérile d'injection et ne pas partager le matériel avec d'autres personnes.

- **PEP.** La prophylaxie post-exposition est un moyen de prévenir l'infection à VIH après une éventuelle exposition récente. Il s'agit de prendre les médicaments contre le VIH dès que possible dans les 3 jours après un seul événement à haut risque [115].

1.11.2. Traitements

Depuis le début de l'épidémie, des recherches significatives ont abouti au développement de plus de 40 médicaments antirétroviraux qui peuvent aider à contrôler l'infection lorsqu'ils sont utilisés dans diverses combinaisons [116]. L'utilisation des thérapies antirétrovirales (ART) améliore non seulement la qualité, mais aussi l'espérance de vie des sujets infectés. En effet, les bénéfices de la ART sont tels qu'il y a une réduction considérable de la morbidité et la mortalité, si bien que l'espérance de vie des sujets séropositifs est seulement de peu inférieure à celle des personnes non infectées par le VIH-1 [117,118]. Les médicaments qui composent la ART sont regroupés en six classes selon leur fonction anti-VIH (**Tableau 2**).

Classes	Niveau d'action	Exemples
Inhibiteurs d'entrée	Bloque le CCR5	<i>Maraviroc</i>
Inhibiteurs de Fusion	Bloque la gp41	<i>Enfuvirtide (T-20)</i>
(NNRTI) Inhibiteurs non nucléosidiques de la RT	Rétrotranscription	<i>Efavirenz, Etravirine</i>
(NRTI) Inhibiteurs nucléosidiques de la RT	Rétrotranscription	<i>Zidovudine, Tenofovir</i>
(PIs) Inhibiteurs de la protéase	Protéase du VIH	<i>Indinavir, Tipranavir</i>
(INSTIs) Inhibiteur de l'intégrase	Intégration de l'ADN viral	<i>Dolutegravir, Raltegravir</i>

Tableau 2: Les différentes classes des antirétroviraux

Cependant, en dépit d'une augmentation importante des personnes ayant accès à la ART, il y avait en 2015, 54% de sujets adultes séropositifs, 51% d'enfants et 23% de femmes enceintes qui n'avaient pas accès à ces traitements [14]. En outre, l'accès reste limité pour les pays pauvres et en voie de développement, qui sont en même temps les plus touchés par la pandémie du VIH-1 tels que les pays de l'Afrique subsaharienne et australe. Enfin, la ART

ne permet pas d'éradiquer le virus, vu l'établissement très précoce du réservoir viral [119-121], et la réplication résiduelle du virus même durant la ART [122,123], même si ce concept demeure controversé, vu qu'il manque à ce jour des méthodes et procédures robustes qui permettraient de déterminer clairement un réservoir actif durant la ART. Par conséquent, il reste à élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques et vaccinales en ciblant des molécules ou cellules immunitaires capables d'induire à la fois des anticorps par les lymphocytes B et des cellules T CD8 efficaces pour espérer, non seulement empêcher de nouvelles infections, mais aussi éventuellement éliminer le réservoir viral.

1.12. Les modèles expérimentaux pour l'étude de la pathogenèse du Sida

1.12.1. Le modèle du chimpanzé

Le chimpanzé étant le primate le plus proche de l'homme, notamment avec ~96% de gènes identiques à ceux de l'homme [124], fut utilisé comme premier modèle animal d'infection *in vivo* du VIH-1 dès les années 1990. Cela a été renforcé par le fait que le SIVcpz, contrairement aux autres souches du VIS, a une structure génomique identique à celle du VIH-1 [36]. Malheureusement, les expériences avec ce modèle n'ont pas permis de développer un vaccin ni d'avancer dans la compréhension du virus, puisque ce modèle, bien que sensible à l'infection par le VIH-1, ne développe que très rarement le SIDA [125,126]. On note en particulier l'absence de déplétion des lymphocytes T CD4 chez les chimpanzés infectés par le VIH-1, ainsi qu'une réponse cellulaire des lymphocytes T CD8 considérablement basse, comparativement aux personnes infectées par le VIH [127]. En dehors de ces différences majeures, des questions d'éthiques rendent ce modèle inaccessible à la recherche biomédicale du fait de la protection de cette espèce [40].

1.12.2. Le modèle du macaque

Les primates comme les macaques rhésus (*Macaca mulata*) d'origine d'Asie, qui sont naturellement indemnes de VIS, développent le SIDA suite à une transmission interspèce [128]. Ainsi, contrairement aux macaques d'autres espèces de primates, comme les singes verts d'Afrique (AGM) et les Sooty mangabey, ne développent pas de maladie bien que ceux-ci répliquent le virus (**Figure 7**).

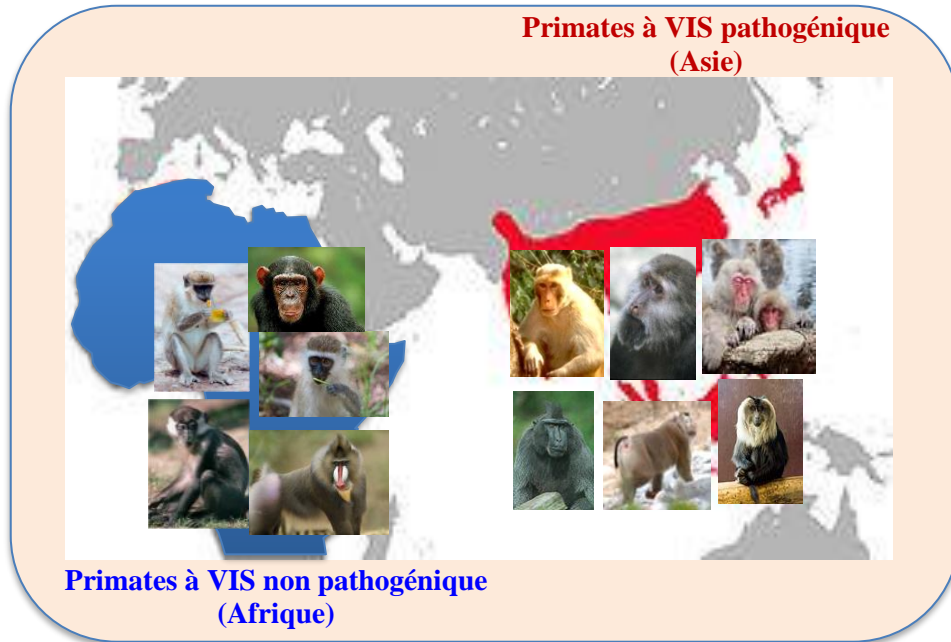


Figure 7: Les espèces simiennes et le Sida

Intéressant est le fait que parmi les macaques, il existe une différence de sensibilité au virus. C'est ainsi que les macaques rhésus d'origine chinoise présentent une sensibilité réduite, traduite par une évolution plus lente vers le SIDA, comparés aux macaques rhésus d'origine indienne [129,130] (**Figure 8**).

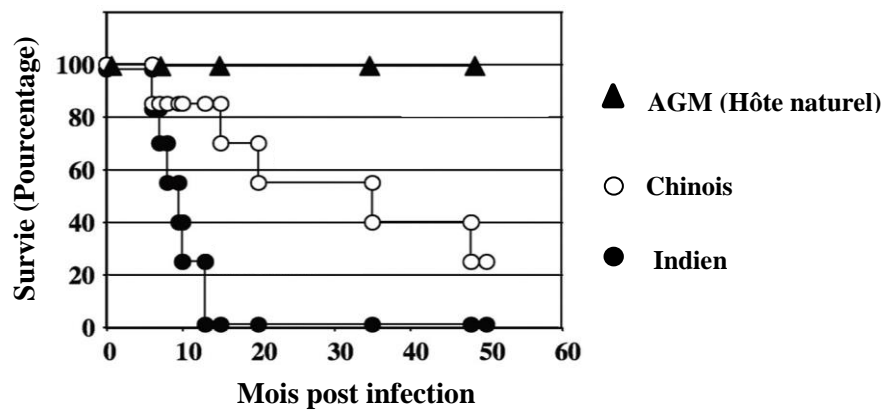


Figure 8: La survie de différents modèles du macaque infectés par le VIS.

Pourcentage de survie par rapport au temps (mois) de 3 types de primates infectés par le VIS. Les macaques chinois et indiens ont été infectés par le SIVmac251 et les AGM par le SIV_{agm.sab92018}.

Adapté de [131]

Partie II

1.13. Le système lymphatique

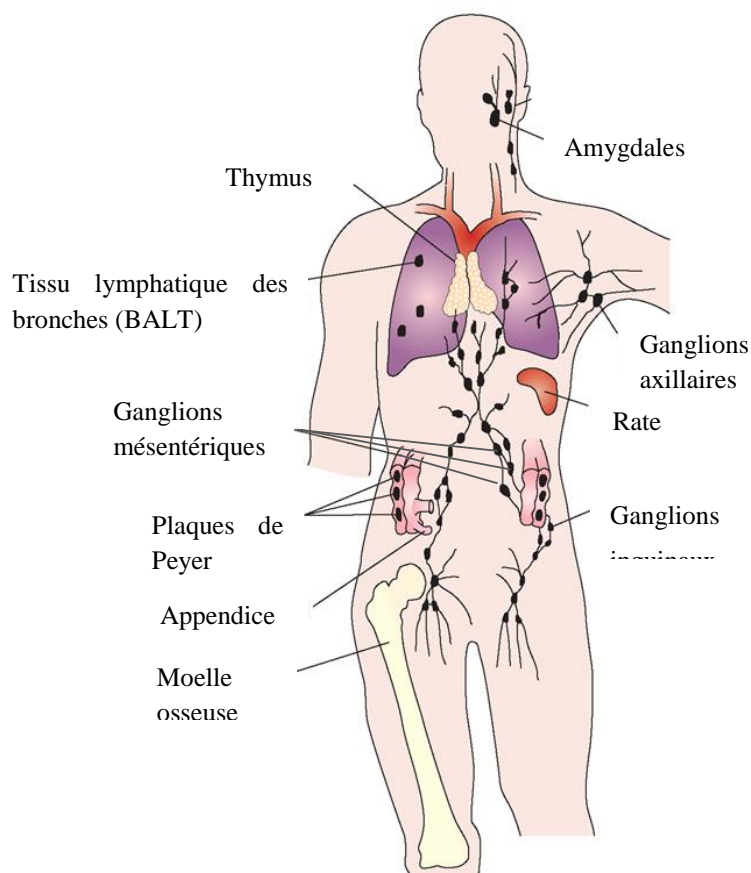


Figure 9: Le système lymphatique
Adapté de [132]

Le système lymphatique comprend les vaisseaux et les organes lymphatiques. Il a pour fonction le drainage des liquides tissulaires et des substances issues des espaces extracellulaires qui ne peuvent pas être résorbées par la circulation sanguine. Puis, il forme un réseau de transport des cellules immunitaires d'un organe lymphatique vers un autre, et vers le sang. On distingue les organes lymphatiques primaires qui sont le thymus et la moelle osseuse (**Figure 9**), et les organes lymphatiques secondaires, dont la rate, les ganglions périphériques (axillaires inguinaux), les ganglions mésentériques (colon et iléon), les plaques de Peyer etc [133].

La moelle osseuse abrite le processus d'hématopoïèse et est le site de la maturation des lymphocytes B à partir des cellules souches hématopoïétiques [134,135]. Ces cellules quittent ensuite la moelle osseuse par le sang et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires.

Le thymus est l'organe de la maturation des lymphocytes T, après que ceux-ci aient quitté la moelle osseuse. Dans le Thymus ces cellules subissent une sélection positive, puis négative, si bien que seuls survivent les lymphocytes T ayant une bonne affinité aux molécules du CMH du soi, mais qui ne reconnaissent pas les antigènes du soi [136].

Les ganglions lymphatiques sont connectés au circuit lymphatique par des vaisseaux lymphatiques afférents, qui importent la lymphe contenant des antigènes des muqueuses, et des cellules immunitaires. Des vaisseaux efférents qui exportent entre autres des cellules mémoires. Le cortex contient la zone des lymphocytes B, pendant que celle des lymphocytes T est localisée dans le paracortex (**Figure 10**).

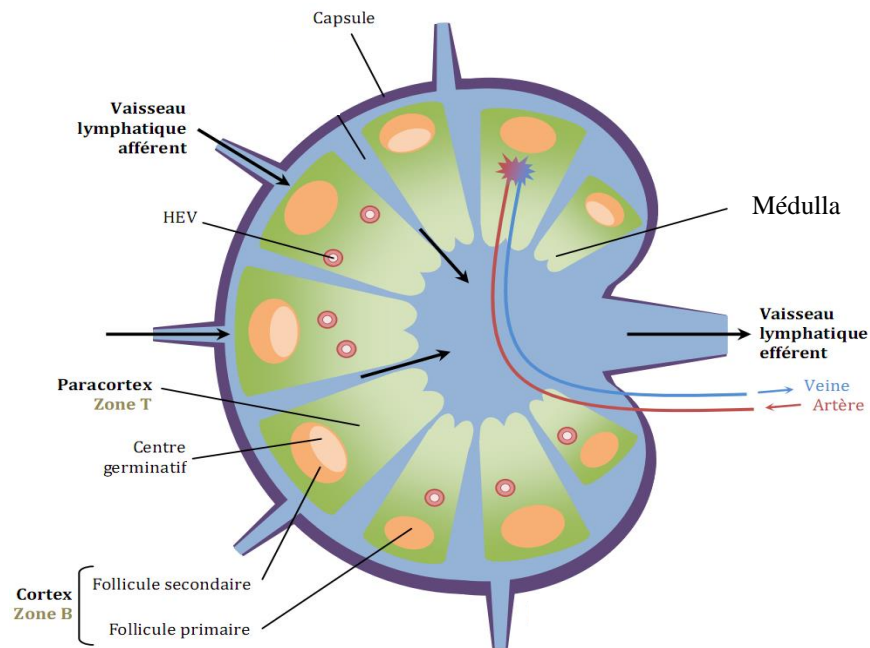


Figure 10: Structure d'un ganglion
Adapté de [133]

Dans cette zone les cellules présentatrices d'antigènes (APC) activent les lymphocytes T, afin d'initier la réponse adaptative [137]. Au cours de l'infection par le VIH-1 et du VIS, il a été proposé que les ganglions périphériques et mésentériques soient des sites de la réplication virale privilégiés [138,139].

La rate est l'organe lymphoïde le plus volumineux et est directement connectée au circuit sanguin par une artère et une veine splénique (**Figure 11**). Elle est constituée de la pulpe rouge contenant les érythrocytes et les macrophages. Et la pulpe blanche contenant les lymphocytes T CD4, T CD8, les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B, ainsi que les follicules lymphoïdes. La rate est importante pour l'élimination d'érythrocytes vieillissants et malformés [140]. Contrairement à d'autres organes lymphoïdes secondaires, la rate n'est pas connectée au système lymphatique. Par conséquent, elle est spécialisée dans la lutte contre les antigènes provenant du sang [141]. La majorité des cellules B matures quittant la moelle osseuse migrent vers la rate, où elles subissent la sélection, l'activation et la tolérance [142], faisant ainsi de cet organe un site essentiel de la réponse humorale. Chez des patients humains infectés par le VIH-1, la rate a été proposée comme réservoir viral [143,144].

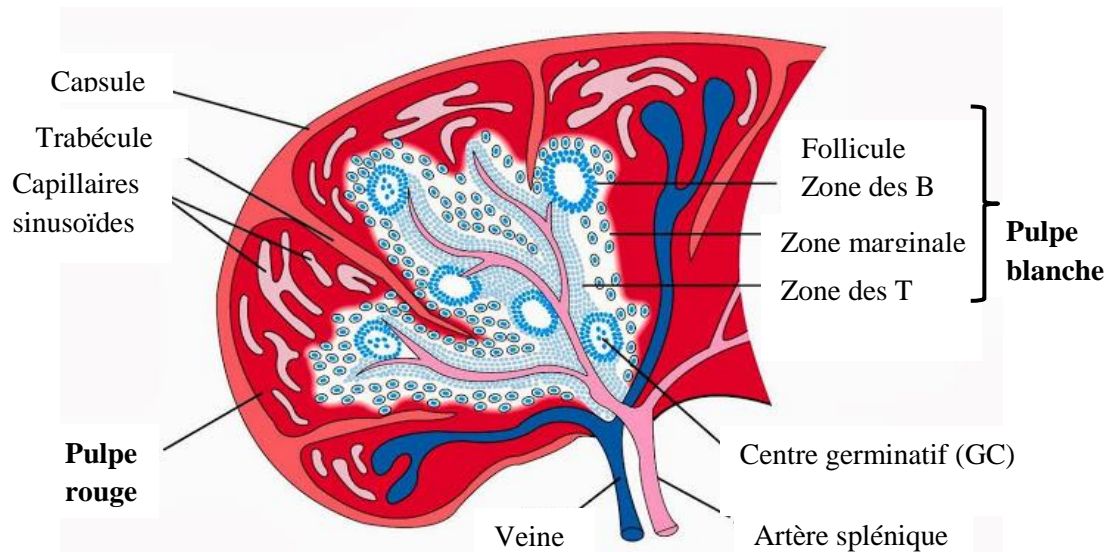


Figure 11: Structure de la rate
Adapté de [145]

1.14. Le tractus gastro-intestinal durant l'infection par le VIH-1/VIS

Le tractus gastro-intestinal (TGI) est un organe crucial non seulement dans son rôle central dans la digestion, mais aussi dans la réponse immunitaire contre les antigènes externes et internes. Il a été estimé que le TGI contient environ 60% de tous les lymphocytes du corps, incluant les lymphocytes T CD4, comparativement à seulement 2% dans le sang périphérique [146,147].

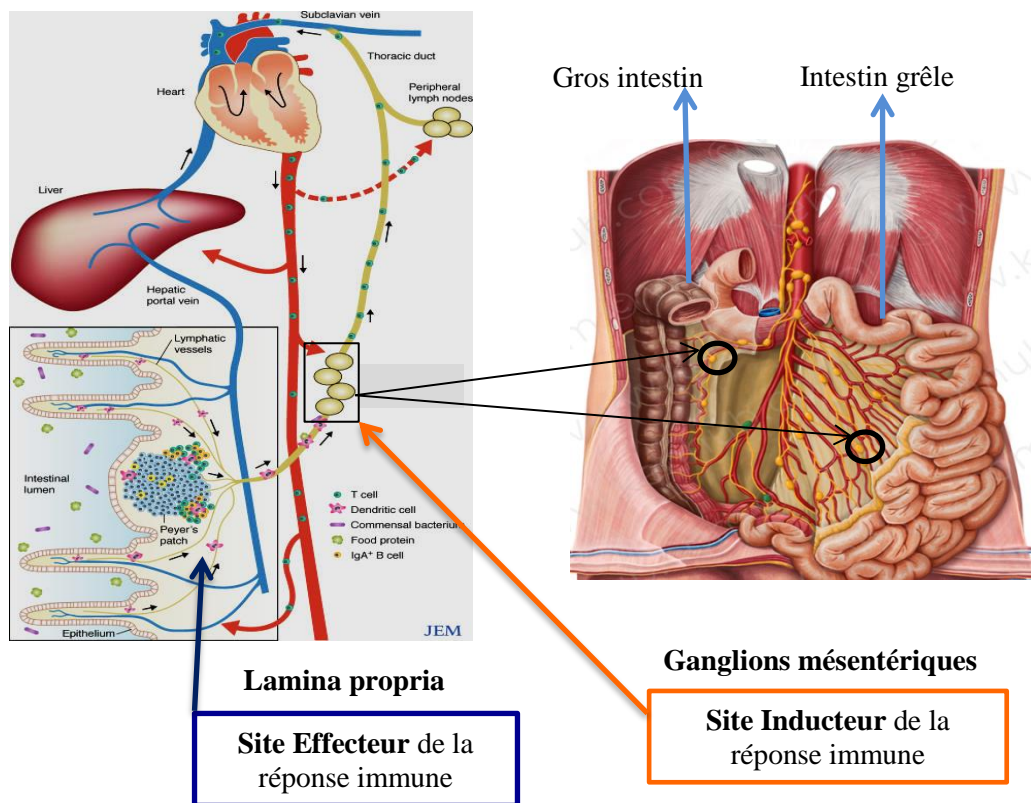


Figure 12: Anatomie du tractus gastro-intestinal
Adapté de [148,149]

Le gros intestin et l'intestin grêle, font partie du TGI et sont drainés par les ganglions mésentériques (Gmes) (**Figure 12**). Ces Gmes sont des sites inducteurs de la réponse immunitaire, dans lesquels a lieu l'activation et la différenciation des cellules immunitaires. Les cellules mémoires issues de cette activation migrent ensuite vers la lamina propria de la muqueuse intestinale, qui représente ainsi le site effecteur dans lequel les cellules effectrices

accomplissent leur fonction contre les pathogènes. Par conséquent, une réponse immunitaire insuffisante dans ce compartiment peut favoriser une translocation bactérienne de la muqueuse intestinale vers la circulation systémique. Ceci entraîne une activation généralisée, qui à son tour provoque la division cellulaire propice à la réplication virale et l'expression des corécepteurs facilitant ainsi de nouvelles infections [150,151].

1.15. Les lymphocytes T CD4 dans la réponse immunitaire

Les lymphocytes T CD4 fournissent de l'aide nécessaire aux lymphocytes B, afin que ces dernières produisent des anticorps. Ils aident également la réponse cellulaire et innée orchestrée par les lymphocytes T CD8 et les macrophages respectivement. Ainsi, lorsque leur nombre est diminué ou leurs fonctions sont perdues, l'individu devient susceptible à une grande variété d'agents infectieux comme le VIH. Pour pouvoir exercer ces multiples fonctions, les lymphocytes T CD4 se différencient en plusieurs sous-groupes jouant des fonctions distinctes (**Figure 13**).

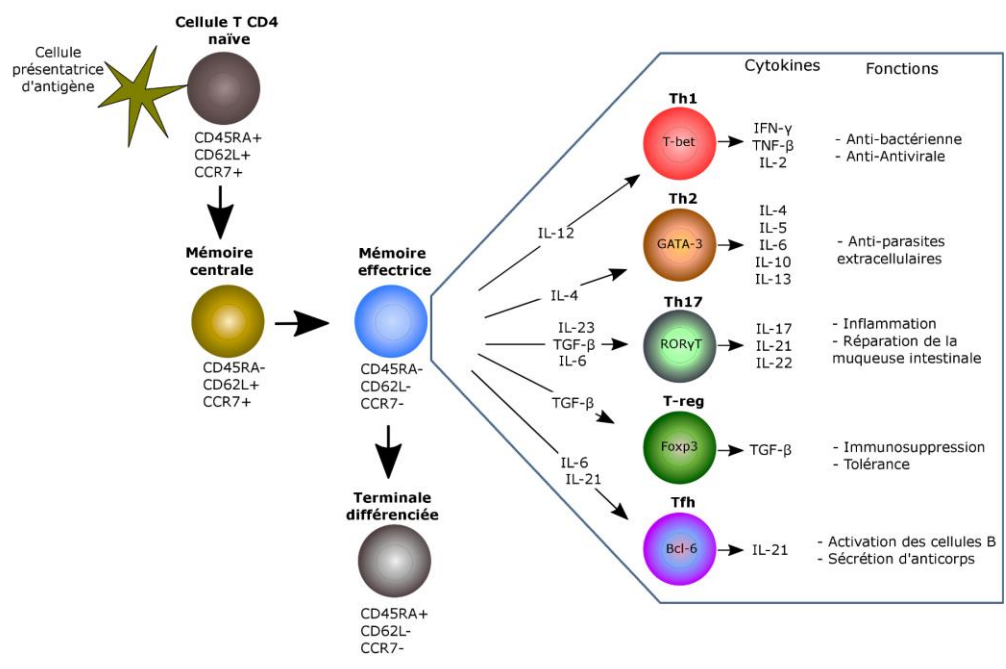


Figure 13: Différenciation et profils des lymphocytes T CD4

En effet, suite à une présentation antigénique par une APC, la cellule T CD4 naïve caractérisée par l'expression des molécules CD45RA, CCR7 et CD62L est activée et se différencie en cellule centrale mémoire (CD45RA-, CD62L+, CCR7+). Celle-ci devient une cellule effectrice mémoire (CD45RA-, CD62L-, CCR7-), et enfin, une cellule sénescence désignée comme terminale différenciée de phénotype CD45RA+, CD62L-, CCR7- [152]. Pendant que les cellules centrales mémoires constituent la mémoire du système immunitaire, en prévision à une réinfection ultérieure, et donc ayant une plus longue durée de vie, les cellules effectrices mémoires quant à elles, sont celles qui vont majoritairement sortir des organes lymphoïdes secondaires pour se rendre dans les tissus, afin d'exercer leur fonction effectrice. Selon les cytokines dans le milieu et aussi en fonction de l'agent pathogène, l'activation antigénique d'une cellule naïve peut aboutir à différentes catégories de cellules effectrices mémoires, telles que les cellules Th1, Th2, Th17, T-reg (régulatrice) ou Tfh (folliculaire auxiliaire) (**Figure 13**), dont chacune se caractérise par un profil différent d'expression de cytokines et de fonctions distinctes.

Th1: Les Th1 sont des cellules caractérisées par l'expression de T-bet, le facteur de transcription qui contrôle leur différenciation. Elles produisent l'IFN- γ et IL-2. La réponse des cellules Th1 est caractérisée par l'activation de la capacité bactéricide des macrophages. Ceci implique une augmentation de la phagocytose de macrophages, ainsi que leur capacité à dégrader les antigènes phagocytés. [153]. Au cours de l'infection par le VIH-1, il a été démontré une diminution progressive des cellules Th1 ou perte [154-157].

Th2: Les cellules Th2 se différencient sous le contrôle de GATA-3. Elles produisent les cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 [158]. IL-4 est responsable de la commutation isotopique induisant la production des immunoglobulines de type IgE par les lymphocytes B, nécessaires pour neutraliser des allergènes [153]. L'IL-5 par contre, incite les cellules éosinophiles à se débarrasser des parasites [159]. Ainsi, les Th2 sont plus efficaces contre les bactéries extracellulaires, les parasites, y compris les helminthes et les toxines. Or au cours de l'infection au VIH-1, une augmentation des Th2 et des IgE a été démontrée [154,155].

Th17: Les Th17 quant à elles secrètent l'IL-17, IL-22 et IL-23 et sont générées sous l'influence du facteur de transcription ROR γ T. La production de l'IL-17 favorise la

production des chimiokines et des cytokines pro-inflammatoires, qui par conséquent recrutent les neutrophiles et les macrophages [160]. Au niveau de l'intestin, les Th17 sont essentiels au maintien de la muqueuse intestinale en favorisant la prolifération des cellules épithéliales [161] et la sécrétion de défensine qui joue un rôle antibactérien. Au cours de l'infection au VIH-1, il y a une déplétion préférentielle des Th17 [162-164].

T-regs: Les lymphocytes T régulateurs sont une sous-population de cellules T qui modulent le système immunitaire, maintiennent la tolérance aux auto-antigènes et empêchent les maladies auto-immunes. Les T-regs répriment ou diminuent l'induction et la prolifération des cellules T effectrices. Les Tregs sont caractérisées par leur facteur de transcription FOXP3, ainsi que par la molécule CD25 à leur surface. Elles secrètent du TGF- β . Au cours de l'infection au VIH-1, une déplétion des T-regs a été observée, et pourrait favoriser le développement de l'activation chronique du système immunitaire [165].

1.16. Les cellules Tfh

1.16.1. Caractéristiques des cellules Tfh

Les cellules T folliculaires auxiliaires (Tfh), une sous-population parmi les lymphocytes T CD4, ont été décrites pour la première fois en 2000 par Schaerli *et al* [166]. Les Tfh expriment la molécule CXCR5, qui est le récepteur de la chimiokine CXCL13 [167] (**Figure 14**). Cette chimiokine est produite chez la souris majoritairement par les cellules dendritiques folliculaires (FDC) qui résident dans les follicules [168]. Chez l'homme, les Tfh produisent également CXCL13 [169,170]. Ces cellules expriment les marqueurs comme PD1, ICOS et CD40L [171]. La genèse des cellules Tfh est sous le contrôle de facteurs de transcription comme Bcl-6, c-MAF [171] et TCF1 [172,173]. Elles sont caractérisées par la production d'IL-21 [171], et peuvent également produire de l'IL-4 [174,175]. Il a été proposé que les cellules dendritiques classiques sont à la fois nécessaires et suffisantes pour amorcer la différenciation d'une cellule naïve T CD4 en cellule Tfh [176]. Cette différenciation est favorisée par les interleukines IL-6 et IL-21 [171,177]. Cependant la différenciation et la fonction des Tfh peuvent être entravées par des cytokines qui induisent le développement des cellules Th1 telles que l'IL-2 et IL-7 [178,179]. Ces cytokines augmentent l'expression des facteurs de transcription inhibiteurs des Tfh parmi lesquels Stat5 et Blimp1, qui inhibent Bcl-

6 [179,180]. D'autres facteurs de transcriptions tels que Foxo1, KLF2 peuvent également inhiber les Tfh en réprimant l'expression de CXCR5 et de Bcl-6 [181,182]. En plus, KLF2 Foxo1 régulent l'expression de CD62L [183,184].

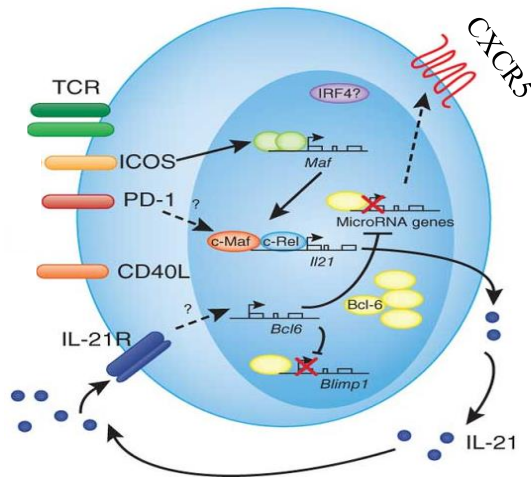


Figure 14: Caractéristiques de la cellule Tfh
Adapté de [185]

D'autres travaux ont montré un rôle différent de l'IL-7 sur la genèse des cellules Tfh. Ainsi, McDonald *et al* [179], propose que l'IL-7 inhibe les Tfh via Stat5 alors que Seo YB *et al* [186] rapporte un rôle de l'IL-7 dans leur développement, puisque des souris immunisées avec un antigène trivalent du virus influenza en présence d'IL-7 présentent une expansion des Tfh et une meilleure immunité humorale. De plus, une surexpression d'IL-7 conduit à la formation de centres germinatifs, une amplification de la réponse Tfh, et une meilleure immunité humorale [187]. D'autre part, T-bet, un facteur de transcription inducteur des Th1 [188,189] inhibe les Tfh via la répression de Bcl-6 [190]. Outre, l'IL-2, l'IL-27 qui induit la différenciation des cellules T en Th1 via T-bet [191,192], conduit également la différenciation des cellules Tfh [193]. Batten *et al* [194] rapporte également que des souris IL-27ra^{+/+} présentent une meilleure induction des cellules Tfh comparées à des souris déficientes pour IL-27ra^{-/-}. Hennerici *et al* [195] propose une corrélation entre l'augmentation de l'IL-27 et le nombre des cellules Tfh chez des sujets humains atteints de pemphigus, une maladie auto-immune qui touche l'épiderme.

Les Tfh sont des cellules mémoires majoritairement localisées dans les organes lymphoïdes secondaires, mais elles sont plus rares dans le sang. Une population de cellules Tfh périphériques (pTfh ou cTfh), semblable à celle des Tfh des GC (GCTfh) a été proposée [196-198]. Contrairement aux GCTfh, les pTfh expriment plus faiblement les marqueurs CXCR5, PD1, Bcl-6 et ICOS, et sont caractérisées par l'expression de CXCR3 et CCR6. C'est ainsi que trois sous-populations distinctes ont été identifiées : les cellules Tfh1 (CXCR3⁺CCR6⁻), les Tfh2 (CXCR3⁻CCR6⁻) et les Tfh17 (CXCR3⁻CCR6⁺) [199,200]. Les pTfh expriment des cytokines caractéristiques des lymphocytes Th1, Th2 et Th17. Par conséquent, les Tfh1 sont analogues aux Th1 et secrètent IFN- γ , mais ne produisent pas de l'IL-21. Elles expriment T-bet comme facteur de Transcription. Les Tfh2 analogues aux Th2 produisent de l'IL-21, l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13. Elles expriment GATA-3 comme facteur de transcription. Les Tfh17 analogues aux Th17 expriment de l'IL-21, l'IL-17A et l'IL-22. Elles ont ROR γ T comme facteur de transcription [199].

1.16.2. La fonction des cellules Tfh et la réaction des GCs

Après leur différenciation dans la zone des T suite à une activation antigénique, les précurseurs des cellules Tfh (pré-Tfh) ou Tfh immatures guidées par la chimiokine CXCL13 se dirigent vers la zone des lymphocytes B et interagissent avec celles-ci (1) (**Figure 15**).

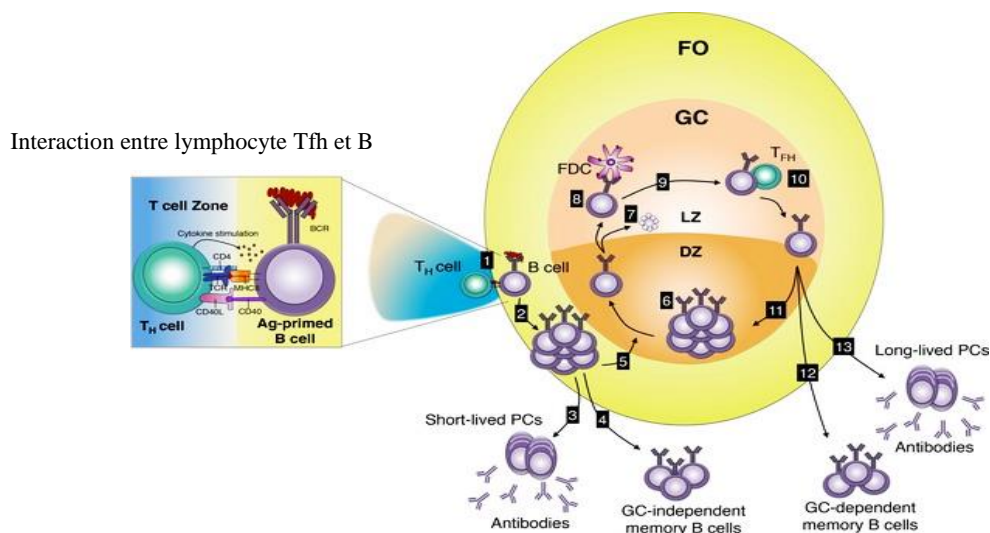


Figure 15: Activation des lymphocytes B par les Tfh
Adapté de [201]

Cette interaction (2) favorise la prolifération des lymphocytes B à l'extérieur du GC et a pour conséquence (3) la génération de cellules plasmiques (PC) (à courte durée de vie) sécrétant des anticorps de faible affinité [202] et (4) l'expansion de lymphocytes B mémoires de courte durée de vie. Cependant, (5) cette interaction entre Tfh immatures et lymphocytes B peut conduire à la formation des GC dans lesquels au niveau de la zone sombre (DZ, Dark Zone) il y a (6) l'expansion clonale des lymphocytes B, qui subissent une hypermutation somatique (HMS) et la commutation isotypique (CI) pour une meilleure affinité et spécificité [203]. Par la suite, dans la zone claire (LZ) (7) les lymphocytes B, dont les anticorps ont une faible affinité à l'antigène, meurent par apoptose, tandis que ceux ayant une plus forte affinité (8) sont sélectionnés positivement par les FDC. Grâce à cette bonne affinité antigénique, ils sont capables de capturer l'antigène à la surface des FDC, de l'internaliser, et (9) de le présenter via le CMH II aux GCTfh matures. Cette interaction permet aux lymphocytes B de recevoir des GCTfh matures (10) d'autres signaux. Ces signaux peuvent occasionner (11) le retour vers la DZ pour subir un autre cycle d'expansion clonale, ou (12) sortir du GC en tant que lymphocytes B mémoires de longue durée vie, ou (13) de PC [201]. Il a été montré que les processus de CI et d'HMS sont soutenus par une enzyme dénommée AID (*activation-induced cytidine deaminase*) [204], dont l'expression est induite par des signaux impliquant CD40-CD40L [205-207] (**Figure 16**).

La différenciation des lymphocytes B est définie selon l'expression des marqueurs de surface CD21 et CD27 [208]. Ainsi, on distingue les cellules naïves ($CD21^+CD27^-$), mémoires quiescentes ($CD21^+CD27^+$), mémoires activées ($CD21^-CD27^+$), et mémoires tissulaires ($CD21^-CD27^-$). Ainsi les cellules Tfh fournissent des signaux de survie et de prolifération aux lymphocytes B via multiples voies, y compris CD40L, ICOS, IL-21 et BAFF. Ces molécules entrent en compétition avec les interactions Fas-FasL, qui induisent la mort cellulaire. De cette manière, les lymphocytes B peuvent mieux survivre [209-211]. À cet effet, les cellules Tfh sont le garant d'une bonne réponse des lymphocytes B.

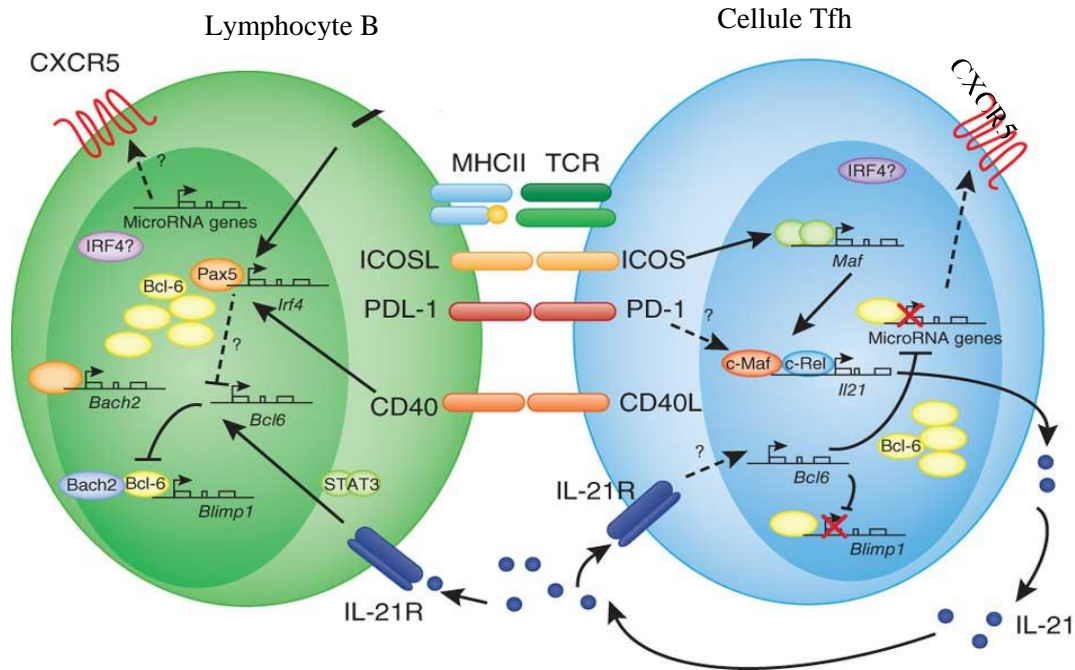


Figure 16: Interaction des Tfh et lymphocytes B dans les organes lymphoïdes secondaires
Adapté de [185]

Plusieurs modèles expérimentaux ont révélé le rôle critique des GCTfh dans le développement des réponses des lymphocytes B dans le contexte de la vaccination. Par exemple, cette population a été décrite chez les personnes vaccinées avec un vaccin contre le virus Ebola [212]. De plus, l'adénovirus induit des cellules GCTfh spécifiques de l'enveloppe du VIS [213]. Dans le modèle du macaque, une corrélation entre les cellules Tfh et les anticorps neutralisants contre le virus a aussi été rapportée [214]. Les pTfh ont été associés à des anticorps neutralisants dans le contexte de l'infection au VIH-1 [197,198], du virus de l'influenza [215,216], ou du papillomavirus humain [217]. Ces études montrent à quel point l'étude de la dynamique des cellules Tfh au cours des infections microbiennes est importante. Si les pTfh qui induisent les anticorps neutralisants au cours de l'infection par le VIH-1 ont été rapportés comme ayant un phénotype CXCR5⁺CXCR3⁻PD1⁺ [198], d'autres travaux ont plutôt proposé qu'il s'agit de pTfh ayant comme phénotype CXCR5⁺CXCR3⁺PD1⁺ [197].

1.16.3. La rate: Le site majeur des cellules Tfh

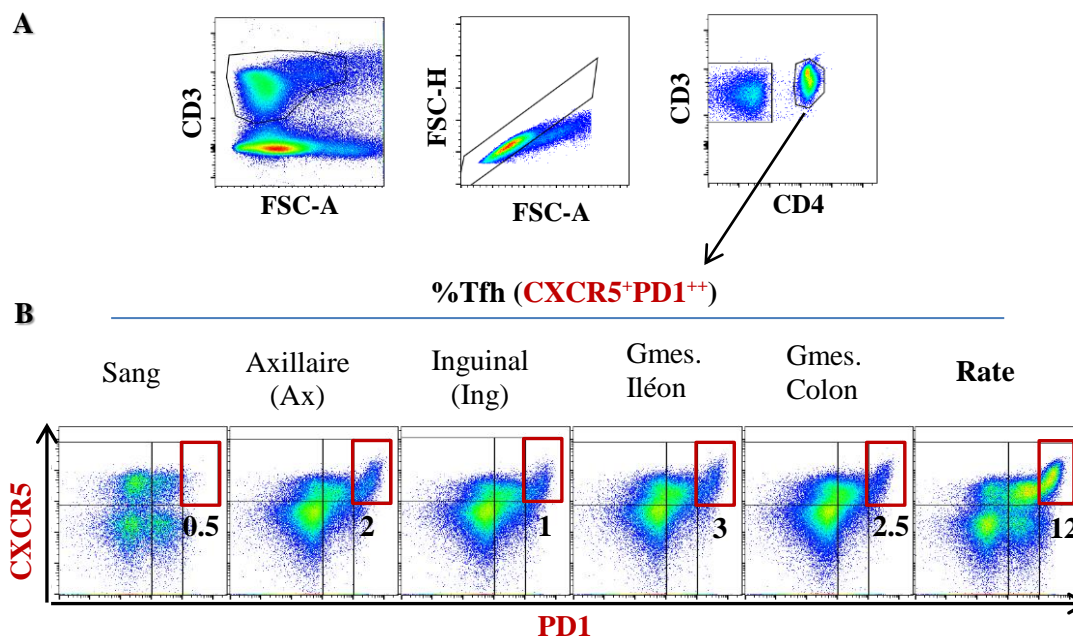


Figure 17: Pourcentages des Tfh dans les organes lymphoïdes secondaires et le sang

Nos études ont permis de montrer que les cellules Tfh sont plus abondantes dans la rate en comparaison à d'autres organes lymphoïdes secondaires, et le sang (**Figure 17**). Ce qui valide l'intérêt d'étudier les cellules Tfh dans cet organe au cours du VIH et VIS.

1.16.4. Les Tfh et les cellules B au cours de l'infection au VIH-1/VIS

Les cellules Tfh au cours du VIH-1

Des études récentes ont montré une augmentation des cellules Tfh dans les ganglions périphériques des sujets humains infectés par le VIH-1 en phase chronique [218], et chez des macaques infectés par le VIS [219]. En plus une étude récente a proposé une augmentation transitoire des cellules Tfh en phase chronique dans les ganglions périphériques des macaques infectés. Cette étude indique aussi que la progression vers le SIDA soit associée à la déplétion des cellules Tfh chez ces macaques [220]. D'autres parts, un dysfonctionnement

des cellules Tfh a été reporté par Cubas *et al* [221] en phase chronique de l'infection par le VIH-1 chez des patients humains. De plus, l'auteur propose que ce dysfonctionnement des cellules Tfh se manifeste par une perte de la sécrétion d'IL-21. Or cette cytokine est nécessaire pour l'activation des cellules B [221,222]. Par contre, l'auteur montre que l'ajout de la cytokine IL-21 restaure la fonction des cellules Tfh. En outre, une infection des cellules Tfh par le VIH-1 [223] et le VIS [224] a été mise en évidence. *Une revue complète de la littérature sur les cellules Tfh en annexe (page 150) de cette thèse apporte plus de détails.*

Les cellules B au cours de l'infection au VIH-1 :

La production des anticorps spécifiques et neutralisants contre le VIH-1 est un phénomène primordial dans la neutralisation, empêchant ainsi de nouvelles infections. Cela contribuerait à un meilleur contrôle de l'infection, de la réduction de la morbidité et de la mortalité des sujets infectés. Or durant l'infection par le VIH-1 et le VIS la perte et le dysfonctionnement des lymphocytes B ont été observés [208,225-228]. Ce qui suggère que le dysfonctionnement des lymphocytes B mémoires peut être un marqueur utile de la progression vers le SIDA. En outre, non seulement la quantité des lymphocytes B dans le sang et les ganglions décroît au cours de l'infection, mais aussi leur dysfonctionnement se manifestant par un manque de réactivité à l'immunisation [229]. Et ceci s'accompagne d'un défaut dans la production des anticorps [225]. De surcroît, une activation anormale des lymphocytes B polyclonaux est mise en évidence par le phénomène de l'hypergammaglobulinémie [230]. Des signes supplémentaires d'anomalie des lymphocytes B au cours du SIDA se manifestent par l'incidence élevée de lymphomes [231].

CHAPITRE 2

2.1.Hypothèse de recherche

La majorité des stratégies vaccinales sont basées sur le développement d'une réponse humorale caractérisée par la production d'anticorps spécifiques de haute affinité contre les pathogènes [232]. Les dysfonctionnements causés par le VIH touchent l'ensemble du système immunitaire y compris les lymphocytes B, qui sont les garants de cette production d'anticorps [208,225-228]. Or, la fonction des lymphocytes B est sous le contrôle de ces cellules Tfh [202, 203]. Ainsi, un dysfonctionnement de cette population de cellules Tfh pourrait rendre compte du déficit de la réponse humorale au cours de l'infection par le VIH. Ceci est d'autant plus concevable que les Tfh sont une sous-population de lymphocytes T CD4 mémoires, et que la déplétion des lymphocytes T CD4 mémoires est l'une des caractéristiques de la pathogenèse du Sida [233-235]. De ce fait, il serait logique de s'attendre à une déplétion des Tfh au cours de l'infection au VIH. Cependant, au début de ma thèse, les résultats d'autres laboratoires indiquaient paradoxalement une expansion des cellules Tfh [218,219], et que celles-ci soient infectées [223]. Si la majorité de ces études a été menée dans le sang et les ganglions périphériques, la rate l'organe majeur de la réponse des lymphocytes B, et les ganglions mésentériques (Gmes) qui jouent un rôle prépondérant dans l'immunité intestinale étaient jusqu'à mon travail que peu étudiés. Ainsi, l'hypothèse de mon travail de doctorat a été que :

Il existerait une déplétion et une différenciation abortive des cellules Tfh, dans la rate et les ganglions mésentériques, qui seraient responsables du déficit des lymphocytes B au cours de l'infection au VIH/VIS.

2.2.Objectifs de recherche

Objectif 1 :

Afin d'évaluer l'impact du VIH/VIS sur les Tfh, j'ai entrepris d'étudier leur dynamique dans la rate et les Gmes, et ses conséquences sur la différenciation des lymphocytes B.

- Plus particulièrement, j'ai étudié le pourcentage et le nombre de cellules Tfh en lien avec la différenciation des lymphocytes B.
- Du fait du rôle des Tfh sur la production des immunoglobulines, j'ai étudié la production d'anticorps spécifiques anti-VIS dans le sérum.

Objectif 2 :

Puisque mon hypothèse propose une différenciation abortive des Tfh, j'ai étudié les mécanismes sous-jacents, qui pourraient rendre compte de ce dysfonctionnement.

- Parmi ces mécanismes potentiels, l'architecture des organes lymphoïdes secondaires pourrait jouer un rôle important dans la mesure où la maturation des Tfh et des lymphocytes B requiert des contacts cellule-cellule.
- De plus, une bonne différenciation des Tfh nécessite les facteurs de transcriptions Bcl-6, c-Maf et TCF-1. Toutefois, lors de mes travaux, il est apparu qu'il existait des facteurs de transcription répresseurs des cellules Tfh, tels que T-bet, Foxo1, KLF2 et Stat5. Je me suis intéressé à étudier leurs expressions au cours de l'infection au VIS.
- Enfin, étant donné que les Tfh sont dans un système complexe impliquant de nombreuses cytokines et que mes observations indiquaient une expression accrue de T-bet, je me suis intéressé aux rôles des cytokines, IL-7 et IL-27, qui ont été rapportées pour induire l'expression de Stat5 et T-bet.

CHAPITRE 3

LA PERTE PRÉCOCE DES CELLULES T_{fh} DANS LA RATE DES MACAQUES INFECTÉS PAR LE VIS

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication en 2015 dans la revue PloS Pathogens (PLOS Pathog. 2015 Dec 7;11(12):e1005287) et est constitué du manuscrit tel que publié.

Early Loss of Splenic T_{fh} Cells in SIV-Infected Rhesus Macaques

Félicien Moukambi¹, Henintsoa Rabezanahary¹, Vasco Rodrigues², Gina Racine¹, Lynda Robitaille¹, Bernard Krust², Guadalupe Andreani¹, Calayselvy Soundaramourty², Ricardo Silvestre^{3,4}, Mireille Laforge^{2,*}, Jérôme Estaquier^{1,2,*}

¹, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Québec Research Center, Faculty of Medicine, Laval University, Québec, QC.

², CNRS FR3636, Faculty of Medicine des Saint-Pères, Paris Descartes University, Paris, France.

³, Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Health Sciences, University of Minho, Braga, Portugal;

⁴, ICVS/3B's-PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal.

Corresponding authors: Jérôme Estaquier, Université Laval, CHU de Québec, Centre de Recherche en Infectiologie, Québec, Canada, E-mail: estaquier@yahoo.fr; Tel.: 001 418 656 4141; Fax: 001 418 654 27 43.

3.1. Résumé

Les cellules T auxiliaires folliculaires (Tfh), une sous-population des lymphocytes T CD4, fournissent une aide cruciale aux lymphocytes B dans la production d'anticorps spécifiques aux antigènes. Bien que plusieurs études aient analysé la dynamique des cellules Tfh dans le sang périphérique et dans les ganglions lymphatiques (LN) dans le contexte du SIDA, aucune de ces études ne s'est penchée sur l'impact que pourrait avoir l'infection par le VIS sur la dynamique des cellules Tfh dans la rate, organe principal de l'activation des lymphocytes B. Dans cette étude, je montre une diminution significative des cellules Tfh durant la phase aiguë dans la rate des macaques infectés par le VIS (SIVmac251). Une diminution qui persiste en phase chronique. Cette perte profonde des Tfh est associée à un manque d'expression soutenue des facteurs de transcription définissant les Tfh, c'est-à-dire Bcl-6 et c-Maf, mais plutôt à une expression plus élevée des facteurs inhibiteurs KLF2 et Foxo1. Dans ce contexte de différenciation abortive et de perte de Tfh, j'ai trouvé une diminution des pourcentages de lymphocytes B mémoire et des titres bas d'IgG spécifiques du VIS. Ensuite, je montre un remodelage drastique de l'architecture de la rate et les ganglions (LNs), ce qui perturbe les interactions cruciales cellule-cellule, nécessaires pour maintenir les lymphocytes B mémoires et cellules Tfh. Enfin, nos données ont montré l'infection précoce des cellules Tfh. Paradoxalement, les fréquences de l'ADN viral du VIS étaient plus élevées dans les cellules Tfh spléniques des macaques progressant plus lentement vers le SIDA, suggérant des sanctuaires du VIS dans la rate. Nos résultats fournissent des informations importantes concernant l'impact de l'infection par le VIH / SIV sur les cellules Tfh, et fournir de nouveaux indices pour des stratégies vaccinales.

3.2. Abstract

Follicular T helper cells (Tfh), a subset of CD4 T lymphocytes, provide crucial help to B cells in the production of antigen-specific antibodies. Although several studies have analyzed the dynamics of Tfh cells in peripheral blood and lymph nodes (LNs) during Aids, none has yet addressed the impact of SIV infection on the dynamics of Tfh cells in the spleen, the primary organ of B cell activation. We show here a significant decrease in splenic Tfh cells in SIVmac251-infected rhesus macaques (RMs) during the acute phase of infection, which persists thereafter. This profound loss is associated with lack of sustained expression of the Tfh-defining transcription factors, Bcl-6 and c-Maf but with higher expression of the repressors KLF2 and Foxo1. In this context of Tfh abortive differentiation and loss, we found decreased percentages of memory B cell subsets and lower titers of SIV-specific IgG. We further demonstrate a drastic remodeling of the lymphoid architecture of the spleen and LNs, which disrupts the crucial cell-cell interactions necessary to maintain memory B cells and Tfh cells. Finally, our data demonstrated the early infection of Tfh cells. Paradoxically, the frequencies of SIV DNA were higher in splenic Tfh cells of RMs progressing more slowly suggesting sanctuaries for SIV in the spleen. Our findings provide important information regarding the impact of HIV/SIV infection on Tfh cells, and provide new clues for future vaccine strategies.

3.3. Introduction

The follicular T helper (Tfh) cell, part of the T helper cell populations, tightly controls germinal center (GC) development. Tfh are considered to be a distinct CD4 T cell type with great importance for protective immunity. Rare in the blood, Tfh are essential for maintaining GCs and mediate B cell affinity maturation [1,2]. Tfh provide survival and proliferation signals to B cells via multiple pathways, including CD40L, IL-21, and BAFF, which compete with Fas-FasL interactions [3-5]. IL-21 production by Tfh has an important function, as B cells are usually aberrant in the absence of IL-21 [4-6]. Moreover, IL-21 is a critical factor for the control of chronic viral infections [7-9]. Tfh cells selectively express CXCR5 and PD-1 [10,11] but only weakly CCR5, CCR2, CX3CR1, and related inflammatory cytokine receptors [12]. *BCL6* and *MAF* have been identified as master regulators of their differentiation [12-16].

It has been reported that during the acute and chronic phase of HIV infection, Tfh frequencies are increased in the blood [17], and especially in LNs of chronically-infected individuals [18]. Several groups, including ours, have shown that blood and LN Tfh cells are infected by HIV/SIV [18-24]. However, other groups have reported a loss of Tfh cells in blood [25]. HIV-infected individuals having less than 200 CD4 T cells/mm³ have a deficiency of IL-21-secreting CD4 T cells [26]. It has been proposed that Tfh cells isolated from peripheral LNs of infected individuals have a high spontaneous cell death rate [21], and limited proliferative capability [19]. Given the crucial role played by Tfh cells on B cell activation/differentiation, Cubas and colleagues have proposed that excessive and persistent triggering of PD-1 on LN Tfh cells may affect their ability to provide adequate B cell help [20]. In mice, even though PD-1 is associated with Tfh expansion in the spleen, it has been reported that in its absence Tfh are impaired in the synthesis of important cytokines for the differentiation of long-lived plasma B cells [27].

Recently, we demonstrated an abortive differentiation of splenic Tfh cells during the course of *Leishmania infantum* infection of rhesus macaques [28]. In this model, splenic Tfh cells fail to express PD-1 and are associated with abnormal B cell differentiation and poor production of parasite-specific IgG, despite the occurrence of polyclonal

hypergammaglobulinemia [28]. These discrepancies may reflect organ-specific Tfh responses, yet no study on HIV/SIV infection has so far addressed the Tfh dynamics in the primary organ of B cell activation, the spleen. We hypothesized that the dynamics of splenic Tfh is affected during SIV infection and warranted investigation.

Herein, we show that splenic Tfh cells decrease early after SIV infection. This profound loss of Tfh cells is associated with the loss of memory B cell subsets and lower titers of SIV-specific IgG. Finally, whereas a transient increase in the transcriptional factors Bcl-6 and cMaf is observed, our results indicate an increase in the expression of the repressors of Tfh differentiation Foxo1 and KLF2. Due to the critical role played by Tfh cells in the establishment of the immune response, preventing both their depletion and infection could be a new challenge for vaccine strategies.

3.4. Results

	Animal OCID	Day of euthanasia post infection	Δ CD4 counts (Cells/mm ³)	Viral load (copies/ml)	Mamu-A Haplotype 1	Mamu-A Haplotype 2	Mamu-B Haplotype 1	Mamu-B Haplotype 2
SIV-	PB057	0	323	0	A004	A006	B001a	B069a
	PB061	0	826	0	A006	A008	B001a	B024
	PB069	0	1350	0	A004	A012	B001a	B056a
	93750	0	ND	0	ND	ND	ND	ND
	528	0	ND	0	ND	ND	ND	ND
SIV+	PB038	14	ND	0	A006	A011	B001a	B001a
	PB052	14	898	7.90×10^4	A002	A008	B069a	B106
	PB006	14	74	2.81×10^7	A001	A023	B002	B056a
	PB041	14	-554	8.94×10^6	A025	A026	B008	B017f
	PB005	14	-784	5.81×10^6	A008	A008	B001a	B012a
	PB051	14	116	4.67×10^7	A004	A004	B012b	B012b
	PB049	30	493	9.12×10^7	A002	A004	B069a	B069a
	PB026	30	-947	2.34×10^6	A007	A008	B008	B008
	PB015	30	-492	1.11×10^6	A008	A224	B001a	B001a
	PB033	30	-160	6.54×10^6	A002	A008	B001a	B017a
	PB030	30	-954	2.08×10^7	A008	A008	B015a	B017a
	PB055	30	257	3.24×10^7	A008	A019	B017a	B017a
	PB023	> 180	-761	1.39×10^8	A001	A006	B001a	B015b
	PB028	> 180	-668	1.61×10^8	A004	A012	B012b	B043a
	PB044	> 180	-216	5.71×10^7	A008	A008	B008	B017a
PB013	> 180	-1404	3.57×10^6	A001	A008	B002	B055	

Dynamics of lymphocytes is organ dependent

RMs of Indian origin were infected with SIVmac251 and sacrificed at different time points post infection to address the dynamics of CD4 and CD8 T cells, and B cells. Given that some MHC class-I alleles, particularly Mamu-A001, Mamu-B008 and Mamu-B017, are associated with low levels of viremia in Indian RMs [29-31], all the RMs used in this study were genotyped. In our cohort, only one homozygote for Mamu-B017 (PB055) was enrolled, and

none of the other RMs resulted homozygote for the two other alleles (Table 1). At the chronic phase, a decrease in peripheral CD4 T cell counts was observed in all SIV-infected RMs except PB055. Viral load is also shown in the Table 1 at the death. At day>180, PB013 and PB044 showed lower levels of viral load compared to PB023 and PB028 (Table 1). The latter are sacrificed since they developed neurological and diarrhea disorders, and are identified in the manuscript as fast progressors, while PB013 and PB044 are identified as slow progressors [32].

In order to study the dynamics of CD4, CD8 and CD20 cells, the samples were recovered in peripheral blood, LNs (axillary and inguinal LNs) and spleen, over the time course of infection. Results in peripheral blood showed, as expected, a significant decrease in the percentage of CD3⁺CD4⁺ T cells concomitantly with the increase in the percentages of CD3⁺CD8⁺ T cells (Figure 1A, left panel); the percentages of B cells (CD3⁻CD20⁺) were also diminished in SIV-infected RMs compared to healthy animals (day 0, 26.77% ± 9.3%; day 14, 13.35% ± 3.36%; $p=0.0013$) (Figure 1 A, left panel). The dynamics of total CD3⁺ T cells is shown in supplemental S1 figure.

Table 1. Genotypes of rhesus macaques included in our cohort. The table indicates the date of sacrifice, CD4 T cell loss (compared to the baseline), and viral load of uninfected (SIV-) and RMs infected with SIVmac251. Animals were genotyped for MHC class I *Mamu-A* and *Mamu-B* haplotypes.

In peripheral LNs (additional peripheral LNs were recovered at day 7 to analyze earlier T and B cell dynamics), the percentage of CD3⁺CD4⁺ T cells decreased whereas the percentage of CD3⁺CD8⁺ T cells significantly increased at day 30 post-infection (CD3⁺CD4⁺ T cells, day 30, 39.76% ± 7.23%; day 0, 54.31% ± 5.95%; $p=0.0003$ and CD3⁺CD8⁺ T cells, day 30, 38.9% ± 6.93%; day 0, 30.20% ± 4.78%; $p=0.0141$) (Figure 1A, middle panel). Total cell numbers were also evaluated. Only minor changes were observed in the LNs with the exception of the two animals having higher viral loads (PB023 and PB028, open circles) at the chronic phase (> 180 days). Thus, the lymphopenia observed in these animals resulted

not only from CD4 T cell depletion but also CD8 T cells and B cells (Figure 1B, middle panel).

In the spleen, the decrease in the percentage of CD3⁺CD4⁺ T cells is related to an increase in the percentages of B cells and CD3⁺CD8⁺ T cells (Figure 1A, right panel). However, we clearly observed a progressive reduction in the numbers of CD3⁺CD4⁺ T cells early after the infection, which persists in the two animals with higher viral loads (PB023 and PB028). These two RMs displayed also lower numbers of splenic B cells and CD3⁺CD8⁺ T cells (Figure 1B, right panel) compared to the two slow progressors (PB013 and PB044); the latter having even higher B cell and CD8 T cell counts than that observed in healthy RMs.

Globally, our data revealed dynamic changes in the main lymphoid populations, which were organ dependent.

Depletion of splenic memory Tfh CD4 T cells early after infection.

Depletion of memory CD4 T cells is a central event in the occurrence of AIDS [33-36]. Given that memory CD4 T cells also include Tfh, we analyzed the dynamics of these two subsets independently. Tfh cells were defined by the simultaneous expression of PD-1 and CXCR5 (CXCR5⁺PD-1^{bright}) (Figure 2 A). We assessed their dynamics in peripheral blood, LNs and in the spleen. Consistent with its role as the major organ for the initiation of humoral response, the percentage of Tfh cells in the spleen is at least five to ten-fold higher than either in LNs or peripheral blood of healthy RMs (Figure 2A, B). Interestingly, we found that SIV infection is associated with a rapid decline in the percentage of splenic Tfh cells (day 0, 6.60% ± 1.88%; day 14, 3.61% ± 1.06%; $p=0.0152$) (Figure 2B, right panel), and a transient increase in the blood (day 0; 0.29% ± 0.19%; day 14, 0.68% ± 0.56%; $p=0.040$). Splenic Tfh cell numbers decreased about five fold at day 14 post-infection as compared with uninfected RMs (Figure 2C). In chronically SIV-infected RMs, the percentages and numbers of splenic Tfh in slow progressors (PB013 and PB044) were equivalent to those observed in healthy RMs, whereas both were drastically reduced in fast progressors (P023 and PB028) (Figure 2B, C). Although a trend toward a decrease in the percentages of effector memory CD4 T cells is observed at day 14 p.i., suggesting that such early depletion is specific to Tfh cells (Figure 2B, right panel), their numbers decreased indicating a more global effect of SIV

infection on the pool of splenic memory CD4 T cells during the acute phase (Figure 2C, right panel). Mostly, the numbers of splenic central memory ($CD45RA^-CD62L^+$) and terminal differentiated ($CD45RA^+CD62L^-$) CD4 T cells decreased during the acute phase (supplemental S2 Figure).

Consistent with our observation that cell dynamics is organ dependent, we found minor changes in the percentages and numbers of Tfh cells in the LNs during the acute phase (Figure 2B, C, middle panel). The absence of Tfh depletion during the acute phase (day 14) contrasts with the depletion of effector memory CD4 T cells (Figure 2C). However, and consistent with previous reports indicating an increase in the percentages of Tfh cells in peripheral LN of chronically SIV-infected macaques [20,21,23], we found that the increase on the percentages of Tfh cells was restricted to slow progressor RMs displaying a lower viral load and higher CD4 T cell counts (PB013 and PB044) (Figure 2B, middle panel). Thus, fast progressors (PB023 and PB028) displayed LNs T cell depletion of both Tfh and effector memory CD4 T cells consistent with global lymphopenia of memory cells observed in those animals.

Therefore, we demonstrated an early and persistent depletion of splenic Tfh cells, particularly in fast progressor RMs.

Abortive differentiation of memory Tfh cells reflects curtailed expression of Tfh-specific transcription factors.

Because central memory are less prone to die than effector memory CD4 T cells of HIV- and SIV-infected individuals [33,36-40], distinct phenotype of Tfh may be a possible explanation in their differential dynamics in LNs and spleen. Therefore, we analyzed the expression of CD62L and CD45RA in fresh Tfh cells. Consistent with previous reports [6,41], splenic Tfh cells from healthy RMs were mostly effector memory cells ($CD45RA^-CD62L^-$) and less than 30% of them have a central memory phenotype ($CD45RA^-CD62L^+$; day 0, $22.11\% \pm 4.60\%$) (Figure 2D). The ratio of effector memory versus central memory Tfh in healthy RMs is 3.5 in the spleen and 1.77 in LNs (Figure 2E). Interestingly, whereas early after infection splenic Tfh cells from SIV-infected RMs maintain an effector memory phenotype, LNs Tfh cells switch to a central memory phenotype (Figure 2E). In chronically

SIV-infected RMs, both in the spleen and LNs, the EM:CM ratio of the Tfh compartment is significantly lower as compared with pre-infection (Figure 2E). Thus, our results indicate the accumulation of central memory Tfh cells in SIV-infected RMs, particularly in LNs.

Because we recently reported the transient expansion of a population of CXCR5⁺ Tfh-like cells that fail to express PD-1 during *L. infantum* infection of RMs [28], we analyzed more in detail the dynamics of CD4 T cells expressing CXCR5 and PD-1 during SIV infection (Figure 3A). In the LNs, early after infection, a significant transient increase of CXCR5⁺PD-1⁻ is observed in all infected RMs peaking at day 14 (CXCR5⁺PD-1⁻, 45.28% ± 5.17%; $p = 0.0011$) compared to healthy RMs (CXCR5⁺PD-1⁻, 29.85% ± 2.26%) (Figure 3B, left upper panel). However, by day 30 and thereafter, the percentages of both CXCR5⁺PD-1⁻ and CXCR5⁺PD-1^{int} subsets declined and reached values lower than those observed before infection, particularly in fast progressors (Figure 3B, left bottom panel). In the spleen as well as in the LNs, a trend towards a decrease was observed at day 30 (Figure 3B, right panel). Thus, in chronically SIV-infected RMs both in the spleen and LNs, loss of CXCR5⁺PD-1⁻ and CXCR5⁺PD-1^{int} subsets were observed that could be an indication of abortive differentiation.

Transcription factors such as Bcl-6 and c-Maf are essential for inducing and maintaining Tfh differentiation [42]. Consistent with the differentiation of Tfh cells, we found higher level of Bcl-6 in Tfh cells compared to naïve CD4 T cells (Figure 4A). Interestingly, c-Maf expression in Tfh cells increased both in LNs and spleen of SIV-infected RMs (Figure 4B). We found a significant transient increase in the percentage of c-Maf⁺ - expressing Tfh cells plateauing at day 30 post-infection in both LNs (30.83% ± 21.12%, $p=0.0001$) and spleen (54.00% ± 21.21%; $p=0.035$) compared to healthy RMs (LNs, 5.85% ± 3.02% and spleen, 24.68% ± 11.10%, respectively) (Figure 4C). These percentages then diminished at the chronic phase (day>180), but nevertheless remained higher in slow progressors (PB013 and PB044) compared to fast progressors (PB023 and PB028) and healthy animals (Figure 4C).

To determine whether splenocytes of chronically SIV-infected RMs of Chinese origin, similarly to Indian RM, displayed a difference in the expression of transcription factors, we

quantified *BCL6*, *MAF* and *CXCR5* mRNA expression by RT-PCR. Because in Chinese monkeys we have previously reported distinct profile of progression [36,43,44], we analyzed their expression in fast and slow progressor RMs, and compared their expression to *L. infantum*-infected RMs as we recently reported [28,45]. Our results clearly indicate lower levels of *MAF* and *CXCR5* mRNA in fast progressor SIV-infected RMs compared to either slow progressor SIV-infected RMs or *L. infantum*-infected RMs (Figure 4D).

Recently, it was reported that expression of the Krüppel-like factor 2 (KLF2) restrains Tfh cell differentiation inhibiting CXCR5 and Bcl-6 expression [46,47]. Moreover, KLF2 is one the genes targeted by Foxo1, which has been also shown to negatively regulate the differentiation of Tfh cells through at least the involvement of the E3 ubiquitin ligase Itch [48,49]. KLF2 as well as Foxo1 were reported to regulate the expression of CD62L [46,50,51]. Thus, we examined the expression of Foxo1 and KLF2 in Tfh cells by flow cytometry (Figure 4E). Whereas the expressions of KLF2 and Foxo1 remained mostly unchanged in Tfh cells isolated from LNs, higher levels were observed in splenic Tfh cells of SIV-infected RMs (at days 30 and >180) compared to naïve CD4 T cells. Furthermore, we also analyzed the expression of T-bet and Eomes, which are critical Th1 transcriptional factors. T-bet was drastically increased in Tfh cells isolated from LNs at days 30 and >180 post-infection as well as in Tfh cells isolated from the spleen although to a lower extent. In opposition, Eomes expression remained unchanged both in Tfh cells isolated from LNs and spleen (Figure 4E).

To evaluate the expression of IL-21, which is characteristic of Tfh cells, we sorted splenic Tfh cells by flow cytometry following the strategy displayed on the supplementary data (S3 Figure). *IL-21* mRNA was quantified by RT-PCR. The higher expression of the *IL21* mRNA in sorted Tfh confirmed their identity in comparison to naïve or central memory CD4 T cells (Figure 4F). Interestingly, we did not observed a difference in the levels of IL-21 expression between uninfected and SIV-infected RMs suggesting that despite higher levels of Foxo1 and KLF2, they have no impact on *IL-21* mRNA expression. In some individuals, particularly at day >180 post-infection, *IL-21* mRNA was also detected in non-Tfh cell subset. These results are consistent with a loss of Tfh cells during SIV-infection rather than the absence of IL-21 expression.

Altogether, these results demonstrated the lack of sustained expression of transcription factors required for Tfh differentiation associated with an increase in the expression of inhibitory transcriptional factors. Thus, the pool of splenic Tfh cells expressing IL-21 is decreased during AIDS.

Loss of splenic memory B cells in SIV-infected RMs.

As Tfh cells are essential for B cell differentiation, and given the early loss of Tfh cells in the spleen compared to LNs, we analyzed the dynamics of B cell differentiation in distinct compartments during the course of SIV infection. We characterized B cell subsets by flow cytometric analysis based on the expression of CD21 and CD27 on CD20⁺CD3⁻ cells. Hence we defined naive B cells as CD21⁺CD27⁻, resting memory as CD21⁺CD27⁺, activated memory as CD21⁻CD27⁺, and tissue memory as CD21⁻CD27⁻ cells (Figure 5A). Consistent with previous reports [52-57], we found in peripheral blood lower percentages of resting and activated memory B cells (Figure 5B, left panel) in SIV-infected RMs compared to the percentages before infection.

Our results indicated that while the percentage of splenic naive B cells significantly increased early after infection (day 14, 53.6% ± 11.36% compared to day 0, 22.18% ± 8.17%; $p=0.0022$), both the percentage of activated memory B cells (day 14, 11.48% ± 6.78% compared to day 0 = 27.38% ± 5.38%; $p=0.0043$) and tissue memory B cells (day 14, 16.80% ± 4.22%; compared to day 0, 28.98% ± 4.68%; $p=0.0043$) decreased (Figure 5B, right panel). It is noteworthy that the percentage of naive B cells remained elevated in fast progressor RMs at the chronic phase (day >180 p.i), consistent with lower levels of memory B cells, whereas the opposite balance is observed in both slow progressor RMs PB013 and PB044. Consistent with B cell lymphopenia, the pool of memory B cells diminished in the spleen of SIV-infected RMs early after infection and persisted thereafter, but again not in slow progressor RMs, PB013 and PB044 (Figure 5C, right panel).

In LNs, at day 30, a decrease in the percentage of resting memory B cells (21.89% ± 6.18% compared to day 0, 35.08% ± 9.95%; $p = 0.0023$) is observed associated with higher levels of tissue memory B cells (day 30, 21.18% ± 5.30% compared to day 0, 12.65% ± 3.18%; $p<0.0001$) (Figure 5B, middle panel). Most importantly, and consistent with the

dynamics of Tfh, the percentages and the numbers of both activated and tissue memory B cells were higher in PB013 and PB044 compared to PB023 and PB28 (Figure 5C, middle panel).

We next assessed the relationship between splenic Tfh pool and of effector memory B cell subsets. Our results clearly indicate a positive correlation between B cell differentiation and Tfh numbers in both LNs and the spleen (Figure 6), particularly with splenic activated memory B cells. In LNs, a better correlation was observed between EM T cells and B cell subsets (S4 Figure). To address the potential impact on the magnitude and quality of the developed humoral response we then assessed titers of SIV-specific IgG antibodies in SIV-infected RMs. SIV-specific antibodies were detected at day 21 post-infection and increased thereafter; no antibodies were detected at day 14 (Figure 7A). Furthermore, no SIV-specific antibodies were detected in PB023, and titer was lower in PB028 compared to PB013 and PB044 (Figure 7A). We plotted the titers of SIV-specific IgG antibodies against the percentage and the pool of Tfh cells. A strong correlation was observed with splenic Tfh cells. Although still significant, this correlate was lower with LNs cells (Figure 7B). We also assessed whether SIV-antibodies were correlated with the pool of B cell subsets. Our results indicate a positive correlation between the pool of splenic memory B cells and the titer of SIV-specific IgG antibodies, whereas no correlation was found with the pool of LNs B cells (Figure 7C), supporting the critical role of splenocytes in the production of SIV-specific IgG antibodies.

Altogether, our results demonstrated the drastic depletion of splenic activated and tissue memory B cells which might be related to the loss of fully mature Tfh cells associated with the production of SIV-specific antibodies.

Progression to AIDS is associated with drastic remodeling of normal lymphoid architecture and loss of Tfh cells from B cell areas.

Our data so far have highlighted the profound quantitative changes that affect the distinct lymphoid lineages during SIV infection. We next subjected splenic and LN tissue sections to confocal microscopy by analyzing T and B cell distribution aiming to elucidate whether such changes also reflected a remodeling of the lymphoid architecture. Remarkably,

both the spleen (Figure 8) and LNs (S5 Figure) of a slow progressor RM demonstrated little change in the organization of their lymphoid structures as compared with non-infected counterpart (Figure 8 and S5, upper and middle panels). In stark contrast, the fast progressor RM exhibited a profound loss of normal lymphoid architecture, particularly in the spleen in which T cell area, B cell follicles and germinal centers become barely distinguishable (Figure 8, lower panels).

Given the profound impact that SIV infection has on Tfh populations, particularly in fast progressor animals, we stained splenic (Figure 9) and LNs (S6 Figure) sections to allow visualization of Tfh cells *in situ*. The pool of CD4 T cells in the spleen and LNs of non-progressor RM does not appear to be severely depleted by SIV infection as compared with naive RM (Figure 9 and S6, upper and middle panels). Furthermore, Tfh cells (CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺) could still be detected in B cell areas in these animals, as previously indicated by our flow cytometric analyses (Figure 2). Contrasting with slow progressor, fast progressor RM exhibits a severe depletion of CD4 T cells in both lymphoid organs and Tfh cells were hardly detectable on the B cell follicles of the spleen and LNs of these animals (Figure 9 and S6, lower panels), again in agreement with our flow cytometry data (Figure 2). Thus, confocal fluorescent microscopy confirmed the depletion of Tfh cells in lymphoid organs and highlighted the profound remodeling of the normal splenic architecture that occurs during progression to AIDS.

Early infection of Tfh cells in SIV-infected RMs

We, and others have previously reported the infection of Tfh cells both in HIV-infected individuals and in SIV-infected RMs [19,23,24]. SIV DNA and RNA were quantified from sorted Tfh and effector memory CD4 T cells. Our results demonstrated the early infection of both Tfh and effector memory CD4 T cell subsets (Figure 10A). The frequency of SIV DNA in both CD4 T cell subsets was similar in the spleen at day 14 whereas in the LNs Tfh cells displayed an increase of 3 to 4 fold comparing to effector memory CD4 T cells. At the chronic phase (>180), it is interesting to note that splenic Tfh cells of both slow progressors RMs (PB013 and PB044) harbored higher frequencies of SIV DNA than fast progressor RMs (PB023 and PB028). On the other hand, in effector memory cells SIV DNA frequencies were

similar for all the animals. The pool of splenic Tfh cells in slow progressor RMs was 10 fold higher than in fast progressors (Figure 2D), suggesting that splenic Tfh cells might be a potential reservoir for SIV. Due to the low levels of Tfh cells in LNs of both fast progressor RMs SIV DNA could not be quantified. Concomitantly, we measured SIV RNA content in the sorted cells. Our data showed a peak of SIV RNA at day 14 in Tfh cells and effector memory CD4 T cells in both the spleen and LNs (Figure 10B), which decreased thereafter. Interestingly, although Tfh cells of slow progressor RMs harbored more SIV DNA than in fast progressors, the levels of SIV RNA were similar in both. In order to determine whether the infected Tfh cells may have an impact on B cells differentiation, we plotted the percentage of infected cells against the percentage of each B cell subset (Figure 10C). However, we did not observe any positive correlation between the extent of infection of Tfh cells and B cell subsets both in LNs or the spleen, suggesting that infection of Tfh cells is probably not the only main driving force causing B cell dysregulation.

Therefore, our results demonstrated the early infection of splenic Tfh cells in SIV-infected RMs, and suggested that Tfh cells could be a potential reservoir for SIV.

3.5. Discussion

Our results revealed that splenic Tfh cells, which are expressing IL-21 mRNA, are specifically depleted early after SIV-infection in RMs. Moreover, we found an increase of the inhibitory transcriptional factors KLF2 and Foxo1 as well as an absence of sustained expression of Bcl-6 and c-Maf, which are essential for Tfh differentiation. This abortive differentiation of Tfh cells concomitantly with the alteration of the architecture of the spleen impaired their interaction with B cells leading to the loss of memory B cells, and the production of SIV antibodies. Thus, our data suggests that depletion of splenic Tfh cells in individuals may represent a critical component in HIV immunodeficiency given that the spleen represents the main organ for the initiation of B cell responses.

Whereas several groups have reported an increase of Tfh cells among memory CD4 T cells [20,23,58], other groups have observed a decreased in Tfh cells. In that sense, Boswell *et al.* [25] showed a loss of Tfh cells during HIV infection by expressing her data proportionately to the total number of CD4 T cells. Moreover, Petrovas *et al.* [21] reported that half of the chronically SIV-infected RMs had elevated LNs Tfh cells, which are accompanied by preserved architecture and distribution of Tfh and B cells in LNs. This profile associated with lower accumulation of naive CD4 T cells is a hallmark of non-progression to AIDS. Moreover, during the revision of our manuscript, two additional manuscripts reported that the quantity of Tfh is lower in LNs of progressor SIV-infected RMs compared to non-progressor SIV-infected RMs [59,60]. Thus, these results are consistent with our data showing that slow progressor RMs display an increased frequency of Tfh cells in LNs whereas their numbers drastically decreased in fast progressors RMs.

Tfh cells are characterized by their expression of CXCR5 and PD-1. Our results indicated the presence of different subsets of memory CD4 T cells expressing CXCR5 in SIV-infected RMs. In the context of the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) infection distinct subsets of CXCR5 T cells have been described [41]. Whereas mostly Tfh cells are effector memory cells (CD45RA⁻CD62L⁻) before infection, Tfh cells exhibited a central effector memory phenotype (CD45RA⁻CD62L⁺) after LCMV infection. Our data demonstrated that SIV-infected RMs present a similar switch. Moreover, we observed that

CXCR5 positive CD4 T cells transiently expressed higher levels Bcl-6 and c-Maf, suggesting the lack of sustained expression of these transcriptional factors [14,61]. In the context of bacterial infection, it has been reported that Tfh cells do not enter the memory pool [62]. We recently demonstrated the transient expansion of immature Tfh cells in the context of *L. infantum* infection, which was associated with an inability to maintain the pool of effector memory B cells and parasite-specific antibodies during chronic visceral leishmaniasis [28]. These results suggest that HIV and SIV infections are associated with abortive Tfh differentiation, which is unable to replenish the pool of Tfh cells lost early after infection. Our data also indicated for the first time in the context of viral infection that Tfh cells express KLF2 and Foxo1, which are inhibitory transcriptional factors responsible for arresting CXCR5 and Bcl-6 expression [46,47]. Thus, we interpret the observation that Tfh cells express higher levels of CD62L after SIV-infection by the fact that those transcriptional factors regulate the expression of CD62L [46,50,51]. Moreover, mRNA expression of both *CXCR5* and *MAF* transcripts were higher in slow progressors than in fast progressors of chronically SIV-infected RMs of Chinese origin [63]. These results in both Indian and Chinese macaques suggested that progression to AIDS is associated with lower levels of Tfh cells.

In situ analysis of CXCR5 and PD-1 expression was consistent with flow cytometry data by demonstrating the absence of fully mature splenic GC-Tfh cells (CXCR5⁺PD-1⁺) in fast progressor animals. The immature cells observed were mostly negative for PD-1. Hong *et al.* investigating the dynamics of GC formation showed that fast disease progression upon infection is associated with an involution of GCs without local IL-21 production [32]. Moreover, it was previously shown the progressive loss of IL-21 producing cells in HIV infected individuals, which remained at normal levels in slow progressors and ELITE controllers [26]. Although the percentage of Tfh cells, which express CXCR5 concomitantly with high levels of PD-1 (PD-1^{bright}), is lower in peripheral blood compared to the spleen (around 20 fold less), altogether these results point to the absence of GC-Tfh cells in pathogenic HIV/SIV infections. Cubas *et al.* [20] have proposed that LNs Tfh cells of infected subjects are not intrinsically dysfunctional; yet, when in contact with PD-L1-expressing B cells their capacity to produce IL-21 is diminished. These differences may

reflect distinct immune response of Tfh cells depending on tissue localization and the nature of help signals, consisting of both cytokines and cell surface molecules.

It has been also shown that some T cells, located at the interface between the T cell zone and the follicle, outside of the GCs, also express CXCR5 and produce IL-21 [64]. These cells, named pre-GC Tfh cells, appear early after immunization and are progressively replaced by PD1^{bright} CD4 T cells that locate within GCs [64-66]. Complete differentiation of Tfh cells depends on cognate interactions between primed CD4 T cells and antigen-activated B cells [67,68]. In this sense, B cells play a crucial role for the survival of Tfh cells and the commitment to the Tfh lineage [67]. In the absence of B cells, Tfh cells are still developed, even though in significantly lower numbers that fail to express PD-1 [68]. Therefore, the CXCR5⁺PD-1⁻ CD4⁺ T cell population that we detected may represent a pre-GC-Tfh state that does not mature to a bona fide Tfh population due to the lack of cognate interactions with B cells. Physical contact between Tfh and GC B cells presenting the highest levels of cognate peptide bound to major histocompatibility complex II is essential [13,69]. Interestingly, our imaging data revealed a nearly total absence of CXCR5 and/or PD-1 expressing CD4 T cells in the B cell follicles of the LNs and spleen of fast progressor RMs; yet, slow progressor RMs preserved a pool of GC-associated Tfh cells. The disruption of tissue architecture during SIV-infection is associated with increased expression of immunosuppressive cytokines such as TGF- β and IL-10 associated with collagen deposit and fibrosis [40,70-72]. In particular, we have previously reported a positive correlation between the level of TGF- β and the progression to AIDS [40,70]. Thus, this profound remodeling in animals progressing fast may impact on the capacity of those cells to be adequately activated compared to animals progressing slowly to AIDS. Therefore these observations sustained the hypothesis that during SIV-infection abnormal bi-directional communication in lymphoid organs between B and T cells may participate in a defective immune response against microbes.

Due to the critical interaction between Tfh and B cells, the depletion of Tfh cells in the spleen very early after infection may participate in the absence of maturation and loss of memory B cells. It is well known that HIV infection leads to chronic B cell immune activation in individuals with AIDS [73]. There are also some indications that impairment of B-cell

function occurs early after infection [52,74,75]. It has been shown that B cells are abnormally prone to undergo apoptosis through engagement of PD-1 [53-55] and death-receptors [56,57]. Interestingly, it has been also shown that the depletion of B cells leads to the death of SIV-infected Pigtail macaques implying that humoral response is an important protection factor [76]. Whereas the vast majority of the results concern peripheral blood and LNs, paradoxically visceral tissues are poorly documented. Herein we demonstrated the progressive loss of memory B cells in the spleen and the accumulation of naive B cells, which is consistent with a previous report in SIV-infected cynomolgus macaques [77]. Moreover, consistent with the reciprocal role of Tfh and memory B cells, we found a positive correlation between the numbers of Tfh and memory B cell subsets in the spleen. Thus, in the context of defect of co-signals provided by close contact with Tfh cells, memory B cells can be abnormally primed to die [78,79]. In this context, it is interesting to note that we and others have reported that the level of B-cell activation within the GC is higher in non-pathogenic SIV-infected African green monkey (AGMs) than in pathogenic SIV-infected Chinese or Indian RMs [63,80,81]. Indeed, our data demonstrates that SIV-specific IgG titers were higher in slow progressors than in fast progressor RMs. Moreover, our data clearly indicate a strong correlation between SIV-specific IgG and the pool of splenic Tfh cells. In HIV-infected individuals a reduction in antibody responses against hepatitis B, measles, mumps and rubella vaccines were reported [52,82]. Furthermore, patients who are responders to a Flu vaccine display an expansion of Tfh cells compared to non-responders [83], supporting a role of Tfh cells in maintaining the pool of long live memory B cells. Finally, it is conceivable to envision that, by inducing an early depletion of Tfh in the spleen, SIV-infection promotes inappropriate B cell differentiation and favors B cell death. Such abnormal B cell differentiation will, in turn, impact on Tfh development resulting in compromised numbers of Tfh population to sustain GC responses in the chronic phase of the infection. The results included in the current study strongly suggest that the depletion of Tfh cells in the spleen is an early pathogenic event associated with AIDS.

Growing evidence suggests that Tfh cells are infected by HIV/SIV early after infection [21,24]. Here, we demonstrated the early infection of Tfh cells both in peripheral LNs and the spleen. However, it is noteworthy that the frequencies of SIV DNA⁺ Tfh cells

as well as their numbers were higher at the chronic phase in slow progressors than in fast progressors RMs suggesting that immune control restrain or maintain the virus within the B cell follicle regions. Therefore, this subset represents a possible viral reservoir in immune controllers. We and others have previously reported that SIV is present in the GCs [63,84]. Importantly, trapping of SIV in GCs was also observed in non-pathogenic SIV-infected AGMs [63] or in sooty mangabey at the border of the GCs where the Tfh cells are localized [85]. Nevertheless, the amount of viral particles trapped in the region of GCs increases with the pathogenicity [84,86]. Despite their high frequency in SIV DNA, Tfh cells of slow progressors showed a similar or lower level of cellular SIV RNA compared to fast progressors, pointing to the fact that slow progressor Tfh cells might be less active to replicate SIV than Tfh cells of fast progressor. However, we did not find any correlation between the extent of SIV-DNA⁺ Tfh cells and the percentages of memory B cell subsets, suggesting that infection of Tfh population by itself is not directly associated with abnormal B cell differentiation. Because viruses are trapped in the GCs where follicular dendritic cells are present, this can affect B cell differentiation [87]. Similarly, soluble HIV proteins such as nef have been reported to interact with B cells either directly [88] or indirectly [89,90]. Therefore, these factors in addition to Tfh cell loss could participate in the dysregulation of B cell response.

Given that the Tfh population is a subset of memory CD4 T cells, which have been shown to be highly prone to die by apoptosis and that the extent of apoptosis is predictive of further progression towards AIDS characterizing pathogenic lentiviral infections, depletion of splenic Tfh cells may be related to the occurrence of apoptosis [33,34,36,38,40,43,44,91-94]. In this sense, Petrovas *et al.* [21] have shown higher propensity of Tfh cells to undergo apoptosis based on the expression of the caspase-3, an effector of apoptosis, and have limited proliferative capability [19]. Tfh cells express CD95 and because CD95L have been shown to be elevated in pathogenic compared to non-pathogenic infections [95], and are involved in the death of memory CD4 T cells [36-38,96], it cannot be excluded that FasL is directly involved in the death of Tfh cells. Furthermore, our data indicated the accumulation of Tfh cells displaying a central memory phenotype instead to an effector memory phenotype; this

former being less prone to die than the latter. This scenario is compatible with preservation of the pool of Tfh cells in RMs, despite their high infection rate.

In conclusion we have demonstrated the early loss and infection of splenic Tfh cells, which is associated with the loss of memory B cells. The lack of sustained expression of transcription factors governing Tfh differentiation certainly participates in the absence of full maturation and reconstitution of the pool of Tfh cells. The huge remodeling of the splenic architecture also restrained the capacity of Tfh and B cells to interact, which is essential for both. Altogether, these may contribute to the poor immune control occurring in fast progressor RMs. Therefore, strategies aimed to prevent the loss of Tfh cells or to help the reconstitution of splenic Tfh cells could be useful for individuals but also for vaccine strategy. However, because Tfh cells are infected early, this subset may represent a reservoir, which may impair functional HIV cure.

3.6. Materials and Methods

Ethics statement. All animals were housed at University Laval in accordance with the rules and regulations of the Canadian Council on Animal Care (<http://www.ccac.ca>). This protocol was approved by the Laval University Animal Protection Committee (Project number 106004). Animals were fed standard monkey chow diet supplemented daily with fruit and vegetables and water ad libitum. Social enrichment was delivered and overseen by veterinary staff and overall animal health was monitored daily. Animals showing significant signs of distress, disease, and weight loss were evaluated clinically and were humanely euthanized using an overdose of barbiturates according to the guidelines of the Veterinary Medical Association.

Animal, viral inoculation and sample collection. Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) of Indian origin, seronegative for SIVmac, STLV-1 (Simian T Leukemia Virus type-1), SRV-1 (type D retrovirus) and herpes-B viruses were used in this study. Sixteen animals were infected with SIVmac251 virus (20 AID₅₀) intravenously and five were left as non-infected controls. Subgroups of animals were euthanized at different time points post-infection covering both acute and chronic phases. Peripheral blood and lymphoid organs (spleen and axillary and inguinal lymph nodes) were recovered for cellular analysis. Cell numbers were calculated from LNs retrieved in each region (inguinal and axillary LNs, the totality of the LNs were retrieved). Cells isolated after mechanical process were counted. Tissues were not digested with collagenase or other proteases for cell isolation limiting side effects on the expression of cell surface markers. Blood sampling was performed at additional time points before and after infection. For each blood-sampling point, a hemogram was elaborated using an Abaxis VetScan HM5 hematology instrument (Abaxis, CA). Frozen samples derived from the spleen of SIV-infected RMs of Chinese origin of previous studies [36,40,70] were used to assess mRNA expressions.

Quantitative-PCR. Samples from rhesus macaques (*Macaca mulatta*) of Chinese origin infected either with *Leishmania infantum* promastigotes or SIVmac251 [28,45] were also used to assess mRNA expression of *CXCR5*, *BCL6*, and *MAF*. Approximately 10 millions of splenic mononuclear cells or total peripheral LNs cells were lysed in RLT buffer (RNeasy

Micro Kit, QIAGEN) and stored at -80° C until further use. RNA was purified using the RNeasy Micro Kit following manufacturer's instructions and reverse transcribed using the Affinity Script QPCR cDNA synthesis kit (Stratagene). Gene expression was analyzed by qPCR in 10 µL reactions, using 100 ng of cDNA. The thermal profile consisted of a hold of 15 min at 95°C, followed by 40 cycles of denaturation (95° C, 15 sec), annealing (60° C, 30 sec) and extension (72° C, 30 sec). Ct values were normalized by quantifying the levels of GAPDH or 18S. Macaque-specific primers were designed using the AutoPrime software. A list of primer sequences used is provided in Table S1.

Cell sorting. 10⁸ freshly isolated cells were sorted using BD Influx cell-sorter based on their expression of CD3, CD8, CD4, PD-1, CXCR5, CD45RA and CCR7. Cells were separated in five different subsets, naïve, central memory, effector memory, differentiated effector memory and T follicular helper cells as shown in supplemental S3 figure. Samples were preserved at -80°C pelleted until used for DNA analysis and in Trizol (Life Technologies) for RNA purification.

Proviral DNA quantification. DNA was purified from 10⁵sorted Tfh and effector memory cells from spleen and LNs using the Genomic DNA Tissue kit from (Macherey Nagel). The cell line SIV-1C, that contains one copy of SIVmac251 DNA per cell was used as reference for proviral DNA quantitation. Serial dilutions of SIV-1C cells with CEMX174 carrier cells were performed to generate a standard curve. SIV-proviral DNA was amplified by nested PCR with SIVmac251-specific primers surrounding the nef region. A first round of PCR was performed using 50 nM of preco and K3 primers, 10X PCR buffer, 0.8 mM DNTP, 2 mM MgCl₂, 1.25 U of AmpliTaq Gold (Life Technologies) in a Biometra thermocycler using the following parameters: one cycle of 105 sec at 95°C, 45 cycles of 30 sec at 95°C, 30 sec at 60°C and 10 sec at 72°C, 6 min at 72°C. The PCR product was diluted 1/8 and 5 µl were re-amplified using 250 nM of A2 and K1 primers and 2X Quantitec Sybr Green PCR Kit (Qiagen) in a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), using the following parameters: one hold of 2 min at 50°C, 15 min at 95°C and 45 cycles of 15 sec at 94°C, 30 sec at 60°C and 35 sec at 72°C. Ribosomal 18S DNA was amplified in parallel as an internal control. A standard curve was used to estimate cell numbers, and the results were expressed as SIV proviral DNA copies per 10,000 cells.

Viral RNA quantification. RNA was purified from 10^5 sorted cells kept in Trizol (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Viral RNA was extracted from 200 μ l of plasma with PureLink Viral RNA/DNA Kit (Life Technologies). RNA was treated with Turbo-DNA free kit (Life Technologies) and quantified by RT-qPCR using 4X TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Life Technologies), 750 nM of primers and 200 nM of probe (Table S1). 10-fold serial dilutions of a SIVmac251 plasmid including SIV *gag* gene were performed to generate a standard curve, starting at 10^9 SIV genome copies/ μ l. Amplifications were carried out with a 7500 Real-Time PCR System (*Applied Biosystems*), using the following parameters: 50°C /5 min, 95°C /20 sec, 40 cycles (95°C /15 sec, 60°C /1 min). 18S rRNA was used as endogenous control using the Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control mix (Life Technologies) for cell samples. Results are expressed as SIV RNA copies per cell detected in cell samples or copies per μ l in serum samples.

Immunophenotyping. Fresh cell suspensions were prepared from macaque spleen, axillary and inguinal LNs. Peripheral blood was collected to EDTA-coated tubes. Fresh cells were stained with a panel of monoclonal antibodies. The fluorochrome-conjugated antibodies used are provided in the Table S2. Intracellular Bcl-6, c-Maf, Foxo1, KLF2, Eomes, and T-bet staining was performed after fixing and permeabilizing the cells with the FoxP3 staining buffer set (eBioscience). After lysing erythrocytes (Lysing buffer Pharm Lyse 10X BD Biosciences), sixty thousand events corresponding to mononuclear cells were recorded in FACS Canto A (BD Bioscience). Analyses were performed using FlowJo software (Tree Star, Inc.).

Immunofluorescence confocal microscopy of tissue sections. Tissues (spleen and peripheral lymph nodes) were embedded in optimal cutting temperature compound (OCT), sectioned at a 7.5 μ m thickness and stored unfixed at -80 °C until use. Tissue sections were fixed in 4% PFA (15 minutes at room temperature) followed by acetone (20 minutes at -20 °C). Slides were submerged in blocking solution (5% normal goat serum, 0.3% triton X-100) for 1 hour at RT.

For this work, we took advantage of two multicolor panels that we had optimized previously [28]. For Panel 1 (Ki-67/IgD/CD3/CD20), sections were initially incubated overnight at 4 °C

with a purified anti-Ki-67 antibody diluted in antibody dilution buffer (1% BSA, 0.3% triton X-100). The next day, sections were washed and incubated with a secondary antibody-coupled to Brilliant Violet-421 (BV-421) diluted in antibody dilution buffer for 1 hour at room temperature. After thorough washing, sections were incubated overnight at 4 °C with fluorochrome-coupled antibodies against the other markers of the panel; IgD-FITC, CD3-PECF594 and CD20-AF647. After washing, slides were mounted with antifade mounting medium.

The procedure employed for Panel 2 staining (CXCR5/CD4/PD1) was similar. Briefly, sections were initially incubated with a purified anti-CXCR5 antibody overnight, followed by a secondary antibody coupled to BV421 (The following reagent was obtained through the NIH Nonhuman Primate Reagent Resource: CXCR5). After washing, samples were incubated overnight with directly coupled antibodies for the remaining markers; CD4-PECF594 and PD1-AF647. Table S2 provides detailed information on the antibodies used for tissue immunofluorescence. Sections were imaged in a Zeiss LSM 710 confocal microscope. Tiled Z-stacks were acquired with a 20X objective and stitched using the Image J stitching plugin [97]. Average intensity projections were obtained from the stitched tiles using built-in Image J tools.

Detection of anti-SIV specific IgG. Specific IgGs were detected in serum samples using a homemade HIV-2 ELISA. Briefly, inactivated HIV-2 crude extract (Biorad) was coated at 0.5 µg/per well. Serial dilutions of serum samples were incubated in HIV-2 antigen-coated plates to determine the serum titer. IgGs were detected using a goat anti-monkey IgG HRP antibody (Serotec). Results are expressed as titer of SIV-specific IgG antibody.

Statistical analysis. Statistics were performed with the GraphPad Prism 5 software. The non-parametric Mann Whitney test was employed for comparison between naive and infected animals at different time points after infection. A spearman test was employed for correlations.

3.7. Acknowledgments

We thank Daphnée Veilleux-Lemieux and Anne-Marie Catudal for their help at the non-human primate center (Quebec city).

3.8. Figure legends

Figure 1. T and B cell dynamics in SIV-infected rhesus macaques. (A) Flow cytometry was used to determine the percentage of CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ T cells, and CD3⁻CD20⁺ B cells in the (Left panel) blood, (Middle panel) LNs and (Right panel) spleen. (B) Histograms show total number of T and B cells in LNs and the spleen, and cell number/mm³ in peripheral blood. Each dot represents an individual RM; Axillary and Inguinal LNs are represented separately by two distinct dots for each RMs at day>180. Statistical analyses were performed using Mann Whitney test. *, p<0.05; **, p<0.01. At day>180, open circles represent fast progressor RMs PB023 and PB028; and full diamonds represent slow progressor RMs, PB013 and PB044.

Figure 2. Early loss of splenic Tfh cells in SIV-infected rhesus macaques. (A) Representative dot plots depicting the expression of CXCR5 and PD-1 in the blood, in LNs and the spleen of either a non-infected RM (SIV⁻) or a SIV-infected RM at day 14. CD3⁺ T cells were first gated (CD3 against FSC-A), and then doublets were eliminated (FSC-H against FSC-A). Among the CD3⁺CD4⁺ T cell population, we assessed the expression of CXCR5 and PD-1. (B) Percentages and (C) cell numbers (expressed in cell number/mm³ in the blood) of effector memory (CD45RA⁻CD62L⁻) CD3⁺CD4⁺ T cells and Tfh (CXCR5⁺PD-1^{bright}) cells are shown. Each dot represents an individual RM. Axillary and Inguinal LNs are represented separately by two distinct dots for each RMs at day >180. Statistical analyses were performed using Mann Whitney test. *, p<0.05; **, p<0.01. At day>180, open circles represent fast progressor RMs PB023 and PB028; and full diamonds represent slow progressor RMs PB013 and PB044. (D) Expression of CD45RA and CD62L on both splenocyte Tfh (CXCR5⁺PD-1^{bright}) and non-Tfh cell subsets isolated from a non-infected RM; naive (CD45RA⁺CD62L⁺), central memory (CD45RA⁻CD62L⁺), effector memory (CD45RA⁻CD62L⁻) and terminally differentiated (CD45RA⁺CD62L⁻). The expression of PD-1 was also assessed on non-Tfh cell subsets. Numbers indicate the percentage of each subpopulation. (E) Histograms show the ratio of EM versus CM Tfh cells in LNs and spleen of RMs at the indicated time. Statistical analyses were performed using Mann Whitney test.

Figure 3. Transient increase of LNs CXCR5⁺CD4⁺ T cells during SIV infection. (A)

Representative dot plots depicting the expression of CXCR5 and PD-1 among CD3⁺CD4⁺ T cells. The percentages of CXCR5⁺PD-1^{int} and CXCR5⁺PD-1⁻ are indicated in LNs and the spleen of either a non-infected RM (SIV⁻), a SIV-infected RM at day 14 (SIV⁺ acute), and a SIV-infected RM at day >180 (SIV⁺ chronic), (B) Histograms showing the percentages of both CXCR5⁺PD-1^{int} and CXCR5⁺PD-1⁻ among CD4 T cells in LNs and the spleen. Each dot represents an individual RM. Axillary and Inguinal LNs are represented separately by two distinct dots for each RMs at day>180. Statistical analyses were performed using Mann Whitney test. *, p<0.05; **, p<0.01. At day>180, open circles represent fast progressor RMs PB023 and PB028; and full diamonds represent slow progressor RMs PB013 and PB044.

Figure 4. Changes in the expression of transcriptional factors associated with the differentiation of Tfh cells during SIV infection. (A) Representative expression of Bcl-6 in Tfh (CXCR5⁺PD-1^{bright}) and naïve non Tfh CD3⁺CD4⁺ T cells in the spleen of a healthy RM. (B) Mean fluorescence intensity (geometric) of c-Maf expression in Tfh (CXCR5⁺PD-1^{bright}) and naïve non Tfh CD3⁺CD4⁺ T cells in both the LNs and spleen of RMs at different days post-infection. (C) Percentages of c-Maf⁺ Tfh cells in LNs and spleen. Each dot represents an individual RM. Statistical analyses were performed using Mann Whitney test. *, p<0.05; **, p<0.01. At day>180, open circles represent fast progressor RMs PB023 and PB028; and full diamonds represent slow progressor RMs PB013 and PB044. Axillary and Inguinal LNs are represented separately by two distinct dots for each RMs at day>180. (D) Histograms show RT-PCR quantification of *BCL6*, *MAF* and *CXCR5* mRNA in splenocytes of chronically SIV-infected RMs of Chinese origin compared to *Leishmania infantum*-infected RMs, and healthy RMs. Each dot represents an individual RM. Statistical analyses were performed using Mann Whitney test. *, p<0.05; **, p<0.01. (E) Histograms show geometric mean fluorescence intensity (MFI) of Foxo1, KLF2, T-bet and Eomes in Tfh cells of RMs at the indicated time compared to naïve non Tfh CD3⁺CD4⁺ T cells of an healthy RM. LNs (upper panel) and spleen (bottom panel) are shown. (F) RT-PCR quantification of IL-21 mRNA expression in naïve, central memory (CM), effector memory (EM), and Tfh cells of SIV-infected RMs.

Figure 5. B cell dynamics in SIV-infected rhesus macaques. (A) Representative dot plots depicting gating strategy and the expression of CD21 and CD27 in B cells (CD3⁻CD20⁺)

derived from blood, LNs and spleen is showed. B cell subsets were defined as naive ($CD21^+CD27^-$), resting memory ($CD21^+CD27^+$), activated memory ($CD21^-CD27^+$) and tissue memory ($CD21^-CD27^-$) B cells. (B) Percentages and (C) cell numbers for each B cell subset are shown. Each dot represents an individual RM. Statistical analyses were performed using Mann Whitney test. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. At day > 180 , open circles represent fast progressor RMs PB023 and PB028; and full diamonds represent slow progressor RMs PB013 and PB044. Axillary and Inguinal LNs are represented separately by two distinct dots for each RMs at day > 180 .

Figure 6. Correlation between Tfh cells and memory B cells. Tfh cell numbers (Log) were plotted against B cell subset numbers (Log) in LNs and spleen of RMs. Each dot represents an individual RM at the time of death. Spearman analysis was used for correlations. The r and p values are indicated in the figures.

Figure 7. Correlation between SIV-specific IgG titers and Tfh cells. (A) Histogram shows the titer of SIV-specific IgG antibodies in the serum of SIV-infected RMs at the indicated time. At day > 180 , open circles represent fast progressor RMs PB023 and PB028; and full diamonds represent slow progressor RMs PB013 and PB044. (B) Dot-plots show the correlation between the titer of SIV-specific IgG antibodies and the percentage as well the number of Tfh cells in LNs and spleen of RMs. (C) Dot-plots show the correlation between the titer of SIV-specific IgG antibodies and the number of B cell subsets in LN and the spleen. Spearman analysis was used for correlations. The r and p values are indicated in the figures.

Figure 8. Dynamics of germinal center in the spleen of rhesus macaque infected with SIV. Splenic tissue sections were stained with antibodies against Ki-67 (white), IgD (green), CD3 (blue) and CD20 (red) and imaged by confocal microscopy. Representative pictures of a naive RM and of two chronically SIV-infected RMs, slow and fast progressor RMs are shown. The picture is representative of two individuals animals performed independently. Higher magnification is shown on the right part of the picture. Scale bar is shown.

Figure 9. Distribution of Tfh cells in the spleen of rhesus macaque infected with SIV. Splenic tissue sections were stained with antibodies against CXCR5 (blue), CD4 (green) and PD-1 (red) and imaged by confocal microscopy. Representative pictures of the same animals

as depicted in figure 8 are shown. Higher magnification is shown on the right part of the picture. Scale bar is shown.

Figure 10. Early infection of Tfh cells. (A) Frequencies of SIV DNA and (B) RNA in sorted Tfh and effector memory CD4 T cells isolated from LNs and spleen of RMs infected with SIV. Each dot represents an individual RM. Statistical analyses are performed using Mann Whitney test. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. At day >180, open circles represent fast progressor RMs, PB023 and PB028; and full diamonds represent slow progressor RMs, PB013 and PB044. (C) Correlation between the frequencies of SIV DNA⁺ Tfh cells and the percentage of B cell subsets (as defined in figure 5) in LNs and spleen of RMs. Each dot represents an individual macaque. Spearman analysis was used for correlations.

3.9. References

1. Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, et al. (2000) Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med* 192: 1545-1552.
2. Schaerli P, Willimann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, et al. (2000) CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med* 192: 1553-1562.
3. Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, et al. (2008) Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 29: 138-149.
4. Linterman MA, Beaton L, Yu D, Ramiscal RR, Srivastava M, et al. (2010) IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J Exp Med* 207: 353-363.
5. Zotos D, Coquet JM, Zhang Y, Light A, D'Costa K, et al. (2010) IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J Exp Med* 207: 365-378.
6. Poholek AC, Hansen K, Hernandez SG, Eto D, Chandele A, et al. (2010) In vivo regulation of Bcl6 and T follicular helper cell development. *J Immunol* 185: 313-326.
7. Elsaesser H, Sauer K, Brooks DG (2009) IL-21 is required to control chronic viral infection. *Science* 324: 1569-1572.
8. Frohlich A, Kisielow J, Schmitz I, Freigang S, Shamshiev AT, et al. (2009) IL-21R on T cells is critical for sustained functionality and control of chronic viral infection. *Science* 324: 1576-1580.
9. Yi JS, Du M, Zajac AJ (2009) A vital role for interleukin-21 in the control of a chronic viral infection. *Science* 324: 1572-1576.

10. Ansel KM, McHeyzer-Williams LJ, Ngo VN, McHeyzer-Williams MG, Cyster JG (1999) In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *J Exp Med* 190: 1123-1134.
11. Kim CH, Rott LS, Clark-Lewis I, Campbell DJ, Wu L, et al. (2001) Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J Exp Med* 193: 1373-1381.
12. Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, et al. (2009) Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* 325: 1006-1010.
13. Fazilleau N, McHeyzer-Williams LJ, Rosen H, McHeyzer-Williams MG (2009) The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. *Nat Immunol* 10: 375-384.
14. Bauquet AT, Jin H, Paterson AM, Mitsdoerffer M, Ho IC, et al. (2009) The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat Immunol* 10: 167-175.
15. Reinhardt RL, Liang HE, Locksley RM (2009) Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat Immunol* 10: 385-393.
16. Nurieva RI, Chung Y, Martinez GJ, Yang XO, Tanaka S, et al. (2009) Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 325: 1001-1005.
17. Yue FY, Lo C, Sakhdari A, Lee EY, Kovacs CM, et al. (2010) HIV-specific IL-21 producing CD4+ T cells are induced in acute and chronic progressive HIV infection and are associated with relative viral control. *J Immunol* 185: 498-506.
18. Lindqvist M, van Lunzen J, Soghoian DZ, Kuhl BD, Ranasinghe S, et al. (2012) Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. *J Clin Invest* 122: 3271-3280.

19. Perreau M, Savoye AL, De Crignis E, Corpataux JM, Cubas R, et al. (2013) Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *J Exp Med* 210: 143-156.
20. Cubas RA, Mudd JC, Savoye AL, Perreau M, van Grevenynghe J, et al. (2013) Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nat Med* 19: 494-499.
21. Petrovas C, Yamamoto T, Gerner MY, Boswell KL, Wloka K, et al. (2012) CD4 T follicular helper cell dynamics during SIV infection. *J Clin Invest* 122: 3281-3294.
22. Hong JJ, Amancha PK, Rogers K, Ansari AA, Villinger F (2012) Spatial alterations between CD4(+) T follicular helper, B, and CD8(+) T cells during simian immunodeficiency virus infection: T/B cell homeostasis, activation, and potential mechanism for viral escape. *J Immunol* 188: 3247-3256.
23. Brenchley JM, Vinton C, Tabb B, Hao XP, Connick E, et al. (2012) Differential infection patterns of CD4+ T cells and lymphoid tissue viral burden distinguish progressive and nonprogressive lentiviral infections. *Blood* 120: 4172-4181.
24. Xu Y, Weatherall C, Bailey M, Alcantara S, De Rose R, et al. (2013) Simian immunodeficiency virus infects follicular helper CD4 T cells in lymphoid tissues during pathogenic infection of pigtail macaques. *J Virol* 87: 3760-3773.
25. Boswell KL, Paris R, Boritz E, Ambrozak D, Yamamoto T, et al. (2014) Loss of circulating CD4 T cells with B cell helper function during chronic HIV infection. *PLoS Pathog* 10: e1003853.
26. Iannello A, Boulassel MR, Samarani S, Debbeche O, Tremblay C, et al. (2010) Dynamics and consequences of IL-21 production in HIV-infected individuals: a longitudinal and cross-sectional study. *J Immunol* 184: 114-126.

27. Good-Jacobson KL, Szumilas CG, Chen L, Sharpe AH, Tomayko MM, et al. (2010) PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat Immunol* 11: 535-542.
28. Rodrigues V, Laforge M, Campillo-Gimenez L, Soundaramourty C, Correia-de-Oliveira A, et al. (2014) Abortive T follicular helper development is associated with a defective humoral response in *Leishmania infantum*-infected macaques. *PLoS Pathog* 10: e1004096.
29. Loffredo JT, Maxwell J, Qi Y, Glidden CE, Borchardt GJ, et al. (2007) Mamu-B*08-positive macaques control simian immunodeficiency virus replication. *J Virol* 81: 8827-8832.
30. Mothe BR, Weinfurter J, Wang C, Rehrauer W, Wilson N, et al. (2003) Expression of the major histocompatibility complex class I molecule Mamu-A*01 is associated with control of simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication. *J Virol* 77: 2736-2740.
31. Yant LJ, Friedrich TC, Johnson RC, May GE, Maness NJ, et al. (2006) The high-frequency major histocompatibility complex class I allele Mamu-B*17 is associated with control of simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication. *J Virol* 80: 5074-5077.
32. Hong JJ, Amancha PK, Rogers KA, Courtney CL, Haverar-Daughton C, et al. (2014) Early lymphoid responses and germinal center formation correlate with lower viral load set points and better prognosis of simian immunodeficiency virus infection. *J Immunol* 193: 797-806.
33. Arnoult D, Petit F, Lelievre JD, Lecossier D, Hance A, et al. (2003) Caspase-dependent and -independent T-cell death pathways in pathogenic simian immunodeficiency virus infection: relationship to disease progression. *Cell Death Differ* 10: 1240-1252.

34. Li Q, Duan L, Estes JD, Ma ZM, Rourke T, et al. (2005) Peak SIV replication in resting memory CD4⁺ T cells depletes gut lamina propria CD4⁺ T cells. *Nature* 434: 1148-1152.
35. Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, et al. (2005) Massive infection and loss of memory CD4⁺ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* 434: 1093-1097.
36. Viollet L, Monceaux V, Petit F, Ho Tsong Fang R, Cumont MC, et al. (2006) Death of CD4⁺ T cells from lymph nodes during primary SIVmac251 infection predicts the rate of AIDS progression. *J Immunol* 177: 6685-6694.
37. Estaquier J, Idziorek T, Zou W, Emilie D, Farber CM, et al. (1995) T helper type 1/T helper type 2 cytokines and T cell death: preventive effect of interleukin 12 on activation-induced and CD95 (FAS/APO-1)-mediated apoptosis of CD4⁺ T cells from human immunodeficiency virus-infected persons. *J Exp Med* 182: 1759-1767.
38. Estaquier J, Tanaka M, Suda T, Nagata S, Golstein P, et al. (1996) Fas-mediated apoptosis of CD4⁺ and CD8⁺ T cells from human immunodeficiency virus-infected persons: differential in vitro preventive effect of cytokines and protease antagonists. *Blood* 87: 4959-4966.
39. Katsikis PD, Garcia-Ojeda ME, Torres-Roca JF, Tijoe IM, Smith CA, et al. (1997) Interleukin-1 beta converting enzyme-like protease involvement in Fas-induced and activation-induced peripheral blood T cell apoptosis in HIV infection. TNF-related apoptosis-inducing ligand can mediate activation-induced T cell death in HIV infection. *J Exp Med* 186: 1365-1372.
40. Cumont MC, Monceaux V, Viollet L, Lay S, Parker R, et al. (2007) TGF-beta in intestinal lymphoid organs contributes to the death of armed effector CD8 T cells and is associated with the absence of virus containment in rhesus macaques infected with the simian immunodeficiency virus. *Cell Death Differ* 14: 1747-1758.

41. Hale JS, Youngblood B, Latner DR, Mohammed AU, Ye L, et al. (2013) Distinct memory CD4⁺ T cells with commitment to T follicular helper- and T helper 1-cell lineages are generated after acute viral infection. *Immunity* 38: 805-817.
42. Kroenke MA, Eto D, Locci M, Cho M, Davidson T, et al. (2012) Bcl6 and Maf cooperate to instruct human follicular helper CD4 T cell differentiation. *J Immunol* 188: 3734-3744.
43. Monceaux V, Estaquier J, Fevrier M, Cumont MC, Riviere Y, et al. (2003) Extensive apoptosis in lymphoid organs during primary SIV infection predicts rapid progression towards AIDS. *AIDS* 17: 1585-1596.
44. Monceaux V, Viollet L, Petit F, Cumont MC, Kaufmann GR, et al. (2007) CD4⁺ CCR5⁺ T-cell dynamics during simian immunodeficiency virus infection of Chinese rhesus macaques. *J Virol* 81: 13865-13875.
45. Campillo-Gimenez L, Laforge M, Fay M, Brussel A, Cumont MC, et al. (2010) Nonpathogenesis of simian immunodeficiency virus infection is associated with reduced inflammation and recruitment of plasmacytoid dendritic cells to lymph nodes, not to lack of an interferon type I response, during the acute phase. *J Virol* 84: 1838-1846.
46. Lee JY, Skon CN, Lee YJ, Oh S, Taylor JJ, et al. (2015) The transcription factor KLF2 restrains CD4(+) T follicular helper cell differentiation. *Immunity* 42: 252-264.
47. Weber JP, Fuhrmann F, Feist RK, Lahmann A, Al Baz MS, et al. (2015) ICOS maintains the T follicular helper cell phenotype by down-regulating Kruppel-like factor 2. *J Exp Med* 212: 217-233.
48. Wang H, Geng J, Wen X, Bi E, Kossenkov AV, et al. (2014) The transcription factor Foxp1 is a critical negative regulator of the differentiation of follicular helper T cells. *Nat Immunol* 15: 667-675.

49. Xiao N, Eto D, Elly C, Peng G, Crotty S, et al. (2014) The E3 ubiquitin ligase Itch is required for the differentiation of follicular helper T cells. *Nat Immunol* 15: 657-666.
50. Fabre S, Carrette F, Chen J, Lang V, Semichon M, et al. (2008) FOXO1 regulates L-Selectin and a network of human T cell homing molecules downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol* 181: 2980-2989.
51. Kerdiles YM, Beisner DR, Tinoco R, Dejean AS, Castrillon DH, et al. (2009) Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nat Immunol* 10: 176-184.
52. Titanji K, De Milito A, Cagigi A, Thorstensson R, Grutzmeier S, et al. (2006) Loss of memory B cells impairs maintenance of long-term serologic memory during HIV-1 infection. *Blood* 108: 1580-1587.
53. Das A, Veazey RS, Wang X, Lackner AA, Xu H, et al. (2011) Simian immunodeficiency virus infection in rhesus macaques induces selective tissue specific B cell defects in double positive CD21+CD27+ memory B cells. *Clin Immunol* 140: 223-228.
54. Kuhrt D, Faith SA, Leone A, Rohankedkar M, Sodora DL, et al. (2010) Evidence of early B-cell dysregulation in simian immunodeficiency virus infection: rapid depletion of naive and memory B-cell subsets with delayed reconstitution of the naive B-cell population. *J Virol* 84: 2466-2476.
55. Titanji K, Velu V, Chennareddi L, Vijay-Kumar M, Gewirtz AT, et al. (2010) Acute depletion of activated memory B cells involves the PD-1 pathway in rapidly progressing SIV-infected macaques. *J Clin Invest* 120: 3878-3890.
56. Moir S, Malaspina A, Pickeral OK, Donoghue ET, Vasquez J, et al. (2004) Decreased survival of B cells of HIV-viremic patients mediated by altered expression of receptors of the TNF superfamily. *J Exp Med* 200: 587-599.

57. van Grevenynghe J, Cubas RA, Noto A, DaFonseca S, He Z, et al. (2011) Loss of memory B cells during chronic HIV infection is driven by Foxo3a- and TRAIL-mediated apoptosis. *J Clin Invest* 121: 3877-3888.
58. Fukazawa Y, Lum R, Okoye AA, Park H, Matsuda K, et al. (2015) B cell follicle sanctuary permits persistent productive simian immunodeficiency virus infection in elite controllers. *Nat Med* 21: 132-139.
59. Xu H, Wang X, Malam N, Lackner AA, Veazey RS (2015) Persistent Simian Immunodeficiency Virus Infection Causes Ultimate Depletion of Follicular Th Cells in AIDS. *J Immunol* 195: 4351-4357.
60. Yamamoto T, Lynch RM, Gautam R, Matus-Nicodemos R, Schmidt SD, et al. (2015) Quality and quantity of TFH cells are critical for broad antibody development in SHIVAD8 infection. *Sci Transl Med* 7: 298ra120.
61. Liu X, Nurieva RI, Dong C (2013) Transcriptional regulation of follicular T-helper (Tfh) cells. *Immunol Rev* 252: 139-145.
62. Pepper M, Pagan AJ, Igyarto BZ, Taylor JJ, Jenkins MK (2011) Opposing signals from the Bcl6 transcription factor and the interleukin-2 receptor generate T helper 1 central and effector memory cells. *Immunity* 35: 583-595.
63. Cumont MC, Diop O, Vaslin B, Elbim C, Viollet L, et al. (2008) Early divergence in lymphoid tissue apoptosis between pathogenic and nonpathogenic simian immunodeficiency virus infections of nonhuman primates. *J Virol* 82: 1175-1184.
64. Lee SK, Rigby RJ, Zotos D, Tsai LM, Kawamoto S, et al. (2011) B cell priming for extrafollicular antibody responses requires Bcl-6 expression by T cells. *J Exp Med* 208: 1377-1388.
65. Bentebibel SE, Schmitt N, Banchereau J, Ueno H (2011) Human tonsil B-cell lymphoma 6 (BCL6)-expressing CD4⁺ T-cell subset specialized for B-cell help outside germinal centers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: E488-497.

66. Kitano M, Moriyama S, Ando Y, Hikida M, Mori Y, et al. (2011) Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity. *Immunity* 34: 961-972.
67. Crotty S (2011) Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* 29: 621-663.
68. Kerfoot SM, Yaari G, Patel JR, Johnson KL, Gonzalez DG, et al. (2011) Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone. *Immunity* 34: 947-960.
69. Shulman Z, Gitlin AD, Weinstein JS, Lainez B, Esplugues E, et al. (2014) Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection. *Science* 345: 1058-1062.
70. Campillo-Gimenez L, Cumont MC, Fay M, Kared H, Monceaux V, et al. (2010) AIDS progression is associated with the emergence of IL-17-producing cells early after simian immunodeficiency virus infection. *J Immunol* 184: 984-992.
71. Estes JD, Wietgreffe S, Schacker T, Southern P, Beilman G, et al. (2007) Simian immunodeficiency virus-induced lymphatic tissue fibrosis is mediated by transforming growth factor beta 1-positive regulatory T cells and begins in early infection. *J Infect Dis* 195: 551-561.
72. Zeng M, Smith AJ, Wietgreffe SW, Southern PJ, Schacker TW, et al. (2011) Cumulative mechanisms of lymphoid tissue fibrosis and T cell depletion in HIV-1 and SIV infections. *J Clin Invest* 121: 998-1008.
73. Moir S, Fauci AS (2009) B cells in HIV infection and disease. *Nat Rev Immunol* 9: 235-245.
74. Morris L, Binley JM, Clas BA, Bonhoeffer S, Astill TP, et al. (1998) HIV-1 antigen-specific and -nonspecific B cell responses are sensitive to combination antiretroviral therapy. *J Exp Med* 188: 233-245.

75. Titanji K, Chiodi F, Bellocco R, Schepis D, Osorio L, et al. (2005) Primary HIV-1 infection sets the stage for important B lymphocyte dysfunctions. *AIDS* 19: 1947-1955.
76. Schmitz JE, Zahn RC, Brown CR, Rett MD, Li M, et al. (2009) Inhibition of adaptive immune responses leads to a fatal clinical outcome in SIV-infected pigtailed macaques but not vervet African green monkeys. *PLoS Pathog* 5: e1000691.
77. Peruchon S, Chaoul N, Burelout C, Delache B, Brochard P, et al. (2009) Tissue-specific B-cell dysfunction and generalized memory B-cell loss during acute SIV infection. *PLoS One* 4: e5966.
78. Lagresle C, Mondiere P, Bella C, Krammer PH, Defrance T (1996) Concurrent engagement of CD40 and the antigen receptor protects naive and memory human B cells from APO-1/Fas-mediated apoptosis. *J Exp Med* 183: 1377-1388.
79. Rothstein TL, Wang JK, Panka DJ, Foote LC, Wang Z, et al. (1995) Protection against Fas-dependent Th1-mediated apoptosis by antigen receptor engagement in B cells. *Nature* 374: 163-165.
80. Goldstein S, Brown CR, Ourmanov I, Pandrea I, Buckler-White A, et al. (2006) Comparison of simian immunodeficiency virus SIV_{agmVer} replication and CD4⁺ T-cell dynamics in vervet and sabaeus African green monkeys. *J Virol* 80: 4868-4877.
81. Pandrea I, Apetrei C, Dufour J, Dillon N, Barbercheck J, et al. (2006) Simian immunodeficiency virus SIV_{agm.sab} infection of Caribbean African green monkeys: a new model for the study of SIV pathogenesis in natural hosts. *J Virol* 80: 4858-4867.
82. Mehta N, Cunningham CK, Flynn P, Pepe J, Obaro S, et al. (2010) Impaired generation of hepatitis B virus-specific memory B cells in HIV infected individuals following vaccination. *Vaccine* 28: 3672-3678.

83. Pallikkuth S, Parmigiani A, Silva SY, George VK, Fischl M, et al. (2012) Impaired peripheral blood T-follicular helper cell function in HIV-infected nonresponders to the 2009 H1N1/09 vaccine. *Blood* 120: 985-993.
84. Chakrabarti L, Cumont MC, Montagnier L, Hurtrel B (1994) Variable course of primary simian immunodeficiency virus infection in lymph nodes: relation to disease progression. *J Virol* 68: 6634-6643.
85. Rey-Cuille MA, Berthier JL, Bomsel-Demontoy MC, Chaduc Y, Montagnier L, et al. (1998) Simian immunodeficiency virus replicates to high levels in sooty mangabeys without inducing disease. *J Virol* 72: 3872-3886.
86. Chakrabarti L, Baptiste V, Khatissian E, Cumont MC, Aubertin AM, et al. (1995) Limited viral spread and rapid immune response in lymph nodes of macaques inoculated with attenuated simian immunodeficiency virus. *Virology* 213: 535-548.
87. Vinuesa CG, Linterman MA, Goodnow CC, Randall KL (2010) T cells and follicular dendritic cells in germinal center B-cell formation and selection. *Immunol Rev* 237: 72-89.
88. Qiao X, He B, Chiu A, Knowles DM, Chadburn A, et al. (2006) Human immunodeficiency virus 1 Nef suppresses CD40-dependent immunoglobulin class switching in bystander B cells. *Nat Immunol* 7: 302-310.
89. Poudrier J, Weng X, Kay DG, Pare G, Calvo EL, et al. (2001) The AIDS disease of CD4C/HIV transgenic mice shows impaired germinal centers and autoantibodies and develops in the absence of IFN-gamma and IL-6. *Immunity* 15: 173-185.
90. Swingler S, Zhou J, Swingler C, Dauphin A, Greenough T, et al. (2008) Evidence for a pathogenic determinant in HIV-1 Nef involved in B cell dysfunction in HIV/AIDS. *Cell Host Microbe* 4: 63-76.

91. Estaquier J, Idziorek T, de Bels F, Barre-Sinoussi F, Hurtrel B, et al. (1994) Programmed cell death and AIDS: significance of T-cell apoptosis in pathogenic and nonpathogenic primate lentiviral infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9431-9435.
92. Finkel TH, Tudor-Williams G, Banda NK, Cotton MF, Curiel T, et al. (1995) Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nat Med* 1: 129-134.
93. Silvestri G, Sodora DL, Koup RA, Paiardini M, O'Neil SP, et al. (2003) Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity* 18: 441-452.
94. Hurtrel B, Petit F, Arnoult D, Muller-Trutwin M, Silvestri G, et al. (2005) Apoptosis in SIV infection. *Cell Death Differ* 12 Suppl 1: 979-990.
95. Laforge M, Campillo-Gimenez L, Monceaux V, Cumont MC, Hurtrel B, et al. (2011) HIV/SIV infection primes monocytes and dendritic cells for apoptosis. *PLoS Pathog* 7: e1002087.
96. Katsikis PD, Wunderlich ES, Smith CA, Herzenberg LA, Herzenberg LA (1995) Fas antigen stimulation induces marked apoptosis of T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Exp Med* 181: 2029-2036.
97. Preibisch S, Saalfeld S, Tomancak P (2009) Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics* 25: 1463-1465.

Supplemental figures legends

Supplemental figure 1. CD3 T cell dynamics in SIV-infected rhesus macaques.

(A) Representative dot plots depicting the expression of CD3 and CD20 in the blood. (B) Histograms show percentages and cell numbers of CD3 T cells in the blood (number/mm³), LNs and spleen of RMs at the indicated time. Statistical analyses are performed using Mann Whitney test. *, p<0.05; **, p<0.01. At day>180, open circles represent fast progressor RMs PB023 and PB028; and full diamonds represent slow progressor RMs PB013 and PB044.

Supplemental figure 2. Dynamics of CD4 T cell subsets in SIV-infected rhesus macaques.

(A) Representative dot plots depicting the expression of CD62L and CD45RA in the blood, LNs and the spleen of non-Tfh cells. (B) Histograms show the expression of PD-1 for each subpopulation: naive (CD45RA⁺CD62L⁺), central memory (CM, CD45RA⁻CD62L⁺), effector memory (EM, CD45RA⁻CD62⁻), and terminally differentiated (TDT, CD45RA⁺CD62L⁻). (C) Percentage and (D) cell number of naive, central memory and terminally differentiated CD4 T cells in the blood, in LNs and spleen. Each dot represents an individual RM. Statistical analyses are performed using Mann Whitney test. *, p<0.05; **, p<0.01. At day>180, open circles represent fast progressor RMs PB023 and PB028; and full diamonds represent slow progressor RMs PB013 and PB044.

Supplemental figure 3. Cell sorting strategy. Representative dot plots depicting gating strategy used to sort CD4 T cell subsets using BD influx cell sorter. CD3⁺ T cells are separated in CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ T cells. After gating on CD3⁺CD4⁺, Tfh cells are sorted based on the expression of CXCR5 and PD-1 (CXCR5⁺PD-1^{bright}). Non-Tfh CD3⁺CD4⁺ T cells are then separated in naive (CD45RA⁺CCR7⁺), central memory (CD45RA⁻CCR7⁺), effector memory (CD45RA⁻CCR7⁻) and terminally differentiated (CD45RA⁺CCR7⁻).

Supplemental figure 4. Correlation between effector memory CD4 T cells and B cell subsets. Diagrams show correlation between the percentage of effector memory cells and the percentage of B cell subset (as defined in figure 5) in LNs and spleen of RMs. Each dot represents an individual RM. Spearman analysis was used for correlations.

Supplemental figure 5. Dynamics of germinal center in LNs of rhesus macaque infected with SIV. LN tissue sections were stained with antibodies against Ki-67 (white), IgD (green), CD3 (blue) and CD20 (red) and imaged by confocal microscopy. Representative pictures of a naive RM and of two chronically SIV-infected RMs, slow and fast progressor RMs are shown. The picture is representative of two individuals animals performed independently. Higher magnification is shown on the right part of the picture. Scale is shown.

Supplemental figure 6. Distribution of Tfh cells in LNs of rhesus macaque infected with SIV. LNs tissue sections were stained with antibodies against CXCR5 (blue), CD4 (green) and PD-1 (red) and imaged by confocal microscopy. Representative pictures of the same animals as depicted in S5 figure are shown. Higher magnification is shown on the right part of the picture. Scale is shown.

Table S1. Primers and probes used for RT-qPCR.

Table S2. Antibodies used for flow cytometry, cell sorting and immunofluorescence. Flow cytometry and cell sorting (upper list), tissue immunofluorescence (bottom list).

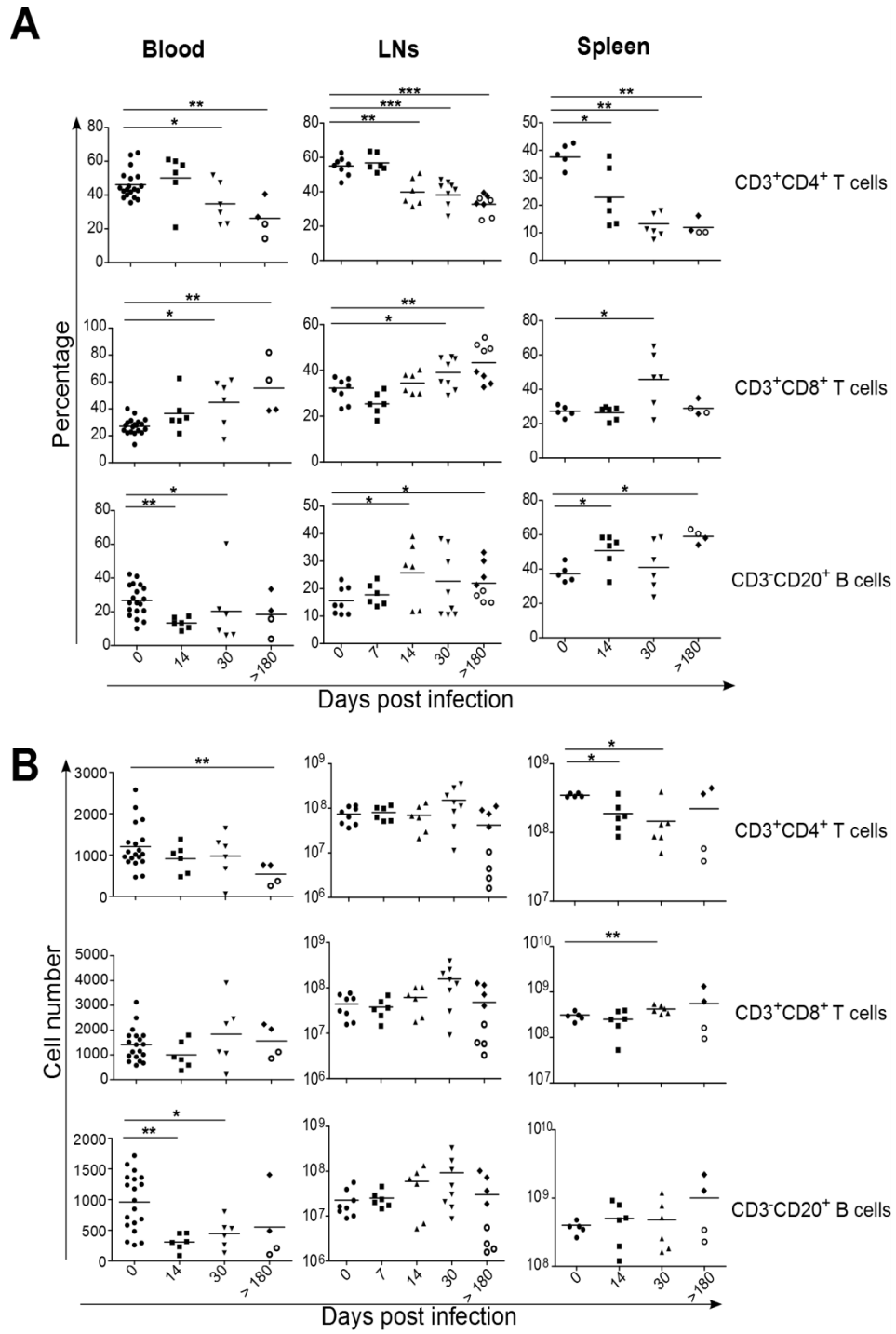


Figure 1

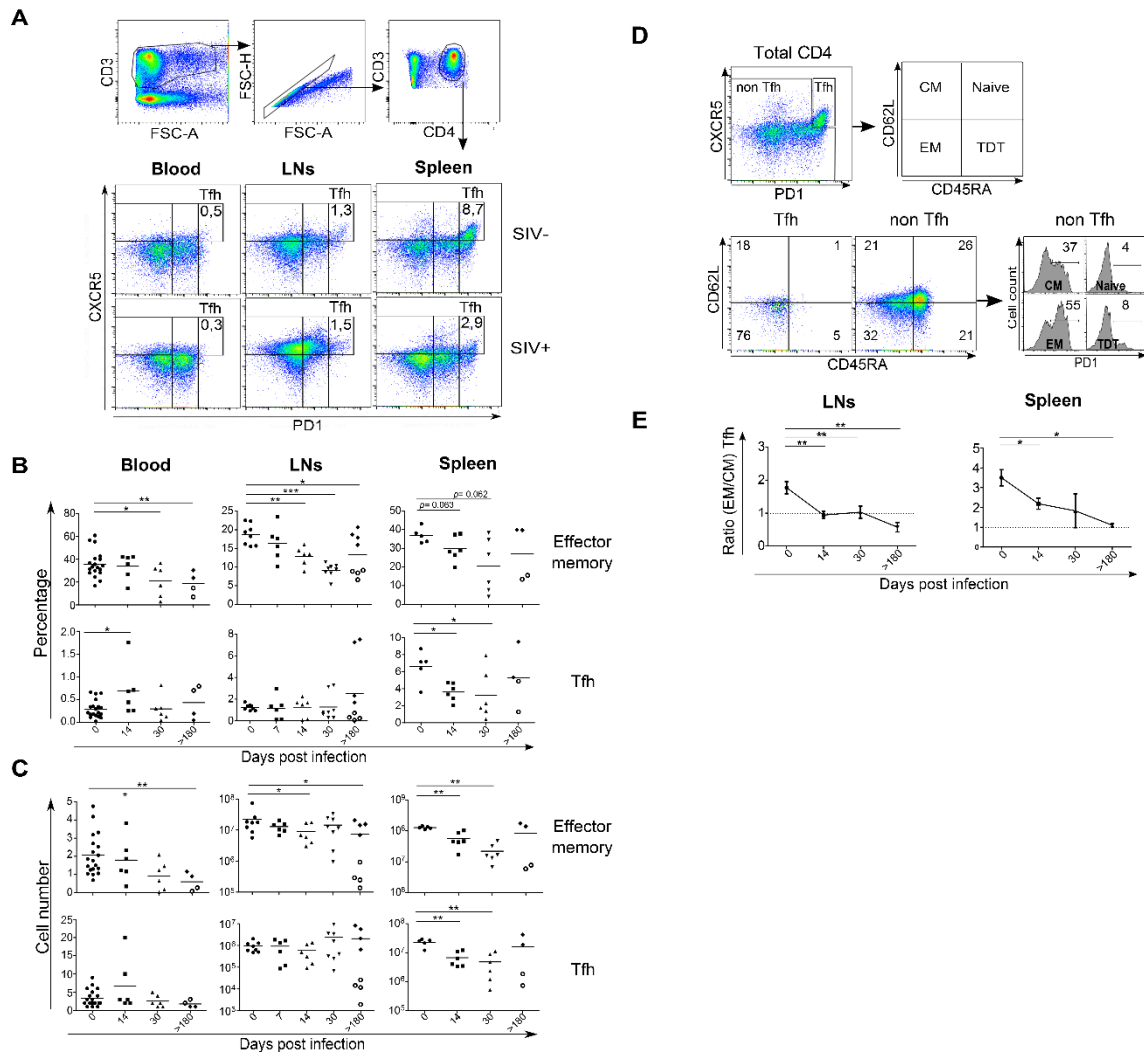


Figure 2

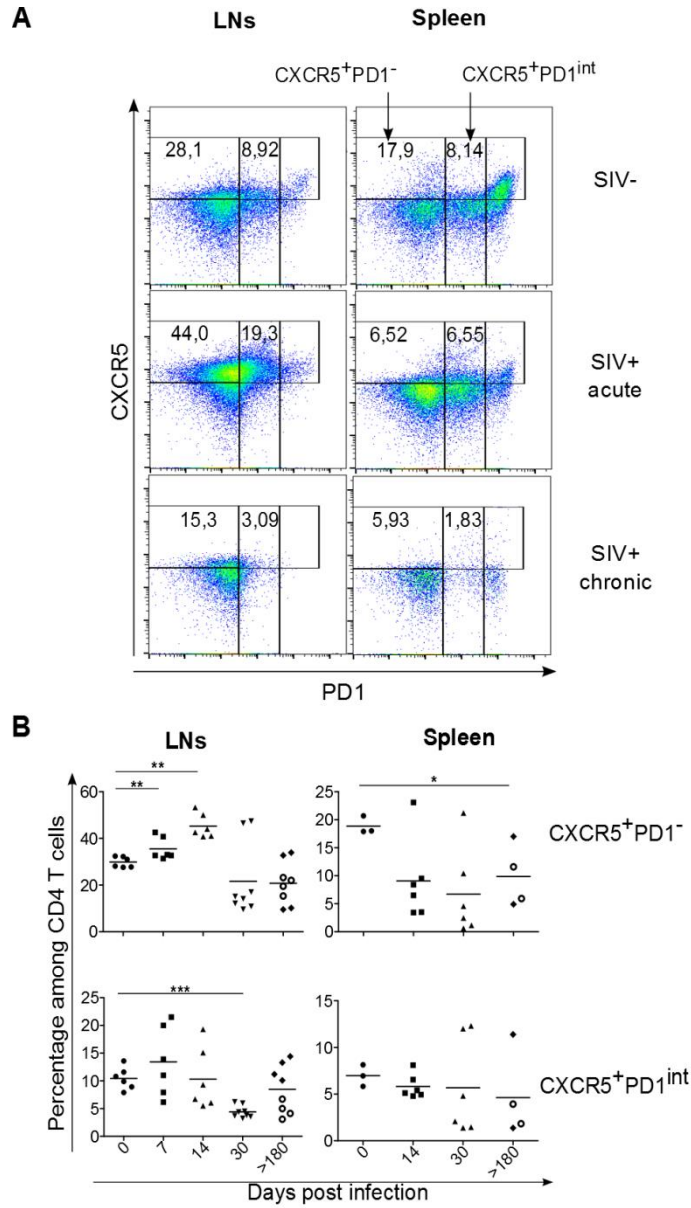


Figure 3

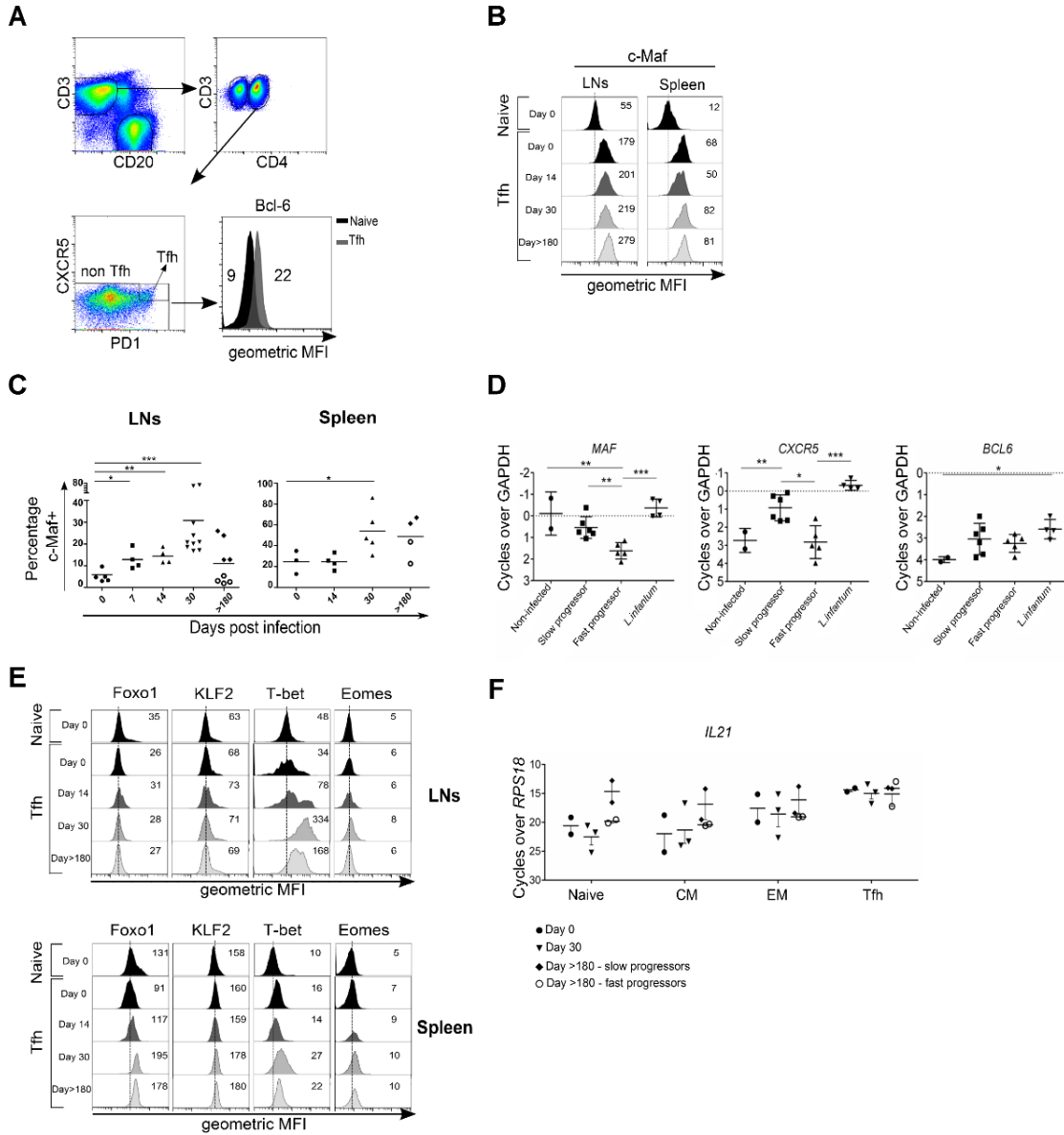


Figure 4

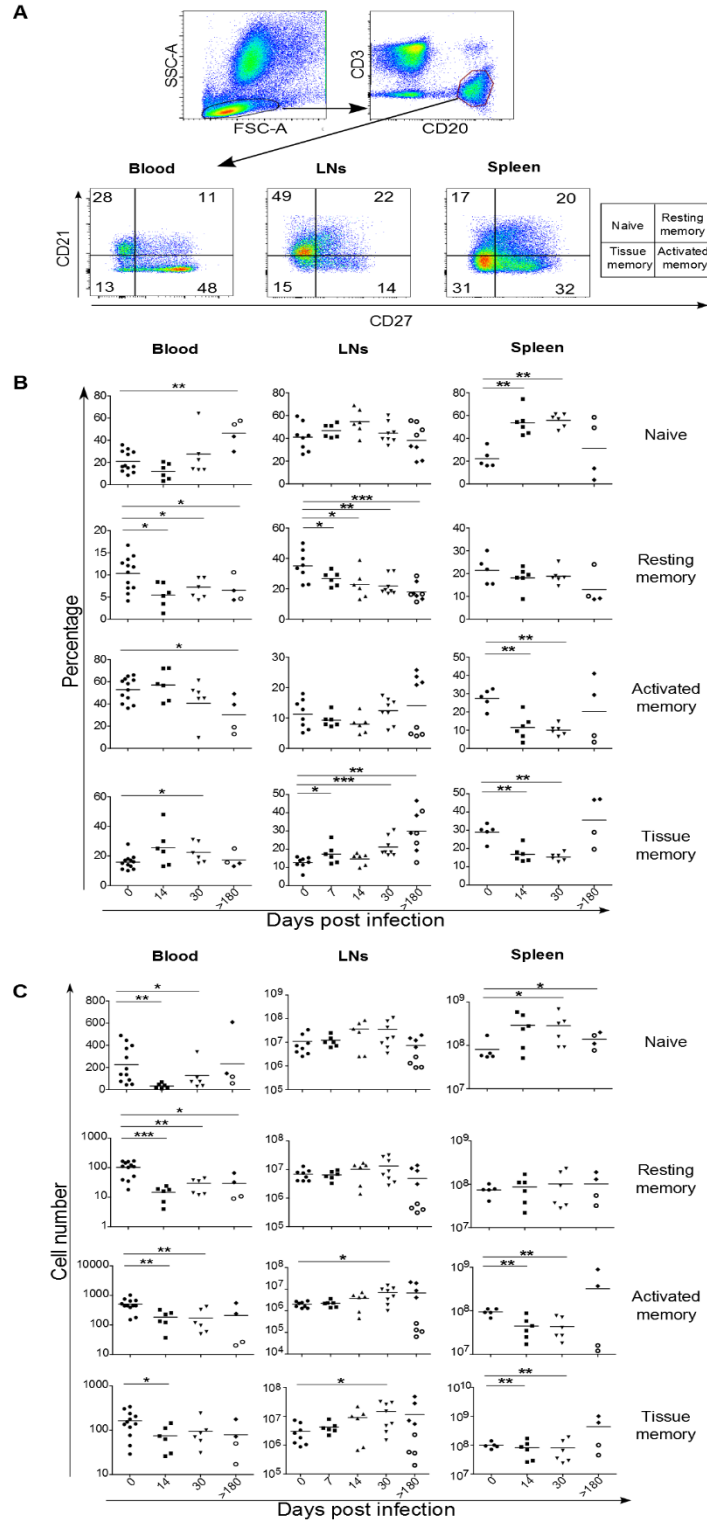


Figure 5

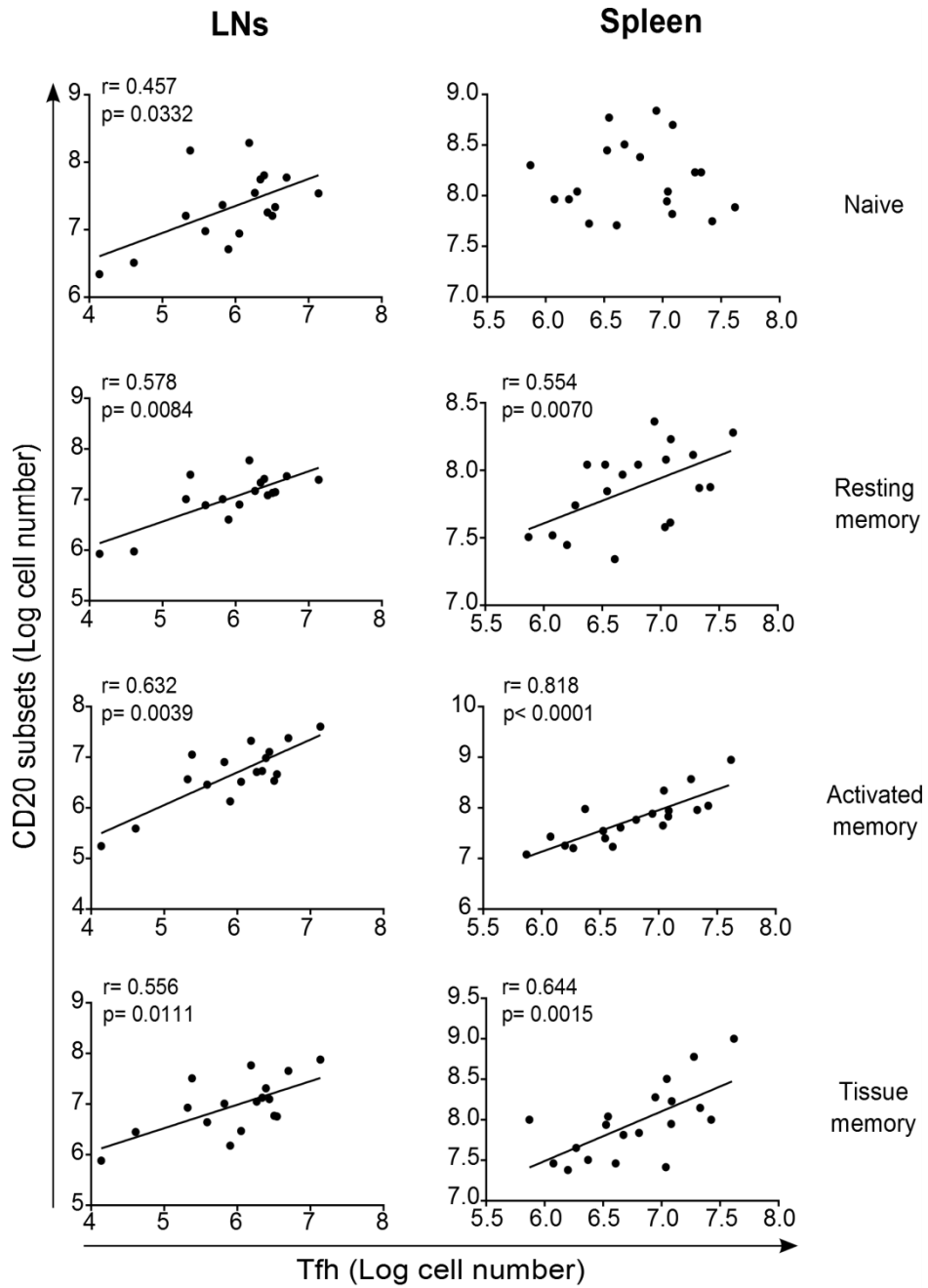


Figure 6

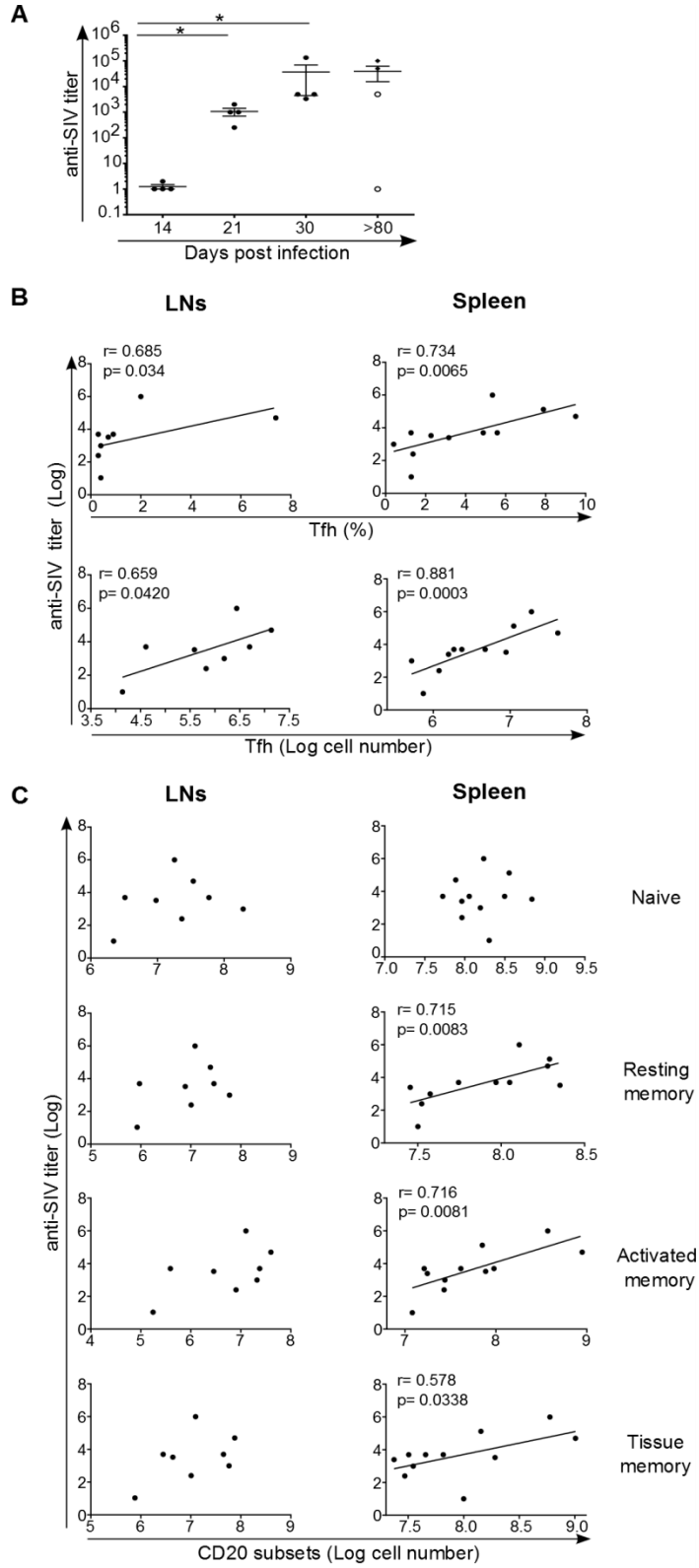


Figure 7

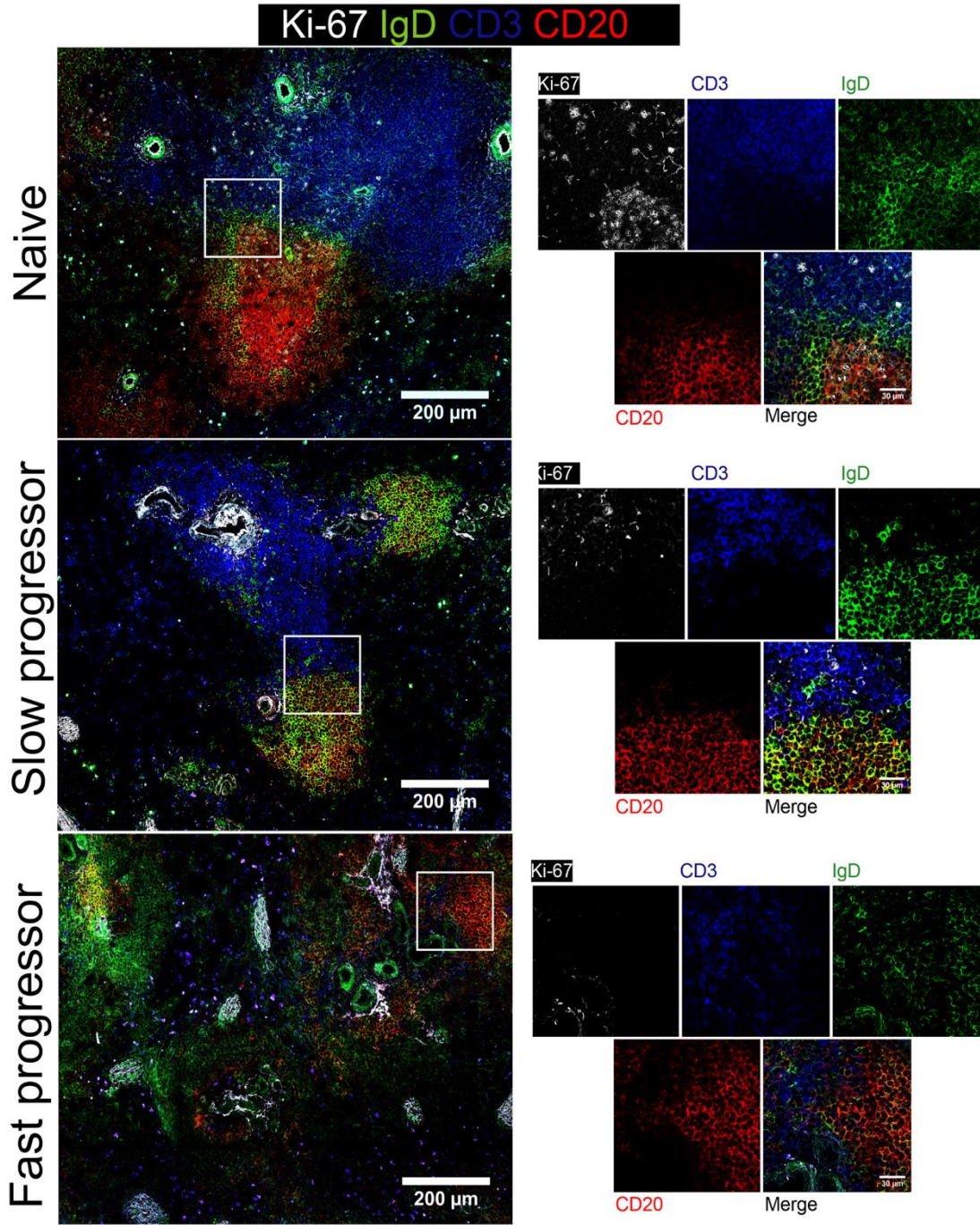


Figure 8

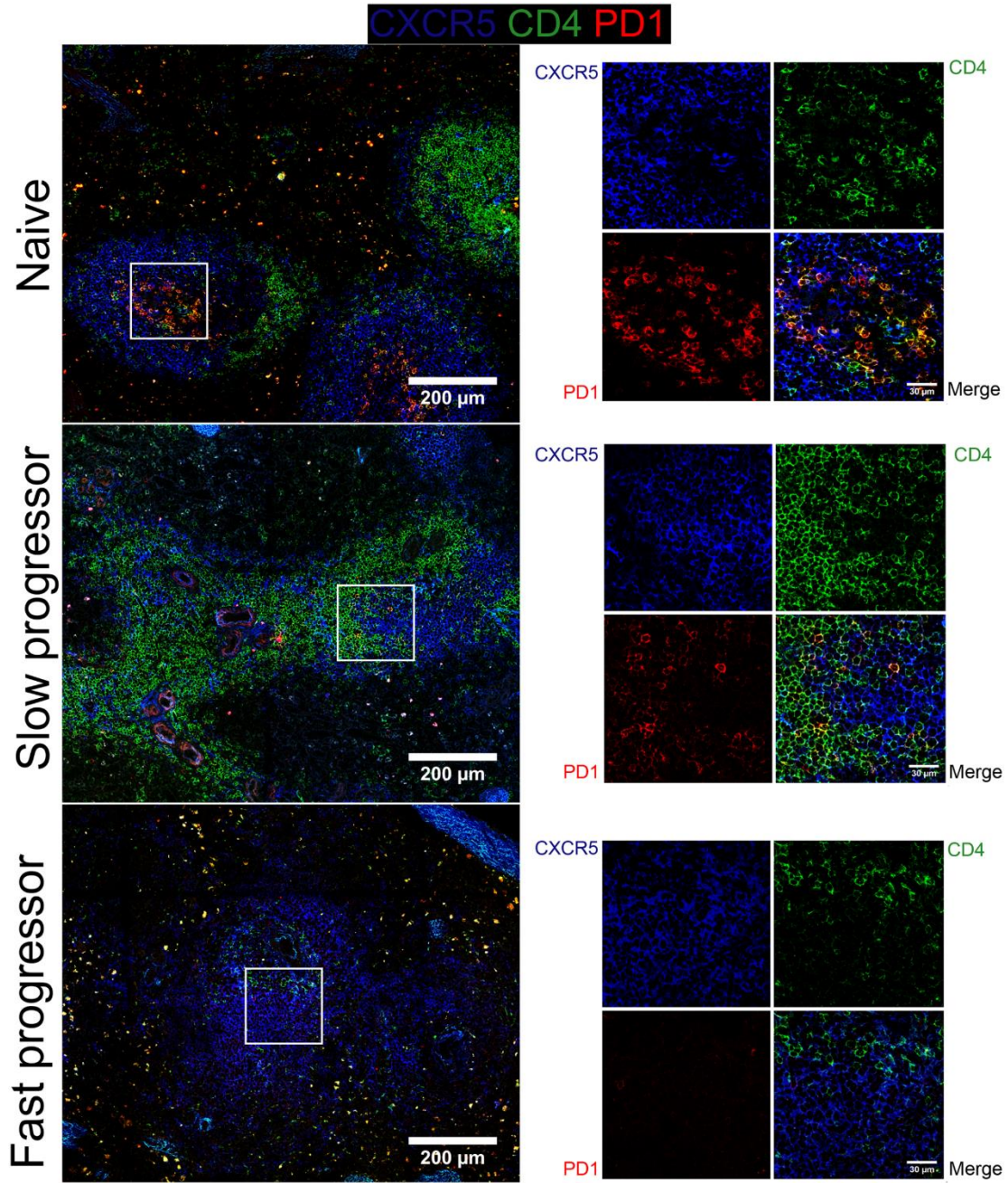


Figure 9

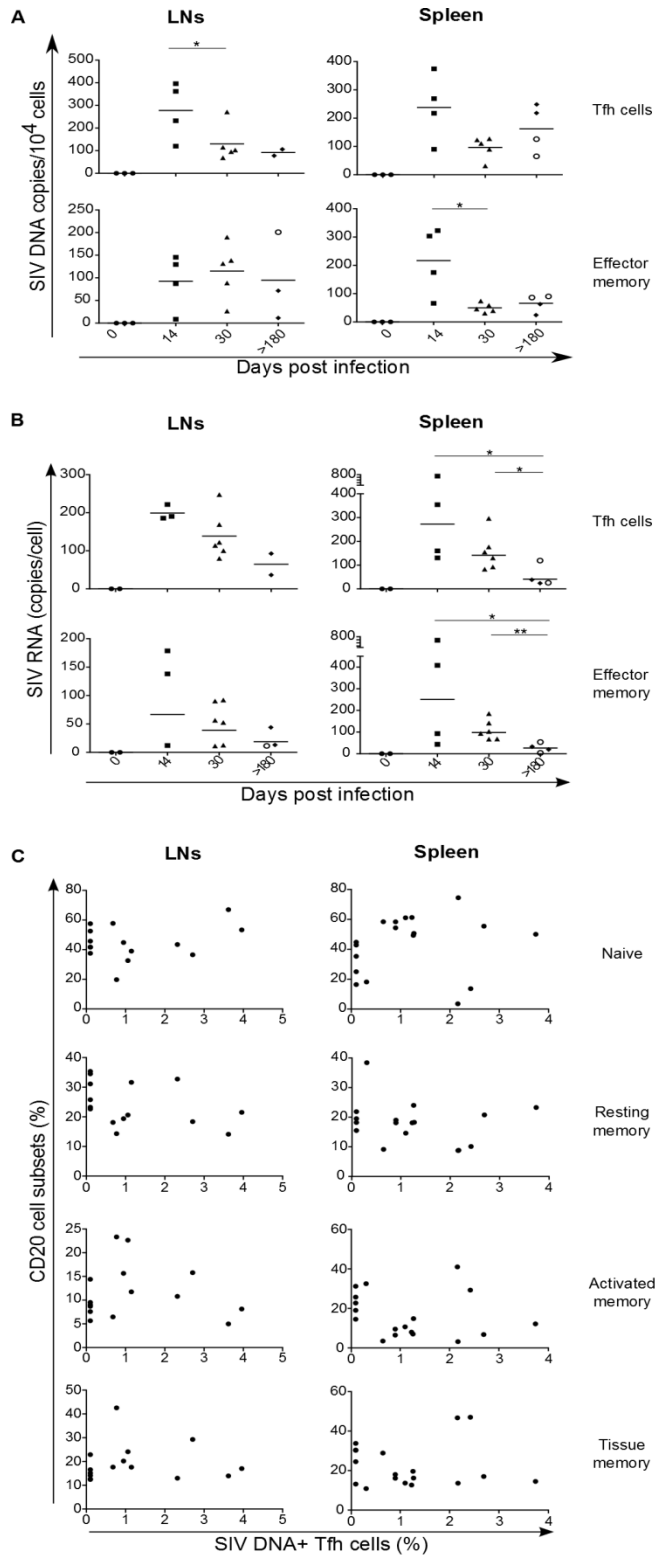
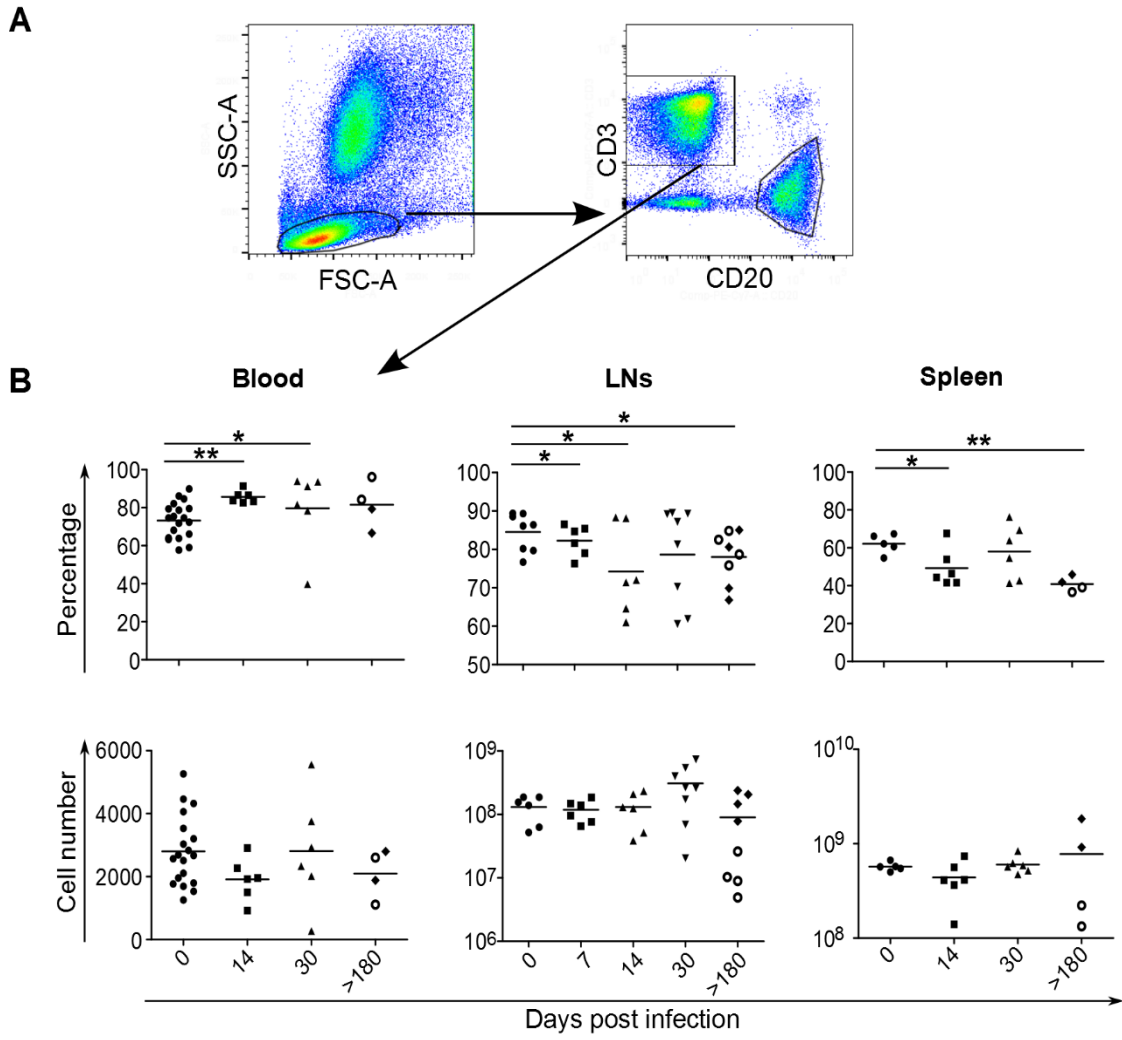
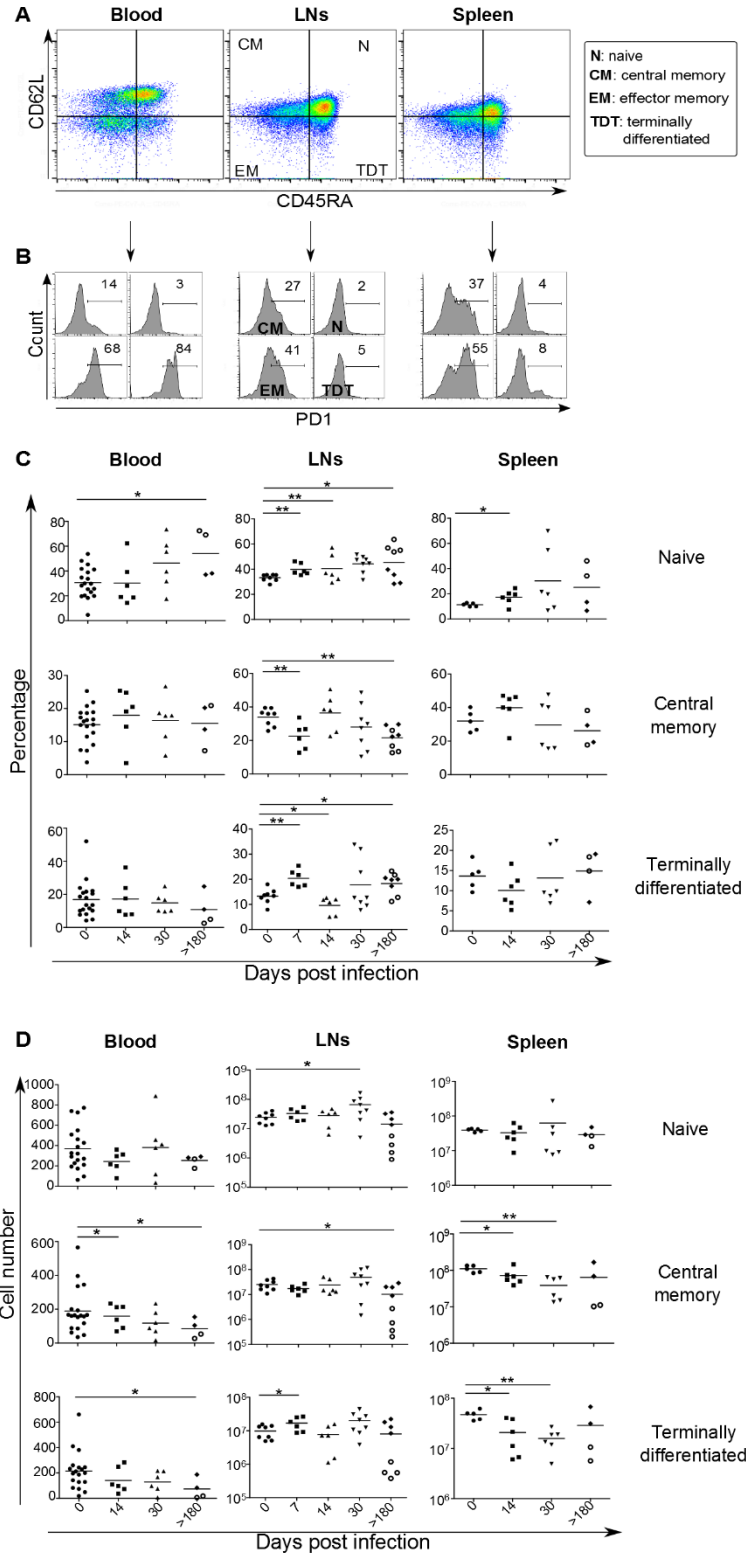


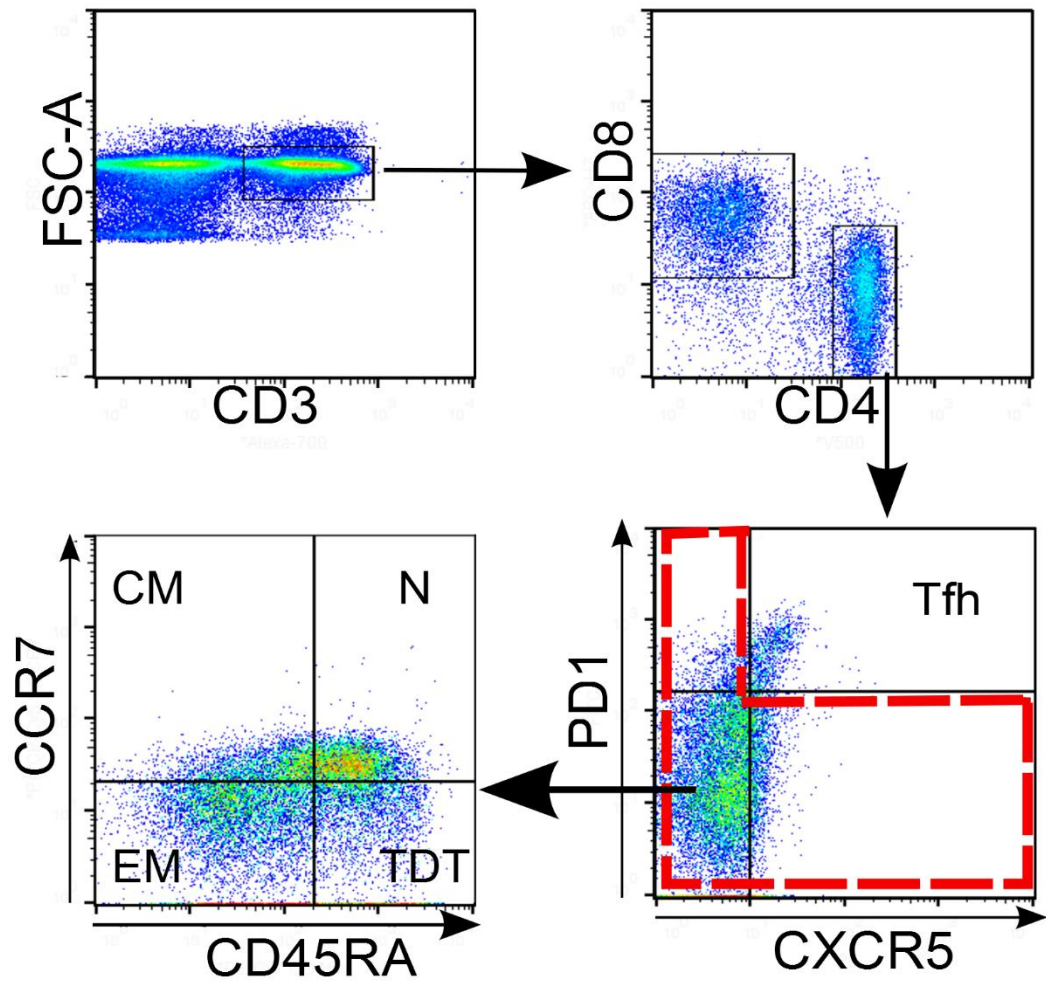
Figure 10



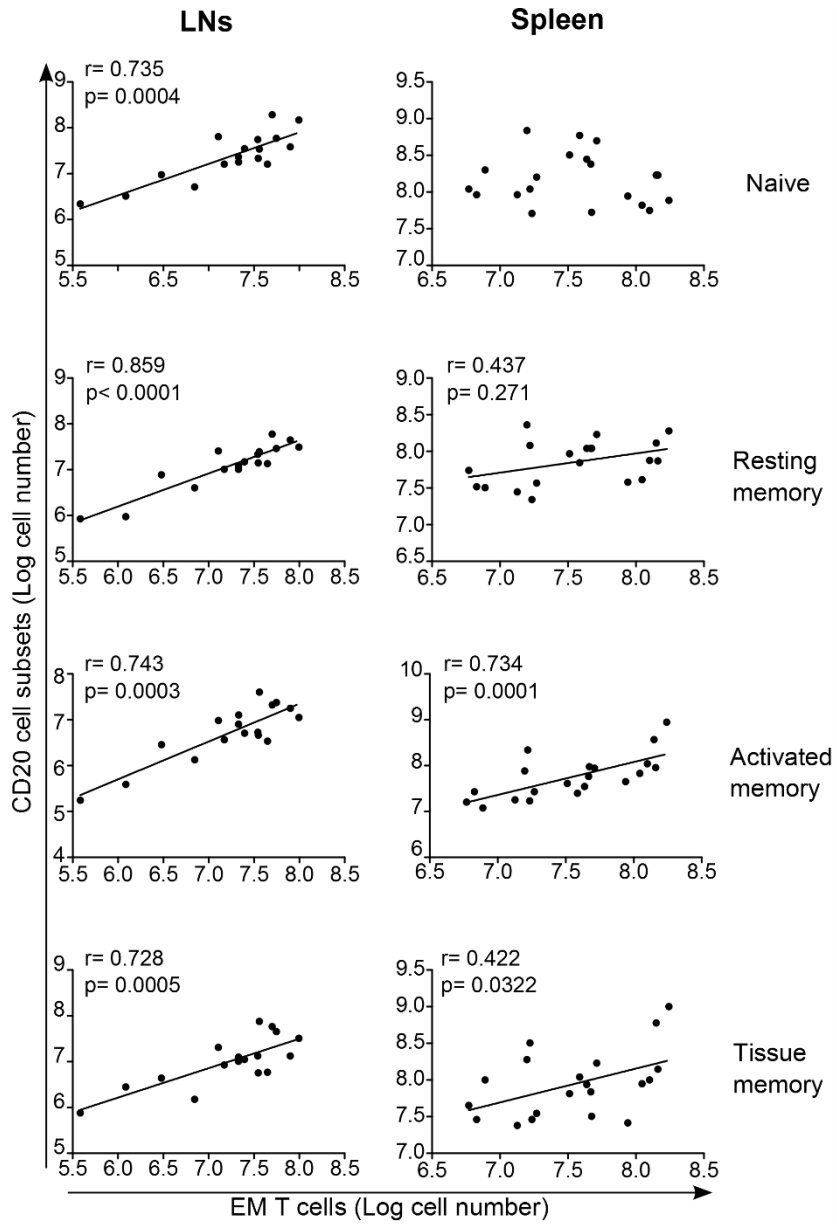
Supplemental Figure 1



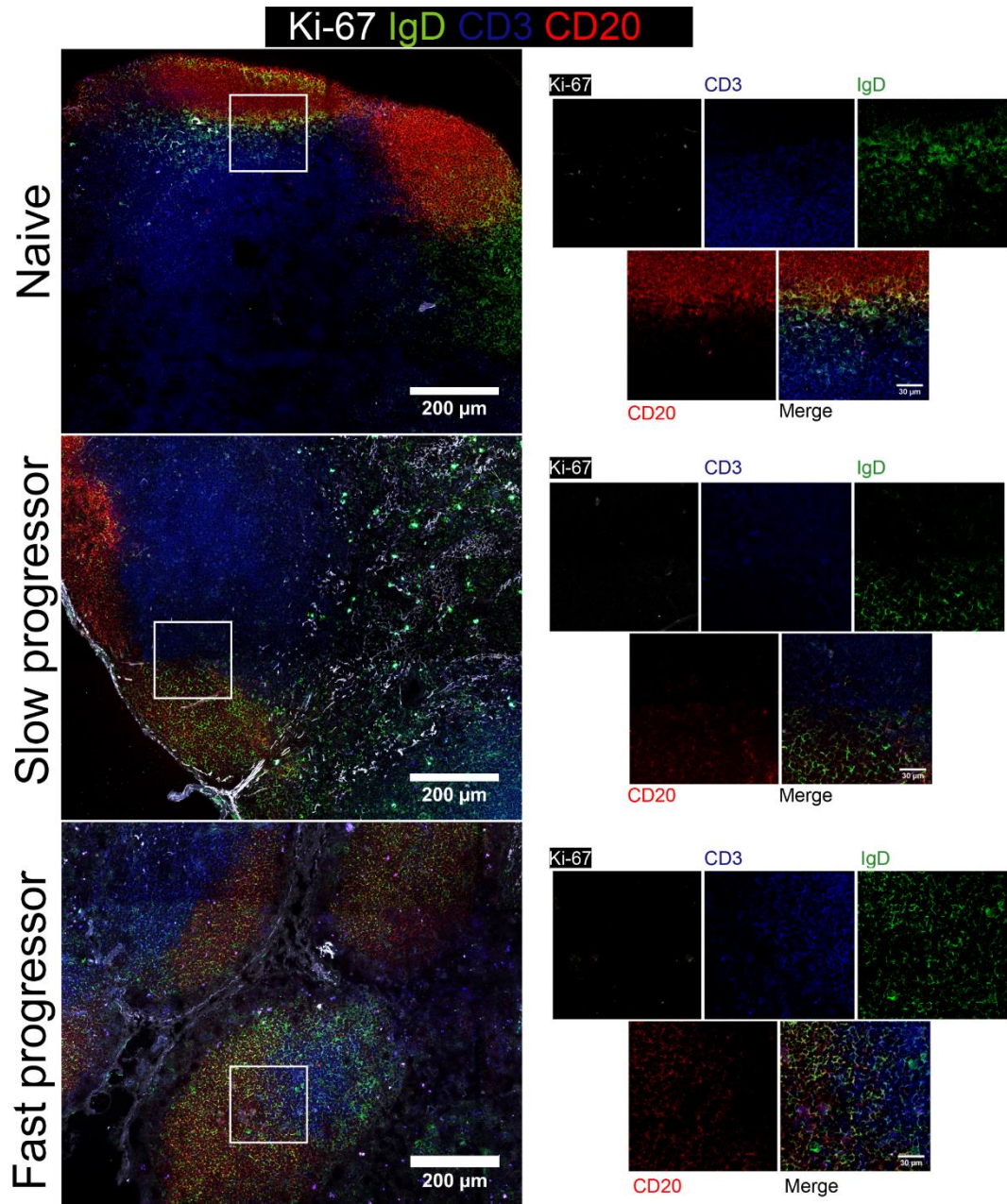
Supplemental Figure 2



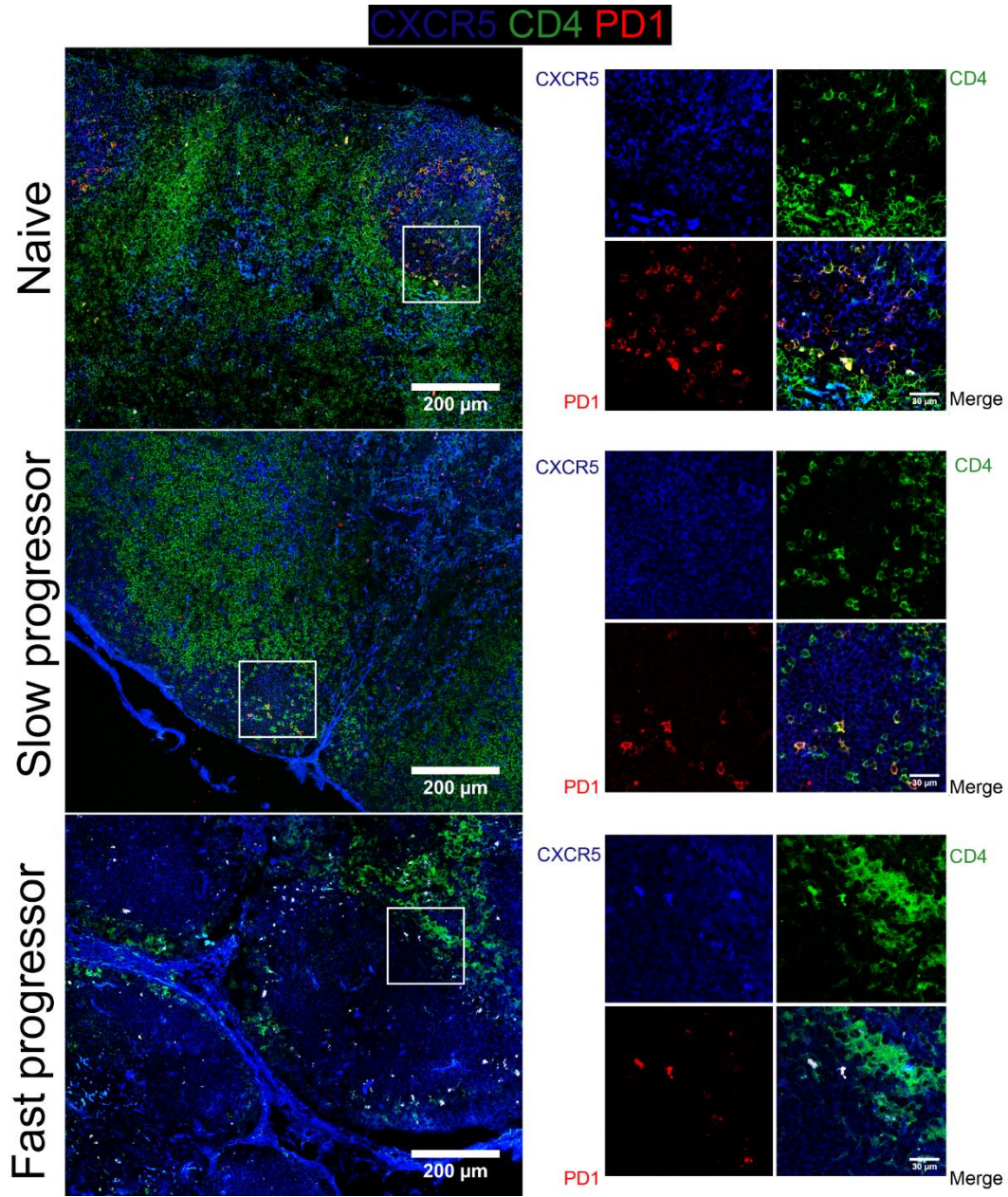
Supplemental Figure 3



Supplemental Figure 4



Supplemental Figure 5



Supplemental Figure 6

Primers and probes	Nucleotide sequence 5'-3'
SIVmac-F	GCAGAGGAGGAAATTACCCAGTAC
SIVmac-R	CAATTTTACCCAGGCATTTAATGTT
SIVmac-Probe	6FAMTGTCCACCTGCCATTAAGCCCGATAMRA
DNA-pro-Preco	CAGAGGCTCTCTGCGACCCTAC
DNA-pro-K3	GACTGAATACAGAGCGAAATGC
DNA-pro-K1	TGGAAGATGGATCCTCGCAATCC
DNA-pro-A2	GGACTAATTTCCATAGCCAGCCA
18SDNA-For	CCTCCAATGGATCCTCGTTA
18SDNA-Rev	AAACGGCTACCACATCCAAG
IL-21-For	CAAGATCGCCACATGATTAG
IL-21 Rev	TGACCACTCACAGTTTGTCTC
BCL-6 For	AGCAAGGCATTGGTGAAG
BCL-6 Rev	GCTCACAACAATGACAACATC
CXCR5 For	GACCTGTTCTTGGAAATTTGAC
CXCR5 Rev	GAGGAAGATGAGGCTGTAGG
GAPDH For	GACCTGTTCTTGGAAATTTGAC
GAPDH Rev	GAGGAAGATGAGGCTGTAGG
C-MAF For	CCCTGAGCTCCATGAAGAG
C-MAF Rev	GCTGAGAGCTTGGTGCTG

Supplemental Table S1

Antibody	Fluorochrome	Clone	Manufacturer
Flow cytometry			
α -CD62L	FITC	SK11	BD Biosciences
α -CXCR5	PE	87.1	eBiosciences
α -PD-1	PerCP-eFluor710	J105	eBiosciences
α -CD45RA	PE-Cy7	5H9	BD Biosciences
α -CD4	APC	L200	BD Biosciences
α -CD3	APC-Cy7	SP34-2	BD Biosciences
α -c-Maf	eFluor660	Sym0F1	eBiosciences
α -Bcl-6	Alexa Fluor488	K112-91	BD Biosciences
α -CD21	FITC	B-ly4	BD Biosciences
α -CD27	PE	M-T271	BD Biosciences
α -CD20	PE-Cy7	2H7	BD Biosciences
α -CD95	APC	DX2	BD Biosciences
α -KLF2	Alexa Fluor488	bs-2772R-A488	Bioss Antibodies
α -Foxo1	Alexa Fluor488	bs-2537R-A488	Bioss Antibodies
α -T-bet	eFluor660	eBio4B10	eBiosciences
α -Eomes	FITC	WD1928	eBiosciences
Tissue immunofluorescence			
α -CXCR5	Purified	710D82.1	NHP Reagent
α -CD4	AF488	OKT4	Biolegend
α -PD-1	AF647	EH12.2H7	Biolegend
α -Ki-67	Purified	MIB-1	DAKO
α -IgD	FITC	IADB6	Southern Biotech
α -CD3	PE-CF594	SP34-2	BD Biosciences
α -CD20	eFluor660	L26	eBioscience

Supplemental Table S2

CHAPITRE 4

DÉPLÉTION DES CELLULES T_{fh} ET TCD4 MÉMOIRES DANS LES GANGLIONS MÉSENTÉRIQUES DES MACAQUES INFECTÉS PAR LE VIS

Ce chapitre fait l'objet d'une publication qui sera soumise sous peu.

Déplétion des cellules T_{fh} et TCD4 mémoires dans les ganglions mésentériques des macaques infectés par le VIS

Félicien Moukambi¹, Henintsoa Rabezanahary¹, Vasco Rodrigues², Yasmina Fortier²,
Gina Racine¹, Lynda Robitaille¹, Guadalupe Andreani¹, Bernard Krust², Calayselvy
Soundaramourty², Ricardo Silvestre^{3,4}, Mireille Laforge² and Jérôme Estaquier^{1,2}

¹Centre de Recherche du CHU de Québec, Université Laval, Québec, QC. ²CNRS FR3636,
Université Paris Descartes, Paris, France.

³, Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Health Sciences, University of
Minho, Braga, Portugal;

⁴, ICVS/3B's-PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal.

Corresponding authors: Jérôme Estaquier, Université Laval, CHU de Québec, Centre de
Recherche en Infectiologie, Québec, Canada, E-mail: estaquier@yahoo.fr; Tel.: 001 418 656
4141; Fax: 001 418 654 27 43.

* These authors co-supervise this project.

4.1. Introduction

Le tractus gastro-intestinal (TGI) contient environ 60% de tous les lymphocytes du corps, y compris les lymphocytes T CD4 [1, 2] et par conséquent représente un site crucial pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) qui infecte les lymphocytes T CD4 [3, 4]. En outre, les ganglions mésentériques (Gmes) sont le site principal de l'induction de la tolérance aux bactéries commensales [5] et représente un site privilégié pour le virus [6, 7]. En tant que site inducteur, les Gmes abritent les processus d'activation et de différenciation des cellules immunitaires en différentes sous-populations mémoires. À partir de ces sites inducteurs, les cellules T CD4, T CD8 et B mémoires migrent vers le site effecteur (la lamina propria) de la muqueuse intestinale, où leur implication dans l'immunité est cruciale [8, 9]. Parmi les lymphocytes T CD4 mémoires, les cellules Tfh sont essentielles à l'activation des lymphocytes B pour la production d'anticorps spécifiques [10]. Ces cellules sont induites par l'IL-6 et l'IL-21 via l'expression de Bcl-6 et de c-Maf et de TCF1 qui contrôlent leur différenciation et leur fonction [11-13]. Récemment, nous avons montré une déplétion précoce des cellules Tfh dans la rate de macaques infectés par le VIS [14]. Bien que nombreuses études aient mis en évidence la perte préférentielle de lymphocytes T CD4 dans la lamina propria intestinale au cours de l'infection par le VIH/VIS [15, 16], on en sait moins sur la dynamique des cellules Tfh et T CD4 mémoires dans les Gmes. Par ailleurs, la cytokine IL-7 qui augmente chez les sujets infectés [17, 18] régule la prolifération et la survie des lymphocytes par Stat5 [19]. Or, Stat5 inhibe les Tfh par la suppression de Bcl-6 [20]. Ensuite, la cytokine IL-27 qui inhibe l'infection des macrophages par le VIH-1 [21], induit T-bet pour la différenciation des Th1 [22, 23]. Si Guzzo *et al* [24, 25] rapportent une baisse de l'IL-27 durant l'infection par le VIH-1, cependant He Lai *et al* [26] proposent une augmentation de cette cytokine dans le plasma. Curieusement, ces deux cytokines ont récemment été décrites comme activatrices de la différenciation des cellules Tfh [27-30]. Cependant, il reste à savoir si ces Tfh gardent leurs caractéristiques (phénotype et fonction). Dans cette étude, je montre une déplétion significative précoce des lymphocytes Tfh et T CD4 mémoires dans les Gmes des macaques rhésus infectés par le VIS. Puis, j'observe que les Tfh présentent une augmentation de l'expression de facteurs de transcription inhibiteurs KLF2, Foxo1 et T-bet, associée une commutation de phénotype vers celui de centrale mémoire et à l'expression de

CD127 (récepteur de l'IL-7). En plus, je montre que les cellules Tfh induites en présence des cytokines IL-7 et IL-27 augmentent l'expression des facteurs de transcription inhibiteurs Foxo1, T-bet et Stat5.

4.2. Résultats

Déplétion précoce des lymphocytes TCD4 dans les Gmes au cours du VIS.

Afin d'évaluer l'impact du VIS sur les lymphocytes T CD4, T CD8 et B (CD20⁺) dans les Gmes, j'ai étudié leur dynamique en pourcentage et en nombre chez les macaques rhésus infectés par le VIS. Les cellules issues des Gmes des macaques ont été marquées avec des anticorps spécifiques (anti-CD3, anti-CD4 et anti-CD20) (**Figure 1A**). J'ai constaté que le pourcentage de lymphocytes B et T CD8 augmente alors que celui des lymphocytes T CD4 diminue progressivement en phase aiguë (jour 14 et jour 30 post infection) comparé aux macaques contrôles non infectés (jour 0) (**Figure 1B**). En phase chronique ($J > 180$), les macaques infectés ont été distingués en progresseurs rapides (PR) ayant une charge virale plus élevée et une déplétion de lymphocytes T CD4 plus prononcée dans le sang comparé aux progresseurs lents (PL). En raison de la lymphopénie chez les PR, une déplétion des lymphocytes T et B est observée alors que chez les PL, les nombres des cellules sont soit similaires ou plus élevés comparés aux macaques non infectés (**Figure 1C**). Ces résultats suggèrent une déplétion précoce des lymphocytes T CD4 pendant la phase aiguë, et se poursuit en phase chronique chez les macaques PR. Ces observations soulèvent la question de la dynamique de chaque sous-population T CD4 dans les Gmes au cours de l'infection par le VIS.

Déplétion des cellules Tfh et T CD4 mémoires dans les Gmes au cours du VIS.

Ensuite, j'ai analysé la dynamique des sous-populations des lymphocytes T CD4, que j'ai définie en cellules naïves (N), centrales mémoires (CM), effectrices mémoires (EM), et terminales différenciées (TDT) selon l'expression des marqueurs de surface CD62L et CD45RA, et les cellules Tfh par l'expression de CXCR5 et PD1 (CXCR5⁺PD1⁺⁺) (**Figure 2A**). Nos résultats montrent une augmentation précoce du pourcentage de lymphocytes T CD4 naïfs à partir du jour 14 post infection (**Figure 2B**). En revanche, j'ai observé une diminution des EM et CM très tôt en phase aiguë. Une diminution qui persiste en phase chronique chez les PR. Une légère augmentation du pourcentage des TDT est également observée chez les PR. Il est intéressant de noter que les nombres de cellules Tfh et EM des PL sont similaires à ceux observés chez les RM macaques contrôles (**Figure 2C**). Par conséquent, il n'y a pas

de déplétion des cellules Tfh et EM chez les macaques PL en phase chronique, mais plutôt chez les macaques PR. Ces résultats montrent que la progression vers le SIDA est associée à la déplétion précoce des lymphocytes T CD4 effecteurs mémoires et Tfh dans les ganglions mésentériques. Cette observation soulève la question des mécanismes sous-jacents à cette déplétion.

Augmentation des facteurs de transcriptions inhibiteurs dans les Tfh, Foxo1, KLF2 et T-bet, associée à une commutation de phénotype des Tfh vers celui de centrale mémoire

Dans la mesure où il a été rapporté que les facteurs de transcriptions Foxo1, KLF2 et T-bet inhibent les Tfh (*voir revue en annexe à la page 150*), j'ai évalué l'expression de ces facteurs dans le but d'expliquer les mécanismes sous-jacents au dysfonctionnement des Tfh dans les Gmes. J'observe une augmentation progressive de l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) de Foxo1, de KLF2 et de T-bet dans les Tfh chez les macaques infectés (J14, J30 et J>180) comparés aux macaques non infectés (J0) (**Figure 3A**). Or il a été rapporté que KLF2 est associé à une expression accrue de la molécule CD62L (*voir revue en annexe à la page 150*), et qui caractérise les cellules centrales mémoires. J'ai donc étudié l'expression de ce marqueur par les Tfh en évaluant le rapport du pourcentage des Tfh effecteurs mémoires (Tfh_{EM}: CD62L⁻CD45RA⁻) et de celui des Tfh centrales mémoires (Tfh_{CM}: CD62L⁺CD45RA⁻). Mes résultats montrent une diminution de ce ratio au cours de l'infection et atteint une valeur de 0.9 dès le jour 14 post-infection. Ceci résulte suggère une commutation de phénotype des Tfh effecteur mémoire vers celui de centrale mémoire (**Figure 3B, C**).

Augmentation de CD127 (récepteur de l'IL-7) au cours de l'infection par le VIS.

La commutation de phénotype des Tfh vers celui de centrale mémoire pose la question de l'expression de CD127 (récepteur de l'IL-7). Car il a été observé que le phénotype de centrale mémoire est associé à l'expression de ce marqueur [31, 32]. Afin d'analyser l'expression de CD127 par cytométrie en flux, les cellules issues des Gmes des macaques ont été marquées avec des anticorps spécifiques, afin de définir les cellules Tfh (**Figure 4A, B**). Nos résultats montrent une augmentation significative du pourcentage de cellules Tfh exprimant CD127 dans les Gmes au cours de l'infection par le VIS comparé aux macaques contrôles non

infectés (J0) (**Figure 4C**). Ce résultat montre que malgré l'augmentation du récepteur de l'IL-7 à leur surface, il y a toutefois une déplétion des cellules Tfh. Ainsi, une étude plus approfondie de l'impact de l'IL-7 sur l'aspect extracellulaire et intracellulaire caractérisant les Tfh pourrait apporter plus de précisions.

L'IL-7 et IL-27 diminuent l'expression de CXCR5 et le nombre de cellules Tfh dans les Gmes.

Des études récentes montrant une forte induction des Tfh par les cytokines IL-7 et IL-27 [27-30]. J'ai étudié *in vitro* l'impact de ces cytokines sur le phénotype et le nombre des cellules Tfh en comparaison avec IL-6 et IL-21, qui sont les cytokines connues pour favoriser la différenciation des Tfh [11]. Les cellules issues des Gmes d'un macaque non infecté (VIS-) ont été activées avec des anticorps anti-CD28 et anti-CD3, puis stimulées pendant 4 jours avec les cytokines IL-6 + IL-21 qui induisent les Tfh, avec ou sans IL-7 ou d'IL-27. Le pourcentage et le nombre de cellules Tfh et cellules non-Tfh ont été évalués par cytométrie en flux. J'ai premièrement constaté que la combinaison des cytokines IL-6 + IL-21 augmente l'intensité moyenne de fluorescence de CXCR5 par les cellules T CD4 (**Figure 4B**). Mais l'ajout des cytokines IL-7 ou IL-27 à cette combinaison est associé à une diminution de cette moyenne d'intensité de CXCR5. En outre, IL-7 et IL-27 diminuent significativement le pourcentage et le nombre des cellules Tfh (CXCR5⁺PD1⁺⁺) induites par IL-6 et IL-21 (**Figure 4C**). Concomitant à cette perte des Tfh, les cytokines IL-7 et IL-27 augmentent significativement le pourcentage et le nombre des cellules non-Tfh (CXCR5⁻PD1⁺⁺) n'exprimant pas CXCR5 à leur surface (**Figure 4D**). Ces résultats montrent que l'IL-7 et IL-27 ne favorisent pas l'expansion des cellules Tfh, mais plutôt entraînent leur contraction. L'étude des facteurs de transcription pourrait éclaircir davantage sur les changements subis par les Tfh sous l'influence de ces cytokines.

L'IL-7 et IL-27 favorisent l'expression de facteurs de transcription inhibiteurs des Tfh.

Sachant d'une part que la cytokine IL-7 induit Stat5 qui inhibe la différenciation des cellules Tfh en supprimant Bcl-6 [33], et d'autre part que l'IL-27 induit le facteur de transcription T-bet [23] qui supprime aussi Bcl-6 [34], j'ai voulu comprendre l'impact de l'IL-7 et IL-27 dans les conditions décrites précédemment sur la capacité des cellules Tfh à exprimer les facteurs de transcription inhibiteurs comme Foxo1, KLF2, T-bet et Stat5, comparativement

aux facteurs de transcription activateurs tels que c-Maf et TCF-1 par cytométrie en flux (**Figure 6**). Cette étude a révélé que la cytokine IL-7 augmente considérablement les intensités moyennes de fluorescence des facteurs de transcriptions inhibiteurs des Tfh, Foxo1 et Stat5. Et que l'IL-27 augmente en dehors de Foxo1 et Stat5 surtout la moyenne de fluorescence de T-bet. À noter que les deux cytokines induisent une légère augmentation de c-Maf et TCF1 (**Figure 6**).

4.3. Discussion

Cette étude montre la perte précoce et progressive de la population lymphocytaire T CD4 dans les Gmes des macaques rhésus infectés par VIS. Ce résultat est en accord avec l'étude récemment menée par Liu *et al* [35], qui décrit une profonde baisse du pourcentage des cellules T CD4 et une augmentation concomitante des cellules T CD8, qui sont aussi fortement activées dans les Gmes. Cependant, leur étude décrit plutôt la variation du pourcentage seulement en phase chronique sans invoquer ce qui se passe en phase aiguë. Par contre, notre étude apporte en plus deux éléments clés, c'est-à-dire d'une part la dynamique en nombre de cellules, et d'autre part l'étude de la phase aiguë. En plus, je précise qu'il n'y a une perte des lymphocytes T CD4, CD8 et B en phase chronique chez les macaques PR seulement et non chez les PL, qui maintiennent voire augmentent leur nombre de cellules. Plusieurs groupes ont proposé une déplétion des lymphocytes T CD4 mémoires dans le site effecteur, qui est la lamina propria au cours du VIH-1 et VIS [15, 36-38]. Ainsi, notre étude montre que la lymphopénie observée dans les Gmes pourrait être une composante majeure à l'origine de l'immunodéficience dans l'intestin au cours du VIH-1 chez les individus progressant rapidement vers le SIDA. Cette perte des cellules mémoires dans les sites inducteurs pourrait résulter dans les sites effecteurs de la muqueuse intestinale par la déplétion des cellules.

Les Tfh sont essentiels à l'activation des lymphocytes B, afin que ceux-ci produisent des anticorps spécifiques. Le rôle crucial des Tfh dans le maintien de l'équilibre de la flore intestinale a été montré dans le modèle du murin, dont la déficience en AID conduisait à une expansion des bactéries anaérobies de l'intestin [39], et favorisait aussi une translocation bactérienne [40]. Récemment il a été montré qu'en stimulant la sécrétion des IgA, les Tfh ne maintiennent pas seulement l'homéostasie, mais participent aussi à la diversification de la flore intestinale [41, 42]. Ainsi, une perte de cette population signifierait un dysfonctionnement de la réponse humorale et de l'équilibre de la flore intestinale. Or, dans notre étude précédente, nous avons décrit une perte précoce des lymphocytes Tfh dans la rate des macaques infectés. Une déplétion qui persiste en phase chronique chez les PR [14]. Cette déplétion était associée à un faible titre d'anticorps spécifique anti-VIS chez ces mêmes animaux. De même, dans cette nouvelle étude, je montre une perte précoce des Tfh dans les

Gmes. Ce qui pourrait présenter une composante favorisant un déficit dans la neutralisation d'antigènes dans la muqueuse intestinale. Or, ce dysfonctionnement, combiné au manque des cellules mémoires T CD4, qui contribuent à l'immunité de la muqueuse intestinale et au maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale, pourrait favoriser une translocation bactérienne vers la circulation systémique comme proposée par plusieurs groupes [43-48].

Enfin, nos résultats ont montré que les cytokines IL-7 et IL-27 inhibent les Tfh (CXCR5⁺PD1⁺⁺) en réduisant leur expression du marqueur CXCR5, tout en augmentant leur capacité à exprimer des facteurs de transcription inhibiteurs de leur fonction tels que Stat5, T-bet et Foxo1. Le fait qu'il y ait accumulation de la population non-Tfh (CXCR5⁻PD1⁺⁺) qui n'exprime pas de CXCR5 sous l'influence de l'IL-7 et l'IL-27, porte à croire que ces deux cytokines causent la réorientation des Tfh vers un autre phénotype et probablement une autre fonction. Cela pourrait participer à la déplétion des Tfh observée *in vivo* au cours du VIS/VIH-1.

En conclusion, notre étude souligne le fait que la progression vers le SIDA soit associée à une déplétion précoce des lymphocytes Tfh, des lymphocytes mémoires T CD4, T CD8 et B dans les sites inducteurs de la réponse immune de l'intestin. Et que cela pourrait se répercuter dans les sites effecteurs par une immunodéficience favorable à une translocation bactérienne. Ainsi, toute stratégie visant à prévenir cette lymphopénie précoce dans les sites inducteurs pourrait être bénéfique pour l'intégrité de l'immunité de l'intestin contre le microbiome au cours du VIH-1/VIS.

4.4. Matériel et Méthodes

Déclaration d'éthique.

Tous les animaux ont été hébergés à l'Université Laval conformément aux règles et règlements du Conseil canadien de protection des animaux (<http://www.ccac.ca>). Ce protocole a été approuvé par le Comité de protection des animaux de l'Université Laval (numéro de projet 106004). Les animaux présentant des signes significatifs de détresse, de maladie et de perte de poids ont été évalués cliniquement et ont été humainement euthanasiés en utilisant un surdosage de barbituriques selon les directives de l'Association médicale vétérinaire.

Animaux, inoculation virale et prélèvement d'échantillons.

Dans cette étude, j'ai utilisé des Macaques rhésus (*Macaca mulatta*) d'origine indienne, séronégatifs pour SIVmac, STLV-1 (*virus T-lymphotropique simien*), SRV-1 (*rétrovirus de type D*) et le virus de l'herpès-B. Ces macaques sont les mêmes que ceux de la première publication, répertoriés dans le tableau 1 du manuscrit. Les animaux ont été infectés par le virus SIVmac251 (20 AID50) par voie intraveineuse et cinq ont été utilisés en tant que contrôles non infectés. Les animaux ont été euthanasiés à différents moments après infection couvrant la phase aiguë et chronique. Les Gmes ont été récupérés pour analyse cellulaire. Les cellules isolées après un processus mécanique ont été comptées.

Immunophénotypage.

Des suspensions cellulaires fraîches ont été préparées à partir des Gmes. Les cellules ont été marquées avec des anticorps monoclonaux. Les anticorps conjugués aux fluorochromes utilisés sont indiqués dans le tableau S1. Soixante mille événements correspondant aux cellules mononucléaires ont été enregistrés sur un FACS Canto A (BD Bioscience). Les analyses ont été effectuées en utilisant le logiciel FlowJo (Tree Star, Inc.).

Stimulation in vitro.

Les puits d'une plaque de 12 puits ont été incubés avec 0,25µl (1 µg/µl) de CD3 purifié (Abcam) et 0,25 µl (1 µg/µl) de CD28 purifié (Biolegend) dans 200 µl d'une solution tampon de Tris-HCl de concentration 0,1 M. Les plaques ont été maintenues 16 h à 4°C. Le lendemain, chaque puits a été lavé 3 fois avec 1 ml de RPMI non complet (Life Technology), avant d'ajouter 500 µl de RPMI contenant 10% FBS (Gibco ThermoFisher), 1% (0.5 mg/mL) de Penicillin-Streptomycin-Glutamine (Gibco Thermo Fisher) et 1% (1mM) de Sodium Pyruvate (Gibco Thermo Fisher). La plaque a été ensuite incubée pendant 1 heure à 37°C et 10⁶ cellules issues des Gmes ont été ajoutées dans chaque puits, incubées pendant 3 heures à 37°C avant d'ajouter une combinaison de cytokines composée d'IL-6 (100 ng), IL-21 (100 ng) IL-27 (100 ng) et IL-7 (10 ng) dans le puits correspondant, à l'exception du puits contrôle. Quatre jours plus tard, les cellules ont été comptées et marquées à l'aide d'anti-PD1-PerCP-eFluor710, CXCR5-PE, CD4-APC-H7 et CD20-PE-Cy7. Les cellules après perméabilisation ont été marquées avec des anticorps anti-Foxo1-FITC, KLF2-FITC, STAT5-FITC, T -bet-eFluor660, c-Maf-eFluor660 et TCF1-Alexa Fluor 647, et analysées par cytométrie de flux.

Analyses statistiques.

Les statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 6. Le test non paramétrique de Mann Whitney et le test de Wilcoxon ont été utilisés pour la comparaison entre les animaux naïfs et infectés à différents moments après l'infection.

4.5. Figures et légendes

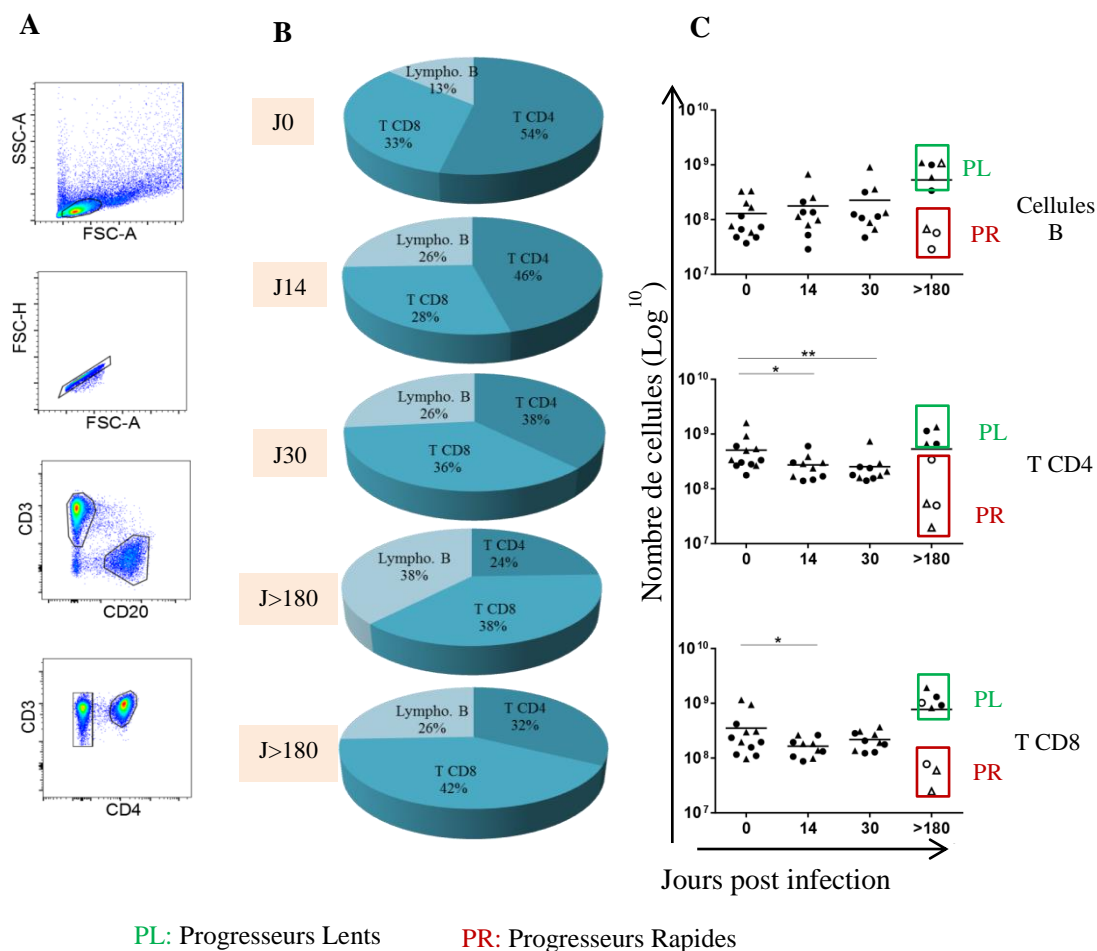


Figure 1 : Pourcentage et nombre des lymphocytes T CD4, CD8 et B dans les Gmes au cours de l'infection au VIS. (A) Stratégie d'analyse des lymphocytes. Les lymphocytes totaux sont identifiés par les paramètres FSC-A contre SSC-A. Puis les doublets sont exclus par la comparaison des paramètres FSC-A contre FSC-H. Puis les lymphocytes B et T sont identifiés par leur expression des marqueurs de surface CD20 et CD3 respectivement. Enfin, les lymphocytes T CD4 auxiliaires (CD3⁺CD4⁺) sont définis par l'expression du marqueur de surface CD4, et par exclusion, les lymphocytes T CD8 qui sont caractérisés par l'absence de l'expression de la molécule CD4 (CD3⁺CD4⁻). (B) Les diagrammes montrent les pourcentages, et (C) les nombres de chaque population lymphocytaire dans les Gmes des macaques infectés par le VIS en phase aiguë (J14 et J30) et en phase chronique (J>180) comparés aux macaques contrôles non-infectés (J0).

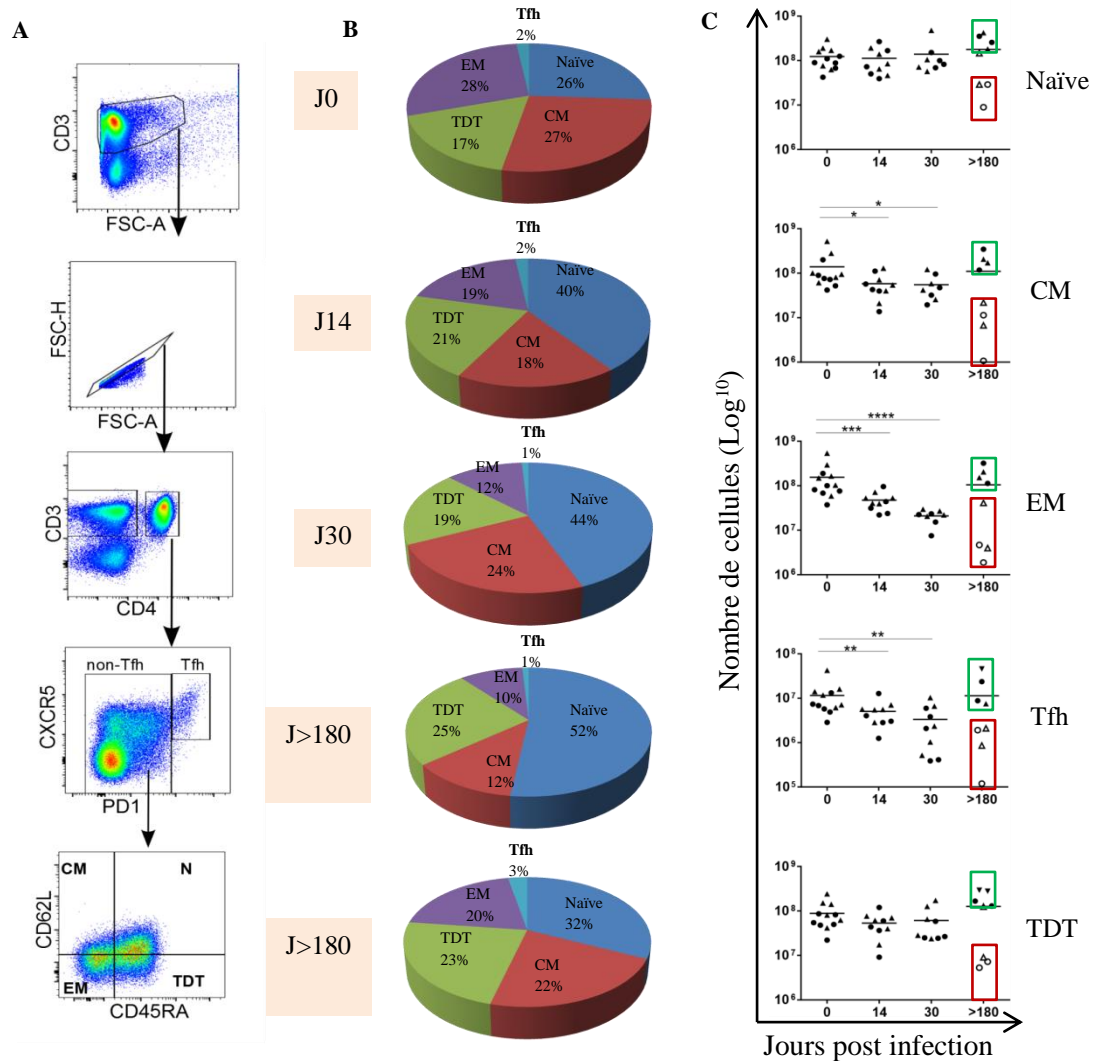


Figure 2: Dynamique des sous populations lymphocytaires T CD4 dans les Gmcs au cours de l'infection au VIS. (A) Stratégie d'analyse des sous-populations T CD4. Premièrement les lymphocytes T ont été définis selon l'expression du CD3. Ensuite les doublets ont été exclus par comparaison des paramètres FSC-H contre FCS-A. Les lymphocytes T CD4 sont analysés après identification des cellules CD3⁺CD4⁺. Les cellules Tfh (CXCR5⁺PD1⁺⁺) et les cellules non Tfh sont définies selon l'expression des marqueurs CD62L et CD45RA. Ainsi on définit les cellules naïves (N) CD62L⁺CD45RA⁺, ensuite centrales mémoires (CM) CD62L⁺CD45RA⁻, effectrices mémoires (EM) CD62L⁻CD45RA⁻ et terminales différenciées (TDT) CD62L⁻CD45RA⁺. (B) Les diagrammes montrent le pourcentage, et (C) le nombre de cellules de chaque sous-population des macaques en phase aiguë (J14 et J30) et en phase chronique (J>180) comparés aux macaques contrôles non-infectés (J0).

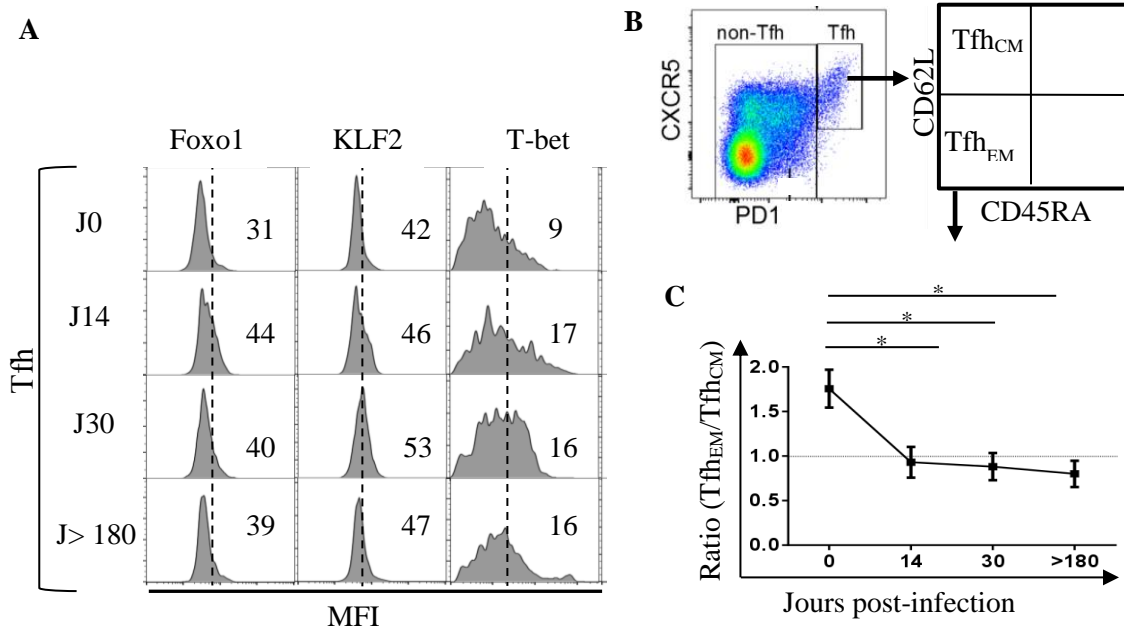


Figure 3: Expression des facteurs de transcriptions inhibiteurs des Tfh dans les Gmes au cours de l'infection au VIS. (A) Les histogrammes montrent l'intensité moyenne de fluorescence de Foxo1, KLF2 et T-bet des Tfh des macaques infectés en phase aiguë (J14 et J30) et en phase chronique (J>180) comparés aux macaques non infectés (J0). (B) Stratégie d'analyse des cellules Tfh et de leur expression des marqueurs CD62L et CD45RA dans les Gmes. (C) l'histogramme montre la dynamique du rapport du pourcentage des Tfh effecteurs mémoires (Tfh_{EM}: CD62L⁻CD45RA⁻) par le pourcentage des Tfh centrales mémoires (Tfh_{CM}: CD62L⁺CD45RA⁻) chez les macaques infectés en phase aiguë (J14 et J30) et en phase chronique (J>180) comparés aux macaques non infectés (J0).

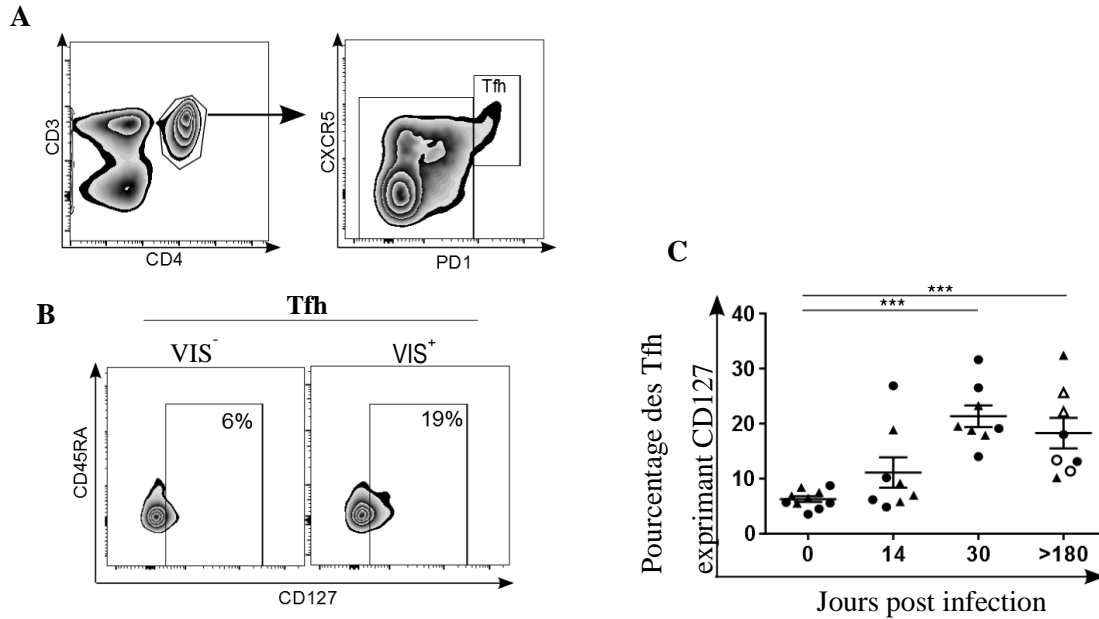


Figure 4: Expression de CD127 par les cellules Tfh dans les Gmes au cours du VIS. (A) Stratégie d'analyse des cellules Tfh parmi la population lymphocytaire T CD4, selon l'expression des marqueurs de surface CXCR5 et PD1. (B) L'expression de CD127 est analysée comparativement à l'expression de CD45RA dans les Gmes d'un macaque non infecté (VIS⁻) comparé à un macaque infecté (VIS⁺) au jour 30 post-infection. (C) L'histogramme montre le pourcentage des cellules Tfh exprimant CD127 en phase aiguë (J14 et J30) et en phase chronique (J>180) comparés aux macaques contrôles non-infectés (J0).

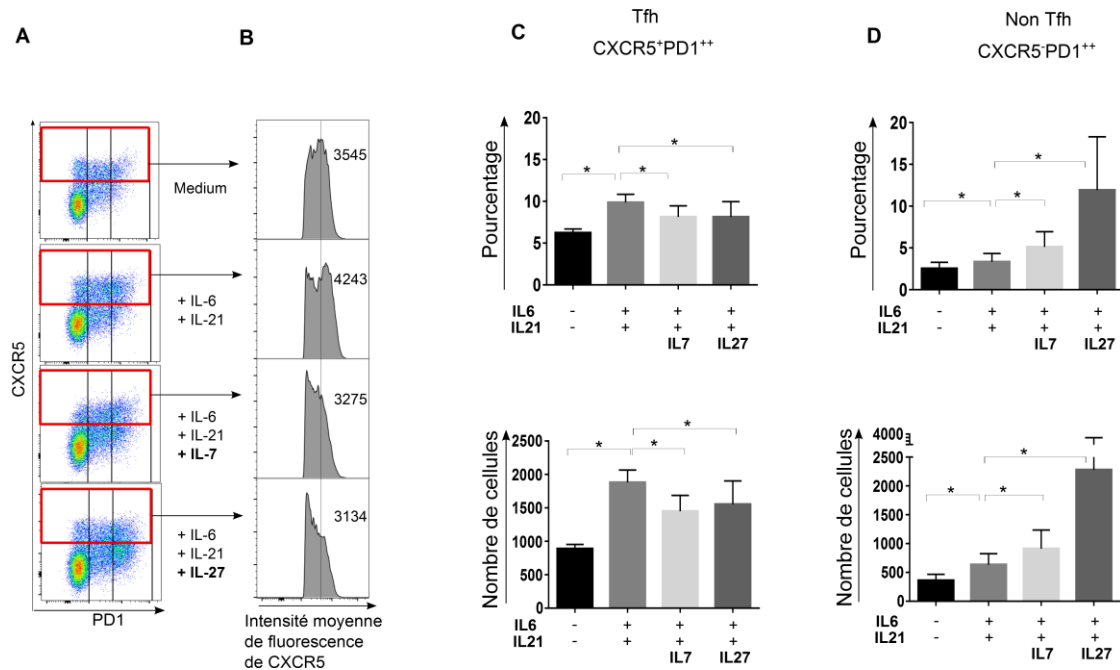


Figure 5 : Impact de l'IL-7 et de l'IL-27 sur la différenciation des Tfh dans les Gmes. (A) Stratégie d'analyse des cellules Tfh dans les Gmes d'un macaque non infecté, selon l'expression des marqueurs CXCR5 et PD1. Les cellules sont activées en présence d'anticorps CD28 (1.25ng/μl) et CD3 (1.25ng/μl). À part le contrôle (médium), les cellules ont été stimulées avec différentes combinaisons de cytokines IL-6 + IL-21, IL-6 + IL-21 + IL-7 ou IL-6 + IL-21 + IL-27. (B) Les histogrammes montrent l'intensité moyenne de fluorescence des cellules CD4 exprimant CXCR5 (cadran rouge, figure 4A) dans les différentes conditions de cultures. (C) Pourcentage et nombre des cellules Tfh (CXCR5⁺PD1⁺⁺), et (D) des cellules non-Tfh (CXCR5⁻PD1⁺⁺).

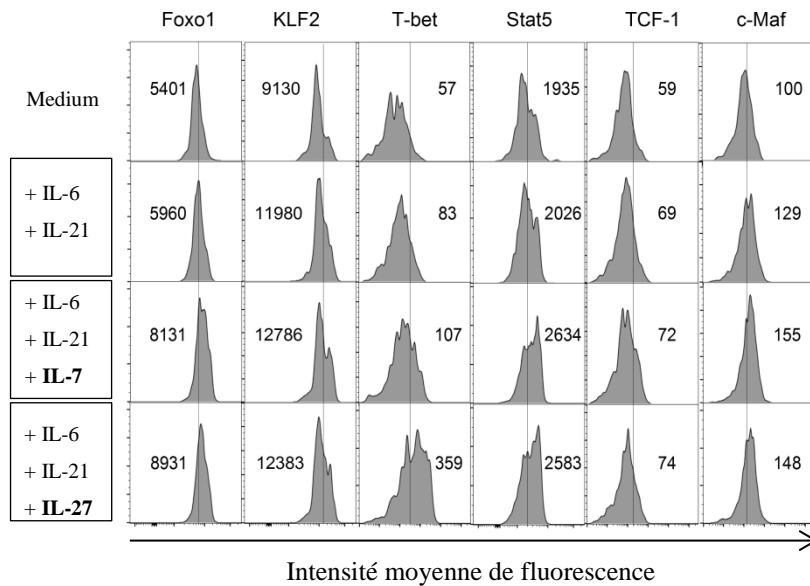


Figure 6 : Impact de l'IL-7 et de l'IL-27 sur l'expression de facteurs de transcription par les Tfh dans les Gmes. Les histogrammes montrent les intensités moyennes de fluorescence des facteurs de transcriptions Foxo1, KLF2, T-bet, Stat5, TCF1 et c-Maf dans les cellules Tfh issues des Gmes d'un macaque non infecté, après 4 jours d'activation en présence d'anticorps CD28 (0.25µg) et CD3 (0.25µg) et de stimulation en absence ou en présence de différents cocktails IL-6 + IL-21, IL-6 + IL-21 + IL-7, et IL-6 + IL-21 + IL-27, comparé aux cellules non stimulées (médium).

4.6. Bibliographie

1. Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A, et al. Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol*. 2003;77(21):11708-17. PubMed PMID: 14557656; PubMed Central PMCID: PMC229357.
2. Mowat AM, Viney JL. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev*. 1997;156:145-66. PubMed PMID: 9176706.
3. McDougal JS, Nicholson JK, Cross GD, Cort SP, Kennedy MS, Mawle AC. Binding of the human retrovirus HTLV-III/LAV/ARV/HIV to the CD4 (T4) molecule: conformation dependence, epitope mapping, antibody inhibition, and potential for idiotypic mimicry. *J Immunol*. 1986;137(9):2937-44. PubMed PMID: 2428879.
4. Sattentau QJ, Dalgleish AG, Weiss RA, Beverley PC. Epitopes of the CD4 antigen and HIV infection. *Science*. 1986;234(4780):1120-3. PubMed PMID: 2430333.
5. Macpherson AJ, Smith K. Mesenteric lymph nodes at the center of immune anatomy. *J Exp Med*. 2006;203(3):497-500. doi: 10.1084/jem.20060227. PubMed PMID: 16533891; PubMed Central PMCID: PMC2118258.
6. Cumont MC, Monceaux V, Viollet L, Lay S, Parker R, Hurtrel B, et al. TGF-beta in intestinal lymphoid organs contributes to the death of armed effector CD8 T cells and is associated with the absence of virus containment in rhesus macaques infected with the simian immunodeficiency virus. *Cell Death Differ*. 2007;14(10):1747-58. doi: 10.1038/sj.cdd.4402192. PubMed PMID: 17612589.
7. Estaquier J, Hurtrel B. [Mesenteric lymph nodes, a sanctuary for the persistence of HIV. Escape mechanisms]. *Med Sci (Paris)*. 2008;24(12):1055-60. Epub 2009/01/01. doi: 10.1051/medsci/200824121055. PubMed PMID: 19116114.
8. Macdonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*. 2005;307(5717):1920-5. doi: 10.1126/science.1106442. PubMed PMID: 15790845.
9. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(4):331-41. doi: 10.1038/nri1057. PubMed PMID: 12669023.
10. Vinuesa CG, Tangye SG, Moser B, Mackay CR. Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(11):853-65. doi: 10.1038/nri1714. PubMed PMID: 16261173.
11. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol*. 2011;29:621-63. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101400. PubMed PMID: 21314428.
12. Wu T, Shin HM, Moseman EA, Ji Y, Huang B, Harly C, et al. TCF1 Is Required for the T Follicular Helper Cell Response to Viral Infection. *Cell Rep*. 2015;12(12):2099-110. doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.049. PubMed PMID: 26365183; PubMed Central PMCID: PMC4591235.

13. Xu L, Cao Y, Xie Z, Huang Q, Bai Q, Yang X, et al. The transcription factor TCF-1 initiates the differentiation of T(FH) cells during acute viral infection. *Nat Immunol.* 2015;16(9):991-9. doi: 10.1038/ni.3229. PubMed PMID: 26214740.
14. Moukambi F, Rabezanahary H, Rodrigues V, Racine G, Robitaille L, Krust B, et al. Early Loss of Splenic Tfh Cells in SIV-Infected Rhesus Macaques. *PLoS Pathog.* 2015;11(12):e1005287. doi: 10.1371/journal.ppat.1005287. PubMed PMID: 26640894; PubMed Central PMCID: PMC4671657.
15. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med.* 2004;200(6):761-70. doi: 10.1084/jem.20041196. PubMed PMID: 15365095; PubMed Central PMCID: PMC4671657.
16. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med.* 2004;200(6):749-59. doi: 10.1084/jem.20040874. PubMed PMID: 15365096; PubMed Central PMCID: PMC4671657.
17. Napolitano LA, Burt TD, Bacchetti P, Barron Y, French AL, Kovacs A, et al. Increased circulating interleukin-7 levels in HIV-1-infected women. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005;40(5):581-4. PubMed PMID: 16284535; PubMed Central PMCID: PMC4671657.
18. Boulassel MR, Young M, Routy JP, Sekaly RP, Tremblay C, Rouleau D. Circulating levels of IL-7 but not IL-15, IGF-1, and TGF-beta are elevated during primary HIV-1 infection. *HIV Clin Trials.* 2004;5(5):357-9. doi: 10.1310/MOCV-R6BX-A9DP-JJV0. PubMed PMID: 15562373.
19. Drake A, Kaur M, Iliopoulou BP, Phennicie R, Hanson A, Chen J. Interleukins 7 and 15 Maintain Human T Cell Proliferative Capacity through STAT5 Signaling. *PLoS One.* 2016;11(11):e0166280. doi: 10.1371/journal.pone.0166280. PubMed PMID: 27855183; PubMed Central PMCID: PMC4671657.
20. Johnston RJ, Choi YS, Diamond JA, Yang JA, Crotty S. STAT5 is a potent negative regulator of TFH cell differentiation. *J Exp Med.* 2012;209(2):243-50. doi: 10.1084/jem.20111174. PubMed PMID: 22271576; PubMed Central PMCID: PMC4671657.
21. Dai L, Lidie KB, Chen Q, Adelsberger JW, Zheng X, Huang D, et al. IL-27 inhibits HIV-1 infection in human macrophages by down-regulating host factor SPTBN1 during monocyte to macrophage differentiation. *J Exp Med.* 2013;210(3):517-34. Epub 2013/03/06. doi: 10.1084/jem.20120572. PubMed PMID: 23460728; PubMed Central PMCID: PMC4671657.
22. Takeda A, Hamano S, Yamanaka A, Hanada T, Ishibashi T, Mak TW, et al. Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *J Immunol.* 2003;170(10):4886-90. Epub 2003/05/08. PubMed PMID: 12734330.
23. Kamiya S, Owaki T, Morishima N, Fukai F, Mizuguchi J, Yoshimoto T. An indispensable role for STAT1 in IL-27-induced T-bet expression but not proliferation of naive CD4+ T cells. *J Immunol.* 2004;173(6):3871-7. Epub 2004/09/10. PubMed PMID: 15356135.

24. Guzzo C, Hopman WM, Che Mat NF, Wobeser W, Gee K. Impact of HIV infection, highly active antiretroviral therapy, and hepatitis C coinfection on serum interleukin-27. *AIDS*. 2010;24(9):1371-4. Epub 2010/04/09. doi: 10.1097/QAD.0b013e3283391d2b. PubMed PMID: 20375875.
25. Guzzo C, Hopman WM, Che Mat NF, Wobeser W, Gee K. IL-27-induced gene expression is downregulated in HIV-infected subjects. *PLoS One*. 2012;7(9):e45706. Epub 2012/10/11. doi: 10.1371/journal.pone.0045706. PubMed PMID: 23049843; PubMed Central PMCID: PMC3458084.
26. He L, Zhao J, Wang MH, Siu KK, Gan YX, Chen L, et al. Interleukin-27 is differentially associated with HIV viral load and CD4+ T cell counts in therapy-naive HIV-mono-infected and HIV/HCV-co-infected Chinese. *PLoS One*. 2014;9(5):e96792. Epub 2014/05/13. doi: 10.1371/journal.pone.0096792. PubMed PMID: 24816922; PubMed Central PMCID: PMC34016030.
27. Seo YB, Im SJ, Namkoong H, Kim SW, Choi YW, Kang MC, et al. Crucial roles of interleukin-7 in the development of T follicular helper cells and in the induction of humoral immunity. *J Virol*. 2014;88(16):8998-9009. doi: 10.1128/JVI.00534-14. PubMed PMID: 24899182; PubMed Central PMCID: PMC34136280.
28. Li Y, Zhou M, Luo Z, Zhang Y, Cui M, Chen H, et al. Overexpression of Interleukin-7 Extends the Humoral Immune Response Induced by Rabies Vaccination. *J Virol*. 2017;91(7). doi: 10.1128/JVI.02324-16. PubMed PMID: 28100620.
29. Batten M, Ramamoorthi N, Kljavin NM, Ma CS, Cox JH, Dengler HS, et al. IL-27 supports germinal center function by enhancing IL-21 production and the function of T follicular helper cells. *J Exp Med*. 2010;207(13):2895-906. doi: 10.1084/jem.20100064. PubMed PMID: 21098093; PubMed Central PMCID: PMC3005229.
30. Gringhuis SI, Kaptein TM, Wevers BA, van der Vlist M, Klaver EJ, van Die I, et al. Fucose-based PAMPs prime dendritic cells for follicular T helper cell polarization via DC-SIGN-dependent IL-27 production. *Nat Commun*. 2014;5:5074. doi: 10.1038/ncomms6074. PubMed PMID: 25278262.
31. Colpitts SL, Dalton NM, Scott P. IL-7 receptor expression provides the potential for long-term survival of both CD62L^{high} central memory T cells and Th1 effector cells during *Leishmania* major infection. *J Immunol*. 2009;182(9):5702-11. Epub 2009/04/22. doi: 10.4049/jimmunol.0803450. PubMed PMID: 19380817; PubMed Central PMCID: PMC2754146.
32. Huster KM, Busch V, Schiemann M, Linkemann K, Kerksiek KM, Wagner H, et al. Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8+ memory T cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(15):5610-5. Epub 2004/03/27. doi: 10.1073/pnas.0308054101. PubMed PMID: 15044705; PubMed Central PMCID: PMC397444.
33. McDonald PW, Read KA, Baker CE, Anderson AE, Powell MD, Ballesteros-Tato A, et al. IL-7 signalling represses Bcl-6 and the TFH gene program. *Nat Commun*. 2016;7:10285. doi: 10.1038/ncomms10285. PubMed PMID: 26743592; PubMed Central PMCID: PMC4729877.

34. Nakayamada S, Kanno Y, Takahashi H, Jankovic D, Lu KT, Johnson TA, et al. Early Th1 cell differentiation is marked by a Tfh cell-like transition. *Immunity*. 2011;35(6):919-31. Epub 2011/12/27. doi: 10.1016/j.immuni.2011.11.012. PubMed PMID: 22195747; PubMed Central PMCID: PMC3244883.
35. Liu J, Xiao Q, Zhou R, Wang Y, Xian Q, Ma T, et al. Comparative Analysis of Immune Activation Markers of CD8+ T Cells in Lymph Nodes of Different Origins in SIV-Infected Chinese Rhesus Macaques. *Front Immunol*. 2016;7:371. doi: 10.3389/fimmu.2016.00371. PubMed PMID: 27708644; PubMed Central PMCID: PMC5030343.
36. Smit-McBride Z, Mattapallil JJ, McChesney M, Ferrick D, Dandekar S. Gastrointestinal T lymphocytes retain high potential for cytokine responses but have severe CD4(+) T-cell depletion at all stages of simian immunodeficiency virus infection compared to peripheral lymphocytes. *J Virol*. 1998;72(8):6646-56. PubMed PMID: 9658111; PubMed Central PMCID: PMC109855.
37. Kewenig S, Schneider T, Hohloch K, Lampe-Dreyer K, Ullrich R, Stolte N, et al. Rapid mucosal CD4(+) T-cell depletion and enteropathy in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *Gastroenterology*. 1999;116(5):1115-23. PubMed PMID: 10220503.
38. Lapenta C, Boirivant M, Marini M, Santini SM, Logozzi M, Viora M, et al. Human intestinal lamina propria lymphocytes are naturally permissive to HIV-1 infection. *Eur J Immunol*. 1999;29(4):1202-8. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199904)29:04<1202::AID-IMMU1202>3.0.CO;2-O. PubMed PMID: 10229087.
39. Fagarasan S, Muramatsu M, Suzuki K, Nagaoka H, Hiai H, Honjo T. Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. *Science*. 2002;298(5597):1424-7. Epub 2002/11/16. doi: 10.1126/science.1077336. PubMed PMID: 12434060.
40. Wei M, Shinkura R, Doi Y, Maruya M, Fagarasan S, Honjo T. Mice carrying a knock-in mutation of Aicda resulting in a defect in somatic hypermutation have impaired gut homeostasis and compromised mucosal defense. *Nat Immunol*. 2011;12(3):264-70. Epub 2011/01/25. doi: 10.1038/ni.1991. PubMed PMID: 21258321.
41. Perruzza L, Gargari G, Proietti M, Fosso B, D'Erchia AM, Faliti CE, et al. T Follicular Helper Cells Promote a Beneficial Gut Ecosystem for Host Metabolic Homeostasis by Sensing Microbiota-Derived Extracellular ATP. *Cell Rep*. 2017;18(11):2566-75. Epub 2017/03/16. doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.061. PubMed PMID: 28297661; PubMed Central PMCID: PMC5368345.
42. Mantis NJ, Rol N, Corthesy B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol*. 2011;4(6):603-11. Epub 2011/10/07. doi: 10.1038/mi.2011.41. PubMed PMID: 21975936; PubMed Central PMCID: PMC3774538.
43. Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, Shimomura Y, Andoh A, Bhan AK, et al. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest*. 2008;118(2):534-44. doi: 10.1172/JCI33194. PubMed PMID: 18172556; PubMed Central PMCID: PMC2157567.

44. Reynolds JM, Martinez GJ, Nallaparaju KC, Chang SH, Wang YH, Dong C. Cutting edge: regulation of intestinal inflammation and barrier function by IL-17C. *J Immunol.* 2012;189(9):4226-30. doi: 10.4049/jimmunol.1103014. PubMed PMID: 23024280; PubMed Central PMCID: PMC3478486.
45. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol.* 2007;8(6):639-46. doi: 10.1038/ni1467. PubMed PMID: 17486092.
46. Sonnenberg GF, Fouser LA, Artis D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat Immunol.* 2011;12(5):383-90. doi: 10.1038/ni.2025. PubMed PMID: 21502992.
47. Fernandes SM, Pires AR, Ferreira C, Foxall RB, Rino J, Santos C, et al. Enteric mucosa integrity in the presence of a preserved innate interleukin 22 compartment in HIV type 1-treated individuals. *J Infect Dis.* 2014;210(4):630-40. doi: 10.1093/infdis/jiu126. PubMed PMID: 24604817.
48. Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, Hu Y, Sa SM, Gong Q, et al. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med.* 2008;14(3):282-9. doi: 10.1038/nm1720. PubMed PMID: 18264109.

Antibody	Fluorochrome	Clone	Manufacturer
Flow cytometry			
α -CD62L	FITC	SK11	BD Biosciences
α -CXCR5	PE	87.1	eBiosciences
α -CXCR5	PE	MU5UBEE	eBiosciences
α -PD-1	PerCP-eFluor710	J105	eBiosciences
α -CD45RA	PE-Cy7	5H9	BD Biosciences
α -CD4	APC	L200	BD Biosciences
α -CD4	APC-H7	L200	BD Biosciences
α -CD3	APC-Cy7	SP34-2	BD Biosciences
α -c-Maf	eFluor660	Sym0F1	eBiosciences
α -CD21	FITC	B-ly4	BD Biosciences
α -CD27	PE	M-T271	BD Biosciences
α -CD20	PE-Cy7	2H7	BD Biosciences
α -KLF2	Alexa Fluor488	bs-2772R-A488	Bioss Antibodies
α -Foxo1	Alexa Fluor488	bs-2537R-A488	Bioss Antibodies
α -T-bet	eFluor660	eBio4B10	eBiosciences
α -Eomes	FITC	WD1928	eBiosciences
α -Phospho-Stat5	Alexa Fluor 488	C71E5	Cell Signaling
α -TCF1	Alexa Fluor 647	C63D9	Cell Signaling
CD3	-	FN-18	Abcam
CD28	-	CD28.2	Biolegend

Figure S1 : Anticorps utilisés pour les analyses de cytométrie et la stimulation *in vitro*.

CHAPITRE 5

5.1. Discussion générale

Les cellules Tfh sont indispensables à l'activation des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes secondaires. Les conséquences de cette activation sont la prolifération et la différenciation des lymphocytes B en cellules mémoires et plasmocytes, responsables de la production d'anticorps de haute affinité et spécifique aux antigènes des organismes pathogènes. Depuis sa découverte dans les années 2000 [166,236], la population Tfh a fait l'objet d'investigations dans le contexte du VIH-1, soit directement chez des sujets humains, ou sur le modèle du macaque rhésus infecté par le VIS. Ces études se sont principalement basées sur la dynamique des cellules Tfh dans les ganglions périphériques et le sang durant la phase chronique [218,224,237,238]. Toutefois, au début de ma thèse aucune donnée ne concernait la rate, l'organe majeur de la réponse humorale, ainsi que les Gmes, site clé de la réponse immune dans l'intestin.

Mes travaux ont montré que le pourcentage de cellules Tfh est plus élevé dans la rate comparée aux ganglions périphériques et mésentériques (**Figure 16**). Ceci confirme le rôle de cet organe comme étant le siège de la réponse humorale. Certains groupes ont proposé l'étude des GCTfh dans le sang périphérique comme alternative, vu la difficulté d'étudier les organes profonds chez l'homme [198,199,239]. Nos résultats montrent qu'il est encore plus difficile d'étudier cette population dans le sang, car les Tfh ayant les caractéristiques CXC5⁺PD1⁺⁺ ne représentent qu'environ 0.5% de la population totale des cellules T CD4 dans le sang (**Figure 18**). Notre analyse de cette population dans la rate révèle pour la première fois une déplétion précoce en phase aiguë de l'infection par le VIS. Pour certains macaques, cette déplétion a débuté dès le quatrième jour post-infection, bien avant que la charge virale ne soit détectable dans le plasma. Ainsi, ce résultat fait état d'un dysfonctionnement précoce du système immunitaire.

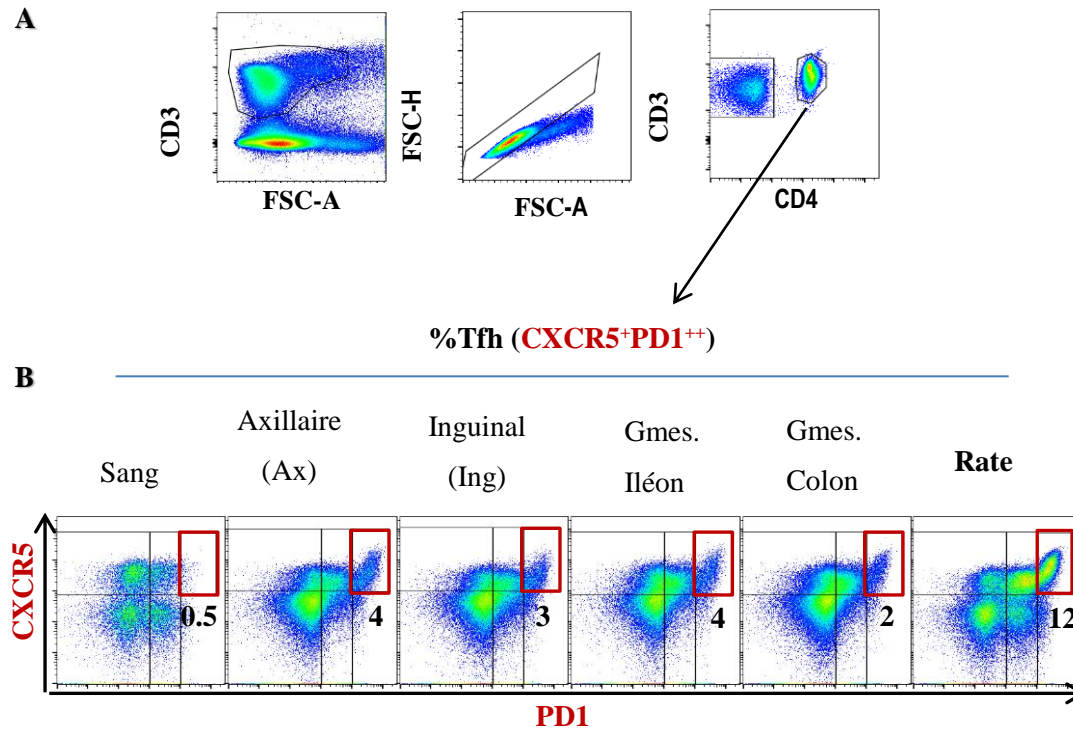


Figure 18: Pourcentages des Tfh dans les organes lymphoïdes secondaires et le sang

Cela apporte plus de lumière par rapport à l'un des mécanismes clés liés au déficit de la production d'anticorps neutralisants dans le contexte du VIH-1/VIS, puisque j'observe aussi la déplétion concomitante précoce des lymphocytes B mémoires. Cela pourrait être un élément déterminant qui favoriserait l'évolution vers la phase chronique et le SIDA. Récemment, il a été proposé une expansion en pourcentage des cellules Tfh dans la rate des patients infectés par le VIH-1 en phase chronique [240]. Cependant, cette étude n'apporte pas plus d'informations sur la phase aiguë de ces patients, ni s'ils sont progressseurs lents (PL) ou rapides (PR). Notre étude apporte plus de précisions sur l'expansion en pourcentage et le nombre des cellules Tfh en phase chronique qui ne sont observables que chez les sujets progressseurs lents. Alors qu'une déplétion persistante de ces cellules caractérise les progressseurs rapides. Nos études ont été depuis confirmées par plusieurs groupes dont ceux de Xu. H *et al* [220], qui note aussi une déplétion des Tfh dans les ganglions des macaques plus sensibles associée à une progression vers le SIDA. L'étude des anticorps spécifiques anti-VIS a aussi montré que les macaques, dont la déplétion des Tfh est plus sévère sont aussi ceux qui présentent moins d'anticorps spécifiques anti-VIS dans leurs sera. En plus, notre

étude a révélé une infection des Tfh dans la rate dès la phase aiguë, et que les Tfh des PL contiennent plus d'ADN viral que les Tfh des PR. Ceci indique que cette sous-population pourrait être un sanctuaire du virus.

En outre, il a été proposé que les Tfh serviraient de cibles majeures pour l'infection, ainsi que la réplication et la production du VIH-1 [223,241]. Mais ce qui semble être paradoxale est le fait que ce sont les macaques qui progressent le plus lentement vers un Sida, chez qui les cellules Tfh contiennent le plus d'ADN viral, sont aussi ceux qui présentent une meilleure différenciation de lymphocytes B, ainsi qu'une production importante d'IgG anti-VIS comparés aux singes progressifs rapides. Cela suggérerait que l'infection des Tfh n'affecterait pas directement la fonction de ces cellules.

En outre, j'ai observé que l'expression des facteurs de transcription inhibiteurs Foxo1, KLF2 et T-bet augmentent dans les Tfh, comme discuté dans la revue (*voir Annexe, page 150*). Ce qui pourrait avoir un impact sur leur fonction. Le fait intéressant est que Cubas *et al* [221] ait proposé que des Tfh issues des ganglions périphériques des patients humains infectés par le VIH-1, perdent leur capacité à activer les lymphocytes B pour la production d'anticorps. L'auteur a montré ensuite que l'ajout de la cytokine IL-21 est capable d'inverser ce dysfonctionnement des Tfh. Par conséquent, améliorer la réponse humorale contre le VIH-1, nécessiterait d'intervenir très tôt et de manière spécifique sur les Tfh, afin de non seulement empêcher leur déplétion, mais aussi de maintenir leur fonction pour une réponse humorale optimale.

La muqueuse intestinale est un compartiment critique qui nécessite en permanence un système immunitaire efficace. Ainsi, une immunodéficiences dans ce compartiment engendrerait une translocation bactérienne [242-247]. J'ai étudié les Gmes, les sites inducteurs de la réponse immune de l'intestin. Nous observons comme pour la rate une perte précoce des cellules Tfh et une déplétion associée à la progression rapide vers le SIDA. Or le rôle important des Tfh dans l'équilibre de la flore intestinale a été récemment montré dans le modèle du murin. En effet, cette étude indique que la déficience en enzyme AID qui est induite par les Tfh, conduirait à une expansion des bactéries anaérobies de l'intestin [248]. Ce qui favoriserait aussi une translocation bactérienne. En plus, par leur implication dans la

sécrétion des IgA, les Tfh participent à maintenir l'homéostasie et la diversification de la flore intestinale [249,250]. Avec la perte des Tfh chez les PR, cela pourrait être un facteur crucial dans le déséquilibre de la flore intestinale de ces singes pouvant conduire à une exacerbation de la pathogenèse. Cela irait dans le même sens que les études montrant un lien entre la progression vers le SIDA et des modifications dans l'homéostasie de la flore intestinale [251,252]. De plus, comme les cellules Tfh sont spécialisées dans la production d'IL-21 [253,254], cette cytokine pourrait avoir un impact sur l'homéostasie des autres cellules immunitaires telles que les Th17 [255].

En dehors de leur déplétion, mes travaux montrent que les Tfh présentent une expression accrue des facteurs de transcription inhibiteurs comme Foxo1, KLF2 et T-bet. Ce profil s'apparente à celui des lymphocytes Th1. Velu *et al* [256] ont également observé une expansion de Tfh ressemblant aux Th1 en phase chronique de l'infection des macaques par le VIS [256]. Or, nos résultats ont montré que les cytokines IL-7 et IL-27 inhibent les Tfh (CXCR5⁺PD1⁺⁺) en réduisant leur expression du marqueur CXCR5, tout en augmentant leur capacité à exprimer des facteurs de transcription inhibiteurs. Le fait qu'il y ait accumulation de la population non-Tfh (CXCR5⁻PD1⁺⁺) qui n'exprime pas de CXCR5 sous l'influence de l'IL-7 et l'IL-27, porte à croire que ces deux cytokines causent la réorientation des Tfh vers un autre phénotype et probablement une autre fonction. Cela pourrait participer à la déplétion des Tfh observée *in vivo* au cours du VIS/VIH-1. Vu qu'il a été proposé une déplétion préférentielle des cellules T CD4 mémoires par apoptose dans le sang, les tissus [131,152,156,157,257-266], et dans la lamina propria de la muqueuse intestinale en phase aiguë de l'infection par le VIS et le VIH-1 [110,267-269], notre étude apporte de nouvelles précisions puisque je propose que cette perte des cellules TCD4 mémoires se situerait en amont, à savoir les sites inducteurs, dont les Gmes et contribuerait à l'immunodéficience dans les sites effecteurs de la muqueuse intestinale.

Hormis le dysfonctionnement du système immunitaire, nos études montrent aussi que la progression vers le SIDA est associée à une déstructuration des organes lymphoïdes secondaires. En accord avec la déplétion des cellules Tfh, cette destruction de l'architecture de la rate et des ganglions a été observée chez les PR. Ce résultat suggérerait des modifications au niveau de la matrice extracellulaire, qui est indispensable au déplacement

des cellules immunitaires [102]. Ce déficit environnemental pourrait aussi jouer un rôle néfaste dans les interactions cellule-cellule du système immunitaire et ainsi contribuer à la gravité de la pathogenèse de ces macaques PR. Ceci nous permet de mieux comprendre l'impact du VIH-1 sur l'organisme en particulier sur l'environnement des cellules immunitaires nécessaire à leur interaction et à leur déplacement. À cet effet, les stratégies d'élaboration de nouvelles thérapies contre le VIH-1 devraient prendre en compte tous ces facteurs pour une meilleure efficacité.

5.2. Conclusion générale

Au cours de mon doctorat, j'ai montré que la progression vers le SIDA est associée à une déplétion des lymphocytes Tfh et TCD4 mémoires dans la rate et les Gmes de l'intestin. Je montre également une destruction de l'architecture des organes lymphoïdes secondaires. Par conséquent, je propose que l'immunodéficience dans les sites effecteurs tels que la muqueuse intestinale puisse être la résultante de la perte des cellules dans les sites inducteurs de la réponse immune, comme les Gmes et la rate. À cet effet, l'amélioration de la réponse immune au cours de l'infection par le VIH-1 serait plus efficace par le développement de stratégies pouvant empêcher la déplétion précoce des Tfh et mémoires TCD4. Aussi, le maintien de l'intégrité de l'architecture des organes lymphoïdes serait une composante bénéfique, qui pourrait aider à maintenir une réponse immunitaire contre le VIH-1. Enfin, la rate est l'organe lymphoïde secondaire qui contient le plus de cellules Tfh (**Figure 18**) ce qui confirme son rôle principal dans la réponse humorale.

Cependant, les limites de mon modèle d'étude sont d'une part que j'ai utilisé le macaque rhésus originaire d'Inde et d'autre part que j'ai réalisé cette étude comparative des différents organes chez des macaques sacrifiés à différents jours post-infection. Ainsi, le macaque d'origine indienne est plus sensible à la pathogenèse du VIS comparé au modèle du macaque rhésus d'origine chinoise (*figure 8, page 20*). La pathogenèse du macaque chinois se rapproche à celle de patients infectés par le VIH. Ainsi, pour des études vaccinales, il serait avantageux d'utiliser le macaque chinois, afin d'avoir des conclusions plus proches de l'humain. De plus, cette analyse n'a pas permis une étude longitudinale des paramètres chez un même individu au niveau des organes. Ceci est assez logique dans la mesure où, il est nécessaire d'analyser des organes comme la rate ou les ganglions mésentériques, qui sont impossibles d'accès sans sacrifier les individus. Ainsi, il n'existe pas d'autre choix que de prélever ces organes après sacrifice de chaque animal et de les comparer à ceux des autres animaux sacrifiés à d'autres temps post-infection.

5.3. Perspectives

Études avec le modèle à VIS non pathogène :

Afin d'approfondir la compréhension et l'implication des cellules Tfh dans la réponse anti-VIH-1, il est nécessaire d'étudier ces questions abordées au cours de mon doctorat à travers l'analyse du modèle du singe à VIS non pathogène, à savoir le singe vert d'Afrique (AGM), dans la mesure où celui-ci ne présente pas de déplétion des cellules mémoires et ne développe pas le SIDA [235]. Ainsi, il serait intéressant de répondre aux questions suivantes :

- *Y a-t-il déplétion, maintien, ou augmentation du pourcentage et du nombre des cellules Tfh en phase aigüe dans la rate et les ganglions mésentériques de l'intestin ?*
- *Qu'en est-il de la dynamique des lymphocytes B mémoires ?*
- *Le profil d'expression des facteurs de transcription des cellules Tfh demeure-t-il intact ?*

Les réponses à ces questions nous fourniraient de précieux indices sur les stratégies thérapeutiques et vaccinales contre le VIH-1 basées sur l'imitation des mécanismes de résistance au VIS. Ceci est d'autant plus important qu'il a été observé qu'en dépit d'une répllication virale soutenue, les AGMs ne présentent ni déplétion significative des lymphocytes T CD4, ni d'activation du système immunitaire [131], probablement due à une réponse précoce anti-inflammatoire [270], comparés aux macaques indiens et chinois. En plus, les AGMs infectés par le VIS présentent une meilleure activation des GCs au niveau des ganglions périphériques comparés aux macaques indiens et chinois [131] (**Figure 19**). Une bonne activation des GC suggère une meilleure réponse des lymphocytes B et donc des cellules Tfh, ce qui pourrait contribuer à une meilleure immunité. D'autres données ont suggéré chez les AGMs l'absence de la transmission postnatale du virus de la mère à l'enfant via le lait maternel, ainsi que l'absence du dysfonctionnement des lymphocytes B, comme cela est le cas chez l'homme ou chez le macaque rhésus. Ce maintien de la fonction des lymphocytes B se traduit par une grande quantité d'anticorps neutralisants anti-gp120 contre VIS dans le lait maternel et le plasma des AGMs femelles [271].

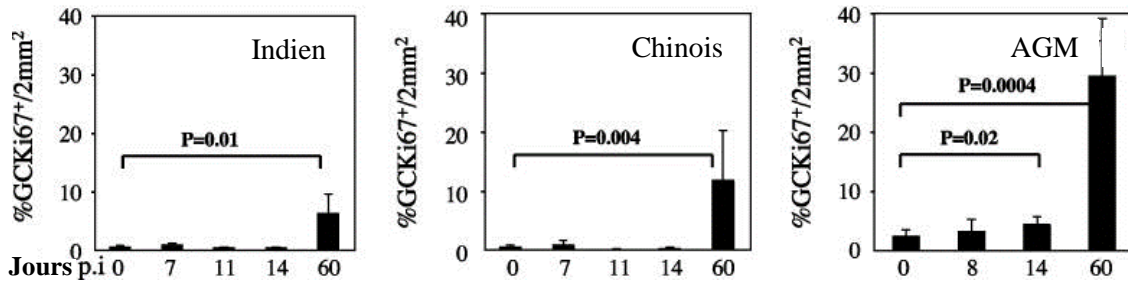


Figure 19: Activation des centres germinatifs (GC) dans les ganglions des macaques indien, chinois et singe vert d'Afrique (AGM) infectés par le VIS

Adapté de [131]

En plus, celles-ci produisent des anticorps neutralisants de type IgA dans les muqueuses et de type IgG anti-gp120, comparés aux macaques rhésus qui sécrètent plutôt des anticorps IgG anti-gp140 [272]. Ceci pourrait aussi suggérer une meilleure capacité de neutralisation via les régions V1, V2 et V3 de la gp120 chez les AGM. Ainsi, mon hypothèse est qu'il existe une stabilité du pourcentage et du nombre de cellules Tfh chez les AGMs.

Tfh sous ART

Afin de comprendre les effets de la tri-thérapie anti-rétrovirale sur les Tfh, il serait intéressant d'étudier leur dynamique durant le traitement initié précocement après l'infection. Cette étude pourrait apporter des réponses à la question de savoir si une thérapie initiée précocement peut maintenir l'homéostasie des Tfh comparée à une thérapie tardive.

Puisque mes résultats montrent une déplétion précoce des lymphocytes GCTfh et mémoires T CD4, une thérapie tardive ne saurait restaurer ce déficit. Ceci a d'ailleurs été récemment suggéré dans une étude chez des enfants infectés par le VIH-1 sous ART. Ainsi, ces enfants présentent une diminution de la fréquence des pTfh dans le sang, ainsi que des anomalies dans la sécrétion d'IL-4, et de la molécule costimulatrice ICOS [273]. Par conséquent, une thérapie précoce devrait maintenir les cellules GCTfh dans les organes lymphoïdes secondaires et des pTfh dans le sang. Ceci pourrait induire une réponse efficace des lymphocytes B dans la production d'anticorps anti-VIS.

Une autre alternative serait de combiner cette thérapie antirétrovirale précoce à l'administration de la cytokine IL-21, puisque celle-ci est impliquée dans la différenciation

des Tfh. En effet, une étude récente a montré que l'administration de l'IL-21 exogène combinée à la thérapie antirétrovirale initiée 60 jours post-infection chez des macaques rhésus indiens, permettait de réduire davantage l'inflammation et l'activation immunitaire résiduelle, ainsi qu'une meilleure restauration des Th17 et Th22 dans le compartiment intestinal [274]. Toutefois, l'administration précoce d'une thérapie précoce devrait accroître les bénéfices de la ART combinée à l'IL-21.

Études de candidats de vaccins pouvant induire une meilleure réponse des Tfh et lymphocytes B

Ainsi, des stratégies vaccinales ciblant une meilleure réponse fonctionnelle des Tfh et lymphocytes B dans la rate et les ganglions mésentériques pourraient apporter plus de lumière aux stratégies vaccinales actuelles. En effet, une étude a permis d'évaluer cette réponse des Tfh et lymphocytes B dans les ganglions périphériques par l'utilisation d'un vecteur à base d'adénovirus 5 exprimant Env, Rev, Gag et Nef du VIS. Les résultats de cette étude mettent en exergue une augmentation des Tfh et lymphocytes B spécifiques anti-VIS chez les macaques immunisés [213]. Une autre étude, dans laquelle les macaques avaient été immunisés à l'aide du virus Ankara modifié exprimant les gènes Gag, Pol, Env, Tat et Rev du VIS, suivit d'un rappel constitué des protéines gp140, a montré une accumulation des cellules exprimant les molécules CXCR5⁺CXCR3⁺ dans les ganglions périphériques ; ceci est associé à une production d'anticorps spécifiques plus soutenue et ayant une bonne avidité et un caractère neutralisant [239]. Cependant, cette étude montre que cette population cellulaire exprime également CCR5, le corécepteur du VIH et VIS, et donc pourrait prédisposer les individus immunisés à une virémie plus forte.

En somme, ces études vaccinales ont analysé majoritairement la réponse des Tfh et lymphocytes B dans les ganglions périphériques et le sang. Par conséquent, je propose d'étudier ces réponses dans la rate et les ganglions mésentériques, deux sites majeurs de la réponse immunologique. Mes travaux montrent qu'il y a une plus forte corrélation entre le nombre des Tfh de la rate et la quantité d'anticorps IgG spécifiques anti-VIS comparativement à ceux des ganglions périphériques.

Comme stratégie vaccinale, je proposerais une immunisation à l'aide de nanoparticules lipidiques contenant des antigènes du VIS, accompagné de l'adjuvant MPLA (*monophosphoryl lipid A*), un activateur du TLR4, dans le modèle du macaque rhésus. En effet, cette stratégie a déjà été utilisée dans le contexte de la malaria, et il a été mis en évidence une expansion des Tfh spécifiques aux antigènes de la malaria dans les ganglions périphériques, ainsi qu'une production d'anticorps spécifiques sur une longue période couvrant plus d'un an [275].

L'avantage d'un vaccin à base de nanoparticules est qu'il n'y a pas de risque de développer une réponse immunitaire contre le vecteur, comme c'est le cas pour les vecteurs à base d'adénovirus ou du virus Ankara. Une réponse aux vecteurs pourrait interférer et perturber la réponse spécifique anti-VIS/VIH, et augmenter la susceptibilité à acquérir le VIS/VIH [276]. En plus, les nanoparticules sont très stables dans l'environnement extracellulaire et retiennent ainsi l'antigène jusqu'à internalisation par les cellules présentatrices d'antigènes. Cela permet une meilleure disponibilité de l'antigène dans les organes lymphoïdes secondaires.

Bibliographie

1. Centers for Disease C (1981) Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 30: 305-308.
2. UNAIDS (2016) GLOBAL HIV STATISTICS.
3. Organization WH (2017) The top 10 causes of death.
4. Gallagher J (2014) Aids: Origin of pandemic 'was 1920s Kinshasa'. *BBC News*.
5. Gottlieb MS (2006) Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. 1981. *Am J Public Health* 96: 980-981; discussion 982-983.
6. Durack DT (1981) Opportunistic infections and Kaposi's sarcoma in homosexual men. *N Engl J Med* 305: 1465-1467.
7. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, et al. (1980) Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 7415-7419.
8. Takatsuki K (2005) Discovery of adult T-cell leukemia. *Retrovirology* 2: 16.
9. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, et al. (2004) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). 1983. *Rev Invest Clin* 56: 126-129.
10. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, et al. (1984) Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224: 500-503.
11. Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, et al. (1984) Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 225: 840-842.
12. Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, et al. (1986) What to call the AIDS virus? *Nature* 321: 10.
13. Organization WH (2016) HIV/AIDS. Global Health Observatory (GHO) data.
14. statistics-2015 UFSG (2015) World AIDS Today.
15. Organization WH HIV/AIDS and other sexually transmitted infections. International travel and health
16. Royce RA, Sena A, Cates W, Jr., Cohen MS (1997) Sexual transmission of HIV. *N Engl J Med* 336: 1072-1078.
17. UNAIDS (2014) The Gap Report.
18. UNAIDS (2015) Core Epidemiology Slides.

19. Organization WH (2016) Antiretroviral therapy (ART) coverage among all age groups. Global Health Observatory (GHO) data
20. Kagee A, Remien RH, Berkman A, Hoffman S, Campos L, et al. (2011) Structural barriers to ART adherence in Southern Africa: Challenges and potential ways forward. *Glob Public Health* 6: 83-97.
21. information) CCssfHahC (2016) The epidemiology of HIV in Canada.
22. information) CCssfHahC (2014) Estimates of HIV incidence, prevalence and proportion undiagnosed in Canada.
23. Simon F, Mauclore P, Roques P, Lousert-Ajaka I, Muller-Trutwin MC, et al. (1998) Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* 4: 1032-1037.
24. Roques P, Robertson DL, Souquiere S, Apetrei C, Nerrienet E, et al. (2004) Phylogenetic characteristics of three new HIV-1 N strains and implications for the origin of group N. *AIDS* 18: 1371-1381.
25. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, et al. (2009) A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* 15: 871-872.
26. Vallari A, Holzmayer V, Harris B, Yamaguchi J, Ngansop C, et al. (2011) Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. *J Virol* 85: 1403-1407.
27. Korber B, Gaschen B, Yusim K, Thakallapally R, Kesmir C, et al. (2001) Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *Br Med Bull* 58: 19-42.
28. Hemelaar J (2012) The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med* 18: 182-192.
29. Letvin NL, Eaton KA, Aldrich WR, Sehgal PK, Blake BJ, et al. (1983) Acquired immunodeficiency syndrome in a colony of macaque monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 2718-2722.
30. King NW, Hunt RD, Letvin NL (1983) Histopathologic changes in macaques with an acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Am J Pathol* 113: 382-388.
31. Kanki PJ, McLane MF, King NW, Jr., Letvin NL, Hunt RD, et al. (1985) Serologic identification and characterization of a macaque T-lymphotropic retrovirus closely related to HTLV-III. *Science* 228: 1199-1201.
32. Daniel MD, Letvin NL, King NW, Kannagi M, Sehgal PK, et al. (1985) Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science* 228: 1201-1204.
33. Apetrei C, Robertson DL, Marx PA (2004) The history of SIVS and AIDS: epidemiology, phylogeny and biology of isolates from naturally SIV infected non-human primates (NHP) in Africa. *Front Biosci* 9: 225-254.

34. Klatt NR, Silvestri G, Hirsch V (2012) Nonpathogenic simian immunodeficiency virus infections. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a007153.
35. Peeters M, Honore C, Huet T, Bedjabaga L, Ossari S, et al. (1989) Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. *AIDS* 3: 625-630.
36. Huet T, Cheynier R, Meyerhans A, Roelants G, Wain-Hobson S (1990) Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* 345: 356-359.
37. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, et al. (1999) Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature* 397: 436-441.
38. Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, et al. (2006) Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* 313: 523-526.
39. Sharp PM, Hahn BH (2011) Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1: a006841.
40. Nath BM, Schumann KE, Boyer JD (2000) The chimpanzee and other non-human-primate models in HIV-1 vaccine research. *Trends Microbiol* 8: 426-431.
41. Muesing MA, Smith DH, Cabradilla CD, Benton CV, Lasky LA, et al. (1985) Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature* 313: 450-458.
42. King SR (1994) HIV: virology and mechanisms of disease. *Ann Emerg Med* 24: 443-449.
43. Jacks T, Power MD, Masiarz FR, Luciw PA, Barr PJ, et al. (1988) Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* 331: 280-283.
44. Kaiser GE The life cycle of HIV.
45. Spletstoesser T (2014) Diagram of the HIV virion.
46. Capon DJ, Ward RH (1991) The CD4-gp120 interaction and AIDS pathogenesis. *Annu Rev Immunol* 9: 649-678.
47. Hallenberger S, Bosch V, Anglikar H, Shaw E, Klenk HD, et al. (1992) Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* 360: 358-361.
48. Ruben S, Perkins A, Purcell R, Joung K, Sia R, et al. (1989) Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol* 63: 1-8.
49. Zapp ML, Green MR (1989) Sequence-specific RNA binding by the HIV-1 Rev protein. *Nature* 342: 714-716.
50. Blissenbach M, Grewe B, Hoffmann B, Brandt S, Uberla K (2010) Nuclear RNA export and packaging functions of HIV-1 Rev revisited. *J Virol* 84: 6598-6604.

51. Malim MH, Hauber J, Le SY, Maizel JV, Cullen BR (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.
52. Garcia JV, Miller AD (1992) Downregulation of cell surface CD4 by nef. *Res Virol* 143: 52-55.
53. Aiken C, Konner J, Landau NR, Lenburg ME, Trono D (1994) Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* 76: 853-864.
54. Lama J, Mangasarian A, Trono D (1999) Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Curr Biol* 9: 622-631.
55. Ross TM, Oran AE, Cullen BR (1999) Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein. *Curr Biol* 9: 613-621.
56. Schwartz O, Marechal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM (1996) Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* 2: 338-342.
57. Heinzinger NK, Bukrinsky MI, Haggerty SA, Ragland AM, Kewalramani V, et al. (1994) The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 7311-7315.
58. Rose KM, Marin M, Kozak SL, Kabat D (2004) The viral infectivity factor (Vif) of HIV-1 unveiled. *Trends Mol Med* 10: 291-297.
59. Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, Strebel K (1992) Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J Virol* 66: 7193-7200.
60. Klimkait T, Strebel K, Hoggan MD, Martin MA, Orenstein JM (1990) The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol* 64: 621-629.
61. Hofmann H, Logue EC, Bloch N, Daddacha W, Polsky SB, et al. (2012) The Vpx lentiviral accessory protein targets SAMHD1 for degradation in the nucleus. *J Virol* 86: 12552-12560.
62. Bouzar AB, Guiguen F, Morin T, Villet S, Fornazero C, et al. (2003) Specific G2 arrest of caprine cells infected with a caprine arthritis encephalitis virus expressing vpr and vpx genes from simian immunodeficiency virus. *Virology* 309: 41-52.
63. Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, et al. (1984) The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312: 763-767.
64. Paxton WA, Dragic T, Koup RA, Moore JP (1996) The beta-chemokines, HIV type 1 second receptors, and exposed uninfected persons. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12: 1203-1207.
65. Berger EA, Murphy PM, Farber JM (1999) Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 17: 657-700.

66. Clapham PR, McKnight A (2001) HIV-1 receptors and cell tropism. *Br Med Bull* 58: 43-59.
67. Cunningham AL, Donaghy H, Harman AN, Kim M, Turville SG (2010) Manipulation of dendritic cell function by viruses. *Curr Opin Microbiol* 13: 524-529.
68. Jordan CA, Watkins BA, Kufta C, Dubois-Dalcq M (1991) Infection of brain microglial cells by human immunodeficiency virus type 1 is CD4 dependent. *J Virol* 65: 736-742.
69. Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, et al. (1996) Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381: 661-666.
70. Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, et al. (1996) A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 85: 1149-1158.
71. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA (1996) HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272: 872-877.
72. Blaak H, van't Wout AB, Brouwer M, Hooibrink B, Hovenkamp E, et al. (2000) In vivo HIV-1 infection of CD45RA(+)CD4(+) T cells is established primarily by syncytium-inducing variants and correlates with the rate of CD4(+) T cell decline. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1269-1274.
73. van Rij RP, Blaak H, Visser JA, Brouwer M, Rientsma R, et al. (2000) Differential coreceptor expression allows for independent evolution of non-syncytium-inducing and syncytium-inducing HIV-1. *J Clin Invest* 106: 1039-1052.
74. Martins-Green M, Petreaca M, Wang L (2013) Chemokines and Their Receptors Are Key Players in the Orchestra That Regulates Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2: 327-347.
75. de Oliveira CE, Oda JM, Losi Guembarovski R, de Oliveira KB, Ariza CB, et al. (2014) CC chemokine receptor 5: the interface of host immunity and cancer. *Dis Markers* 2014: 126954.
76. Struyf S, Menten P, Lenaerts JP, Put W, D'Haese A, et al. (2001) Diverging binding capacities of natural LD78beta isoforms of macrophage inflammatory protein-1alpha to the CC chemokine receptors 1, 3 and 5 affect their anti-HIV-1 activity and chemotactic potencies for neutrophils and eosinophils. *Eur J Immunol* 31: 2170-2178.
77. Miyakawa T, Obaru K, Maeda K, Harada S, Mitsuya H (2002) Identification of amino acid residues critical for LD78beta, a variant of human macrophage inflammatory protein-1alpha, binding to CCR5 and inhibition of R5 human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Biol Chem* 277: 4649-4655.
78. Slimani H, Charnaux N, Mbemba E, Saffar L, Vassy R, et al. (2003) Interaction of RANTES with syndecan-1 and syndecan-4 expressed by human primary macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1617: 80-88.
79. Griffith JW, Sokol CL, Luster AD (2014) Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol* 32: 659-702.

80. Busillo JM, Benovic JL (2007) Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta* 1768: 952-963.
81. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, et al. (2000) International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 52: 145-176.
82. Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schiøth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63: 1256-1272.
83. Sucupira MC, Sanabani S, Cortes RM, Giret MT, Tomiyama H, et al. (2012) Faster HIV-1 disease progression among Brazilian individuals recently infected with CXCR4-utilizing strains. *PLoS One* 7: e30292.
84. Regoes RR, Bonhoeffer S (2005) The HIV coreceptor switch: a population dynamical perspective. *Trends Microbiol* 13: 269-277.
85. Shimizu N, Soda Y, Kanbe K, Liu HY, Mukai R, et al. (2000) A putative G protein-coupled receptor, RDC1, is a novel coreceptor for human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* 74: 619-626.
86. Combadiere C, Salzwedel K, Smith ED, Tiffany HL, Berger EA, et al. (1998) Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1. *J Biol Chem* 273: 23799-23804.
87. Samson M, Edinger AL, Stordeur P, Rucker J, Verhasselt V, et al. (1998) ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in monocyte-derived dendritic cells and macrophages and is a coreceptor for SIV and some primary HIV-1 strains. *Eur J Immunol* 28: 1689-1700.
88. Shimizu N, Tanaka A, Mori T, Ohtsuki T, Hoque A, et al. (2008) A formylpeptide receptor, FPRL1, acts as an efficient coreceptor for primary isolates of human immunodeficiency virus. *Retrovirology* 5: 52.
89. Simmons G, Reeves JD, Hibbitts S, Stine JT, Gray PW, et al. (2000) Co-receptor use by HIV and inhibition of HIV infection by chemokine receptor ligands. *Immunol Rev* 177: 112-126.
90. Pollakis G, Paxton WA (2012) Use of (alternative) coreceptors for HIV entry. *Curr Opin HIV AIDS* 7: 440-449.
91. Edinger AL, Hoffman TL, Sharron M, Lee B, O'Dowd B, et al. (1998) Use of GPR1, GPR15, and STRL33 as coreceptors by diverse human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus envelope proteins. *Virology* 249: 367-378.
92. D'Onofrio A (2015) *The Life Cycle of Viruses with Prokaryote Hosts*.
93. Coffin JM HS, Varmus HE, editors (1997) *Overview of Reverse Transcription*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
94. Van Lint C, Bouchat S, Marcello A (2013) HIV-1 transcription and latency: an update. *Retrovirology* 10: 67.

95. Mbonye U, Karn J (2014) Transcriptional control of HIV latency: cellular signaling pathways, epigenetics, happenstance and the hope for a cure. *Virology* 454-455: 328-339.
96. Sundquist WI, Krausslich HG (2012) HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a006924.
97. Munoz A, Wang MC, Bass S, Taylor JM, Kingsley LA, et al. (1989) Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-free time after human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seroconversion in homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study Group. *Am J Epidemiol* 130: 530-539.
98. Munoz A, Kirby AJ, He YD, Margolick JB, Visscher BR, et al. (1995) Long-term survivors with HIV-1 infection: incubation period and longitudinal patterns of CD4+ lymphocytes. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 8: 496-505.
99. O'Brien M, Markowitz M (2012) Should we treat acute HIV infection? *Curr HIV/AIDS Rep* 9: 101-110.
100. Kahn JO, Walker BD (1998) Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 339: 33-39.
101. Sigve (2011) Hiv-timecourse. Wikipedia.
102. Hallmann R, Zhang X, Di Russo J, Li L, Song J, et al. (2015) The regulation of immune cell trafficking by the extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 36: 54-61.
103. Wawer MJ, Gray RH, Sewankambo NK, Serwadda D, Li X, et al. (2005) Rates of HIV-1 transmission per coital act, by stage of HIV-1 infection, in Rakai, Uganda. *J Infect Dis* 191: 1403-1409.
104. Bollinger RC, Brookmeyer RS, Mehendale SM, Paranjape RS, Shepherd ME, et al. (1997) Risk factors and clinical presentation of acute primary HIV infection in India. *JAMA* 278: 2085-2089.
105. Mellors JW, Rinaldo CR, Jr., Gupta P, White RM, Todd JA, et al. (1996) Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 272: 1167-1170.
106. Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, Margolick JB, Tassoni CJ, et al. (1997) Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* 126: 946-954.
107. Lu X, Li Z, Li Q, Jiao Y, Ji Y, et al. (2016) Preferential loss of gut-homing alpha4beta7 CD4+ T cells and their circulating functional subsets in acute HIV-1 infection. *Cell Mol Immunol* 13: 776-784.
108. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Manuelli V, Jean-Pierre P, et al. (2007) Mechanisms of gastrointestinal CD4+ T-cell depletion during acute and early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 81: 599-612.
109. Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, et al. (2005) Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* 434: 1093-1097.

110. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, et al. (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.
111. Gori A, Tincati C, Rizzardini G, Torti C, Quirino T, et al. (2008) Early impairment of gut function and gut flora supporting a role for alteration of gastrointestinal mucosa in human immunodeficiency virus pathogenesis. *J Clin Microbiol* 46: 757-758.
112. Brenchley JM, Douek DC (2008) HIV infection and the gastrointestinal immune system. *Mucosal Immunol* 1: 23-30.
113. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, et al. (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.
114. AIDS.gov (2015) PRE-EXPOSURE PROPHYLAXIS (PrEP).
115. AIDS.gov (2015) Post-Exposure Prophylaxis (PEP).
116. Administration USFaD (2016) Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection.
117. Teeraananchai S, Kerr SJ, Amin J, Ruxrungtham K, Law MG (2017) Life expectancy of HIV-positive people after starting combination antiretroviral therapy: a meta-analysis. *HIV Med* 18: 256-266.
118. Antiretroviral Therapy Cohort C (2008) Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *Lancet* 372: 293-299.
119. Chun TW, Engel D, Berrey MM, Shea T, Corey L, et al. (1998) Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8869-8873.
120. Pinzone MR, Graf E, Lynch L, McLaughlin B, Hecht FM, et al. (2016) Monitoring Integration over Time Supports a Role for Cytotoxic T Lymphocytes and Ongoing Replication as Determinants of Reservoir Size. *J Virol* 90: 10436-10445.
121. Chavez L, Calvanese V, Verdin E (2015) HIV Latency Is Established Directly and Early in Both Resting and Activated Primary CD4 T Cells. *PLoS Pathog* 11: e1004955.
122. Martinez-Picado J, Deeks SG (2016) Persistent HIV-1 replication during antiretroviral therapy. *Curr Opin HIV AIDS* 11: 417-423.
123. Conway JM, Perelson AS (2016) Residual Viremia in Treated HIV+ Individuals. *PLoS Comput Biol* 12: e1004677.
124. Varki A, Altheide TK (2005) Comparing the human and chimpanzee genomes: searching for needles in a haystack. *Genome Res* 15: 1746-1758.

125. Novembre FJ, Saucier M, Anderson DC, Klumpp SA, O'Neil SP, et al. (1997) Development of AIDS in a chimpanzee infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 71: 4086-4091.
126. Wei Q, Fultz PN (1998) Extensive diversification of human immunodeficiency virus type 1 subtype B strains during dual infection of a chimpanzee that progressed to AIDS. *J Virol* 72: 3005-3017.
127. Ferrari G, Ottinger J, Place C, Nigida SM, Jr., Arthur LO, et al. (1993) The impact of HIV-1 infection on phenotypic and functional parameters of cellular immunity in chimpanzees. *AIDS Res Hum Retroviruses* 9: 647-656.
128. Apetrei C, Kaur A, Lerche NW, Metzger M, Pandrea I, et al. (2005) Molecular epidemiology of simian immunodeficiency virus SIVsm in U.S. primate centers unravels the origin of SIVmac and SIVstm. *J Virol* 79: 8991-9005.
129. Ling B, Veazey RS, Luckay A, Penedo C, Xu K, et al. (2002) SIV(mac) pathogenesis in rhesus macaques of Chinese and Indian origin compared with primary HIV infections in humans. *AIDS* 16: 1489-1496.
130. Reimann KA, Parker RA, Seaman MS, Beaudry K, Beddall M, et al. (2005) Pathogenicity of simian-human immunodeficiency virus SHIV-89.6P and SIVmac is attenuated in cynomolgus macaques and associated with early T-lymphocyte responses. *J Virol* 79: 8878-8885.
131. Cumont MC, Diop O, Vaslin B, Elbim C, Viollet L, et al. (2008) Early divergence in lymphoid tissue apoptosis between pathogenic and nonpathogenic simian immunodeficiency virus infections of nonhuman primates. *J Virol* 82: 1175-1184.
132. <http://what-when-how.com/nursing/the-immune-system-structure-and-function-nursing-part-1/>
133. Simon M Les cellules immunitaires et les organes lymphoïdes. Cours-Pharmaciecom.
134. Cooper MD (2015) The early history of B cells. *Nat Rev Immunol* 15: 191-197.
135. Kondo M (2010) Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Immunol Rev* 238: 37-46.
136. Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA (2014) Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol* 14: 377-391.
137. Willard-Mack CL (2006) Normal structure, function, and histology of lymph nodes. *Toxicol Pathol* 34: 409-424.
138. Horiike M, Iwami S, Kodama M, Sato A, Watanabe Y, et al. (2012) Lymph nodes harbor viral reservoirs that cause rebound of plasma viremia in SIV-infected macaques upon cessation of combined antiretroviral therapy. *Virology* 423: 107-118.
139. Cumont MC, Monceaux V, Viollet L, Lay S, Parker R, et al. (2007) TGF-beta in intestinal lymphoid organs contributes to the death of armed effector CD8 T cells and is associated

with the absence of virus containment in rhesus macaques infected with the simian immunodeficiency virus. *Cell Death Differ* 14: 1747-1758.

140. Mebius RE, Kraal G (2005) Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 5: 606-616.
141. Bronte V, Pittet MJ (2013) The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity* 39: 806-818.
142. Liu YJ (1997) Sites of B lymphocyte selection, activation, and tolerance in spleen. *J Exp Med* 186: 625-629.
143. Jung A, Maier R, Vartanian JP, Bocharov G, Jung V, et al. (2002) Recombination: Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature* 418: 144.
144. Costiniuk CT, Jenabian MA (2015) HIV reservoir dynamics in the face of highly active antiretroviral therapy. *AIDS Patient Care STDS* 29: 55-68.
145. <http://immunologyden.blogspot.com/2012/11/spleen.html>
146. Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, et al. (2003) Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 77: 11708-11717.
147. Mowat AM, Viney JL (1997) The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev* 156: 145-166.
148. Macpherson AJ, Smith K (2006) Mesenteric lymph nodes at the center of immune anatomy. *J Exp Med* 203: 497-500.
149. <https://www.kenhub.com/>
150. Marchetti G, Tincati C, Silvestri G (2013) Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS. *Clin Microbiol Rev* 26: 2-18.
151. Zevin AS, McKinnon L, Burgener A, Klatt NR (2016) Microbial translocation and microbiome dysbiosis in HIV-associated immune activation. *Curr Opin HIV AIDS* 11: 182-190.
152. Viollet L, Monceaux V, Petit F, Ho Tsong Fang R, Cumont MC, et al. (2006) Death of CD4+ T cells from lymph nodes during primary SIVmac251 infection predicts the rate of AIDS progression. *J Immunol* 177: 6685-6694.
153. Charles A Janeway J, Paul Travers, Mark Walport, and Mark J Shlomchik (2001) *Immunobiology*, 5th edition. New York: Garland Science.
154. Clerici M, Hakim FT, Venzon DJ, Blatt S, Hendrix CW, et al. (1993) Changes in interleukin-2 and interleukin-4 production in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive individuals. *J Clin Invest* 91: 759-765.
155. Becker Y (2004) The changes in the T helper 1 (Th1) and T helper 2 (Th2) cytokine balance during HIV-1 infection are indicative of an allergic response to viral proteins that may be

reversed by Th2 cytokine inhibitors and immune response modifiers--a review and hypothesis. *Virus Genes* 28: 5-18.

156. Estaquier J, Idziorek T, Zou W, Emilie D, Farber CM, et al. (1995) T helper type 1/T helper type 2 cytokines and T cell death: preventive effect of interleukin 12 on activation-induced and CD95 (FAS/APO-1)-mediated apoptosis of CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected persons. *J Exp Med* 182: 1759-1767.
157. Estaquier J, Tanaka M, Suda T, Nagata S, Golstein P, et al. (1996) Fas-mediated apoptosis of CD4+ and CD8+ T cells from human immunodeficiency virus-infected persons: differential in vitro preventive effect of cytokines and protease antagonists. *Blood* 87: 4959-4966.
158. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136: 2348-2357.
159. Spencer LA, Weller PF (2010) Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights. *Immunol Cell Biol* 88: 250-256.
160. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, et al. (2001) Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 194: 519-527.
161. O'Connor W, Jr., Zenewicz LA, Flavell RA (2010) The dual nature of T(H)17 cells: shifting the focus to function. *Nat Immunol* 11: 471-476.
162. Brenchley JM, Paiardini M, Knox KS, Asher AI, Cervasi B, et al. (2008) Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood* 112: 2826-2835.
163. El Hed A, Khaitan A, Kozhaya L, Manel N, Daskalakis D, et al. (2010) Susceptibility of human Th17 cells to human immunodeficiency virus and their perturbation during infection. *J Infect Dis* 201: 843-854.
164. Bixler SL, Mattapallil JJ (2013) Loss and dysregulation of Th17 cells during HIV infection. *Clin Dev Immunol* 2013: 852418.
165. Eggena MP, Barugahare B, Jones N, Okello M, Mutalya S, et al. (2005) Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. *J Immunol* 174: 4407-4414.
166. Schaerli P, Willimann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, et al. (2000) CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med* 192: 1553-1562.
167. Aust G, Sittig D, Becherer L, Anderegg U, Schutz A, et al. (2004) The role of CXCR5 and its ligand CXCL13 in the compartmentalization of lymphocytes in thyroids affected by autoimmune thyroid diseases. *Eur J Endocrinol* 150: 225-234.
168. Vermi W, Lonardi S, Bosisio D, Ugucioni M, Danelon G, et al. (2008) Identification of CXCL13 as a new marker for follicular dendritic cell sarcoma. *J Pathol* 216: 356-364.

169. Kim CH, Lim HW, Kim JR, Rott L, Hillsamer P, et al. (2004) Unique gene expression program of human germinal center T helper cells. *Blood* 104: 1952-1960.
170. Rasheed AU, Rahn HP, Sallusto F, Lipp M, Muller G (2006) Follicular B helper T cell activity is confined to CXCR5(hi)ICOS(hi) CD4 T cells and is independent of CD57 expression. *Eur J Immunol* 36: 1892-1903.
171. Crotty S (2011) Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* 29: 621-663.
172. Xu L, Cao Y, Xie Z, Huang Q, Bai Q, et al. (2015) The transcription factor TCF-1 initiates the differentiation of T(FH) cells during acute viral infection. *Nat Immunol* 16: 991-999.
173. Wu T, Shin HM, Moseman EA, Ji Y, Huang B, et al. (2015) TCF1 Is Required for the T Follicular Helper Cell Response to Viral Infection. *Cell Rep* 12: 2099-2110.
174. Sahoo A, Alekseev A, Tanaka K, Obertas L, Lerman B, et al. (2015) Batf is important for IL-4 expression in T follicular helper cells. *Nat Commun* 6: 7997.
175. Belanger S, Crotty S (2016) Dances with cytokines, featuring TFH cells, IL-21, IL-4 and B cells. *Nat Immunol* 17: 1135-1136.
176. Goenka R, Barnett LG, Silver JS, O'Neill PJ, Hunter CA, et al. (2011) Cutting edge: dendritic cell-restricted antigen presentation initiates the follicular helper T cell program but cannot complete ultimate effector differentiation. *J Immunol* 187: 1091-1095.
177. Eto D, Lao C, DiToro D, Barnett B, Escobar TC, et al. (2011) IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (Tfh) differentiation. *PLoS One* 6: e17739.
178. Ballesteros-Tato A, Leon B, Graf BA, Moquin A, Adams PS, et al. (2012) Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper cell differentiation. *Immunity* 36: 847-856.
179. McDonald PW, Read KA, Baker CE, Anderson AE, Powell MD, et al. (2016) IL-7 signalling represses Bcl-6 and the TFH gene program. *Nat Commun* 7: 10285.
180. Liao W, Lin JX, Leonard WJ (2013) Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity* 38: 13-25.
181. Lee JY, Skon CN, Lee YJ, Oh S, Taylor JJ, et al. (2015) The transcription factor KLF2 restrains CD4(+) T follicular helper cell differentiation. *Immunity* 42: 252-264.
182. Weber JP, Fuhrmann F, Feist RK, Lahmann A, Al Baz MS, et al. (2015) ICOS maintains the T follicular helper cell phenotype by down-regulating Kruppel-like factor 2. *J Exp Med* 212: 217-233.
183. Fabre S, Carrette F, Chen J, Lang V, Semichon M, et al. (2008) FOXO1 regulates L-Selectin and a network of human T cell homing molecules downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol* 181: 2980-2989.

184. Kerdiles YM, Beisner DR, Tinoco R, Dejean AS, Castrillon DH, et al. (2009) Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nat Immunol* 10: 176-184.
185. Nutt SL, Tarlinton DM (2011) Germinal center B and follicular helper T cells: siblings, cousins or just good friends? *Nat Immunol* 12: 472-477.
186. Seo YB, Im SJ, Namkoong H, Kim SW, Choi YW, et al. (2014) Crucial roles of interleukin-7 in the development of T follicular helper cells and in the induction of humoral immunity. *J Virol* 88: 8998-9009.
187. Li Y, Zhou M, Luo Z, Zhang Y, Cui M, et al. (2017) Overexpression of Interleukin-7 Extends the Humoral Immune Response Induced by Rabies Vaccination. *J Virol* 91.
188. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, et al. (2000) A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100: 655-669.
189. Usui T, Preiss JC, Kanno Y, Yao ZJ, Bream JH, et al. (2006) T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *J Exp Med* 203: 755-766.
190. Nakayamada S, Kanno Y, Takahashi H, Jankovic D, Lu KT, et al. (2011) Early Th1 cell differentiation is marked by a Tfh cell-like transition. *Immunity* 35: 919-931.
191. Kamiya S, Owaki T, Morishima N, Fukai F, Mizuguchi J, et al. (2004) An indispensable role for STAT1 in IL-27-induced T-bet expression but not proliferation of naive CD4+ T cells. *J Immunol* 173: 3871-3877.
192. Hibbert L, Pflanz S, De Waal Malefyt R, Kastelein RA (2003) IL-27 and IFN-alpha signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12Rbeta2 in naive T cells. *J Interferon Cytokine Res* 23: 513-522.
193. Gringhuis SI, Kaptein TM, Wevers BA, van der Vlist M, Klaver EJ, et al. (2014) Fucose-based PAMPs prime dendritic cells for follicular T helper cell polarization via DC-SIGN-dependent IL-27 production. *Nat Commun* 5: 5074.
194. Batten M, Ramamoorthi N, Kljavin NM, Ma CS, Cox JH, et al. (2010) IL-27 supports germinal center function by enhancing IL-21 production and the function of T follicular helper cells. *J Exp Med* 207: 2895-2906.
195. Hennerici T, Pollmann R, Schmidt T, Seipelt M, Tackenberg B, et al. (2016) Increased Frequency of T Follicular Helper Cells and Elevated Interleukin-27 Plasma Levels in Patients with Pemphigus. *PLoS One* 11: e0148919.
196. Pallikkuth S, Sharkey M, Babic DZ, Gupta S, Stone GW, et al. (2015) Peripheral T Follicular Helper Cells Are the Major HIV Reservoir within Central Memory CD4 T Cells in Peripheral Blood from Chronically HIV-Infected Individuals on Combination Antiretroviral Therapy. *J Virol* 90: 2718-2728.

197. Martin-Gayo E, Cronin J, Hickman T, Ouyang Z, Lindqvist M, et al. (2017) Circulating CXCR5+CXCR3+PD-1^{lo} Tfh-like cells in HIV-1 controllers with neutralizing antibody breadth. *JCI Insight* 2: e89574.
198. Locci M, Havenar-Daughton C, Landais E, Wu J, Kroenke MA, et al. (2013) Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity* 39: 758-769.
199. Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, Ranganathan R, Bourdery L, et al. (2011) Human blood CXCR5(+)/CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* 34: 108-121.
200. Schmitt N, Ueno H (2013) Blood Tfh cells come with colors. *Immunity* 39: 629-630.
201. Bergmann B, Grimsholm O, Thorarinsdottir K, Ren W, Jirholt P, et al. (2013) Memory B cells in mouse models. *Scand J Immunol* 78: 149-156.
202. Ma CS, Deenick EK, Batten M, Tangye SG (2012) The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J Exp Med* 209: 1241-1253.
203. LeBien TW, Tedder TF (2008) B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112: 1570-1580.
204. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, et al. (2000) Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102: 553-563.
205. Dedeoglu F, Horwitz B, Chaudhuri J, Alt FW, Geha RS (2004) Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NFkappaB. *Int Immunol* 16: 395-404.
206. Jain S, Chodiseti SB, Agrewala JN (2011) CD40 signaling synergizes with TLR-2 in the BCR independent activation of resting B cells. *PLoS One* 6: e20651.
207. Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, Briere F, Galizzi JP, et al. (1994) The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol* 12: 881-922.
208. Titanji K, Velu V, Chennareddi L, Vijay-Kumar M, Gewirtz AT, et al. (2010) Acute depletion of activated memory B cells involves the PD-1 pathway in rapidly progressing SIV-infected macaques. *J Clin Invest* 120: 3878-3890.
209. Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, et al. (2008) Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 29: 138-149.
210. Linterman MA, Beaton L, Yu D, Ramiscal RR, Srivastava M, et al. (2010) IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J Exp Med* 207: 353-363.

211. Zotos D, Coquet JM, Zhang Y, Light A, D'Costa K, et al. (2010) IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J Exp Med* 207: 365-378.
212. Farooq F, Beck K, Paolino KM, Phillips R, Waters NC, et al. (2016) Circulating follicular T helper cells and cytokine profile in humans following vaccination with the rVSV-ZEBOV Ebola vaccine. *Sci Rep* 6: 27944.
213. Vargas-Inchaustegui DA, Demers A, Shaw JM, Kang G, Ball D, et al. (2016) Vaccine Induction of Lymph Node-Resident Simian Immunodeficiency Virus Env-Specific T Follicular Helper Cells in Rhesus Macaques. *J Immunol* 196: 1700-1710.
214. Yamamoto T, Lynch RM, Gautam R, Matus-Nicodemos R, Schmidt SD, et al. (2015) Quality and quantity of TFH cells are critical for broad antibody development in SHIVAD8 infection. *Sci Transl Med* 7: 298ra120.
215. Bentebibel SE, Lopez S, Obermoser G, Schmitt N, Mueller C, et al. (2013) Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH cells correlates with antibody responses to influenza vaccination. *Sci Transl Med* 5: 176ra132.
216. Pallikkuth S, Parmigiani A, Silva SY, George VK, Fischl M, et al. (2012) Impaired peripheral blood T-follicular helper cell function in HIV-infected nonresponders to the 2009 H1N1/09 vaccine. *Blood* 120: 985-993.
217. Matsui K, Adelsberger JW, Kemp TJ, Baseler MW, Ledgerwood JE, et al. (2015) Circulating CXCR5(+)CD4(+) T Follicular-Like Helper Cell and Memory B Cell Responses to Human Papillomavirus Vaccines. *PLoS One* 10: e0137195.
218. Lindqvist M, van Lunzen J, Soghoian DZ, Kuhl BD, Ranasinghe S, et al. (2012) Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. *J Clin Invest* 122: 3271-3280.
219. Petrovas C, Yamamoto T, Gerner MY, Boswell KL, Wloka K, et al. (2012) CD4 T follicular helper cell dynamics during SIV infection. *J Clin Invest* 122: 3281-3294.
220. Xu H, Wang X, Malam N, Lackner AA, Veazey RS (2015) Persistent Simian Immunodeficiency Virus Infection Causes Ultimate Depletion of Follicular Th Cells in AIDS. *J Immunol* 195: 4351-4357.
221. Cubas RA, Mudd JC, Savoye AL, Perreau M, van Grevenynghe J, et al. (2013) Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nat Med* 19: 494-499.
222. de Leur K, Dor FJ, Dieterich M, van der Laan LJ, Hendriks RW, et al. (2017) IL-21 Receptor Antagonist Inhibits Differentiation of B Cells toward Plasmablasts upon Alloantigen Stimulation. *Front Immunol* 8: 306.
223. Perreau M, Savoye AL, De Crignis E, Corpataux JM, Cubas R, et al. (2013) Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *J Exp Med* 210: 143-156.

224. Xu Y, Weatherall C, Bailey M, Alcantara S, De Rose R, et al. (2013) Simian immunodeficiency virus infects follicular helper CD4 T cells in lymphoid tissues during pathogenic infection of pigtail macaques. *J Virol* 87: 3760-3773.
225. Dykhuizen M, Mitchen JL, Montefiori DC, Thomson J, Acker L, et al. (1998) Determinants of disease in the simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaque: characterizing animals with low antibody responses and rapid progression. *J Gen Virol* 79 (Pt 10): 2461-2467.
226. Titanji K, De Milito A, Cagigi A, Thorstensson R, Grutzmeier S, et al. (2006) Loss of memory B cells impairs maintenance of long-term serologic memory during HIV-1 infection. *Blood* 108: 1580-1587.
227. Zhang ZQ, Casimiro DR, Schleif WA, Chen M, Citron M, et al. (2007) Early depletion of proliferating B cells of germinal center in rapidly progressive simian immunodeficiency virus infection. *Virology* 361: 455-464.
228. Kuhrt D, Faith SA, Leone A, Rohankedkar M, Sodora DL, et al. (2010) Evidence of early B-cell dysregulation in simian immunodeficiency virus infection: rapid depletion of naive and memory B-cell subsets with delayed reconstitution of the naive B-cell population. *J Virol* 84: 2466-2476.
229. De Milito A (2004) B lymphocyte dysfunctions in HIV infection. *Curr HIV Res* 2: 11-21.
230. Lane HC, Masur H, Edgar LC, Whalen G, Rook AH, et al. (1983) Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 309: 453-458.
231. Martinez-Maza O, Breen EC (2002) B-cell activation and lymphoma in patients with HIV. *Curr Opin Oncol* 14: 528-532.
232. Siegrist C-A (2013) *Vaccines: Sixth Edition*.
233. Fevrier M, Dorgham K, Rebollo A (2011) CD4+ T cell depletion in human immunodeficiency virus (HIV) infection: role of apoptosis. *Viruses* 3: 586-612.
234. Arnoult D, Violette L, Petit F, Lelievre JD, Estaquier J (2004) HIV-1 triggers mitochondrion death. *Mitochondrion* 4: 255-269.
235. Hurtrel B, Petit F, Arnoult D, Muller-Trutwin M, Silvestri G, et al. (2005) Apoptosis in SIV infection. *Cell Death Differ* 12 Suppl 1: 979-990.
236. Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, et al. (2000) Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med* 192: 1545-1552.
237. Shi S, Seki S, Matano T, Yamamoto H (2013) IL-21-producer CD4+ T cell kinetics during primary simian immunodeficiency virus infection. *Microbes Infect* 15: 697-707.
238. Boswell KL, Paris R, Boritz E, Ambrozak D, Yamamoto T, et al. (2014) Loss of circulating CD4 T cells with B cell helper function during chronic HIV infection. *PLoS Pathog* 10: e1003853.

239. Iyer SS, Gangadhara S, Victor B, Gomez R, Basu R, et al. (2015) Codelivery of Envelope Protein in Alum with MVA Vaccine Induces CXCR3-Biased CXCR5+ and CXCR5- CD4 T Cell Responses in Rhesus Macaques. *J Immunol* 195: 994-1005.
240. Colineau L, Rouers A, Yamamoto T, Xu Y, Urrutia A, et al. (2015) HIV-Infected Spleens Present Altered Follicular Helper T Cell (Tfh) Subsets and Skewed B Cell Maturation. *PLoS One* 10: e0140978.
241. Banga R, Procopio FA, Noto A, Pollakis G, Cavassini M, et al. (2016) PD-1(+) and follicular helper T cells are responsible for persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals. *Nat Med* 22: 754-761.
242. Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, Shimomura Y, Andoh A, et al. (2008) IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest* 118: 534-544.
243. Reynolds JM, Martinez GJ, Nallaparaju KC, Chang SH, Wang YH, et al. (2012) Cutting edge: regulation of intestinal inflammation and barrier function by IL-17C. *J Immunol* 189: 4226-4230.
244. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, et al. (2007) Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 8: 639-646.
245. Sonnenberg GF, Fouser LA, Artis D (2011) Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat Immunol* 12: 383-390.
246. Fernandes SM, Pires AR, Ferreira C, Foxall RB, Rino J, et al. (2014) Enteric mucosa integrity in the presence of a preserved innate interleukin 22 compartment in HIV type 1-treated individuals. *J Infect Dis* 210: 630-640.
247. Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, Hu Y, Sa SM, et al. (2008) Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med* 14: 282-289.
248. Fagarasan S, Muramatsu M, Suzuki K, Nagaoka H, Hiai H, et al. (2002) Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. *Science* 298: 1424-1427.
249. Perruzza L, Gargari G, Proietti M, Fosso B, D'Erchia AM, et al. (2017) T Follicular Helper Cells Promote a Beneficial Gut Ecosystem for Host Metabolic Homeostasis by Sensing Microbiota-Derived Extracellular ATP. *Cell Rep* 18: 2566-2575.
250. Mantis NJ, Rol N, Corthesy B (2011) Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol* 4: 603-611.
251. Lozupone CA, Li M, Campbell TB, Flores SC, Linderman D, et al. (2013) Alterations in the gut microbiota associated with HIV-1 infection. *Cell Host Microbe* 14: 329-339.
252. Nowak P, Troseid M, Avershina E, Barqasho B, Neogi U, et al. (2015) Gut microbiota diversity predicts immune status in HIV-1 infection. *AIDS* 29: 2409-2418.

253. Kuchen S, Robbins R, Sims GP, Sheng C, Phillips TM, et al. (2007) Essential role of IL-21 in B cell activation, expansion, and plasma cell generation during CD4+ T cell-B cell collaboration. *J Immunol* 179: 5886-5896.
254. Li Q, Liu Z, Dang E, Jin L, He Z, et al. (2013) Follicular helper T Cells (Tfh) and IL-21 involvement in the pathogenesis of bullous pemphigoid. *PLoS One* 8: e68145.
255. Micci L, Cervasi B, Ende ZS, Iriete RI, Reyes-Aviles E, et al. (2012) Paucity of IL-21-producing CD4(+) T cells is associated with Th17 cell depletion in SIV infection of rhesus macaques. *Blood* 120: 3925-3935.
256. Velu V, Mylvaganam GH, Gangadhara S, Hong JJ, Iyer SS, et al. (2016) Induction of Th1-Biased T Follicular Helper (Tfh) Cells in Lymphoid Tissues during Chronic Simian Immunodeficiency Virus Infection Defines Functionally Distinct Germinal Center Tfh Cells. *J Immunol* 197: 1832-1842.
257. Estaquier J, Idziorek T, de Bels F, Barre-Sinoussi F, Hurtrel B, et al. (1994) Programmed cell death and AIDS: significance of T-cell apoptosis in pathogenic and nonpathogenic primate lentiviral infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9431-9435.
258. Ameisen JC, Estaquier J, Idziorek T (1994) From AIDS to parasite infection: pathogen-mediated subversion of programmed cell death as a mechanism for immune dysregulation. *Immunol Rev* 142: 9-51.
259. Ameisen JC, Estaquier J, Idziorek T, De Bels F (1995) The relevance of apoptosis to AIDS pathogenesis. *Trends Cell Biol* 5: 27-32.
260. Petit F, Arnoult D, Lelievre JD, Moutouh-de Parseval L, Hance AJ, et al. (2002) Productive HIV-1 infection of primary CD4+ T cells induces mitochondrial membrane permeabilization leading to a caspase-independent cell death. *J Biol Chem* 277: 1477-1487.
261. Monceaux V, Estaquier J, Fevrier M, Cumont MC, Riviere Y, et al. (2003) Extensive apoptosis in lymphoid organs during primary SIV infection predicts rapid progression towards AIDS. *AIDS* 17: 1585-1596.
262. Arnoult D, Petit F, Lelievre JD, Lecossier D, Hance A, et al. (2003) Caspase-dependent and -independent T-cell death pathways in pathogenic simian immunodeficiency virus infection: relationship to disease progression. *Cell Death Differ* 10: 1240-1252.
263. Ho Tsong Fang R, Khatissian E, Monceaux V, Cumont MC, Beq S, et al. (2005) Disease progression in macaques with low SIV replication levels: on the relevance of TREC counts. *AIDS* 19: 663-673.
264. Benveniste O, Flahault A, Rollot F, Elbim C, Estaquier J, et al. (2005) Mechanisms involved in the low-level regeneration of CD4+ cells in HIV-1-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy who have prolonged undetectable plasma viral loads. *J Infect Dis* 191: 1670-1679.
265. Laforge M, Petit F, Estaquier J, Senik A (2007) Commitment to apoptosis in CD4(+) T lymphocytes productively infected with human immunodeficiency virus type 1 is initiated by

- lysosomal membrane permeabilization, itself induced by the isolated expression of the viral protein Nef. *J Virol* 81: 11426-11440.
266. Estaquier J, Zaunders J, Laforge M (2013) HIV integrase and the swan song of the CD4 T cells? *Retrovirology* 10: 149.
267. Smit-McBride Z, Mattapallil JJ, McChesney M, Ferrick D, Dandekar S (1998) Gastrointestinal T lymphocytes retain high potential for cytokine responses but have severe CD4(+) T-cell depletion at all stages of simian immunodeficiency virus infection compared to peripheral lymphocytes. *J Virol* 72: 6646-6656.
268. Kewenig S, Schneider T, Hohloch K, Lampe-Dreyer K, Ullrich R, et al. (1999) Rapid mucosal CD4(+) T-cell depletion and enteropathy in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *Gastroenterology* 116: 1115-1123.
269. Lapenta C, Boirivant M, Marini M, Santini SM, Logozzi M, et al. (1999) Human intestinal lamina propria lymphocytes are naturally permissive to HIV-1 infection. *Eur J Immunol* 29: 1202-1208.
270. Kornfeld C, Ploquin MJ, Pandrea I, Faye A, Onanga R, et al. (2005) Antiinflammatory profiles during primary SIV infection in African green monkeys are associated with protection against AIDS. *J Clin Invest* 115: 1082-1091.
271. Amos JD, Wilks AB, Fouda GG, Smith SD, Colvin L, et al. (2013) Lack of B cell dysfunction is associated with functional, gp120-dominant antibody responses in breast milk of simian immunodeficiency virus-infected African green monkeys. *J Virol* 87: 11121-11134.
272. Amos JD, Himes JE, Armand L, Gurley TC, Martinez DR, et al. (2015) Rapid Development of gp120-Focused Neutralizing B Cell Responses during Acute Simian Immunodeficiency Virus Infection of African Green Monkeys. *J Virol* 89: 9485-9498.
273. Bekele Y, Amu S, Bobosha K, Lantto R, Nilsson A, et al. (2015) Impaired Phenotype and Function of T Follicular Helper Cells in HIV-1-Infected Children Receiving ART. *Medicine (Baltimore)* 94: e1125.
274. Micci L, Ryan ES, Fromentin R, Bosinger SE, Harper JL, et al. (2015) Interleukin-21 combined with ART reduces inflammation and viral reservoir in SIV-infected macaques. *J Clin Invest* 125: 4497-4513.
275. Moon JJ, Suh H, Li AV, Ockenhouse CF, Yadava A, et al. (2012) Enhancing humoral responses to a malaria antigen with nanoparticle vaccines that expand Tfh cells and promote germinal center induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 1080-1085.
276. Fauci AS, Marovich MA, Dieffenbach CW, Hunter E, Buchbinder SP (2014) Immunology. Immune activation with HIV vaccines. *Science* 344: 49-51.

Annexe

LES CELLULES T_{fh} ET L'INFECTION PAR À VIH : DES AMIES OU DES ENNEMIES ?

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication en 2017 dans la revue *Frontiers* (<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00135>) et est constitué du manuscrit tel que publié.

CD4 T Follicular Helper Cells and HIV Infection: Friends or Enemies?

**Félicien Moukambi¹, Vasco Rodrigues², Yasmina Fortier², Henintsoa Rabezanahary¹,
Chloé Borde², Bernard Krust², Guadalupe Andreani¹, Ricardo Silvestre^{3,4},
Constantinos Petrovas⁵, Mireille Laforge² and Jérôme Estaquier^{1,2*}**

¹ Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Québec Research Center, Faculty of Medicine, Laval University, Québec, QC, Canada, ² CNRS FR3636, Faculty of Medecine des Saint-Pères, Paris Descartes University, Paris, France, ³ School of Health Sciences, Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), University of Minho, Braga, Portugal, ⁴ ICVS/3B's-PT Government Associate Laboratory, Braga, Portugal, ⁵Tissue Analysis Core, Vaccine Research Center, NIAID, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

Résumé

Les lymphocytes Tfh, une sous-population de lymphocytes T CD4, sont essentiels pour l'activation, la survie et la différenciation des lymphocytes B en cellules mémoires et plasmocytes productrices d'anticorps spécifiques aux antigènes. Les travaux effectués ces dernières années ont pu mettre en évidence l'importance des cellules Tfh dans le contexte des infections par le VIH-1 et le VIS. La distribution tissulaire des Tfh est également un point important, puisque leur fréquence diffère entre le sang périphérique, les ganglions lymphatiques, et la rate qui est l'organe principal pour l'activation des lymphocytes B, et leur différenciation. Nos observations récentes indiquent une perte précoce et profonde des cellules Tfh dans la rate. Le rôle des facteurs de transcriptions activateurs et répresseurs qui contrôlent la différenciation des Tfh est également discutée dans le contexte de l'infection par le VIH-1/VIS. Puisque les cellules Tfh sont importantes pour la différenciation des lymphocytes B et la production d'anticorps, l'induction des réponses Tfh au début de l'infection par le VIH-1/VIS pourrait être prometteuse en tant que nouvelle approche immunothérapeutique ou stratégie alternative de vaccination. Cependant, parce que les cellules Tfh sont infectées pendant l'infection par le VIH-1/VIS et représentent ainsi un réservoir, cela peut interférer avec la stratégie du vaccin contre le VIH-1. Ainsi, les Tfh représentent les bons et les méchants lors de l'infection par le VIH-1.

ABSTRACT

Follicular T helper (Tfh) cells, a subset of CD4 T lymphocytes, are essential for memory B cell activation, survival, and differentiation and assist B cells in the production of antigen-specific antibodies. Work performed in recent years pointed out the importance of Tfh cells in the context of HIV and SIV infections. The importance of tissue distribution of Tfh is also an important point since their frequency differs between peripheral blood and lymph nodes compared to the spleen, the primary organ for B cell activation, and differentiation. Our recent observations indicated an early and profound loss of splenic Tfh cells. The role of transcriptional activator and repressor factors that control Tfh differentiation is also discussed in the context of HIV/SIV infection. Because Tfh cells are important for B cell differentiation and antibody production, accelerating the Tfh responses early during HIV/SIV infection could be promising as novel immunotherapeutic approach or alternative vaccine strategies. However, because Tfh cells are infected during the HIV/SIV infection and represent a reservoir, this may interfere with HIV vaccine strategy. Thus, Tfh represent the good and bad guys during HIV infection.

Keywords: AIDS, Tfh, CD4, B cell, vaccine, pathogen, SIV, reservoir

Adaptive immunity against pathogens originates with the expansion of antigen-specific T lymphocytes in secondary lymphoid organs. T cells are a heterogeneous population (1). Based on an array of cell surface markers, distinct subsets have been discriminated including naive, central memory (TCM), effector memory (TEM), and terminally differentiated (TDM) T cells (2). The function of TEM T cells is dependent not only on the production of cytokines, but also on the expression of a particular set of chemokine receptors that determine in a combinatorial fashion, the steps of extravasation and positioning in different tissue microenvironments (3–5). The discovery of follicular T helper (Tfh) cells dates back to the early 1990s, during a key period coincident with the acknowledgment of the crucial importance of chemokines in immunology. CXCL13 or B cell-attracting chemokine 1 (BCL6) (6, 7) is the selective chemokine ligand for CXC chemokine receptor 5 (CXCR5, originally named MDR15/BLR1); the phenotypic marker used to characterize Tfh cells in early studies (8, 9). Circulating memory CD4 T cells bearing the phenotype of Tfh cells have been termed

“circulating Tfh” or “peripheral Tfh.” While some assume that peripheral Tfh cells are the *bona fide* circulating counterparts of lymphoid tissue Tfh cells (10, 11), such notion remains controversial (12) as revealed by RNA sequencing (13) and levels of programmed death molecule-1 (PD-1) (14, 15) in circulating Tfh cells compared to those in lymphoid tissues (16). Tfh cells are relatively scarce in peripheral blood.

DYNAMICS OF Tfh CELLS DURING AIDS

Lymphopenia is a hallmark of the progression to AIDS. As infection progresses, CD4 T cell count progressively declines. The excessive induction of apoptosis and immune activation has been proposed as major mechanisms responsible for the CD4 T cell depletion (17, 18). Studies performed in pathogenic and non-pathogenic lentiviral infections in non-human primate models have further suggested a correlation between the pathology and the levels of CD4 T cells apoptosis and immune activation (19–21). The extent of T cells apoptosis in lymph nodes (LNs) during primary infection predicts disease progression (22, 23) and increased apoptosis is also observed in the gut lamina propria (24, 25). In particular, memory CD4⁺ T cells are rapidly depleted in lymphoid tissues (26, 27) and are more prone to undergo apoptosis (23, 28). As a subset of memory CD4 T cells, Tfh cells were expected to undergo progressive depletion during AIDS. However, Tfh frequencies are increased in the blood (29), and LNs of chronically infected individuals (30). This frequency increases among the pool of memory CD4 T cells in SIV-infected monkeys (31–33). On the contrary, Boswell *et al.* (13) showed a loss of Tfh cells during HIV infection. Petrovas *et al.* (34) have initially reported that half of the chronically SIV-infected rhesus macaques (RM) had increased numbers of LN Tfh cells, which are associated with preserved lymphoid architecture and lower accumulation of naive CD4 T cells, a hallmark of non-progression to AIDS. Two recent reports also indicated that the numbers of Tfh are higher in LNs of non-progressor compared to progressor SIV-infected RMs (35, 36). While the spleen contains the majority of Tfh cells, their dynamics in this compartment was still missing. We recently demonstrated an early depletion of splenic Tfh cells after SIV infection of RMs (16). This depletion persists in monkeys progressing faster to AIDS. These results underline the critical impact of tissue compartmentalization on Tfh cell dynamics during AIDS. Therefore, assuming that the

dynamics of circulating Tfh reflects the dynamics of their lymphoid tissue counterparts should be taken with caution and merits to be reevaluated.

TRANSCRIPTIONAL FACTORS AND ABNORMAL DIFFERENTIATION OF Tfh CELLS DURING AIDS

Bcl-6 promotes the Tfh transcriptional program, at least in part by suppressing the expression of the transcriptional regulators such as T-bet (Th1) (37), ROR γ t (Th17) (38), GATA3 (Th2) (39), and Blimp-1 (40–42). Bcl-6 and Blimp-1 are mutually antagonistic, and the balance between the expression of these two factors is a critical element in determining the fate of Tfh cells. Nevertheless, others have proposed an alternative, STAT3-independent pathway, for Tfh cell development (43). In addition to Bcl-6, it has been shown that c-MAF plays an important role in the differentiation and/or function of Tfh cells (44, 45). Among the transcriptional repressors, Krüppel-like factor 2 (KLF2) restrains Tfh cell differentiation by inhibiting CXCR5 and Bcl-6 expression (46, 47) (**Figure 1A**). KLF2 is one of the genes targeted by Foxo1, which has been also shown to negatively regulate the differentiation of Tfh cells through at least the involvement of the E3 ubiquitin ligase Itch (48, 49). KLF2 as well as Foxo1 regulate the expression of CD62L (50, 51), which may have an impact on T cell redistribution. Whereas in uninfected mice, most of Tfh cells are TEM cells (CD45RA–CD62L–), they exhibit a central TEM phenotype (CD45RA–CD62L+) after lymphocytic choriomeningitis virus infection (12). Our results demonstrated similar commutation of Tfh splenocytes during SIV infection (16). Because TCM cells are less prone to die than TEM CD4 T cells of HIV- and SIV-infected individuals (23, 28, 52–54), the observation that splenic Tfh cells of SIV-infected RMs present a switch toward TCM phenotype may reconcile the apparently contradictory observations that the frequency of Tfh cells increases among the pool of memory CD4 T cells, whereas total Tfh cell numbers decreased. Our results have also indicated that Tfh transiently expressed higher levels of Bcl-6 and c-MAF, whereas Foxo1 and KLF2 are increased in Tfh cells of SIV-infected RMs concomitantly with higher levels of CD62L (16) (**Figures 1B and 2**). However, the list of transcriptional factors regulating Tfh cell differentiation is growing, which includes the basic leucine zipper transcriptional ATF-like (BATF), interferon regulatory factor 4, achaete–scute complex homolog 2 (55), NFATC1 (56), STAT1 (57), TCF1 (58–61), and Bob1 (62), and

merit to be further analyzed in the context of AIDS. Our analyses have also indicated higher T-bet expression in splenic Tfh cells at the chronic phase indicating the accumulation of Th1-like Tfh cells (16) (**Figures 1B and 2**). Interestingly, from these initial observations the list of pathogens impacting on Tfh function and differentiation leading to abortive differentiation is growing (63–66). Although T-bet has been reported to antagonize the expression of IL-21 (67, 68), IL-21 mRNA expression in sorted splenic Tfh cells of chronically SIV infected RMs is not lower as compared to splenic Tfh cells isolated from healthy monkeys. The depletion of Tfh cells may participate in the decrease of IL-21 that has been reported in HIV-infected individuals (69, 70). Such observation is of crucial importance, given the known role of IL-21 in controlling chronic viral infections by supporting CD8 T cell function (71–73). Schultz *et al.* (74) proposed that expression of IL-21 can be a surrogate marker for Tfh cells that can be used in various clinical settings as a useful monitoring tool for immune-based interventions aimed at selectively boosting Tfh cell function in humans (74). However, this should be extremely limitative in the sense that IL-21 would be therefore enough to mimic Tfh cell function, not integrating the role of cell–cell contact interaction and the architecture of lymphoid organs.

Tfh CELLS AND B CELL IMMUNITY DURING AIDS

Besides CXCR5 and high levels of PD-1, Tfh cells express the inducible T-cell costimulator (ICOS) and CD40L (57, 75). Thus, Tfh cells provide survival and proliferation signals to B cells *via* CD40L, ICOS, IL-21, and BATF, which compete with death inducing Fas–FasL interactions (76–78). IL-21 production by Tfh cells is an important mediator in most processes occurring inside germinal centers (GCs), namely, affinity maturation, class switching, and differentiation of long-lived plasmacytoid cells. The depletion of Tfh cells in the spleen very early after infection may participate in the absence of maturation and loss of memory B cells (79–81). We found a positive correlation between B cell differentiation and Tfh cell number in the spleen of SIV-infected RMs (16), but no correlation between the extent of infection of Tfh cells and the percentages of memory B cell subsets, suggesting that infection of Tfh cells is not directly associated with abnormal B cell differentiation (16). Cubas and colleagues have proposed that excessive and persistent triggering of PD-1 on LN Tfh cells may affect their ability to provide adequate B cell help (31). It is noteworthy that

patients who are responders to a Flu vaccine display an expansion of circulating Tfh-like cells compared to non-responders (82), supporting a role of Tfh cells in maintaining the pool of long live memory B cells (36). It has been proposed in HIV-infected individuals that a subpopulation of peripheral blood memory PD-1+CXCR5+CD4+ T cells is associated with the development of broadly neutralizing antibodies (bnAbs) (83). In the sera, higher level of CXCL13, the CXCR5 ligand, is associated with the detection of bnAbs positive in HIV-infected individuals (84). They propose that individuals able to generate HIV bnAbs may have superior GC responses (84). On the contrary, defect in Tfh cells can be associated with hypergammaglobulinemia and the absence of bnAbs. Therefore, the early depletion of Tfh cells in the spleen of SIV-infected monkeys may contribute to the absence of efficient B cell immune response in controlling HIV and SIV infections. The significant association between frequency and quality (IFN- γ lowIL-21high) of Env-specific Tfh cells and development of broad neutralization activity was recently described in NHP infected with SHIV virus (36). The co-evolution of virus (a process likely affected by the immunological pressure of the humoral responses too) and Tfh responses could represent major biological factors underlying the development of bnAbs. Investigation of the follicular immune reactions in lymph nodes from patients mounting bnAbs combined with studies utilizing the NHP model could provide critical information regarding the relative impact of these factors on this process. Furthermore, several studies indicate that full expression of the Tfh differentiation program depends on cognate interactions between primed CD4 T cells and antigen-activated B cells (40, 85). Thus, a reciprocal regulation exists between Tfh and GC B cells, mediated by ICOS–ICOSL and CD40–CD40L interactions (86). In mice, the absence of PD-1 impairs Tfh function, resulting in suboptimal synthesis of important cytokines for the differentiation of long-lived plasma B cells (87). In SIV-infected RMs, B cell follicles and GCs become barely distinguishable in progressor animals, but are preserved in non-progressors, highlighting the profound remodeling of the normal splenic architecture that occurs during progression to AIDS (16). Tfh cells are hardly detectable on the B cell follicles of the spleen and LNs (16, 88, 89). Altogether, these observations showing abortive differentiation (quality) associated with the loss of Tfh cells (quantity) provides rationale for interventions aimed at boosting Tfh cell responses in the setting of HIV prevention or therapy, in particular for inducing the generation of more efficient antibodies and bnAbs.

INFECTION OF T_{fh} CELLS

Virus production in human immunodeficiency virus 1-infected individuals is largely the result of a dynamic process involving continuous rounds of *de novo* infection and replication in CD4 T cells with rapid turnover of both free virus and virus-producing cells. Thus, the level of viral load in the peripheral blood is a strong predictor of disease progression in pathogenic lentivirus infection (90–92). Earlier it has been clearly shown that even during clinical latency, HIV infection is never completely silent (93). Productively infected cells are detected at a higher frequency, emphasizing the progressive nature of HIV infection in lymphoid organs. Peripheral lymphoid tissues such as axillary and inguinal (LNs) and the spleen are major sites for HIV/SIV replication. An increasing body of evidence suggests that reservoirs, cell types or anatomical sites (“sanctuaries”), represent a major barrier to virus eradication (94). This has been recently demonstrated by the observation that despite intense ART therapy introduced early after infection, drug regimen has been unable to clear reservoirs (95). In this context, intestine tissues and their draining LNs also represent likely sanctuaries for persistent viral replication due to the particularity of the immune response in these sites, which are exposed to myriad of antigens to surveil the intestinal microbiome (96). In the context of natural infection, it was clearly established that productively infected cells and virus trapped at the follicular dendritic cell (FDC) surface, showing a diffuse labeling over the FDC network in GC, are detectable in lymphoid tissues. The amount of viral particles trapped in the region of GCs increases with the pathogenicity (97, 98). Trapping of SIV in GCs is also observed in non-pathogenic SIV-infected African green monkeys (AGMs) (21) or in sooty mangabeys at the border of the GCs where T_{fh} cells are localized (99). During the early acute phase of infection, the viral dynamics in peripheral blood is quite similar between pathogenic and non-pathogenic lentiviral infections. However, a major distinction is evident by the end of the acute phase with higher numbers of SIV RNA⁺ cells in RMs compared to AGMs, in which productively infected cells are barely detectable (21, 100). In HIV long-term non-progressors, it has been recently reported that B cell follicles represent an active site for viral replication (33), suggesting distinct viral dynamics. Furthermore, a clear difference in the dynamics of GC and B cells is observed between non-pathogenic (AGM) and pathogenic (RM) lentiviral infections. SIV-infected AGMs showed a more prominent B-cell activation than SIV-infected RMs, as manifested by the level of Ki67⁺ cells

in the LN GCs at the set point compared to that in RMs (21, 101, 102). Altogether these observations indicated that the dynamic of GC and innate immunity is inversely correlated with viral replication and pathogenicity in peripheral LNs (100). Growing evidences suggest that Tfh cells are infected by HIV/SIV early after infection (33, 89, 103–105). Splenic Tfh cells are infected early after SIV inoculation in RMs. Importantly, the frequencies and total numbers of SIV DNA+ Tfh cells were higher at the chronic phase in non-progressor than in progressor RMs (16) suggesting that this population may be a latent pool associated with a “silent” Tfh phenotype in non-progressors. Consistent with *in situ* hybridization, few SIV p28 positive cells are observed in follicles of LN GCs of non-progressors (106). Because Tfh cells do not express CCR5, the main co-receptor for HIV and SIV, how to explain that this memory subset is infected? Circulating Tfh cells are more permissive *in vitro* to HIV infection than non-Tfh cells (107). It has been reported that Tfh precursor cells (LN CXCR5+PD-1intCD4+) express CCR5 (106). This observation suggests that this subset (PD-1intCD4+) can be the target of infection and not Tfh themselves (**Figure 2**). Furthermore, the observation that Tfh cells display a TCM phenotype (16) may favor viral persistence because this CD4 T cell subset is less potent to die than TEM CD4 T cell subset. Our results have also demonstrated that despite their high frequency in SIV DNA, Tfh cells of non-progressors showed a similar or lower level of cellular SIV RNA compared to progressors (16), pointing to the fact that non-progressor Tfh cells might be less active to replicate SIV than Tfh cells of progressors, which might be related to the differentiation stage of Tfh cells (central *versus* TEM subset). Interestingly, HIV long terminal repeat contains binding sites for Bcl-6 that has previously been reported to repress HIV transcription (108), which may control HIV replication in Tfh cells. Altogether these results indicate that Tfh cells may represent a potent viral reservoir in lymphoid tissues, in particular in non-progressors.

CONCLUSION

Although this review synthesizes recent advances on the role of Tfh cells in the context of HIV/SIV infections, several key questions remain to be addressed. By which mechanisms Tfh are early lost? Which are the processes leading to abortive Tfh cell differentiation by inducing a Th1-like profile? Does preventing CD4 T cell depletion boost the generation of

high affinity and HIV-neutralizing Abs? Does ART therapy improve the quality and the quantity of splenic Tfh cells? Therefore, understanding the biology and dynamics of Tfh cells in deep tissues is of crucial interest for the development of novel vaccine strategies and the delineation of the cellular and molecular mechanisms leading to the formation of persistent reservoirs for HIV.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

FM, VR, YF, CB, BK, GA, RS, CP, ML, and JE contributed to writing of this review.

FUNDING

This work was supported by grants to JE from the Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites Virales (ANRS) and from The Canadian HIV Cure Enterprise Team Grant HIG-13305 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) in partnership with CANFAR and IAS. FM is supported by a fellowship from Fondation du CHU de Québec. CB and YF are supported by fellowships from ANRS. JE acknowledges the support of the Canada Research Chair program. RS is supported by FCT—Fundação para a Ciência e a Tecnologia/MEC—Ministério da Educação e Ciência através de fundos nacionais e quando aplicável cofinanciado pelo FEDER, no âmbito do Acordo de Parceria PT2020 referente à unidade de investigação n°4293. RS is supported by the Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) (IF/00021/2014).

REFERENCES

1. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* (1999) 401:708–12. doi:10.1038/44385
2. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* (2004) 22:745–63. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702
3. Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* (2009) 30:646–55. doi:10.1016/j.immuni.2009.05.001
4. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* (1996) 272:60–6. doi:10.1126/science.272.5258.60
5. Bromley SK, Mempel TR, Luster AD. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat Immunol* (2008) 9:970–80. doi:10.1038/ni.f.213
6. Legler DF, Loetscher M, Roos RS, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5. *J Exp Med* (1998) 187:655–60. doi:10.1084/jem.187.4.655
7. Gunn MD, Ngo VN, Ansel KM, Ekland EH, Cyster JG, Williams LT. A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature* (1998) 391:799–803. doi:10.1038/35876
8. Barella L, Loetscher M, Tobler A, Baggiolini M, Moser B. Sequence variation of a novel heptahelical leucocyte receptor through alternative transcript formation. *Biochem J* (1995) 309(Pt 3):773–9. doi:10.1042/bj3090773
9. Dobner T, Wolf I, Emrich T, Lipp M. Differentiation-specific expression of a novel G protein-coupled receptor from Burkitt's lymphoma. *Eur J Immunol* (1992) 22:2795–9. doi:10.1002/eji.1830221107
10. He J, Tsai LM, Leong YA, Hu X, Ma CS, Chevalier N, et al. Circulating precursor CCR7(lo)PD-1(hi) CXCR5(+) CD4(+) T cells indicate Tfh cell activity and promote antibody responses upon antigen reexposure. *Immunity* (2013) 39:770–81. doi:10.1016/j.immuni.2013.09.007
11. Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G, et al. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* (2011) 34:108–21. doi:10.1016/j.immuni.2011.01.009
12. Hale JS, Youngblood B, Latner DR, Mohammed AU, Ye L, Akondy RS, et al. Distinct memory CD4+ T cells with commitment to T follicular helper- and T helper 1-cell lineages are generated after acute viral infection. *Immunity* (2013) 38:805–17. doi:10.1016/j.immuni.2013.02.020

13. Boswell KL, Paris R, Boritz E, Ambrozak D, Yamamoto T, Darko S, et al. Loss of circulating CD4 T cells with B cell helper function during chronic HIV infection. *PLoS Pathog* (2014) 10:e1003853. doi:10.1371/journal.ppat.1003853
14. Ansel KM, McHeyzer-Williams LJ, Ngo VN, McHeyzer-Williams MG, Cyster JG. In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *J Exp Med* (1999) 190:1123–34. doi:10.1084/jem.190.8.1123
15. Kim CH, Rott LS, Clark-Lewis I, Campbell DJ, Wu L, Butcher EC. Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J Exp Med* (2001) 193:1373–81. doi:10.1084/jem.193.12.1373
16. Moukambi F, Rabazanahary H, Rodrigues V, Racine G, Robitaille L, Krust B, et al. Early loss of splenic Tfh cells in SIV-infected rhesus macaques. *PLoS Pathog* (2015) 11:e1005287. doi:10.1371/journal.ppat.1005287
17. Ameisen JC, Estaquier J, Idziorek T, De Bels F. The relevance of apoptosis to AIDS pathogenesis. *Trends Cell Biol* (1995) 5:27–32. doi:10.1016/S0962-8924(00)88933-3
18. Hurtrel B, Petit F, Arnoult D, Muller-Trutwin M, Silvestri G, Estaquier J. Apoptosis in SIV infection. *Cell Death Differ* (2005) 12(Suppl 1):979–90. doi:10.1038/sj.cdd.4401600
19. Estaquier J, Idziorek T, de Bels F, Barre-Sinoussi F, Hurtrel B, Aubertin AM, et al. Programmed cell death and AIDS: significance of T-cell apoptosis in pathogenic and nonpathogenic primate lentiviral infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1994) 91:9431–5. doi:10.1073/pnas.91.20.9431
20. Silvestri G, Sodora DL, Koup RA, Paiardini M, O’Neil SP, McClure HM, et al. Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity* (2003) 18:441–52. doi:10.1016/S1074-7613(03)00060-8
21. Cumont MC, Diop O, Vaslin B, Elbim C, Viollet L, Monceaux V, et al. Early divergence in lymphoid tissue apoptosis between pathogenic and nonpathogenic simian immunodeficiency virus infections of nonhuman primates. *J Virol* (2008) 82:1175–84. doi:10.1128/JVI.00450-07
22. Monceaux V, Estaquier J, Fevrier M, Cumont MC, Riviere Y, Aubertin AM, et al. Extensive apoptosis in lymphoid organs during primary SIV infection predicts rapid progression towards AIDS. *AIDS* (2003) 17:1585–96. doi:10.1097/00002030-200307250-00002
23. Viollet L, Monceaux V, Petit F, Ho Tsong Fang R, Cumont MC, Hurtrel B, et al. Death of CD4+ T cells from lymph nodes during primary SIVmac251 infection predicts the rate of AIDS progression. *J Immunol* (2006) 177:6685–94. doi:10.4049/jimmunol.177.10.6685
24. Li Q, Duan L, Estes JD, Ma ZM, Rourke T, Wang Y, et al. Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature* (2005) 434:1148–52. doi:10.1038/nature03513

25. Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* (2005) 434:1093–7. doi:10.1038/nature03501
26. Picker LJ, Hagen SI, Lum R, Reed-Inderbitzin EF, Daly LM, Sylwester AW, et al. Insufficient production and tissue delivery of CD4+ memory T cells in rapidly progressive simian immunodeficiency virus infection. *J Exp Med* (2004) 200:1299–314. doi:10.1084/jem.20041049
27. Veazey RS, Tham IC, Mansfield KG, DeMaria M, Forand AE, Shvetz DE, et al. Identifying the target cell in primary simian immunodeficiency virus (SIV) infection: highly activated memory CD4(+) T cells are rapidly eliminated in early SIV infection in vivo. *J Virol* (2000) 74:57–64. doi:10.1128/JVI.74.1.57-64.2000
28. Arnoult D, Petit F, Lelievre JD, Lecossier D, Hance A, Monceaux V, et al. Caspase-dependent and -independent T-cell death pathways in pathogenic simian immunodeficiency virus infection: relationship to disease progression. *Cell Death Differ* (2003) 10:1240–52. doi:10.1038/sj.cdd.4401289
29. Yue FY, Lo C, Sakhdari A, Lee EY, Kovacs CM, Benko E, et al. HIV-specific IL-21 producing CD4+ T cells are induced in acute and chronic progressive HIV infection and are associated with relative viral control. *J Immunol* (2010) 185:498–506. doi:10.4049/jimmunol.0903915
30. Lindqvist M, van Lunzen J, Soghoian DZ, Kuhl BD, Ranasinghe S, Kranias G, et al. Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. *J Clin Invest* (2012) 122:3271–80. doi:10.1172/JCI64314
31. Cubas RA, Mudd JC, Savoye AL, Perreau M, van Grevenynghe J, Metcalf T, et al. Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nat Med* (2013) 19:494–9. doi:10.1038/nm.3109
32. Brenchley JM, Vinton C, Tabb B, Hao XP, Connick E, Paiardini M, et al. Differential infection patterns of CD4+ T cells and lymphoid tissue viral burden distinguish progressive and nonprogressive lentiviral infections. *Blood* (2012) 120:4172–81. doi:10.1182/blood-2012-06-437608
33. Fukazawa Y, Lum R, Okoye AA, Park H, Matsuda K, Bae JY, et al. B cell follicle sanctuary permits persistent productive simian immunodeficiency virus infection in elite controllers. *Nat Med* (2015) 21:132–9. doi:10.1038/nm.3781
34. Petrovas C, Yamamoto T, Gerner MY, Boswell KL, Wloka K, Smith EC, et al. CD4 T follicular helper cell dynamics during SIV infection. *J Clin Invest* (2012) 122:3281–94. doi:10.1172/JCI63039
35. Xu H, Wang X, Malam N, Lackner AA, Veazey RS. Persistent simian immunodeficiency virus infection causes ultimate depletion of follicular Th cells in AIDS. *J Immunol* (2015) 195:4351–7. doi:10.4049/jimmunol.1501273
36. Yamamoto T, Lynch RM, Gautam R, Matus-Nicodemos R, Schmidt SD, Boswell KL, et al. Quality and quantity of TFH cells are critical for broad antibody development in SHIVAD8 infection. *Sci Transl Med* (2015) 7:298ra120. doi:10.1126/scitranslmed.aab3964

37. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* (2000)100:655–69. doi:10.1016/S0092-8674(00)80702-3
38. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* (2006) 126:1121–33. doi:10.1016/j.cell.2006.07.035
39. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* (1997) 89:587–96. doi:10.1016/S0092-8674(00)80240-8
40. Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, Barnett B, et al. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* (2009) 325:1006–10. doi:10.1126/science.1175870
41. Nurieva RI, Chung Y, Martinez GJ, Yang XO, Tanaka S, Matskevitch TD, et al. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* (2009) 325:1001–5. doi:10.1126/science.1176676
42. Yu D, Rao S, Tsai LM, Lee SK, He Y, Sutcliffe EL, et al. The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity* (2009) 31:457–68. doi:10.1016/j.immuni.2009.07.002
43. Eddahri F, Denanglaire S, Bureau F, Spolski R, Leonard WJ, Leo O, et al. Interleukin-6/STAT3 signaling regulates the ability of naive T cells to acquire B-cell help capacities. *Blood* (2009) 113:2426–33. doi:10.1182/blood-2008-04-154682
44. Bauquet AT, Jin H, Paterson AM, Mitsdoerffer M, Ho IC, Sharpe AH, et al. The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat Immunol* (2009) 10:167–75. doi:10.1038/ni.1690
45. Kroenke MA, Eto D, Locci M, Cho M, Davidson T, Haddad EK, et al. Bcl6 and Maf cooperate to instruct human follicular helper CD4 T cell differentiation. *J Immunol* (2012) 188:3734–44. doi:10.4049/jimmunol.1103246
46. Lee JY, Skon CN, Lee YJ, Oh S, Taylor JJ, Malhotra D, et al. The transcription factor KLF2 restrains CD4(+) T follicular helper cell differentiation. *Immunity* (2015) 42:252–64. doi:10.1016/j.immuni.2015.01.013
47. Weber JP, Fuhrmann F, Feist RK, Lahmann A, Al Baz MS, Gentz LJ, et al. ICOS maintains the T follicular helper cell phenotype by down-regulating Kruppel-like factor 2. *J Exp Med* (2015) 212:217–33. doi:10.1084/jem.20141432
48. Wang H, Geng J, Wen X, Bi E, Kossenkov AV, Wolf AI, et al. The transcription factor Foxp1 is a critical negative regulator of the differentiation of follicular helper T cells. *Nat Immunol* (2014) 15:667–75. doi:10.1038/ni.2890

49. Xiao N, Eto D, Elly C, Peng G, Crotty S, Liu YC. The E3 ubiquitin ligase Itch is required for the differentiation of follicular helper T cells. *Nat Immunol* (2014) 15:657–66. doi:10.1038/ni.2912
50. Fabre S, Carrette F, Chen J, Lang V, Semichon M, Denoyelle C, et al. FOXO1 regulates I-selectin and a network of human T cell homing molecules downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol* (2008) 181:2980–9. doi:10.4049/jimmunol.181.5.2980
51. Kerdiles YM, Beisner DR, Tinoco R, Dejean AS, Castrillon DH, DePinho RA, et al. Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating I-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nat Immunol* (2009) 10:176–84. doi:10.1038/ni.1689
52. Estaquier J, Idziorek T, Zou W, Emilie D, Farber CM, Bourez JM, et al. T helper type 1/T helper type 2 cytokines and T cell death: preventive effect of interleukin 12 on activation-induced and CD95 (FAS/APO-1)-mediated apoptosis of CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected persons. *J Exp Med* (1995) 182:1759–67. doi:10.1084/jem.182.6.1759
53. Estaquier J, Tanaka M, Suda T, Nagata S, Golstein P, Ameisen JC. Fas-mediated apoptosis of CD4+ and CD8+ T cells from human immunodeficiency virus-infected persons: differential in vitro preventive effect of cytokines and protease antagonists. *Blood* (1996) 87:4959–66.
54. Katsikis PD, Wunderlich ES, Smith CA, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Fas antigen stimulation induces marked apoptosis of T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Exp Med* (1995) 181:2029–36. doi:10.1084/jem.181.6.2029
55. Liu X, Chen X, Zhong B, Wang A, Wang X, Chu F, et al. Transcription factor achaete-scute homologue 2 initiates follicular T-helper-cell development. *Nature* (2014) 507:513–8. doi:10.1038/nature12910
56. Vaeth M, Muller G, Stauss D, Dietz L, Klein-Hessling S, Serfling E, et al. Follicular regulatory T cells control humoral autoimmunity via NFAT2-regulated CXCR5 expression. *J Exp Med* (2014) 211:545–61. doi:10.1084/jem.20130604
57. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* (2011) 29:621–63. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101400
58. Oestreich KJ, Mohn SE, Weinmann AS. Molecular mechanisms that control the expression and activity of Bcl-6 in TH1 cells to regulate flexibility with a TFH-like gene profile. *Nat Immunol* (2012) 13:405–11. doi:10.1038/ni.2242
59. Ballesteros-Tato A, Leon B, Graf BA, Moquin A, Adams PS, Lund FE, et al. Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper cell differentiation. *Immunity* (2012) 36:847–56. doi:10.1016/j.immuni.2012.02.012
60. Nurieva RI, Podd A, Chen Y, Alekseev AM, Yu M, Qi X, et al. STAT5 protein negatively regulates T follicular helper (Tfh) cell generation and function. *J Biol Chem* (2012) 287:11234–9. doi:10.1074/jbc.M111.324046
61. Johnston RJ, Choi YS, Diamond JA, Yang JA, Crotty S. STAT5 is a potent negative regulator of TFH cell differentiation. *J Exp Med* (2012) 209:24350. doi:10.1084/jem.20111174

62. Yamashita K, Kawata K, Matsumiya H, Kamekura R, Jitsukawa S, Nagaya T, et al. Bob1 limits cellular frequency of T-follicular helper cells. *Eur J Immunol* (2016) 46:1361–70. doi:10.1002/eji.201545499
63. Pepper M, Pagan AJ, Igyarto BZ, Taylor JJ, Jenkins MK. Opposing signals from the Bcl6 transcription factor and the interleukin-2 receptor generate T helper 1 central and effector memory cells. *Immunity* (2011) 35:583–95. doi:10.1016/j.immuni.2011.09.009
64. Nakayamada S, Kanno Y, Takahashi H, Jankovic D, Lu KT, Johnson TA, et al. Early Th1 cell differentiation is marked by a Tfh cell-like transition. *Immunity* (2011) 35:919–31. doi:10.1016/j.immuni.2011.11.012
65. Rodrigues V, Laforge M, Campillo-Gimenez L, Soundaramourty C, Correia-de-Oliveira A, Dinis-Oliveira RJ, et al. Abortive T follicular helper development is associated with a defective humoral response in *Leishmania infantum*-infected macaques. *PLoS Pathog* (2014) 10:e1004096. doi:10.1371/journal.ppat.1004096
66. Obeng-Adjei N, Portugal S, Tran TM, Yazew TB, Skinner J, Li S, et al. Circulating Th1-cell-type Tfh cells that exhibit impaired B Cell help are preferentially activated during acute malaria in children. *Cell Rep* (2015) 13:425–39. doi:10.1016/j.celrep.2015.09.004
67. Mehta DS, Wurster AL, Weinmann AS, Grusby MJ. NFATc2 and T-bet contribute to T-helper-cell-subset-specific regulation of IL-21 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) 102:2016–21. doi:10.1073/pnas.0409512102
68. Suto A, Kashiwakuma D, Kagami S, Hirose K, Watanabe N, Yokote K, et al. Development and characterization of IL-21-producing CD4+ T cells. *J Exp Med* (2008) 205:1369–79. doi:10.1084/jem.20072057
69. Iannello A, Boulassel MR, Samarani S, Debbèche O, Tremblay C, Toma E, et al. Dynamics and consequences of IL-21 production in HIV-infected individuals: a longitudinal and cross-sectional study. *J Immunol* (2010) 184:114–26. doi:10.4049/jimmunol.0901967
70. Bekele Y, Amu S, Bobosha K, Lantto R, Nilsson A, Endale B, et al. Impaired phenotype and function of T follicular helper cells in HIV-1-infected children receiving ART. *Medicine (Baltimore)* (2015) 94:e1125. doi:10.1097/MD.0000000000001125
71. Elsaesser H, Sauer K, Brooks DG. IL-21 is required to control chronic viral infection. *Science* (2009) 324:1569–72. doi:10.1126/science.1174182
72. Frohlich A, Kisielow J, Schmitz I, Freigang S, Shamshiev AT, Weber J, et al. IL-21R on T cells is critical for sustained functionality and control of chronic viral infection. *Science* (2009) 324:1576–80. doi:10.1126/science.1172815
73. Yi JS, Du M, Zajac AJ. A vital role for interleukin-21 in the control of a chronic viral infection. *Science* (2009) 324:1572–6. doi:10.1126/science.1175194

74. Schultz BT, Teigler JE, Pissani F, Oster AF, Kranias G, Alter G, et al. Circulating HIV-specific interleukin-21(+)CD4(+) T cells represent peripheral Tfh cells with antigen-dependent helper functions. *Immunity* (2016) 44:167–78. doi:10.1016/j.immuni.2015.12.011
75. Ma CS, Deenick EK, Batten M, Tangye SG. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J Exp Med* (2012) 209:1241–53. doi:10.1084/jem.20120994
76. Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L, et al. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* (2008) 29:138–49. doi:10.1016/j.immuni.2008.07.010
77. Linterman MA, Beaton L, Yu D, Ramiscal RR, Srivastava M, Hogan JJ, et al. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J Exp Med* (2010) 207:353–63. doi:10.1084/jem.20091738
78. Zotos D, Coquet JM, Zhang Y, Light A, D’Costa K, Kallies A, et al. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J Exp Med* (2010) 207:365–78. doi:10.1084/jem.20091777
79. Moir S, Fauci AS. B cells in HIV infection and disease. *Nat Rev Immunol* (2009) 9:235–45. doi:10.1038/nri2524
80. Moir S, Malaspina A, Pickeral OK, Donoghue ET, Vasquez J, Miller NJ, et al. Decreased survival of B cells of HIV-viremic patients mediated by altered expression of receptors of the TNF superfamily. *J Exp Med* (2004) 200:587–99. doi:10.1084/jem.20032236
81. Kuhrt D, Faith SA, Leone A, Rohankedkar M, Sodora DL, Picker LJ, et al. Evidence of early B-cell dysregulation in simian immunodeficiency virus infection: rapid depletion of naive and memory B-cell subsets with delayed reconstitution of the naive B-cell population. *J Virol* (2010) 84:2466–76. doi:10.1128/JVI.01966-09
82. Pallikkuth S, Parmigiani A, Silva SY, George VK, Fischl M, Pahwa R, et al. Impaired peripheral blood T-follicular helper cell function in HIV-infected nonresponders to the 2009 H1N1/09 vaccine. *Blood* (2012) 120:985–93. doi:10.1182/blood-2011-12-396648
83. Locci M, Havenar-Daughton C, Landais E, Wu J, Kroenke MA, Arlehamn CL, et al. Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity* (2013) 39:758–69. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.031
84. Havenar-Daughton C, Lindqvist M, Heit A, Wu JE, Reiss SM, Kendric K, et al. CXCL13 is a plasma biomarker of germinal center activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2016) 113:2702–7. doi:10.1073/pnas.1520112113
85. Kerfoot SM, Yaari G, Patel JR, Johnson KL, Gonzalez DG, Kleinstein SH, et al. Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone. *Immunity* (2011) 34:947–60. doi:10.1016/j.immuni.2011.03.024

86. Baumjohann D, Preite S, Reboldi A, Ronchi F, Ansel KM, Lanzavecchia A et al. Persistent antigen and germinal center B cells sustain T follicular helper cell responses and phenotype. *Immunity* (2013) 38:596–605. doi:10.1016/j.immuni.2012.11.020
87. Good-Jacobson KL, Szumilas CG, Chen L, Sharpe AH, Tomayko MM, Shlomchik MJ. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat Immunol* (2010) 11:535–42. doi:10.1038/ni.1877
88. Hong JJ, Amancha PK, Rogers K, Ansari AA, Villinger F. Spatial alterations between CD4(+) T follicular helper, B, and CD8(+) T cells during simian immunodeficiency virus infection: T/B cell homeostasis, activation, and potential mechanism for viral escape. *J Immunol* (2012) 188:3247–56. doi:10.4049/jimmunol.1103138
89. Xu Y, Weatherall C, Bailey M, Alcantara S, De Rose R, Estaquier J, et al. Simian immunodeficiency virus infects follicular helper CD4 T cells in lymphoid tissues during pathogenic infection of pigtail macaques. *J Virol* (2013) 87:3760–73. doi:10.1128/JVI.02497-12
90. Lifson JD, Nowak MA, Goldstein S, Rossio JL, Kinter A, Vasquez G, et al. The extent of early viral replication is a critical determinant of the natural history of simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* (1997) 71:9508–14.
91. Mellors JW, Rinaldo CR Jr, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* (1996) 272:1167–70. doi:10.1126/science.272.5265.1167
92. Watson A, Ranchalis J, Travis B, McClure J, Sutton W, Johnson PR, et al. Plasma viremia in macaques infected with simian immunodeficiency virus: plasma viral load early in infection predicts survival. *J Virol* (1997) 71:284–90.
93. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* (1993) 362:355–8. doi:10.1038/362355a0
94. Blankson JN, Persaud D, Siliciano RF. The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu Rev Med* (2002) 53:557–93. doi:10.1146/annurev.med.53.082901.104024
95. Whitney JB, Hill AL, Sanisetty S, Penaloza-MacMaster P, Liu J, Shetty M, et al. Rapid seeding of the viral reservoir prior to SIV viraemia in rhesus monkeys. *Nature* (2014) 512:74–7. doi:10.1038/nature13594
96. Cumont MC, Monceaux V, Viollet L, Lay S, Parker R, Hurtrel B, et al. TGF-beta in intestinal lymphoid organs contributes to the death of armed effector CD8 T cells and is associated with the absence of virus containment in *Rhesus macaques* infected with the simian immunodeficiency virus. *Cell Death Differ* (2007) 14:1747–58. doi:10.1038/sj.cdd.4402192
97. Chakrabarti L, Cumont MC, Montagnier L, Hurtrel B. Variable course of primary simian immunodeficiency virus infection in lymph nodes: relation to disease progression. *J Virol* (1994) 68:6634–43.

98. Chakrabarti L, Baptiste V, Khatissian E, Cumont MC, Aubertin AM, Montagnier L, et al. Limited viral spread and rapid immune response in lymph nodes of macaques inoculated with attenuated simian immunodeficiency virus. *Virology* (1995) 213:535–48. doi:10.1006/viro.1995.0026
99. Rey-Cuille MA, Berthier JL, Bomsel-Demontoy MC, Chaduc Y, Montagnier L, Hovanessian AG, et al. Simian immunodeficiency virus replicates to high levels in sooty mangabeys without inducing disease. *J Virol* (1998) 72:3872–86.
100. Campillo-Gimenez L, Laforge M, Fay M, Brussel A, Cumont MC, Monceaux V, et al. Nonpathogenesis of simian immunodeficiency virus infection is associated with reduced inflammation and recruitment of plasmacytoid dendritic cells to lymph nodes, not to lack of an interferon type I response, during the acute phase. *J Virol* (2010) 84:1838–46. doi:10.1128/JVI.01496-09
101. Goldstein S, Brown CR, Ourmanov I, Pandrea I, Buckler-White A, Erb C, et al. Comparison of simian immunodeficiency virus SIV_{agmVer} replication and CD4⁺ T-cell dynamics in vervet and sabaeus African green monkeys. *J Virol* (2006) 80:4868–77. doi:10.1128/JVI.80.10.4868-4877.2006
102. Pandrea I, Apetrei C, Dufour J, Dillon N, Barbercheck J, Metzger M, et al. Simian immunodeficiency virus SIV_{agm.sab} infection of Caribbean African green monkeys: a new model for the study of SIV pathogenesis in natural hosts. *J Virol* (2006) 80:4858–67. doi:10.1128/JVI.80.10.4858-4867.2006
103. Perreau M, Savoye AL, De Crignis E, Corpataux JM, Cubas R, Haddad EK, et al. Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *J Exp Med* (2013) 210:143–56. doi:10.1084/jem.20121932
104. Kohler SL, Pham MN, Folkvord JM, Arends T, Miller SM, Miles B, et al. Germinal center T follicular helper cells are highly permissive to HIV-1 and alter their phenotype during virus replication. *J Immunol* (2016) 196:2711–22. doi:10.4049/jimmunol.1502174
105. Boritz EA, Darko S, Swaszek L, Wolf G, Wells D, Wu X, et al. Multiple origins of virus persistence during natural control of HIV infection. *Cell* (2016) 166(4):1004–15. doi:10.1016/j.cell.2016.06.039
106. Xu H, Wang X, Malam N, Aye PP, Alvarez X, Lackner AA, et al. Persistent simian immunodeficiency virus infection drives differentiation, aberrant accumulation, and latent infection of germinal center follicular T helper cells. *J Virol* (2015) 90:1578–87. doi:10.1128/JVI.02471-15
107. Pallikkuth S, Sharkey M, Babic DZ, Gupta S, Stone GW, Fischl MA, et al. Peripheral T follicular helper cells are the major HIV reservoir within central memory CD4 T cells in peripheral blood from chronically HIV-infected individuals on combination antiretroviral therapy. *J Virol* (2015) 90:2718–28. doi:10.1128/JVI.02883-15
108. Baron BW, Desai M, Baber LJ, Paras L, Zhang Q, Sadhu A, et al. BCL6 can repress transcription from the human immunodeficiency virus type I promoter/enhancer region. *Genes Chromosomes Cancer* (1997) 19:14–21. doi:10.1002/(SICI)1098-2264(199705)19:1<14::AID-GCC3>3.0.CO;2-3

Conflict of Interest Statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest. *Copyright © 2017 Moukambi, Rodrigues, Fortier, Rabezanahary, Borde, Krust, Andreani, Silvestre, Petrovas, Laforge and Estaquier. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.*

Figure Legends

FIGURE 1: Reciprocal expression of transcriptional factors in Th1 and follicular T helper (Tfh) cells. (A) T-bet is the principal transcription factor for the differentiation and function of Th1 CD4 T cell. T-bet inhibits the expression of programmed death molecule-1 (PD-1) but induces IL-2 and IFN- γ , which in turn leads to the expression of Foxo1 and Krüppel-like factor 2 (KLF2). These factors including Blimp-1 inhibit Bcl-6, c-MAF, TCF1, and LEF1 necessary for the differentiation and function of Tfh cells. (B) In the context of HIV/SIV infection, a Th1-like Tfh profile is associated with the expression of T-bet.

FIGURE 2: Follicular T helper (Tfh) cell, a reservoir for HIV. Tfh precursor cells that express CCR5, the main co-receptor for HIV/SIV entry, are early infected. Because Foxo1 and Krüppel-like factor 2 (KLF2) are upregulated in Tfh cells during HIV/SIV infection, these transcriptional factors control the full maturation of Tfh leading to central memory cells associated with the expression of CD62L. Because these cells are less sensitive to undergo death than effector memory T cells, infected Tfh cells represent potent reservoirs for viral replication.

Figures

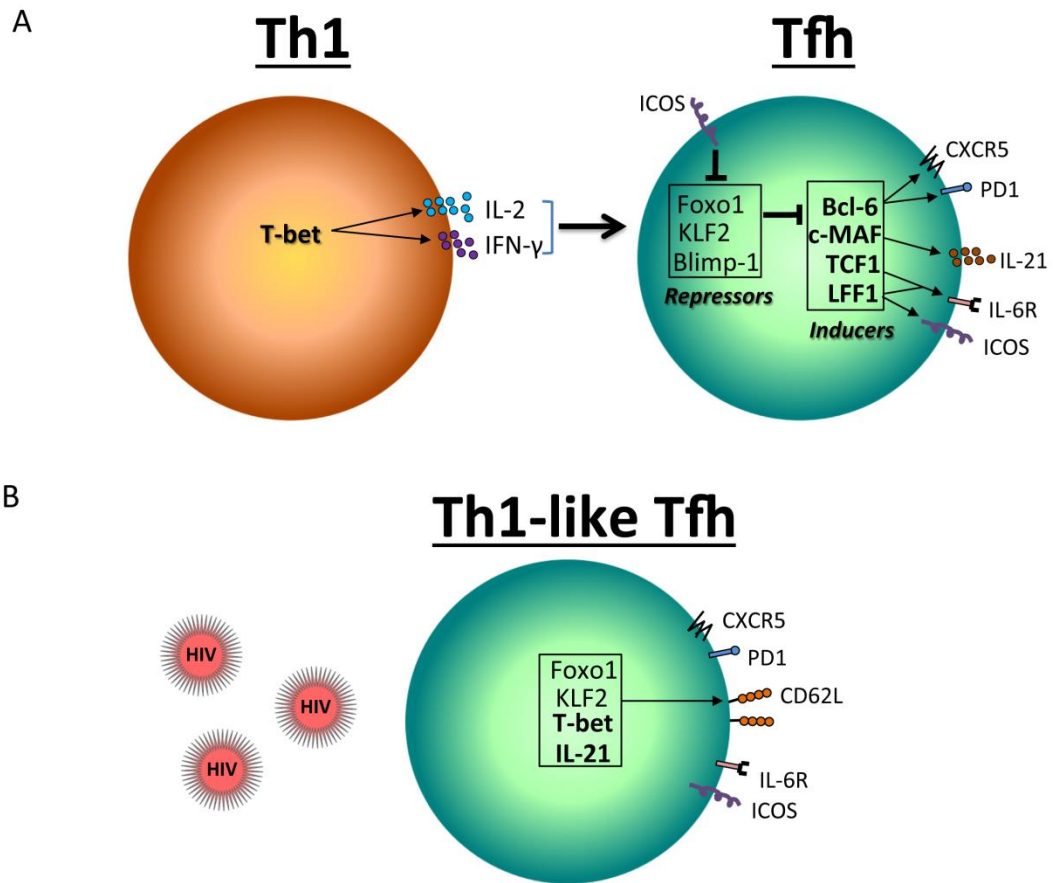


Figure 1

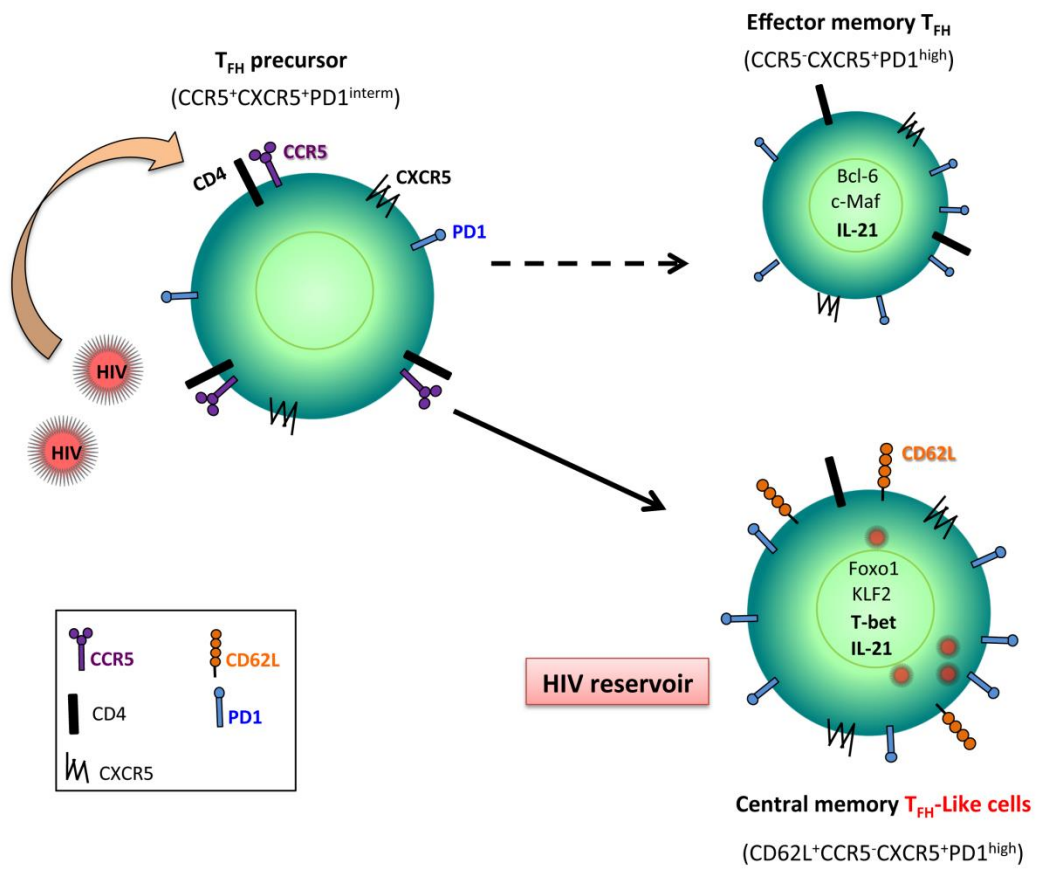


Figure 2