HAL
open science

Étude de la réponse immunitaire au traitement antirétroviral au cours de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine

Julien Saison

To cite this version:

Julien Saison. Étude de la réponse immunitaire au traitement antirétroviral au cours de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine. Microbiologie et Parasitologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10108 . tel-01661456

HAL Id: tel-01661456

https://theses.hal.science/tel-01661456

Submitted on 12 Dec 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Ecole doctorale 341 - Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation

Etude de la réponse immunitaire au traitement antirétroviral au cours de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine

Thèse d'université

Présentée à l'Université Claude Bernard -Lyon 1

et soutenue publiquement le 07 09 2015

pour obtenir le grade de Docteur en Science

par

Mr SAISON Julien
Né(e) le 08 07 1983 à Lannemezan (65)

Directeur de thèse
Pr FERRY Tristan

Membres du Jury
Pr CHIDIAC Christian (président)
Dr CARCELAIN Brigitte (rapporteur)
Pr LE MOING Vincent (rapporteur)
Pr CALMY Alexandra
Pr MONNERET Guillaume
Pr FERRY Tristan

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. François-Noël GILLY**
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe LALLE
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur Germain GILLET
Directeur Général des Services	M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. FLEURY
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme Caroline FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. Jean-Claude PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. P. FOURNIER
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Ecole doctorale :

ED 341 E2M2

Ecologie, Ecosystèmes, Microbiologie et Modélisation

Directeur de Thèse :

Pr FERRY Tristan

Laboratoire de rattachement :

Pr VANDENESH François,
Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, Université Lyon 1, CNRS, UMR 5308, Lyon, France.

Laboratoire où a été réalisée la thèse :

Pr MONNERET Guillaume,
Laboratoire d'immunologie cellulaire,
Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon

Rapporteurs :

Dr CARCELAIN Brigitte

Pr LE MOING Vincent

Président du jury :

Pr CHIDIAC Christian

Membres du Jury :

Pr CALMY Alexandra

Dr CARCELAIN Brigitte

Pr LE MOING Vincent

Pr MONNERET Guillaume

Pr FERRY Tristan

REMERCIEMENTS

A Monsieur Christian Chidiac, pour avoir accepté de présider cette soutenance de thèse, et pour m'avoir offert l'opportunité de travailler dans un service formidable ;

A Mme Brigitte Carcelain et Mr Vincent Le Moing, pour leur relecture attentive du manuscrit ;

A Mme Alexandra Calmy, pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail ;

A Guillaume Monneret, merci d'avoir accepté dans votre laboratoire un interne de médecine, puis d'avoir su le faire progresser dans la connaissance et la compréhension de mécanismes au moins aussi complexes que passionnants ; merci de votre confiance, de votre disponibilité, et de vos conseils qui ont permis la réalisation de ces différents travaux.

A Tristan Ferry, pour ton encadrement rassurant et constant depuis le début de mon internat, pour la patience que tu as montré, pour la confiance que tu m'as accordée lorsque le projet « Treg » a débuté, et enfin pour tes conseils toujours pertinents ;

A Delphine Maucort-Boulch, merci pour ton soutien lors des comités de pilotage, de ton enseignement en statistique, des nombreuses heures passées à élaborer un modèle permettant d'interpréter les données brutes de notre étude prospective, ainsi qu'à ta relecture attentive des manuscrits ;

A Fabienne Venet, pour ses nombreuses et enrichissantes relectures ;

A Julie Demaret, pour ton aide à de nombreux niveaux, du réglage de centrifugeuse au coaching linguistique…;

A tous mes collègues médicaux, biologistes, pharmaciens, paramédicaux et techniciens qui font du labeur quotidien un plaisir partagé ;

A tous les personnels de laboratoires, à tous les patients.

A ma femme, Camille, que j'aime, à ton soutien pendant ces difficiles années, à ta gestion parfaite de la « Saison's PME » et surtout de notre petite famille, qui te doit beaucoup ;

A nos filles chéries, Zélie et Agathe, qui sont parvenues à égayer ces années laborieuses, chaque jour plus brillantes, charmantes et adorables…vous êtes ce que nous avons de plus cher et de plus précieux ;

A tous les moments à venir où nous allons profiter ensemble de la vie et des projets que nous avons imaginés ;

A mon frère Grégoire, super star, je t'adore, bon courage pour les années à venir, je serais toujours là pour toi ;

A mes parents, pour m'avoir transmis vos valeurs, et le goût des bons moments, merci pour votre soutien pendant ces années d'études et encore actuellement ;

A tous nos amis, merci d'être vous, d'être là malgré la distance parfois, de nous faire marrer et partager des moments qui seront, espérons-le, toujours plus énormes et secs.

A Killian Jornet et Fréderic Dard, qui chacun de leur façon ont pu me permettre lors des moments difficiles de décompresser.

LISTE DES ABREVIATIONS ***10***

RESUME ***11***

INTRODUCTION ***15***

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES ***17***

I. VIH ET IMMUNITE 17

A. Infection par le VIH : mécanismes conduisant à la lymphopénie T CD4
B. Infection par le VIH : activation immune
C. Mécanismes de régulation/contrôle de la lymphopénie

II. TREG ET INFECTION PAR LE VIH 25

A. Généralité sur l'induction et la régulation de la réponse immune
B. Généralité sur les Treg
C. Modes d'action des Treg
D. Phénotypage des Treg
E. Les Treg en pathologie infectieuse
F. Treg et infection chronique par le VIH

III. IMPACT DE LA TARV SUR LES PERTURBATIONS IMMUNITAIRES INDUITES PAR LE VIH 38

A. Généralité sur la TARV
B. Réponse immunitaire à la TARV
C. Définition de la non réponse immunologique (NRI)
D. Conséquences de la NRI
E. Les facteurs associés à la NRI
F. Réponse immunitaire à la TARV : effets sur l'activation immune
G. Réponse immunitaire à la TARV : effets sur les Treg

SYNTHESE DE LA PROBLEMATIQUE ***59***

Et introduction aux travaux réalisés

TRAVAIL PERSONNEL ***61***

Article 1 61

Article 2 70

Article 3 83

Article 4 90

DISCUSSION ***111***

I. SYNTHESE DES RESULTATS 111

A. Les marqueurs de réponse immune à la TARV : pourcentage de Treg et nadir de LT CD4

B. Réflexion sur la définition de la réponse immune à la TARV

C. Amélioration du phénotypage des Treg

D. Evolution du pourcentage de Treg sous TARV

II. LIMITES 116

III. OUVERTURES 117

A. Meilleur dépistage des personnes à risques de NRI

B. Perturbations homéostatiques des LT CD4 chez les NRI

C. Les Treg dans la réponse immune discordante : une cible thérapeutique ?

IV. PROJETS 121

CONCLUSION ***122***

BIBLIOGRAPHIE ***123***

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
Ag : antigène
ARN : Acide ribonucléique
AZT : Azydothimidine
CCR5 : C-C chemokine receptor type 5
CD : Cluster of differentiation
CMV : Cytomegalovirus
CRP : C reactive protein
CV : Charge virale
CXCR4 : Chemokine receptor type 4
CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DDI : Didanosine
Gp : Glycoprotéine
HLA : Human leukocyte antigen
Hi : High
IE : Inhibiteur d'entrée
IF : Inhibiteur de fusion
II : Inhibiteur d'intégrase
IL : Interleukine
IL-R : Récepteur d'interleukine
INTI : Inhibiteur nucléos(t)idique de la transcriptase inverse
INNTI : Inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse
IP/r : Inhibiteur de protéase, boosté par du ritonavir
LB : Lymphocyte B
Lo : low
LT : Lymphocyte T
LTNP : Long term non progressor
NRI : Non réponse immunologique
PBMC : Peripheral blood mononuclear cells
PD-1 : program death-1
RI : Réponse immunologique
TARV : Trithérapie anti rétrovirale
TCR : T cell receptor
TDF : Tenofovir
Treg : Lymphocyte T régulateur
VA : Valeur absolue
VHB : Virus de l'hépatite B
VHC : Virus de l'hépatite C
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
SIDA : Syndrome d'immunodéficience aquise

RESUME

Plus de 30 ans après la découverte du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), entre 20 et 30% des patients sous trithérapie anti rétrovirale (TARV) ne récupèrent pas un taux normal de lymphocytes (LT) CD4, ce qui est associé à une plus grande morbi-mortalité. Il existe de nombreux résultats discordants dans la littérature concernant le rôle joué par l'activation immunitaire des LT CD4 et CD8, ainsi que des incertitudes sur celui des LT régulateurs (Treg), dans cette non réponse immunologique (NRI).

Dans le but de clarifier les liens entre NRI, activation immunitaire et Treg, nous avons formulé deux hypothèses : (i) il existe un lien entre le pourcentage de Treg, l'activation immune des LT CD4 et/ou LT CD8, et NRI; et (ii) le pourcentage de Treg mesuré à l'introduction de la TARV est utilisable en tant que marqueur indépendant de risque de NRI à la TARV.

Afin de tester nos hypothèses, nous avons dans un premier temps amélioré le phénotypage des Treg en pratique quotidienne, d'abord en comparant différents phénotypes de Treg, puis en validant dans des échantillons cliniques une nouvelle méthode de marquage de FoxP3 intracellulaire en un temps. Puis nous avons analysé dans une étude transversale les liens entre NRI, activation immune, différentes sous populations de Treg et la détection d'une virémie résiduelle, au sein d'une population de patients infectés par le VIH-1, en succès virologique sous TARV depuis de nombreuses années. Les facteurs prédictifs associée à la NRI ont été analysés au moyen d'une analyse multivariée. Nous avons parallèlement étudié au moyen d'une étude prospective le rôle pronostic de la mesure du pourcentage de Treg à l'introduction de la TARV, sur la réponse immune en LT CD4 dans les 2 ans suivant le début du traitement.

Nous avons montré que la NRI après 7 ans de TARV en moyenne était associée de façon indépendante au nadir de LT CD4 et au pourcentage de Treg. Nous avons retrouvé une augmentation significative de l'activation immune des LT CD4 en cas de NRI, mais pas des LT CD8. Enfin, nous avons montré que le pourcentage de Treg était, avec le nadir de LT CD4, un facteur prédictif de NRI dans les 2 ans suivant le début de la TARV, et que son impact sur la réponse immune était d'autant plus marqué que le nadir de CD4 était bas.

La mesure du pourcentage de Treg à l'introduction de la TARV pourrait être un outil simple et facilement utilisable en routine pour mieux cibler les patients à risque de NRI, en association avec la mesure du nadir des LT CD4. Un suivi de la cohorte permettra de confirmer ces résultats à plus long terme. D'autres études devront être conduites, en se focalisant sur les patients avec un nadir de LT CD4 bas, ainsi que chez des patients plus âgés, afin d'explorer les interactions entre immunosénescence, activation immune et Treg.

Mots clés : VIH ; Lymphocytes T régulateurs ; Non réponse immunologique ; Activation immune ; Nadir CD4

ABSTRACT

More than 30 years after the discovery of HIV, between 20 and 30% of patients on highly active antiretroviral therapy (ART) do not recover normal levels of CD4 T lymphocytes (CD4). This immunological non response (INR) to ART is associated with an increased morbidity and mortality. There are many conflicting results in the literature related the role of T cells immune activation of T regulator cells (Treg), in INR. In order to clarify the links between INR, immune activation and Treg, we made two hypotheses: (i) there is a link between Treg's percentage, immune activation of CD4 and / or CD8, and INR; and (ii) the percentage of Treg measured at ART introduction can be used as an independent predictor for INR.

To test our hypotheses, we initially improved the immunophenotyping of Treg in daily practice, by comparing different Treg's phenotype, and by validating in clinical samples a new « one step» staining method of intracellular FoxP3. Then we analyzed in a cross-sectionnal study the links between INR, immune activation, different Treg's subpopulations and detection of very low level viremia, in a population of HIV-1 infected patients, under suppressive ART for many years. Predictive factors associated with the INR were analyzed using multivariate analysis. Simultaneously, we performed a prospective study to analyse the prognostic role of Treg's percentage at ART introduction on the CD4 reconstitution within 2 years.

We have shown that INR after 7 years of ART was independently associated with CD4 nadir and Treg's percentage. We found in INR patients a significant increase of CD4 immune activation, but not of CD8. Finally, we showed that the Treg's percentage and the CD4 nadir were independant predictors of INR within 2 years from the start of ART. The effect of Treg at baseline on CD4 evolution was as lower as the CD4 nadir was higher.
Measuring the percentage of Treg at ART introduction could be a simple and easy tool to use in daily routine. It could help to better target patients at risk of INR in association with the measurement of CD4 nadir. A follow-up of the cohort will confirm these results in the long term. Further studies will be conducted, focusing on patients with a low CD4 nadir, and on older patients, in order to explore the interactions between immunosenescence, immune activation and Treg.

Keywords: HIV; T regulatory cells; immunological non response; Immune activation; CD4 nadir

INTRODUCTION

En 1981, avec les premiers cas de pneumocystose pulmonaire, apparaissent les premiers symptômes d'une maladie qui sera bientôt connue sous le nom de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA)(1). Une équipe française découvre en 1983 le virus responsable, nommé virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

Il s'agit d'un rétrovirus, de la famille des lentivirus, qui dérive probablement d'un virus simien (2). Il existe 2 sous-types viraux, le VIH-1, très majoritaire, et le VIH-2. Ce virus entraine une déplétion progressive en lymphocytes T CD4 (LT CD4), cellules centrales dans la défense immunitaire anti infectieuse et anti tumorale, et conduit en moyenne en une dizaine d'années au SIDA, caractérisé par la survenue d'infections opportunistes et de cancers, et au décès de la personne infectée (3).

Depuis sa découverte, on estime que 78 millions de personnes ont été infectées dans le monde, dont 39 millions sont décédées de complications liées à la maladie. En 2013, 35 millions de personnes dans le monde vivraient avec le VIH, avec la même année 2.9 millions de nouvelles infections, et 1.6 millions de décès. Seules 37% des personnes infectées ont un accès aux traitements (4). Une évolution progressive des connaissances scientifiques a conduit à une meilleure compréhension des mécanismes de cette lymphopénie progressive, faisant intervenir l'effet cytopathogène propre du virus, mais accordant une place de plus en plus prépondérante aux conséquences de l'état d'hyper activation immunitaire (5)(6). Dans ce contexte, de nombreuses équipes se sont intéressées au rôle que pouvaient avoir les lymphocytes T régulateurs (Treg), une sous population de LT CD4 possédant des fonctions suppressives contre les cellules T activées (7)(8).

L'utilisation à partir de 1996 des premières trithérapies antirétrovirales hautement actives (TARV) permettent alors une réduction drastique de la morbi-mortalité des personnes traitées (9). Cependant, malgré un arrêt de la réplication virale, la restauration immunitaire n'est pas obtenue chez l'ensemble des patients. Ce phénomène est dénommé « réponse discordante à la TARV », ou « non réponse immunologique » (NRI)(10). Les patients présentant une telle réponse discordante présentent alors une morbidité et une mortalité

augmentée, par rapport aux patients répondant à la fois virologiquement et immunologiquement à la TARV(11).

Le but de cette thèse était d'évaluer les paramètres associés à une non réponse immunologique à la trithérapie anti rétrovirale. Sur la base d'un travail d'analyse bibliographique (partie 1), de nombreuses discordances sont apparues concernant l'activation immune, les Treg et la NRI chez les patients infectés par le VIH. Nous avons ainsi orienté notre travail sur l'importance des Treg dans cette situation (partie 2). Afin d'explorer l'hypothèse d'un rôle de ces cellules dans la NRI, nous avons conduits deux types d'études de recherche clinique : une étude transectionnelle permettant d'envisager simultanément de nombreux paramètres et en particulier les sous-populations de Treg, et une étude prospective permettant le suivi de patients sur une période de deux ans.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. VIH ET IMMUNITE

A. Infection par le VIH : mécanismes conduisant à la lymphopénie T CD4

L'infection par le VIH induit une diminution progressive de la valeur absolue des LT CD4, et une perturbation de leur capacité de réponse immune (12)(13). La perte moyenne des LT CD4 est estimée à 50 cellules/mm^3/an (14)(15), conduisant en moyenne en une dizaine d'année au stade SIDA (3). La demi-vie des LT CD4 est estimée *in vivo* entre 1 et 2 jours, avec une destruction quotidienne de $1x10^6$-10^9 cellules par jour (15)(14). Les mécanismes physiopathologiques conduisant à la perte des LT CD4 infectés et non infectés sont complexes, et font intervenir différents mécanismes.

a) Epuisement du système immunitaire, ou déséquilibre entre destruction et défaut de production ?

Certains auteurs ont proposé au milieu des années 1990 que le remplacement des cellules infectées et détruites massivement par le virus se faisait par une augmentation considérable du nombre de LT CD4 produits (multiplication du taux de LT CD4 par 70)(15)(14). En partant du postulat que le système immunitaire n'est capable de produire qu'un nombre limité de LT CD4 au cours de la vie d'un individu, cette régénération permanente et intense pourrait conduire au bout de plusieurs années à un épuisement du système immunitaire, et à une lymphopénie profonde.

Cependant il a été montré par d'autres auteurs qu'au cours de l'infection chronique par le VIH, ce « turn-over » des LT CD4 n'était finalement que peu augmenté par rapport à ce qui était précédemment suspecté (16)(17)(18). Il a alors été proposé un modèle dans lequel la diminution progressive des LT CD4, conduisant à la déplétion absolue, serait due à un

déséquilibre entre une destruction des LT CD4 (phénomène mineur, mais progressif), et à un dysfonctionnement important de la capacité centrale de régénération (19)(20)(21). Ceci pourrait s'expliquer par l'infection directe des tissus thymiques et médullaires par le VIH (22).

b) Destruction des cellules infectées par le VIH

Au cours du VIH, le déclenchement de l'apoptose et la survenue de la mort cellulaire des cellules infectées sont liés à de nombreux mécanismes. Il a été montré de nombreuses et complexes interactions entre les protéines virales, et la régulation des mécanismes pro-apoptotiques intrinsèques et extrinsèques de la cellule infectée (23)(24). L'apoptose peut résulter de l'entrée du virus dans la cellule, de la réplication virale intracellulaire, ou du bourgeonnement viral à la surface de la cellule à la fin de son cycle réplicatif (Cf. Figure 1) (25). La destruction directe des LT CD4 est particulièrement intense lors de la période de primo-infection, où elle est surtout observable dans les ganglions lymphatiques et au sein de la muqueuse du tractus gastro-intestinal (26). L'infection préférentielle des LT CD4 dans les tissus muqueux est liée à leur niveau important d'expression de CCR5, qui est le corécepteur majoritairement utilisé par le VIH au stade précoce de la maladie pour infecter les lymphocytes T CD4 (27)(28). Aux stades plus tardifs de la maladie, l'apoptose peut également être déclenchée par la formation de syncytias, phénomène qui résulte des interactions entre des glycoprotéines d'enveloppe virales gp120 et gp41 (exprimées à la surface des cellules infectées) avec la membrane des cellules infectées ou non infectées (29)(30).

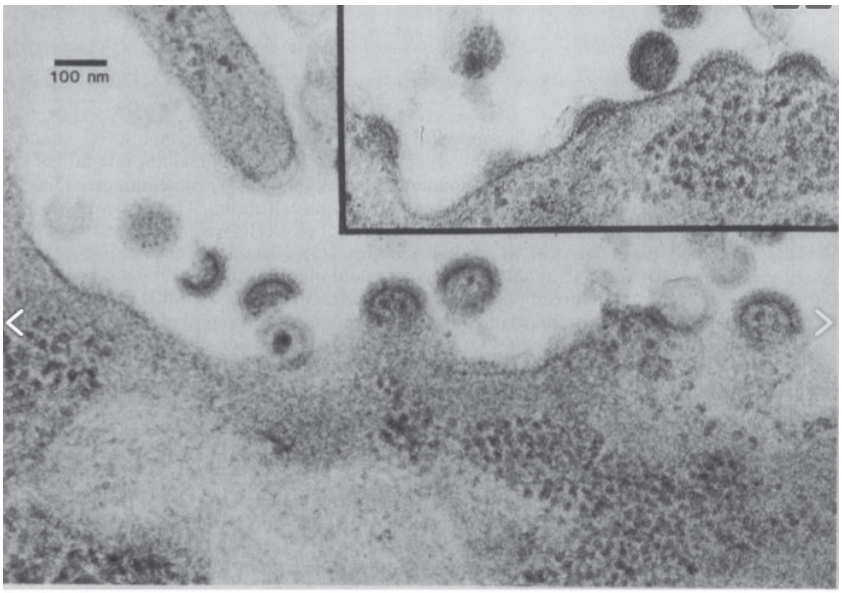


Figure 1. Différentes étapes du bourgeonnement du VIH à la surface d'un lymphocyte (Microscopie électronique)(31).

Enfin, il existe également une participation importante de l'immunité antivirale, spécifique (immunité cellulaire, ou cytotoxicité dépendante des anticorps) ou innée (macrophages), dans la destruction des LT CD4 infectés (32)(33)(34)(26)(35).

c) Apoptose des cellules non infectées

Cependant, il a été montré que seulement 1% des LT CD4 circulants étaient infectés par le VIH. Ainsi, ces nombreux mécanismes de destruction des cellules infectés ne peuvent suffirent à expliquer la profonde lymphopénie caractéristique de la maladie (34)(5). De plus, il a été retrouvé un nombre anormalement important de cellules apoptotiques au niveau sanguin périphérique chez des patients infectés, et que ceci concernait des LT CD4 infectées (cf. ci-dessus) mais aussi et surtout principalement des LT CD4 non infectées par le virus (36). De même, la proportion de lymphocytes à courte demi-vie est augmentée chez les patients infectés par le VIH, par rapport à des individus non infectés (37). L'infection par le VIH, avec une production quotidienne de 10^{10} nouveaux virions par jour, induit cette hyper activation pathologique du système immunitaire: les cellules T CD4 et CD8 activées, mais non infectées, subissent plusieurs cycles de division cellulaire et meurent par apoptose (15)(38).

Cette apoptose des cellules non infectées est un mécanisme important de la perte des LT CD4 au cours de l'infection chronique, et un facteur important de progression vers le stade SIDA (39). Il existe plusieurs voies d'apoptoses cellulaires décrites, certaines impliquant une perte préférentielles des LT CD4, mais aussi des LT CD8 (ex : Fas-Fas ligand, voie des caspases, apoptose spontanée, TNF et TRAIL-R…)(40)(41)(42) (43).

L'importance de l'activation immune dans la pathogenèse du VIH est illustrée par l'observation que les primates africains infectés par le SIV (simian immunodeficiency virus), endémique dans leur lieu de vie, tolèrent des niveaux importants de réplication virale, sans progression vers l'immunodéficience ou la survenue d'infections opportunistes. Il est constaté, chez ces animaux (hôtes naturels de ce virus SIV), à la phase chronique de la maladie, des niveaux très faibles d'activation immune. L'infection par le même virus de macaques asiatiques résulte en une maladie similaire à celle observée chez l'humain, avec l'évolution vers une immunodéficience sévère et l'incapacité à réguler négativement l'hyper activation du système immunitaire (44)(45).

d) Progression de la maladie, lymphopénie et sous populations lymphocytaires

Chez l'homme, au stade le plus avancé de la maladie, l'activation immune est majeure, avec une augmentation très significative du pourcentage de cellules en division, et une lymphopénie profonde (46). Mais les différentes sous populations lymphocytaires ne sont pas affectées dans les même proportions par cette lymphopénie. Il a fréquemment été montré une diminution de la proportion de cellules naïves au profit de la proportion de cellules mémoires, parallèlement à une augmentation du pourcentage de cellules T activées (47)(48)(49)(50)(51)(52)(**Figure 2**).

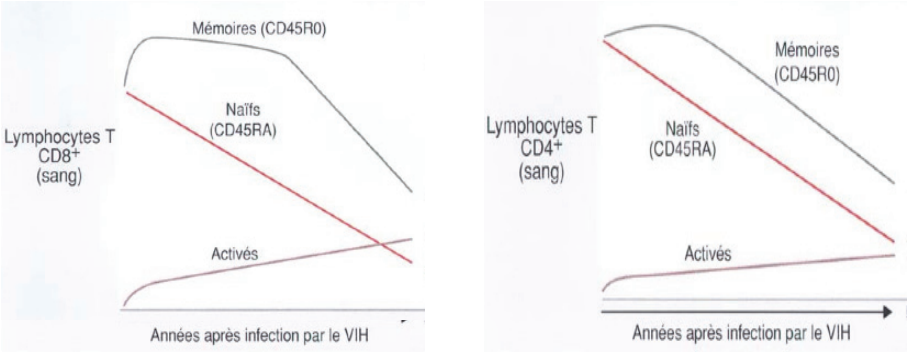


Figure 2. Dynamique des sous populations lymphocytaires au cours de l'infection par le VIH.

Le déclin de la population LT CD4 concerne principalement initialement le compartiment des LT CD4 « naïfs » (CD4+CD45RA+), au profit du compartiment LT CD4 «mémoire» (CD4+CD45RO+)(52)(53). D'autre part, l'expansion initiale du compartiment T CD8 résulte de la prolifération rapide des LT CD8 «mémoires» (CD45RO+) et des CTL (lymphocytes T cytotoxiques) CD8 « activés » (CD38+HLA-DR+) (cf. infra)(54), alors que la population de LT CD8 « naïfs » diminue à une vitesse semblable à celle des LT CD4 naïfs (55). Le déclin des LT CD4 et CD8 mémoires, relativement faible au début de l'infection, s'accentue à mesure que l'infection progresse vers le SIDA. Outre la baisse quantitative des populations lymphocytaires et son impact sur la fonction immunitaire, le déclin des lymphocytes T naïfs et mémoires a pour conséquence de restreindre la diversité du répertoire des cellules T, ce qui contribue également à l'immunosuppression (56).

B. Infection par le VIH : activation immune

L'activation immunitaire, cellulaire et humorale, est donc une importante caractéristique de l'infection par le VIH-1, qui participe de façon majoritaire aux mécanismes immunopathologiques complexes aboutissant au stade SIDA. Elle regroupe l'ensemble des manifestations dysimmunitaires incluant l'augmentation de l'expression des marqueurs de prolifération et d'apoptose, des marqueurs d'activation, une augmentation du renouvellement cellulaire avec régulation aberrante du cycle cellulaire, de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL6, TNF α, CRPus…), augmentation de la fibrose du tissu lymphoïde…

Deux équipes différentes ont montré, en comparant la longueur moyenne des télomères de LT CD4 et de LT CD8 de patients infectés par le VIH, que le taux de prolifération des LT CD8 était plus important que celui des LT CD4 (16)(57). Ainsi, avec la progression de la maladie, il est observé une perte préférentielle des cellules LT CD4 et une prolifération accélérée des LT CD8, objectivable par une diminution du ratio CD4/CD8 (58).

L'activation des LT CD8 s'accompagne d'une augmentation de l'expression d'antigènes de surface, dont CD38 et HLA-DR (59)(60)(48)(52). Cependant, le marqueur HLA-DR était plus exprimé chez les patients infectés asymptomatiques, alors que le marqueur CD38 était plus représentatif des stades plus avancés de la maladie, y compris le stade SIDA. Il a été observé une corrélation entre le niveau de cytotoxicité des LT CD8 et le niveau d'expression de CD38 ou d'HLA-DR chez les patients infectés, à différents stades de la maladie (48)(51).

Concernant les LT CD4, un plus grand nombre de cellules exprimant HLA-DR est retrouvé chez les patients infectés par rapport aux patients sains (49). Il existe une corrélation significative entre le niveau d'expression de HLA-DR par les LT CD4, et la gravité clinique de la maladie (50). Enfin, il a été montré des corrélations entre divers marqueurs plasmatiques d'activation immune, la lymphopénie LT CD4, et la charge virale plasmatique ou la progression clinique de la maladie (61)(62)(63).

Cette activation cellulaire est délétère pour le système immunitaire. Elle permet d'expliquer par exemple les désordres cytokiniques et les lymphadénopathies persistantes, l'état d'anergie immunitaire (les cellules déjà hyper stimulées deviennent incapables de répondre à un antigène), ou encore l'incapacité à générer une réponse immunitaire mémoire en perturbant l'homéostasie lymphocytaire, et ce bien avant la survenue d'une lymphopénie majeure et des infections opportunistes caractérisant le stade SIDA (64)(65)(66).

De plus, cette activation immune favorise la lymphopénie, mais aussi la réplication virale (le virus se répliquant dans les cellules LT CD4 activées) et donc la progression de la maladie (67)(68)(69). Ainsi, la mesure de l'activation immune est un facteur prédictif indépendant de la perte des LT CD4, et de la progression de la maladie (6)(70).

Les causes de l'activation immunitaire au cours du VIH sont multiples. En plus de l'hyperstimulation de système immunitaire par le grand nombre de virions produits continuellement, ont été discutées les autres stimulations antigéniques infectieuses, telles que les herpes virus, dont le CMV, mais aussi la translocation bactérienne digestive. L'infection virale chronique favorise la translocation perpétuelle des bactéries et de produits immunostimulateurs à partir de la lumière intestinale, et qui participent à l'hyperstimulation du système immunitaire, ainsi qu'à l'aggravation de la lymphopénie LT CD4 (71). En effet, l'infection par le VIH altère l'intégrité de la barrière intestinale, qualitativement et quantitativement (apoptose des entérocytes, rupture des « tight junctions »). Elle entraine une modification de la flore microbiennes et favorise la prolifération de bactéries plus agressives (72), la diminution locale des LT CD4, des Th17, l'augmentation des Treg, et la diminution des capacités phagocytaires des macrophages (73).

C. Mécanismes de régulation/contrôle de la lymphopénie

L'interleukine 7 (IL-7), produite par les cellules stromales de la moelle osseuse et du thymus, est une cytokine centrale dans le fonctionnement des LT CD4 et CD8. Elle est impliquée dans la thymopoïese, la prolifération des LT CD4 naïfs, et la survie à long terme des LT CD4 mémoires (74)(75)(76)(77)(78)(**Figure 3**).

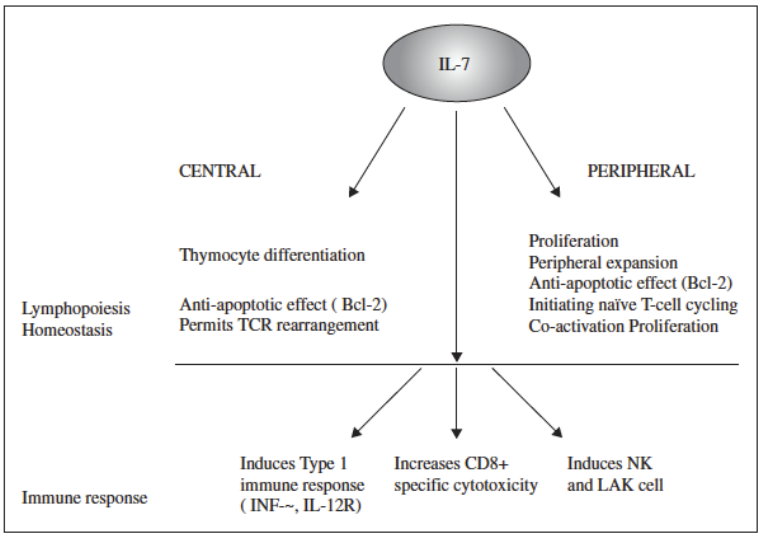


Figure 3. Effets de l'IL-7 sur les compartiments cellulaires des LT CD4 et des LT CD8, centraux et périphériques (79).

Chez les patients lymphopéniques (incluant patients infectés par le VIH, les greffés de moelle, patients sous chimiothérapies), il existe une augmentation de la production d'IL-7, permettant l'augmentation de la prolifération cellulaire, des taux de lymphocytes (80)(81), l'augmentation du métabolisme cellulaire, la diminution de la production de facteurs pro-apoptotiques, et l'augmentation de production de facteurs anti-apoptotiques (82)(76). Ceci a été notamment décrit chez les patients infectés par le VIH (83)(84)(85). Chez ces patients, il existe une corrélation inverse entre le taux de LT CD4 naïfs et les taux sériques d'IL-7 (80)(86).

Cependant, ce mécanisme de rétrocontrôle positif est inefficace pour restaurer un taux normal de lymphocytes T CD4, chez les patients virémiques.

Ceci s'explique en partie par l'effet différent de l'activation immune d'une part, et de la prolifération cellulaire induite par le virus d'autre part, sur l'expression des chaines du récepteur à l'IL-7. Effectivement, ce récepteur, IL-7R, est composé de deux chaines : (i) IL-7Rα (CD127) et (ii) IL-7Rγc (CD132). Cette deuxième chaine sert également à d'autres cytokines importantes dans la prolifération cellulaire, comme IL-2, IL-4, IL-9, IL-15, and IL-21 (87)(77). Or ces 2 chaines sont régulées par des mécanismes différents : l'expression de CD127 est diminuée en cas d'activation de la cellule via le TCR (T Cell receptor), ou par voie cytokinique (incluant l'IL-7 elle même), alors que CD132 est augmenté dans ces même conditions (88)(76)(89) (90). Dans ces conditions, l'action de l'IL7 sera donc diminuée.

De plus, la liaison de l'IL-7 avec son récepteur provoque par rétrocontrôle négatif une diminution de la densité en surface de la cellule en IL-7R (91). Enfin, l'IL-7 pourrait favoriser la réplication du VIH dans les LT CD4, en augmentant le nombre de cibles cellulaires du virus en périphérie, mais aussi au niveau des thymocytes, et donc pourrait pérenniser l'ensemble des mécanismes conduisant à la lymphopénie (92)(93).

II. TREG ET INFECTION PAR LE VIH

A. **Généralité sur l'induction et la régulation de la réponse immune**

Les réponses immunes aux antigènes du soi et aux antigènes étrangers sont contrôlées par de complexes interactions entre divers médiateurs cellulaires et humoraux de l'immunité innée et acquise.

Les cellules T CD4 naïves subissent une prolifération clonale après activation par la cellule présentatrice effectrice via le TCR, le corécepteur CD4 et les molécules co-stimulatrices. Puis les cellules filles se différencient en différentes cellules effectrices (Ex : Th1, Th2, Th17) capables d'élaborer des réponses différentes selon l'antigène inducteur de la réponse immune, et donc selon les cytokines présentes au moment de l'activation initiale : les bactéries extra cellulaires et les champignons induisent une polarisation Th17, les agents intracellulaires une polarisation Th1 et une production d'interféron gamma, et les helminthes entrainent une production d'IgE et l'activation des éosinophiles via une polarisation Th2 (94–96). Chaque lignée de lymphocyte T dépend de l'expression et de la régulation d'un facteur de transcription spécifique : RORyT pour les Th17, T-bet pour les Th1 et GATA3 pour les Th2 (97,98).

D'une part, le système immunitaire doit donc être capable de déclencher cette réponse immune efficace contre un antigène étranger, mais pas contre un antigène du soi. D'autre part, chacune de ces réponses inflammatoires doit être régulée, car potentiellement délétère pour les tissus, afin que la réponse soit stoppée après éradication du pathogène, ou lorsque le bénéfice induit par le contrôle du pathogène est contrebalancé par la destruction tissulaire résultant de l'inflammation induite.

Les cellules T régulatrices (Treg), ont un rôle central dans le maintien de la tolérance du soi, le maintien de l'homéostasie cellulaire, dans la régulation de la réponse immune aux agents infectieux et dans l'immunité anti tumorale.

B. Généralité sur les Treg

Les Treg sont une sous population de lymphocytes, constituant entre 1 et 10% des LT CD4 circulantes (99). Deux sous populations sont décrites (**Figure 4**).

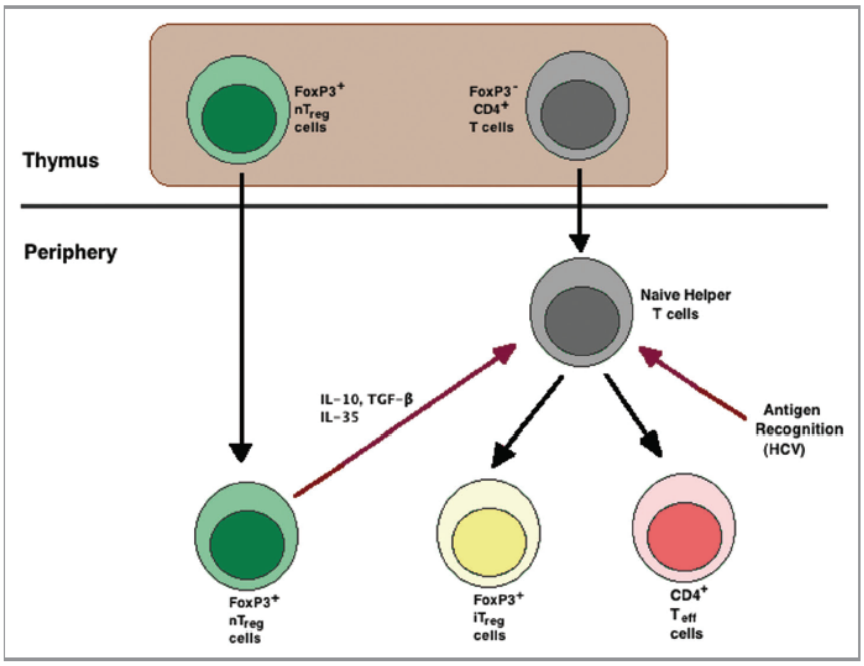


Figure 4. Production des Treg FoxP3+, dans le thymus (Treg naturels, nTreg), et en périphérie (Treg induits, iTreg).

Les « Treg naturels» (nTreg) sont des cellules qui se développent dans le thymus après l'expression du facteur de transcription FoxP3. La cytokine clef pour le développement, l'homéostasie des Treg et leurs fonctions est l'IL2 (100), peut-être de façon paracrine après production par les cellules CD4+Foxp3- (101)(102). Des signaux issus du TCR, de molécules costimulatrices et de l'IL-2 sont nécessaires pour le développement des Treg (103). D'autres molécules semblent importantes, comme la sphingosine-1-phosphate (S1P, dont le récepteur est sur exprimé chez les Treg, et qui jouerait un rôle dans la prolifération et la survie)(104), ou encore le CD44 (pour la prolifération)(105).

Les «Treg induits » (iTreg) résultent de la conversion périphérique des LT CD4 effecteurs (FoxP3-), comme montré *in vitro* (106), ou *in vivo* chez la souris dans les

« sites inflammatoires », par exemple en cas de colite (107), ou dans les organes transplantés (108).

La régulation de l'homéostasie des Treg diffère de celle des LT CD4 conventionnels. Les Treg ont une augmentation de l'expression de CD25/IL2-R, et une diminution de l'expression de CD127/IL-7R (109)(110). Ils sont donc plus sensibles à l'action de l'IL2, et moins à celle de l'IL7. Cependant, des publications récentes suggèrent que l'IL7 pourrait jouer un rôle dans la différentiation et la survie des Treg, *in vivo* (111)(112)(113).

C. Modes d'action des Treg

Les Treg ont un répertoire antigénique aussi étendu que les cellules T effectrices. Ils sont capables de contrôler la pathogénicité des lymphocytes T auto réactifs, en inhibant les réponses immunitaires spécifiques (114,115)(116). Ainsi, l'absence de Treg conduit à l'apparition d'une défaillance multi-organe en lien avec une auto immunité, sévère et fatale, chez la souris (117,118). Ceci démontre l'inefficacité des autres mécanismes immuno-régulateurs dans le contrôle des lymphocytes T auto réactifs, en l'absence de Treg.

En dehors de ce rôle « anti-auto-immunité », les Treg sont capables de restaurer l'homéostasie cellulaire au cours des réponses polarisées Th1, Th2 et Th17 après une stimulation antigénique par antigène étranger (**Figure 5**). *In vivo*, il a été montré une augmentation progressive de la concentration en Treg dans les jours suivant une stimulation antigénique dans les ganglions lymphatiques, au contact des zones riches en cellules T effectrices, et capable de limiter la réponse immune à cet antigène (119).

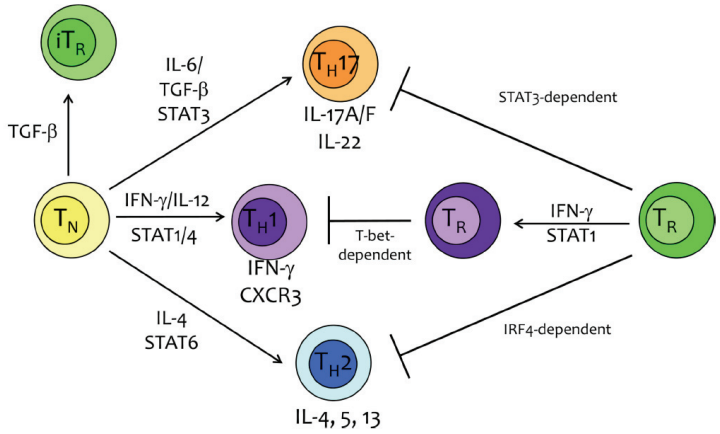


Figure 5 : Différentiation des cellules T naives (T_N), en différentes sous-populations de cellules effectrices : T_H17, T_H1, T_H2, T_{reg} induits (iT_R).

Les mécanismes par lesquels les Treg contrôlent spécifiquement les réponses Th1, Th2 et Th17 ne sont pas complètement élucidés, mais sont complexes et multiples ; certains de ces mécanismes sont capables d'induire l'apoptose de la cellule T effectrice ciblée (**Figure 6** et **Tableau 1**).

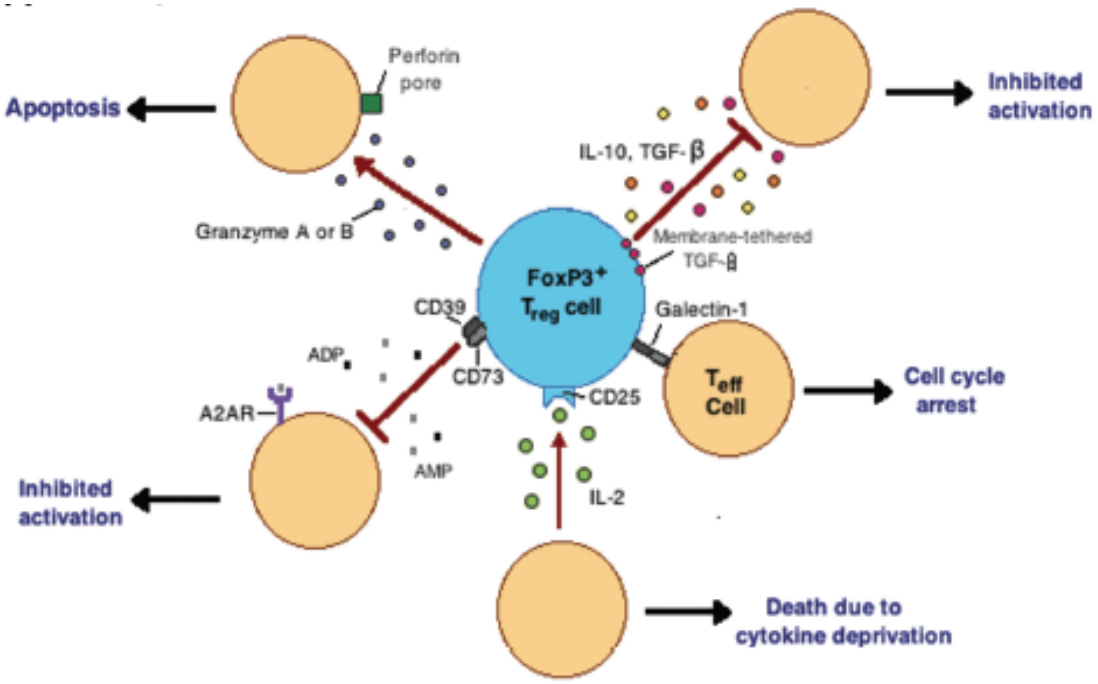


Figure 6. Mécanismes d'action des Treg. Les Treg induisent une suppression de l'activité des LT effecteurs (Teff), par des mécanismes multiples, contact-dépendant ou contact-indépendant (120).

Key molecule(s)	Function
Mechanisms of contact-dependent suppression	
CTLA4	Downregulation of APC co-stimulatory function
	Interaction with CD80 and CD86 on conventional T cells
CD73–CD39	Hydrolysis of inflammatory extracellular ATP
LAG3	Induction of inhibitory signalling through MHC class II molecules
Granzyme B (mouse) and granzyme A (human)	Lysis of conventional T cells
CD95–CD95 ligand	Induction of apoptosis in conventional T cells
Mechanisms of cytokine-mediated suppression	
TGFβ and LAP	Induction of FOXP3 in conventional T cells
IL-10	Attentuation of DC function
	Conversion of conventional T cells to T_R1 cells
Galectin 1	Cell cycle arrest and apoptosis in conventional T cells
CD25	Adsorption of IL-2
IL-35	Induction of conventional T cell expression of IL-35 by T_{Reg} cells enhances suppression (IL-35 is not expressed by human T_{Reg} cells)

Tableau 1. Mécanismes de l'action suppressive des Treg. APC, antigen-presenting cell; CTLA4, cytotoxic T lymphocyte antigen 4; DC, dendritic cell; FOXP3, forkhead box P3; IL, interleukin; LAG3, lymphocyte activation gene 3; LAP, latency-associated peptide; TGFβ, transforming growth factor-β; Treg, regulatory T (121).

D. **Phénotypage des Treg**

Les Treg expriment de façon constitutive le CD25 (IL-2Rα) (122). Cependant, le marqueur CD25 ne peut à lui seul différencier les Treg des LT CD4 conventionnels effecteurs activés. Ils sont surtout caractérisés par l'expression du facteur de transcription FoxP3, qui joue un rôle clé dans leur développement et leur activité suppressive (123). Le marquage de FoxP3 est un marquage intracellulaire. Il nécessite, avec la technique de référence la plus répandue actuellement, plusieurs étapes de lavage cellulaire, de centrifugation et de perméabilisation. La durée de la procédure est de 200 minutes (124). L'ensemble de ces considérations rend complexe l'étude des Treg CD4+CD25+FoxP3+ sur de grandes populations de patients, ou lors d'études prospectives avec un nombre important d'échantillons biologiques. Ainsi, la plupart des études portant sur les Treg dans le VIH ont été conduites avec un petit nombre de patient, et il existe très peu d'études prospectives (125)(126).

Du fait de ces difficultés techniques, des marqueurs de substitution ont été étudiés. En particulier, le marqueur CD127, exprimé faiblement à la surface des Treg, permet également de distinguer les Treg des autres sous populations de LT CD4. Effectivement, il a été montré que les cellules CD4+CD25++CD127- expriment FoxP3, et sont capables d'exercer une activité suppressive in vitro (110).

Cependant, les LT CD4 activés effecteurs peuvent eux-aussi exprimer FoxP3 transitoirement. Ils expriment le CD25, et diminuent l'expression du CD127. Enfin, les Treg activés peuvent diminuer leur expression de FoxP3. Ces variations phénotypiques rendent complexe l'identification des Treg, et la distinction avec les LT effecteurs activés, au cours de l'infection par le VIH, du fait de l'activation immune, de la lymphopénie, et des conséquences déjà discutées de ces perturbations immunitaires sur les mécanismes de rétrocontrôle, d'expression des cytokines et des récepteurs CD25 et CD127 (127)(128) (129)(76)(130)(131).

Cependant, pour certains auteurs, le phénotype CD4+CD25+CD127- est un bon phénotype de substitution pour les Treg au cours du VIH, chez les patients virémiques (125)(132), mais ceci est discuté par d'autres (133)(**Figure 7**).

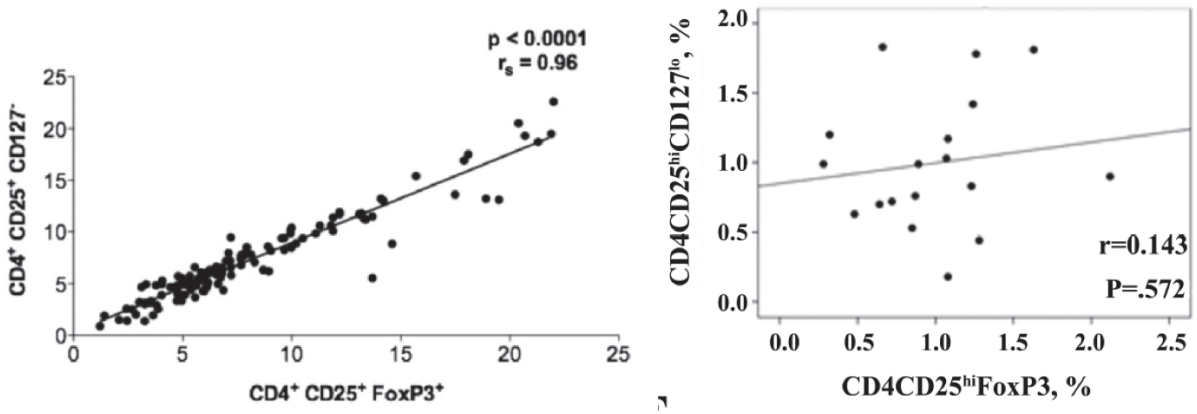


Figure 7. Le phénotype de substitution CD4+CD25+CD127- est pour certains auteurs un bon marqueur des Treg chez les patients VIH, virémiques ou avirémiques, avec une bonne corrélation avec le phénotype de référence CD4+CD25+FoxP3+ (**à gauche**) (132). Pour Del-pozo *et al*, une perte de la corrélation entre les 2 phénotypes est observé chez les patients virémiques (**à droite**) (133).

De nombreux autres marqueurs ont été utilisés pour caractériser les Treg : CTLA-4 (cytotoxic-T-lymphocyte-associated antigen) (134), CD62L (L-selectin)(135), CD103 (E-integrin)(136), GITR (glucocorticoidinduced tumor necrosis factor receptor)(137), GARP (glycoprotein A repetitions predominant)(138)(Cf. **Tableau 2**).

Transcription factor	Activation and memory	Homing and origin	Suppressive and effector function	Apoptosis, survival or other
FOXP3	CD45RA CD45RO CD25 HLA-DR Lack of CD127 CD69	CD62L CCR4 CCR6 CCR9 CD103 CD304 CD31 Lack of CD49d	CTLA4 ICOS CD39–CD73 LAP Granzyme B Galectin 1 Galectin 10 TRANCE CD80 and CD86 IL-10 IL-17 CD2 Lack of IL-2	CD27 OX40 CD95 PD1 GITR Galectin 3 GARP MS4A4B IL-1R CD6

Tableau 2. Les marqueurs des Treg. CCR, CC-chemokine receptor; CTLA4, cytotoxic T lymphocyte antigen 4; FOXP3, forkhead box P3; GARP, glycoprotein A repetitions predominant; GITR, glucocorticoid-induced TNF-receptor-related protein; ICOS, inducible T cell co-stimulator; IL, interleukin; LAP, latency-associated peptide; MS4A4B, membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4B; PD1, programmed cell death 1; R, receptor; TRANCE, TNF-related activation-induced cytokine; Treg, regulatory T (121).

E. Les Treg en pathologie infectieuse

Le rôle des Treg est central dans la régulation de la réponse aux antigènes étrangers. Selon les situations cliniques, il a été rapporté un rôle bénéfique ou délétère, favorisant la chronicité ou la gravité de la maladie, ou au contraire en limitant son expression clinique (**Figure 8**).

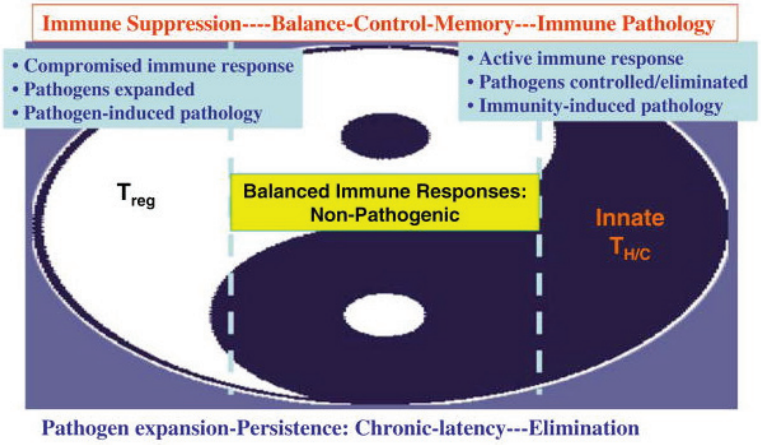


Figure 8 : Les Treg sont induits au cours des infections pour réguler la réponse immune et contrôler l'hyper activation qui pourrait être délétère. Dans certaines infections virales, les Treg pourraient favoriser la chronicité de l'infection, en diminuant les capacités anti infectieuses de l'hôte (139).

Chez des patients en choc septique, il a été rapporté un effet délétère d'une augmentation des Treg (124); ces effets étaient contrés par le blocage des Treg dans des modèles murins (124,140).

Une étude a montré que le nombre de Treg CD4+CD25+CD127- était augmenté dans le sang et au niveau du foyer infectieux chez des patients infectés par *Mycobacterium tuberculosis*, et que ces cellules étaient capables ex-vivo d'inhiber les productions d'interféron gamma et d'IL-10 en réponse au BCG (141). Il a aussi été montré une augmentation des Treg chez des patients avec une tuberculose pulmonaire, et une diminution après un mois de traitement, par rapport à des patients sains (142). Ces éléments sont en faveur d'un rôle délétère des Treg, qui pourraient favoriser la chronicité de cette maladie. Les Treg pourraient également jouer un rôle important dans l'anergie immunitaire chez les patients souffrant de lèpre lépromateuse (143–145).

Ce rôle des Treg favorisant les infections chroniques a été discuté au cours des infections par les virus des hépatites C et B. Plusieurs études prospectives ont montré une forte corrélation entre une augmentation du nombre de Treg et l'existence d'une infection chronique par le VHC (146–148). Une étude prospective conduite chez des patients avec infection aigue par le VHC a mis en évidence une association entre une diminution des fonctions suppressives des Treg et la résolution de la maladie (149). Pour les auteurs, cette étude était en faveur d'un rôle des Treg dans la régulation des réponses T effectrices, et

l'installation de la chronicité de l'infection virale. Cependant, une autre étude prospective n'a pas permis de retrouver une telle association (150). Dans le cadre de l'hépatite B, une méta analyse récente a montré :

(i) que les patients avec une hépatite B chronique avaient un pourcentage de Treg plus élevé que les contrôles sains;

(ii) que les patients avec des charges virales élevées avaient un pourcentage de Treg plus important que les patients avec CV plus basse;

(iii) que les patients avec une hépatite B chronique avaient un pourcentage de Treg plus élevé que les patients avec hépatite aigue,

(iv) que les patients ne répondant pas au traitement par interféron avaient un pourcentage de Treg plus important;

(v) et que l'augmentation des Treg était associée à un risque plus important de cancer hépatocellulaire.

Ainsi, il semble que les Treg soient un facteur pronostic majeur au cours de l'infection par le VHB (151).

Cependant les Treg ne jouent pas qu'un rôle immunosuppresseur péjoratif dans les réponses aux agents infectieux. Par exemple, il a été montré que les Treg jouaient un rôle dans le contrôle du chimiotactisme des cellules effectrices de l'immunité en contrôlant la migration des cellules dendritiques et des cellules effectrices des ganglions périphériques vers le site infecté, en l'occurrence la muqueuse génitale dans un contexte d'infection à HSV chez la souris (152). Des résultats similaires ont été observés chez un modèle murin déplété en Treg puis infecté par le virus West Nile. Il était observé une augmentation de la mortalité, des atteintes plus sévères, une aggravation de la perte de poids associés à de plus importantes charges virales dans le cerveau ou dans la moelle épinière chez ces souris « Treg-négatives » par rapport aux souris contrôles (153). En pathologie humaine, il a par exemple été montré une augmentation du rapport Treg/LT effecteurs chez les patients ayant une dengue « modérée », non retrouvée chez les patients présentant une dengue sévère (154).

F. **Treg et infection chronique par le VIH**

L'action des Treg au cours de l'infection chronique par le VIH est très discutée, entre un rôle bénéfique, ou bien délétère (**Figure 9**).

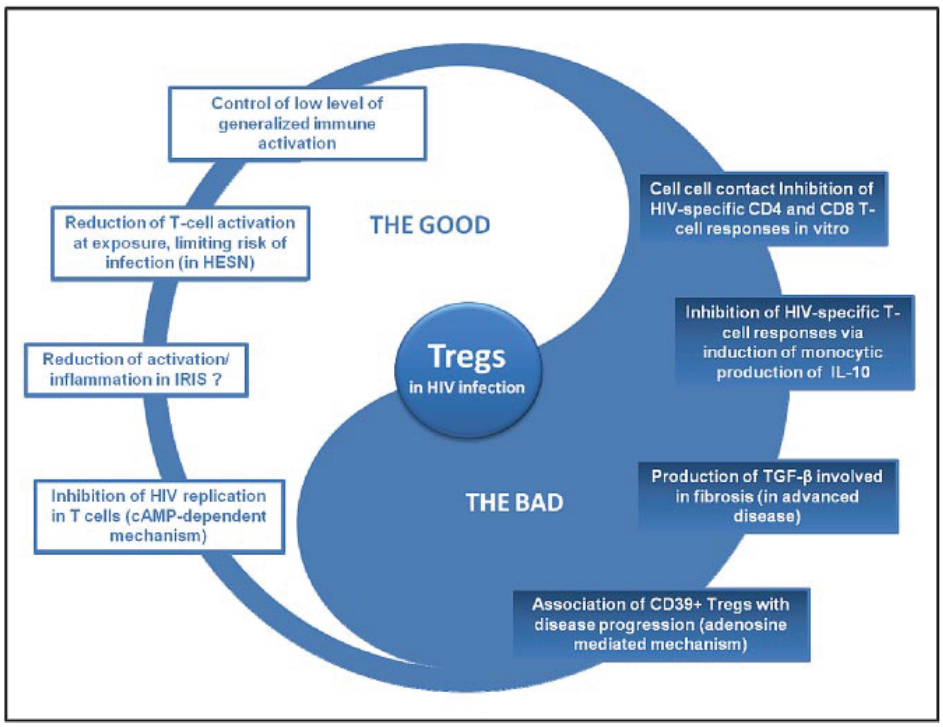


Figure 9. La dualité du rôle des Treg au cours de l'infection chronique par le VIH (HESN : HIV exposed sero-negative patients)(155)

a) Rôle délétère des Treg

De nombreux travaux ont montré que les Treg issus de patients infectés par le VIH-1, conservaient, in vitro, leur fonction suppressive (156)(157)(158)(159). L'existence d'un rôle délétère des Treg au cours de l'infection chronique par le VIH est suggérée par l'augmentation ex-vivo de la réponse des LT CD4 à des antigènes viraux et à la tuberculine après déplétion en Treg, et par une diminution dose dépendante de ces mêmes activités avec l'augmentation du nombre de Treg (phénotype CD4+CD25+) (160). Cette persistance des activités suppressives via les Treg au cours de l'infection par le VIH sur les réponses lymphocytaires antivirales (sang périphérique, et/ou dans les tissus lymphoïdes) est retrouvée par de nombreuses études (161)(162)(160)(163)(164). L'inhibition de ces réponses favoriserait la persistance de la réplication virale, et donc de l'activation immune délétère.

En accord avec cette hypothèse, l'augmentation du pourcentage de Treg a été retrouvée associée à l'aggravation clinique de la maladie (165)(166). Un pourcentage élevé de Treg est associé à une diminution de la valeur absolue des LT CD4 (132)(167) (168) (156)(169) (170) (171)(172), alors que la valeur absolue des Treg (sous population de CD4) diminue (**figure**

10). Les associations entre augmentation de la proportion en Treg et (i) l'augmentation de la charge virale plasmatique, ou (ii) l'augmentation de l'activation immune sont moins consensuelles (173)(174)(175)(172)(166). Ces différences sont sans doute liées à l'inclusion de populations différentes (dont des stades différents de la maladie), souvent en petits effectifs, à l'utilisation de marqueurs phénotypiques d'activation immune différents, à différents modes de préservation des cellules étudiées (fraiches vs cryopreservées), au travail à partir de différents substrats (sang total *vs* cellules périphériques mononuclées = PBMC)…

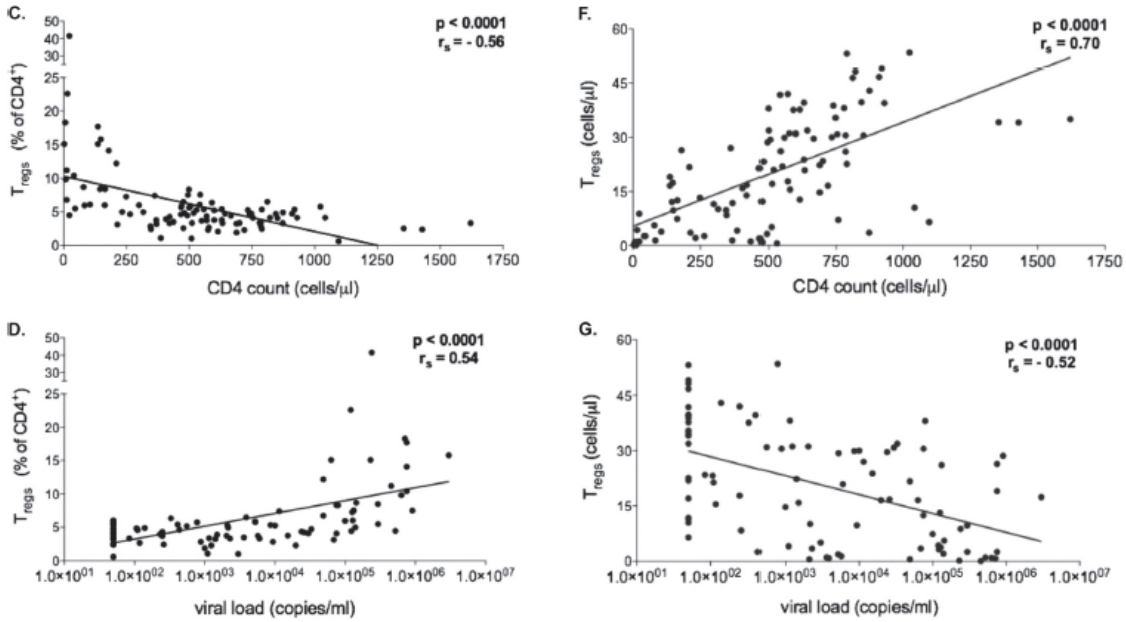


Figure 10: Augmentation du pourcentage de Treg parmi les LT CD4, mais diminution de leur valeur absolue, avec l'aggravation de l'infection par le VIH (132).

Enfin, une étude récente publiée dans la revue « Nature » s'est intéressée aux LT CD8 spécifiques du VIH-1, exprimant les HLA B*27 et B*57 (7). Ces allèles sont classiquement associés à une évolution plus lente de la maladie, et sont retrouvés en majorité chez les patients « long term non progressor » (176). Cette équipe a montré que ces LT CD8 effecteurs, spécifiques du VIH-1, étaient capables d'échapper à la suppression des Treg *ex-vivo*, et même de les détruire. A l'inverse, les LT CD8 non porteurs de ces allèles protecteurs étaient détruits par les Treg.

Enfin, les Treg pourraient contribuer à la destruction de l'organisation des organes lymphoïdes secondaires (et donc à la lymphopénie, et à l'absence de reconstitution immune

sous traitement), comme ce qui a été observé dans un modèle de macaque infecté par le SIV, via une augmentation de la production notamment de TGFbeta, favorisant la fibrose et les dépôts de collagène (177).

b) Rôle bénéfique des Treg

Les Treg pourraient avoir également avoir un rôle bénéfique au cours de l'infection chronique par le VIH, en luttant contre l'activation immune, qui joue un rôle majeur dans la physiopathologie de la maladie, comme discuté précédemment. Effectivement, il a été retrouvé une diminution du pourcentage de Treg en cas d'augmentation de l'activation immune (8). Dans une étude publiée en 2004, les Treg étaient capables, *in vitro*, de diminuer l'activation des LT CD4 et CD8 des patients infectés par le VIH, mais cliniquement asymptomatiques, ainsi que de diminuer la production cytokinique. Ces activités suppressives n'étaient plus retrouvées chez les patients aux stades plus avancés de la maladie (163). Ceci pourrait s'expliquer par une altération de l'activation de la voie JAK/STAT5, qui perturberait la capacité des Treg à contrôler l'activation immune caractéristique de l'infection chronique (112)(178)(179). L'incapacité des Treg à lutter contre cette activation immune est à nouveau retrouvée plus récemment par une autre équipe (180).

De plus, il a été suggéré que l'augmentation des Treg activés, dans le sang périphérique et dans les tissus, pouvait être liée au contrôle de la maladie chez les patients Long Term Non Progressor (LTNP)(181).

c) Les Treg : plus ou moins sensibles que les LT CD4 conventionnels à l'infection par le VIH ?

Les Treg expriment le CD4 et le CCR5, et sont donc des cibles de réplication pour le VIH (132)(182)(158). Pour certains auteurs, les Treg étaient, *in vitro*, plus susceptibles à l'infection par le VIH que les LT CD4 (182)(183). Cependant, il a été montré que les LT CD4+CD127+ contenaient 5 fois plus d'ADN viral que les cellules CD4+CD127- (184). Dans une étude *in vivo*, il était retrouvé une plus grande infectivité des souches virales à tropisme

CCR5 (au début de la maladie) pour les LT effecteurs (LT CD4 conventionnels), alors que les Treg étaient plus infectés par les souches CXCR4 (population virale majoritaire lors des stade les plus avancés de la maladie)(158). D'autres auteurs ont confirmé que les Treg n'étaient probablement pas plus sensible à l'infection que les LT CD4 conventionnels (185). Pour Selliah *et al*, les LT CD4+Foxp3+ seraient même plus résistants à l'infection, via une inhibition par Foxp3 de la transcription du LTR du VIH-1 (séquence « Long Terminal Repeat », qui contient le promoteur assurant la transcription de l'ARN viral, et qui participe à l'intégration des éléments viraux dans le génome de l'hôte) (186). Il a aussi été retrouvé une diminution de l'activation de NFkB (nécessaire à la réplication virale) lors de l'expression de CTLA-4, qui est justement surexprimé par les Treg (187)(188).

d) Causes de l'augmentation du pourcentage de Treg au cours de l'infection chronique par le VIH

Cette association entre plus grande résistance à l'infection par le virus et diminution des capacités réplicatives du virus pourrait en partie expliquer l'augmentation du pourcentage de Treg observée lors de l'infection chronique par le VIH (172). Cette augmentation pourrait aussi être une réponse à l'augmentation de l'activation immune caractérisant la maladie (cf. supra). Des auteurs ont montré au cours de l'infection par le VIH une augmentation des marqueurs d'activation au sein du thymus, une augmentation de la génération de Treg et une diminution de la production de précurseurs LT CD4 (189). Il a aussi été montré une diminution de l'apoptose des Treg (166)(190), une augmentation de la conversion périphérique des LT CD4 effecteurs en Treg (191)(192), et une redistribution périphérique des Treg augmentée (190). Ces éléments sont résumés dans la **figure 11** ci-dessous :

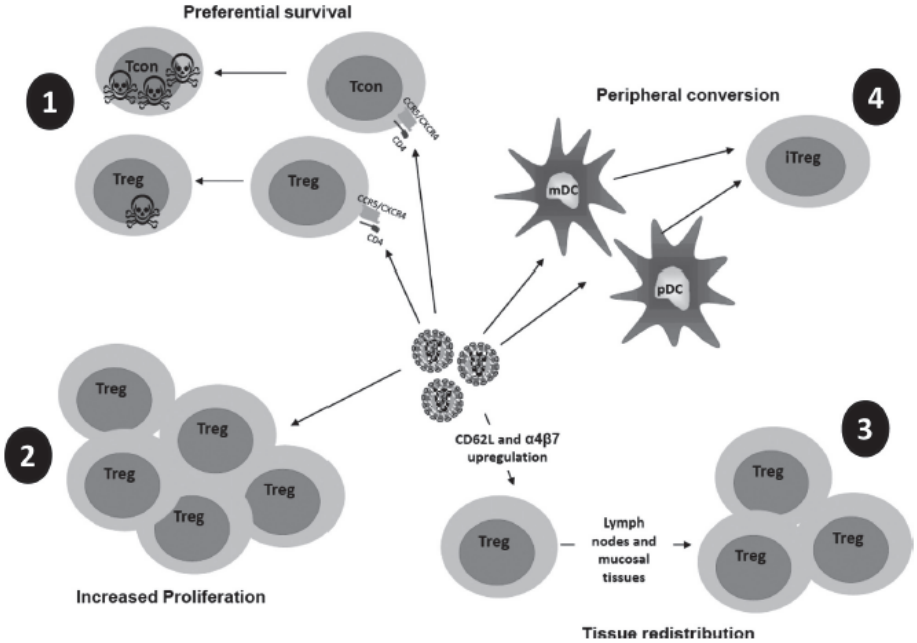


Figure 11 : Différents mécanismes qui pourraient expliquer l'augmentation du pourcentage de Treg au cours de l'infection par le VIH (193).

III. IMPACT DE LA TARV SUR LES PERTURBATIONS IMMUNITAIRES INDUITES PAR LE VIH

A. Généralité sur la TARV

La première molécule anti rétrovirale est développée en 1986 (194). En 1996 apparaissent les premières trithérapies antirétrovirales hautement actives (TARV). En permettant le contrôle durable de la réplication virale en dessous du seuil « d'indétectabilité », ces traitements virostatiques entraînent une remontée du taux de LT CD4, la diminution du risque d'acquisition de résistance, et donc une diminution importante de la mortalité du VIH (9).

Le taux de LT CD4 à l'introduction du traitement est le principal facteur pronostique de mauvaise évolution (**Figure 12**) :

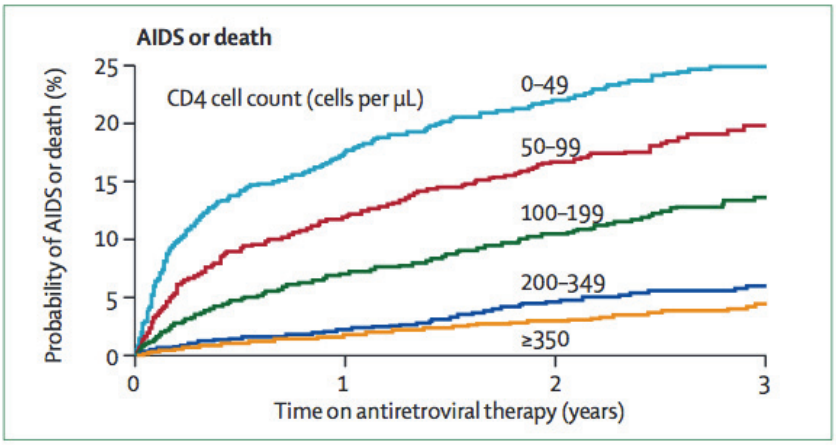


Figure 12 : Probabilité de progression vers le SIDA ou le décès, en fonction du taux de LT CD4 à l'introduction de la TARV (195).

Actuellement 6 familles différentes sont disponibles et utilisées en pratique quotidienne :

- les inhibiteurs nucléos(t)idiques de la transcriptase inverse (INTI, par ex. zidovudine, emtricitabine, lamivudine, abacavir, tenofovir);
- les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) de première génération (efavirenz, névirapine) et de seconde génération (étravirine, rilpivirine) ;
- les inhibiteurs de protéase (IP), le plus souvent « boostés » par du ritonavir (IP/r) (par ex. lopinavir/r, atazanavir/r, darunavir/r) ;
- les inhibiteurs d'intégrase (INI) (par ex. raltegravir, elvitegravir, dolutegravir)
- les inhibiteurs d'entrée (IE) (par ex. maraviroc)
- et les inhibiteurs de fusion (IF) (par ex. l'enfuvirtide).

La TARV est généralement constituée de 2 INTI, associés à un troisième agent, qui peut être un INNTI, un IP/r, ou plus récemment un INI (**figure 13**). D'autres types de traitements sont en cours de développement, comme les inhibiteurs de maturation.

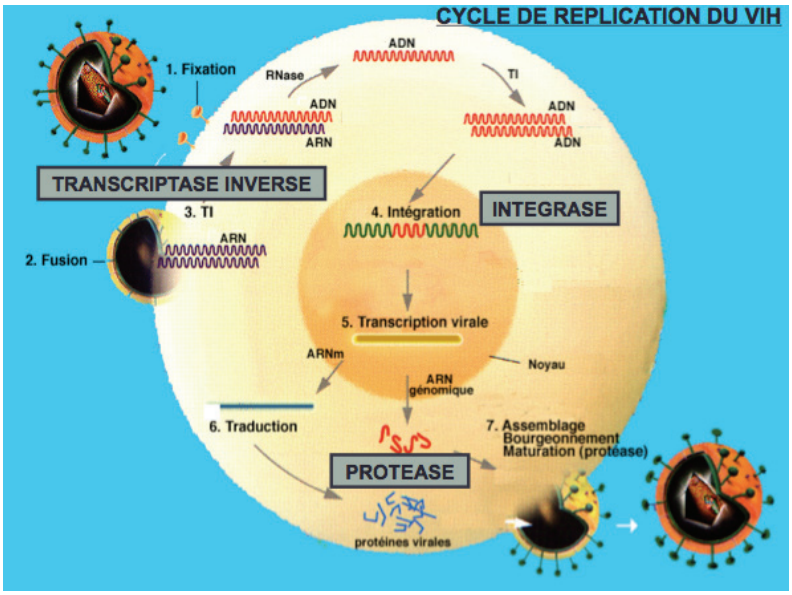


Figure 13 : Cycle cellulaire de la réplication du VIH, et cibles (carrés grisés) des principales molécules anti rétrovirales utilisées en première ligne.

Ainsi, en 1996, certains auteurs évoquaient la possibilité que la maladie soit curable après un traitement d'environ 3 ans (196). Cependant cet espoir disparaît rapidement. En effet, il est systématiquement constaté une récidive de la réplication virale à l'arrêt du traitement, et ce même après plusieurs mois de TARV. Ceci est expliqué par la capacité du VIH à persister à l'état latent dans certaines cellules de l'hôte (197). Les traitements actuellement disponibles sont inefficaces sur ces virus latents. En conséquence, et malgré les avancées majeures des connaissances, il n'existe pas de traitement médical anti-VIH curatif à ce jour.

L'objectif actuel de la TARV est l'obtention du succès virologique, soit une charge virale (CV) plasmatique (ARN du VIH plasmatique) inférieure à 40 copies/mL, mesurée avec les techniques de routine. Ce seuil est dit « seuil d'indétectabilité » en pratique clinique quotidienne. Le succès virologique, doit être obtenu au cours de la première année de traitement, idéalement dans les 6 premiers mois (198). Il est obtenu chez plus de 80 % des patients avec une première ligne de traitement (199)(200). Parallèlement à la diminution de la réplication virale, il est observé une remontée progressive des LT CD4 (10)(201) : il s'agit de la réponse immunitaire à la TARV.

B. Réponse immunitaire à la TARV

Il a été décrit plusieurs phases de récupération en LT CD4 après l'introduction d'une TARV. Elle est généralement rapide au cours des 3-4 premiers mois, et a été estimée en moyenne à une augmentation de 21 LT CD4/mm^3/mois (202). Cette première phase est due principalement à la redistribution périphérique de lymphocytes mémoires, antérieurement « séquestrés » dans les ganglions lymphatiques enflammés (54)(203). Une seconde phase de récupération, moins importante, survient entre 4 mois et 24 mois (en moyenne +5.5/mm^3/mois)(202), et est due à l'expansion des LT CD4 naïfs (54)(**figure 14**).

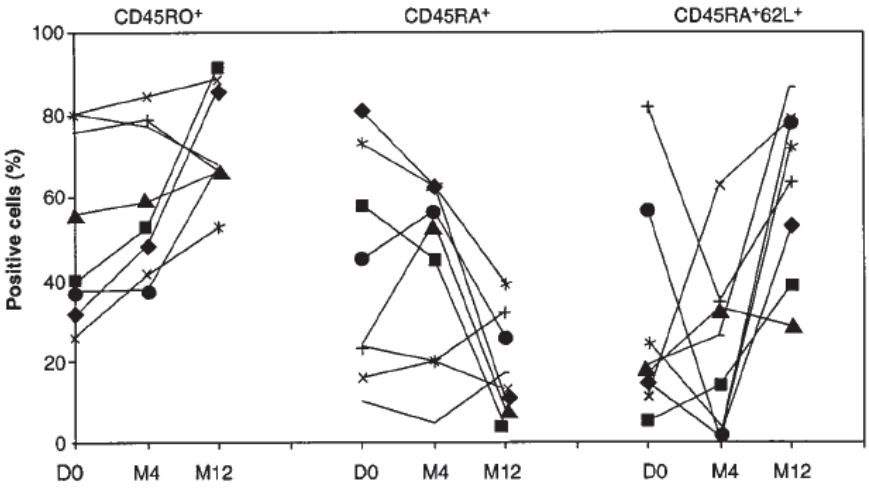


Figure 14: Les deux phases de récupération des LT CD4 dans l'année suivant l'introduction de la TARV sont dues aux cinétiques différentes d'expansion des cellules mémoires (CD45RO+) et naives (CD45RA+62L+)(54).

Cependant, les pentes de récupération dans les 2 premières années de traitement sont différentes (dans chacune de ces deux phases) en fonction du taux de LT CD4 mesuré à l'introduction du traitement (202). Effectivement, dans cette étude, la pente initiale de récupération était plus importante chez les patients avec des LT CD4 entre 200 et 500/mm^3 par rapport aux patients moins immunodéprimés (LT CD4 >500/mm^3). A l'inverse, après 4 mois,

cette pente devenait plus importante chez ceux avec des LT CD4> 500/mm^3 au moment du début de la TARV.

Wolbers *et al.* ont étudié en 2007 la cinétique de récupération des LT CD4 jusque 5 ans après l'obtention du succès virologique (1816 patients étudiés, dont 340 avec un suivi de 5 ans). Ils ont mis en évidence une augmentation médiane des LT CD4 de +87/mm^3/an la première année, +52/mm^3/an les 2èmes et 3eme années, puis +19/mm^3/an les 4emes et 5èmes années (différences significatives entre les différentes périodes, p<0.001)(204). Ce gain plus important dans les premiers mois de traitement a également été montré par Mocroft *et al.* dans la revue « The Lancet » la même année : +100/mm3, contre environ +50/mm^3 les années suivantes. Il était également montré dans cette étude que les patients avec un niveau bas de LT CD4 à l'introduction du traitement (<200/mm^3) pouvaient encore avoir un gain positif à 5 ans du début du traitement (205). Cependant, il a aussi été montré que la moitié des patients avec une valeur anormale de LT CD4 (*i.e.* <500/mm^3) après 5 ans de traitement ont une stabilisation «en plateau » du taux de LT CD4 (10)(**Figure 15**). D'autres auteurs ont retrouvé des résultats similaires (206)(207)(208)(209).

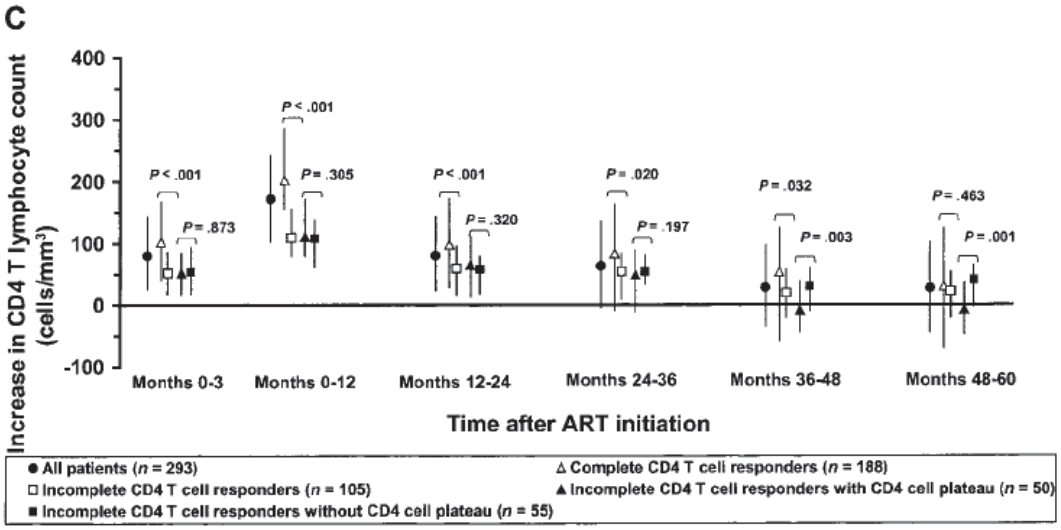


Figure 15: Gain médian en LT CD4 au cours du temps après l'introduction d'une TARV. Les patients "incomplete cell responder" sont définis par un taux de LT CD4 au moment de la mesure <500/mm^3 (10).

C. Définition de la non réponse immunologique (NRI)

Ainsi, certains patients en succès virologique présentent une réponse immunitaire (RI) incomplète. Celle-ci est aussi qualifiée de non réponse immunologique (NRI), ou réponse immunitaire discordante. La définition de la NRI varie entre les nombreuses études qui se sont intéressées au sujet. Elle implique souvent la définition d'un délai par rapport à l'instauration de la TARV, et une valeur cible de LT CD4 à atteindre dans ce délai. Or il n'existe pas de valeur consensuelle pour ces 2 paramètres. Il est donc difficile de comparer les résultats des études sur le sujet, car elles sont très hétérogènes. Malgré ces discordances, environ 20 à 30% des patients sont globalement considérés comme étant des « non » ou des « mauvais répondeurs immunologiques » à la TARV.

Certains auteurs utilisent une valeur cible de LT CD4 en valeur absolue, en deçà de laquelle les patients sont classés NRI, par exemple : <200/mm^3 à 1 an de TARV (210); <250/mm^3 après au moins 1 an « d'indétectabilité » (succès virologique si CV <200cp/mL)(211) ; <200/mm^3 après un minimum de 2 ans d'indétectabilité (212); <200/mm^3 après 3 ans d'indétectabilité (213) ; <350/mm^3 après au moins un an (71), ou 2 ans d'indétectabilité (CV<40cp/mL) (214)(215); <500/mm^3 après 4 ans (216), 5 ans (217)(218) ou 7 ans (219) d'indétectabilité; <200/mm^3 ou < 500$^{/mm3}$ après 4 ans (206)…

D'autres ont utilisé comme définition une augmentation minimum des LT CD4 par rapport à la valeur à l'instauration du traitement : +50/mm^3 entre 3 et 9 mois après l'introduction de la TARV (220) ; valeurs différentes selon le mois d'évaluation au cours de la première année de traitement, par exemple : + 50/mm3 au 7ème mois, jusque 75/mm3 au 12ème mois)(221); ou +100/mm^3 après un an de traitement (222).

Certains auteurs utilisent l'association d'une augmentation de la valeur de départ des LT CD4 et d'un objectif de valeur absolue de LT CD4 (223), comme Marziali *et al.* ou les NRI étaient les patients, après au moins un an de TARV, avec un gain de LT CD4<20%, et une VA <200/mm^3 (224).

Enfin, certains auteurs ont caractérisé les patients répondeurs immunologiques de façon fonctionnelle, comme étant ceux capables de répondre à un antigène alors qu'ils étaient, avant l'introduction du traitement, anergiques vis a vis de cet antigène (225).

D. Conséquences de la NRI

Quelles que soient les définitions et les populations étudiées, il est constant que les études retrouvent chez les patients NRI une morbimortalité plus importante par rapport aux patients avec une meilleure réponse immunitaire (**Figure 15 et 16**) (226)(217)(11)(227)(228)(229). Les infections opportunistes, les tumeurs classant SIDA, ou les évènements non classant SIDA, sont plus fréquents dans cette population, par rapport à la population générale, ou aux patients avec un taux de LT CD4 >500/mm^3 (11)(217)(230).

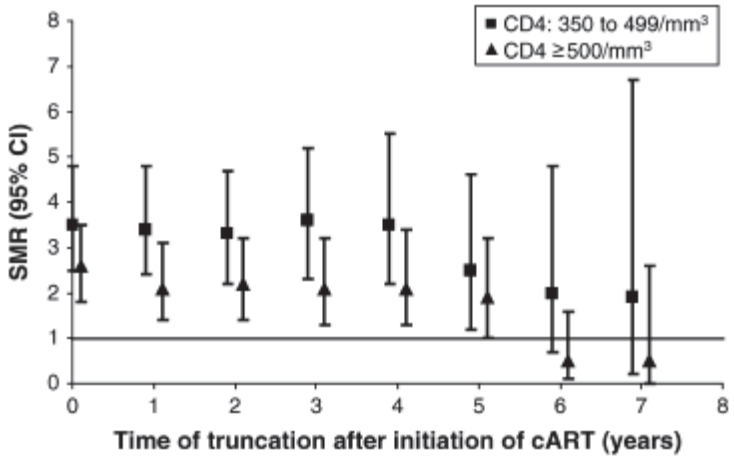


Figure 15. Standardized Mortality Ratios (SMR), chez 2435 patients infectés par le VIH, en fonction du temps passé avec des LT CD4 entre 350 ou 499/mm3, ou >500/mm3 à partir de la troncature. Chez les patients avec des LT CD4>500/mm3, le SMR rejoint celui de la population générale après 6 ans de TARV, alors qu'il reste environ 2 fois supérieur pour ceux avec des LT CD4<500/mm^3 (Truncation = troncature = période de temps de 1, 2, 3… an après le début de la TARV)(11).

D'autres études ont montré des associations statistiques entre NRI et augmentation du risque cardiovasculaire (231)(232), ostéoporose et risque fracturaire (233), augmentation du risque néoplasique (234)(235). Il a été montré dans une étude prospective que la valeur absolue des LT CD4 était significativement associée à la dégradation des fonctions

physiologiques (échelle de fragilité de Fried (236)) des personnes vivants avec le VIH, comme le fait la vieillesse, et ce indépendamment de l'utilisation ou non d'une trithérapie (237). Ceci a été à nouveau retrouvé dans une autre étude réalisée chez des patients sous trithérapie (238).

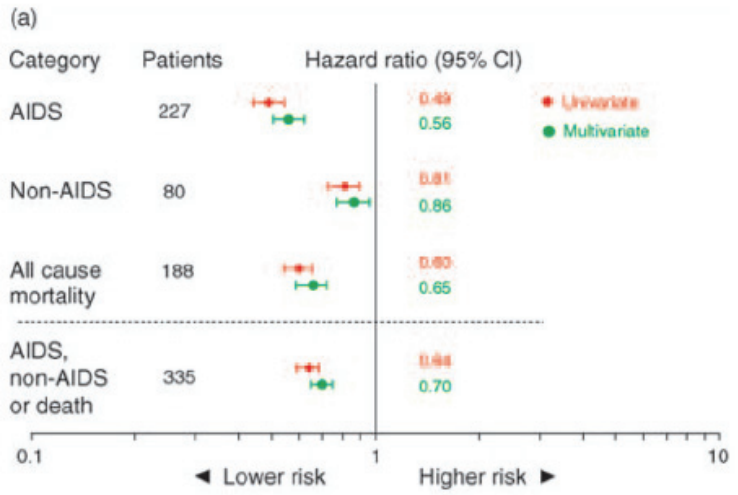


Figure 16. Risque univarié (en rouge) et multivarié (en vert, ajusté sur âge, sexe, ethnie, antécédent d'évènement classant SIDA, coinfection par le VHB ou le VHC de décès) de survenue d'évènement classant SIDA ou non classant SIDA, en fonction du taux de LT CD4 dans une cohorte de 1397 patients débutant une TARV. Les points à gauche de « 1 » sont en faveur d'une réduction du risque avec un taux plus haut de LT CD4 (230).

.

Ainsi, la récupération d'un taux normal de LT CD4 (*i.e.* >500/mm^3) peut être considérée comme le marqueur pronostique principal d'un patient traité pour le VIH.

E. Les facteurs associés à la NRI

De façon logique, la persistance d'une réplication virale au dessus du seuil de détection est un facteur de mauvaise réponse immunologique à la TARV. Ainsi, les patients présentant des périodes de réplication virale ont une moins bonne réponse immunologique au traitement (209)(239)(202). Cependant, malgré une réplication virale persistante sous

traitement, les LT CD4 peuvent continuer d'augmenter, ce qui souligne l'importance de la TARV. Ceci serait lié à la sélection de virus mutants, avec diminution du « fitness viral » conféré par la résistance au traitement (240).

a) Nadir de LT CD4 et valeur de LT CD4 à l'instauration du traitement

Le nadir de LT CD4 est le principal facteur de risque de non réponse immunologique après l'instauration de la TARV (239)(207)(241)(242)(221)(217)(212)(214)(206)(219). Une étude prospective de 2009, incluant 366 patients, suivis pendant 7.5 ans en médiane, a montré que 46% des patients qui avaient un taux de LT CD4 à l'introduction du traitement inférieur à 100/mm^3 récupéraient un taux de CD4 au dessus de 500/mm3, contre 75% et 95% pour ceux avec un taux de CD4 entre 100 et 200/mm^3, et au dessus de 350/mm^3, respectivement (216). Les facteurs de risque de non réponse au sein des patients les plus immunodéprimés ne sont pas étudiés dans ce travail. Des résultats similaires sont observés dans une autre étude longitudinale, française, où 45% des patients avec des LT CD4<200/mm^3 récupèrent un taux de LT CD4> 500/mm^3 après 5 ans de traitement (218).

Cependant, le nadir de LT CD4 n'est pas le seul facteur pronostic de réponse immune, car parmi les patients avec un seuil bas de LT CD4 à l'introduction du traitement, certains d'entre eux récupèrent un taux normal de LT CD4.

b) Activation immune

Il a été montré une corrélation entre la persistance de l'expression des marqueurs d'apoptose cellulaire et le niveau de LT CD4 chez des patients traités depuis en moyenne 48 mois (43). Ont également été retrouvé chez les patients NRI : une expression plus importante du marqueur de prolifération Ki67, un plus grand nombre de LT CD4 et CD8 apoptotiques, une diminution du nombre des LT CD4 et CD8 naïfs chez les patients NRI, et une diminution du rapport LT CD4/CD8 (219)(212)(243)(211)(244)(215)(245).

Plusieurs auteurs retrouvent chez les NRI une plus grande proportion de cellules activées LT CD8 et/ou CD4 (215)(246)(247)(248)(243)(214)(212)(223)(222). Une étude a montré que le gain en LT CD4 était statistiquement corrélé à la baisse de l'expression de CD38 sur les LT CD8, chez des patients suivis un an après l'introduction de la TARV (249). Une étude récente a montré une association significative entre la persistance d'une lymphopénie, la taille du réservoir viral, et une plus grande fréquence en LT CD4 activés (exprimant CD38, HLA-DR, CCR5, et/ou PD-1)(250). Cette étude met en évidence, chez les NRI, des perturbations au sein des LT CD4 pouvant être en lien direct avec la persistance du VIH, après 31 mois en moyenne de TARV « suppressive ».

Il faut cependant souligner qu'il existe parfois des différences importantes entre ces études dans les caractéristiques des patients RI et NRI, pouvant interférer avec l'interprétation des résultats. Par exemple, dans l'étude de Lederman *et al*, les LT CD4 à l'inclusion étaient respectivement pour les groupes NRI et RI de 227/mm^3 et 770/mm^3 (215). De plus, ces associations entre taux de LT CD4 et niveau d'activation cellulaire ne sont souvent retrouvés qu'en analyse univariée (243)(214)(212)(223)(222), ou bien sont statistiquement non significatives (Ex : corrélation entre le pourcentage de LT CD8+CD38+ et valeur absolue de LT CD4, p=0.07)(249). Enfin, parfois les patients étudiés présentaient des virémies résiduelles <1000 cp/mL, pouvant expliquer au moins en partie cette activation immune persistante (247).

A l'inverse, d'autres travaux ont montré l'absence de différence significative entre expression des marqueurs d'activation immunitaire cellulaire CD38 et/ou HLA-DR, et réponse immunologique en LT CD4 (244)(251). Une équipe retrouve une association entre taux de LT CD4 et expression d'HLA-DR sur les LT CD4, mais pas sur les LT CD8(224).

Ces différences peuvent s'expliquer par les définitions utilisées pour caractériser la NRI, le type de patients inclus, la profondeur de la lymphopénie et du niveau d'activation immune avant la TARV, et par la durée de traitement anti rétroviral et d'indétectabilité au moment de l'analyse des sous populations lymphocytaires, par exemple 12 mois pour Anthony *et al*. *vs* 76 mois pour Méndez-Lagares *et al*. (243) et (244).

Enfin, l'activation immune non lymphocytaire joue sans doute un rôle dans la réponse immunitaire à la TARV, comme suggéré par l'augmentation chez les patients NRI de l'IL-6, du CD14 soluble, des D-Dimères ou de l'interféron α (252)(215).

c) Les Treg

Quelques études, toutes transversales, se sont intéressées aux Treg chez les patients sous TARV, et à leur rôle dans la non réponse immunologique au traitement (167)(172)(219)(251)(253) :

Horta *et al*. ont étudié 53 patients infectés par le VIH et 51 individus contrôles (167). Les patients VIH avaient des LT CD4 <500/mm^3, et étaient à l'inclusion sous TARV effective depuis au moins un an. La durée précise de TARV reçue, la valeur de LT CD4 à l'inclusion ainsi que le nadir de LT CD4 ne sont pas connus dans cette étude. Le pourcentage moyen de Treg était non différent entre les 2 groupes (environ 7%, p>0.05). Cependant, la proportion de patients avec un pourcentage de Treg >10% était plus important dans le groupe VIH (20% *vs* 5%, p=0.002). Ils ont cependant ensuite montré dans une analyse en sous groupe que parmi les patients avec un nadir de LT CD4 pré thérapeutique bas (*i.e.*<200/mm^3), ceux qui avaient un pourcentage de Treg >10% avaient des taux de LT CD4 significativement plus bas que ceux avec un pourcentage de Treg<10%. Ces éléments sont en faveur d'une association péjorative entre l'observation d'un taux de Treg élevé sous TARV et la NRI, au moins chez les patients avec un nadir de LT CD4 bas.

Mendez-Lagares *et al* ont comparé 16 patients sous TARV avec des LT CD4 <250/mm^3 (patients NRI), 18 patients avec des LT CD4 >250/mm^3 (patients RI), et 16 sujets sains. Les nadirs de LT CD4 entre les 2 groupes de patients VIH étaient respectivement 39 et 54/mm3 (p=0.05). Les auteurs ont retrouvé une augmentation significative du pourcentage de Treg chez les patients NRI par rapport aux RI et aux sujets sains, ainsi qu'une corrélation négative entre le pourcentage de Treg et le pourcentage de CD4 naïfs chez les patients NRI, non retrouvé chez les patients RI (251).

Piconi *et al*. ont comparé de façon transversale 32 patients avec des LT CD4>500/mm^3 après en moyenne 7 ans de TARV (patients NRI), et 35 patients avec des LT CD4<500/mm^3

(219). Ils ont notamment retrouvé une augmentation du pourcentage de Treg chez les patients NRI, et une corrélation significative négative entre pourcentage de Treg et taux de LT CD4.

Enfin, Foxall *et al*. ont retrouvé une augmentation du pourcentage de Treg chez (i) les patients infectés par le VIH-2 (lymphopéniques, mais charges virales plasmatiques basses), (ii) chez les patients infectés par le VIH-1 non traités (lymphopéniques et CV plasmatiques élevées), et (iii) chez les patients VIH-1 traités avec une réponse immunologique discordante (lymphopéniques et avirémiques), par rapport aux patients infectés par le VIH1 en succès immunovirologique sous TARV et à des sujets contrôles (non lymphopéniques, et avirémiques) (172). Les résultats de cette étude sont en faveur d'une association entre taux de LT CD4 et pourcentage de Treg, mais pas entre pourcentage de Treg et charge virale plasmatique.

Il est donc souvent constaté dans ces études une augmentation du pourcentage de Treg chez les patients non répondeurs immunologiques. Cependant, il est possible que cette augmentation ne soit que le reflet du nadir plus bas de LT CD4 chez les NRI. Aucune de ces études n'a comporté d'analyse multivariée pour prendre en compte le biais induit par les associations connues entre pourcentage de Treg élevés, et taux de LT CD4 bas, que les patients soient traités ou non. Il est donc difficile de conclure à partir de ces études sur le caractère pronostique du pourcentage de Treg, indépendamment du rôle connu et majeur du nadir de LT CD4.

d) Dysfonctionnement thymique et médullaire

Certains auteurs discutent un dysfonctionnement thymique (senescence, fibrose) chez les patients NRI, expliquant une diminution du nombre de LT CD4 et CD8 naïfs par défaut de production centrale (224)(223)(211)(212). La diminution des TREC (TCR-rearrangement excision circles = ADN épisomal circulaire produit lors du réarrangement du TCR) chez les NRI en serait le reflet (212). Il a cependant été montré une capacité de régénération thymique sous TARV (21). L'âge, qui est également un facteur pronostic de la récupération en LT CD4, est peut-être lié à la diminution progressive des capacités fonctionnelles du thymus. Il est évoqué aussi la possibilité d'infection des précurseurs hématopoïétiques, ou bien encore l'infection des micro environnements thymiques (68). Des dysfonctionnements médullaires

ont également été mis en évidence, associant diminution du nombre des progéniteurs, augmentation des marqueurs d'apoptose cellulaire et anomalies quantitatives cytokiniques (254)(68).

e) Désordres cytokiniques

Nous avons discuté précédemment les liens entre les perturbations quantitatives de l'IL7, son récepteur CD127 (IL-7Rα), et du taux de LT CD4, chez les patients infectés par le VIH et non traités. Chez les patients débutant une TARV, il a été montré une corrélation positive entre le taux initial d'IL-7, et la récupération des LT CD4 à 20 mois (255). Dans une autre étude, il a été observé sous TARV une restauration de l'activité de l'IL7, incomplète cependant (256). Il a également été observé une diminution des taux sériques d'IL7, parallèlement à la restauration des LT CD4.

Cependant, la réponse à l'IL-7 est altérée chez les patients NRI, alors que les taux sériques d'IL-7 sont retrouvés plus élevés (212)(224). Une autre étude a montré que chez les NRI, la diminution des cellules naïves LT CD4 était associée à une diminution de l'expression de IL-7Rα sur ces cellules (224). Cependant, une autre équipe a retrouvé des résultats discordants, avec des pourcentages comparables d'expression de CD127 sur les LT CD4 et de mesure de MFI (mean fluorescence intensity) entre des patients RI et des patients NRI (244). Dans une étude prospective réalisée chez des patients très immunodéprimés ($CD4<150/mm^3$), et suivis pendant un an après l'introduction de la TARV, il a été montré que les patients NRI avaient à l'initiation du traitement des taux sériques d'IL-7 plus élevés. Cependant, ils gardaient, malgré des taux plus bas de LT CD4 par rapports aux patients RI, une diminution de l'expression du récepteur IL-7Rα, probablement par rétrocontrôle négatif. Les patients RI avaient par contre une augmentation concordante de l'expression de IL-7Rα et du taux de LT CD4.

Il semble donc que le phénomène de réponse immune au traitement soit également associé à un dysfonctionnement majeur du système de contrôle de l'homéostasie des LT CD4 impliquant l'IL-7, et le récepteur CD127/IL-7Rα.

Enfin, récemment il a été découvert des polymorphismes dans le gène codant IL-7Rα associés a une meilleure restauration immunitaire sous TARV (257).

f) Translocation bactérienne et CD14s

Une étude transversale, conduite chez des patients chez qui une TARV avait été introduite lors de la primo infection, a montré (par rapport à un groupe contrôle sain) la persistance sous traitement d'une importante lymphopénie LT CD4 au sein des muqueuses du tractus gastro intestinal, alors qu'il n'était pas observé de différences significatives dans le pourcentage de LT CD4 au niveau sanguin (258). Ceci reflète la perte préférentielle au sein des muqueuses des LT CD4 mémoires activés, exprimant CCR5, avant l'introduction des ARV. Cette lymphopénie persistante, associée à d'autres altérations structurelles et biologiques de la barrière immunitaire intestinale, serait responsable d'une augmentation de la translocation de peptides bactériens (ex : lipopolysacharide soluble) (259). Cette stimulation chronique des monocytes circulants est évaluée de façon quantitative par la mesure de marqueurs sériques solubles, comme le CD14 soluble (sCD14)(260). Au moins 2 études récentes n'ont pas retrouvé de différence dans les taux de CD14s chez des patients NRI *vs* des patients RI (244)(71).

g) Age

Un âge plus élevé à l'introduction de la trithérapie, généralement supérieur à 40 ans *vs* <30-35 ans, est un facteur pronostique défavorable pour la réponse immunitaire au traitement, quelle que soient les définitions utilisées, pour un grand nombre d'auteurs (248)(207)(209)(221)(217). Ceci résulterait de l'altération du fonctionnement thymique avec l'âge, avec donc une altération de la capacité centrale à produire de nouveaux LT CD4 naïfs (204). Pour Kelley *et al*, par exemple, un âge élevé et un nadir bas de LT CD4 étaient les 2 seuls facteurs indépendants associés à une moins bonne RI (216). Dans une étude récente africaine, il a été montré un gain en LT CD4 par an d'autant plus faible que les patients étaient âgés (261). L'âge à l'introduction du traitement était un facteur prédictif de décès dans cette étude. Ce gain plus modeste chez les patients plus âgés était retrouvé dans une étude française plus ancienne, mais ce résultat n'était cependant pas statistiquement significatif en analyse multivariée (202).

h) Sexe, consommation de toxiques

Plusieurs auteurs ont retrouvé chez les patientes infectées par le VIH une meilleure récupération immune, par rapport aux patients masculins (204) (239)(248), mais ceci n'est pas retrouvé par d'autres auteurs (217)(262). Une seule étude retrouve un impact de la consommation de drogues intraveineuse (207). Cependant, 38% des patients inclus sont des patients toxicomanes, ce qui est plus de 10 fois la fréquence habituelle de cette population dans les autres études. Ceci introduit sans doute un biais sur l'observance du traitement.

i) Effet du type de TARV

Il a été retrouvé un gain en LT CD4 plus faible en cas de TARV comprenant du TDF, ou pour l'association AZT-3TC, *vs* une combinaisons de d4T et 3TC (262). L'utilisation combinée de TDF et DDI a été associée à un gain suboptimal en LT CD4 dans de nombreuses études (263)(264)(265) . Il a été retrouvé dans une méta analyse un gain plus grand en LT CD4 chez les patients en succès virologique à 48 semaines du début de la TARV, chez les patients traités par un IP/r en 3ème agent (associé à 2 INTIs), par rapport aux patients traités par un INNTI ou un 3eme INTI, alors que l'efficacité virologique était identique (266). Dans une étude publiée en 2008, il n'était pas retrouvé d'effet du 3eme agent sur la réponse immune (267). Les stratégies d'intensifications thérapeutiques avec du maraviroc, un inhibiteur de CCR5, n'ont pas permis de montrer un gain en LT CD4 chez les patients traités (268)(269).

j) Coinfections

L'impact de l'existence d'une coinfection par les virus des hépatites B et/ou C est discuté. Certains auteurs retrouvent une association entre NRI et une coinfection par le VHC (214)(267). D'autres auteurs ne retrouvent pas cet effet lié au VHC, mais avec le portage de l'Ag Hbs (204).

F. Réponse immunitaire à la TARV : effet sur l'activation immune

a) **Diminution des marqueurs d'activation immunitaire T**

La réduction de la charge virale induite par la TARV provoque une diminution très rapide de l'expression des marqueurs d'activation HLA-DR et CD38 sur les LT CD4 et les LT CD8 (**figure 17 et 18**). Une étude française, prospective, publiée dans la revue « Science » en 1997, conduite chez 8 patients débutant un traitement, a retrouvé après un an une normalisation des valeurs de l'expression des marqueurs d'activation sur les LT CD4 et CD8 (54). Une autre étude a montré à 48 semaines de TARV la normalisation de l'expression des marqueurs d'activation lymphocytaire dans le tissus amygdalien, par rapport à une population contrôle non infectée, mais la persistance d'une augmentation de l'expression de HLA-DR sur les LT CD4 et LT CD8 sanguins (malgré une nette diminution)(270). Une étude récente, portant sur 24 patients, a analysé de façon prospective l'évolution de nombreux paramètres immunitaires pendant 2 ans. Les auteurs ont montré une tendance rapide à la normalisation des marqueurs de prolifération et d'apoptose, mais une persistance de l'activation immune lymphocytaire, surtout chez les patients avec des LT CD4<200/mm^3 à l'introduction du traitement (203).

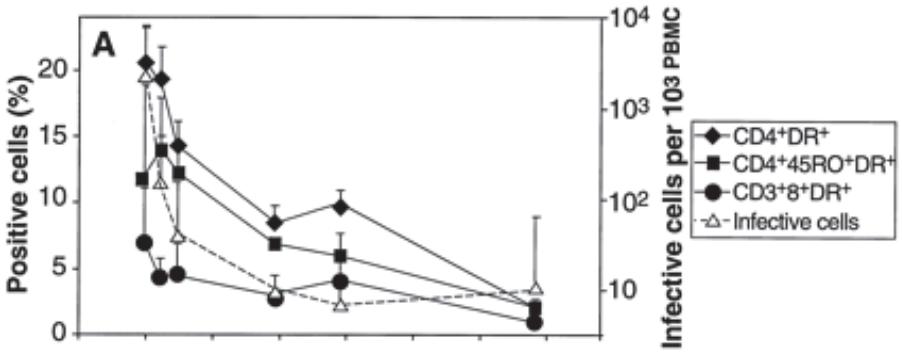


Figure 17 : diminution de l'activation cellulaire des LT CD4 et LT CD8 au cours de la première année de TARV (N=8) (54)

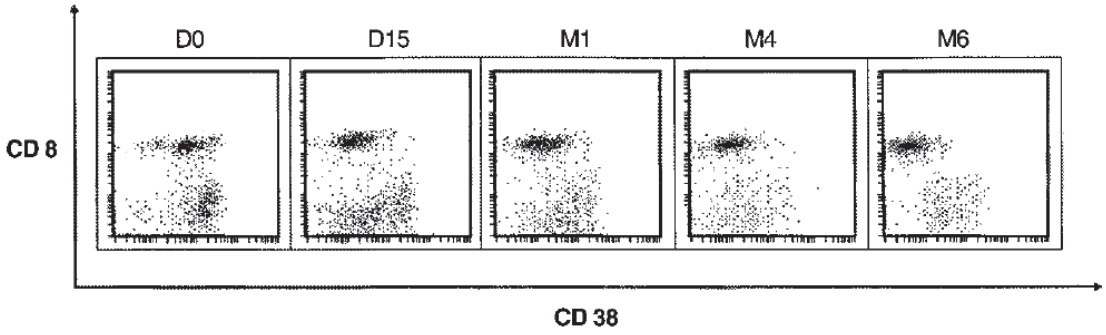


Figure 18. Diminution de l'expression de CD38 sur les LT CD8 au cours de la première année de TARV (54).

b) Persistance d'une augmentation des marqueurs lymphocytaires T d'activation humorale

Pour la plupart des auteurs, il existe une diminution importante de l'activation immune chez les patients infectés par le VIH, mais restant plus élevée que chez les populations contrôles non infectées (271). Ceci a été montré à 1 an de TARV, concernant le pourcentage de LT CD8 exprimant CD38 et/ou HLA-DR (272)(273), mais aussi à 3 ans (273). Il semble que cette persistance d'activation immune soit d'autant plus marquée que les patients débutent une TARV avec des niveaux bas de LT CD4 (<100/mm^3)(274). Il a été montré, à partir de prélèvements sanguins de patients sous TARV, que le traitement permettait de diminuer l'apoptose cellulaire, parallèlement à la récupération des LT CD4 et de façon proportionnelle (40). De même, la TARV permettrait de diminuer les marqueurs de prolifération cellulaire, y compris chez les patients très immunodéprimés avec des LT CD4<100/mm^3 (46).

Enfin, le nombre de LT CD8 peut rester élevé malgré la TARV, dont une majorité de cellules non spécifiques du VIH (275). Ceci reflète l'activation immune persistante malgré un blocage de la réplication virale. De même, le ratio CD4/CD8, perturbé avant l'introduction de la TARV, peut rester anormal chez les patients traités, y compris chez les patients récupérant un taux de LT CD4> 500/mm^3 (276).

c) Facteurs associés à une activation immune persistante

Les facteurs associés à une augmentation persistante du pourcentage de LT CD8 exprimant HLA-DR et CD38 sous TARV ont été récemment étudiés dans une étude transversale (277). Ont été notamment retrouvés comme facteurs prédictifs : un âge >45 ans, la positivité de la sérologie VHC, l'appartenance à l'ethnie hispanique (probablement le reflet d'un accès au soin plus limité, à un diagnostic et une prise en charge plus tardifs de la maladie), un taux de LT CD4<200/mm^3, un ratio CD4/CD8 bas, et le niveau d'activation lymphocytaire avant le début de la TARV.

Cette activation immune persistante pourrait être le reflet d'une réplication virale persistante, malgré une TARV considérée comme « efficace » (278). Dans cette étude, il est montré que l'expression de CD38 sur les LT CD8 ré-augmente lors des périodes de reprise intermittente de la réplication virale (« blips »). D'autres auteurs proposent que cette activation soit le reflet de la réplication virale dans les réservoirs du VIH (*i.e.* compartiments anatomiques moins accessibles à la TARV)(272)(279). Cette réplication virale résiduelle peut être mise en évidence après plus de 10 ans de TARV efficace, avec indétectabilité plasmatique (280). Il a été récemment montré l'absence de lien entre activation immune et une diversité génétique virale, ainsi qu'avec un historique d'échec virologique antérieur (281).

Une étude française a récemment mis en évidence que la persistance de l'expression de CD38 et HLA-DR sur les LT CD8 était indépendante des marqueurs de translocation microbienne, du taux de LT CD4, de Treg ou de l'âge, mais était associée à l'expression de marqueurs de réplication du CMV (282). Le traitement du CMV par valganciclovir chez des patients NRI a permis de montrer une diminution de l'activation immune (283).

d) Effets de l'AI persistante sous TARV

La persistance d'une augmentation des marqueurs d'activation de l'immunité innée (marqueurs solubles : IL1, IL6, CRP…) sous trithérapie a été associée à une morbidité augmentée (cardiovasculaire, cancers..) chez les patients infectés par le VIH (284)(285)(286).

Les données concernant les marqueurs d'activité immunitaire des LT CD4 et CD8 sont

plus discutées.

Il a été montré qu'une augmentation des LT CD8 exprimant CD38 et HLA-DR sous TARV efficace était associée à une augmentation de la mortalité dans une cohorte de 451 patients ougandais suivis pendant 2 ans (287). D'autres études récentes n'ont pas retrouvé d'association entre activation des LT et un plus mauvais devenir clinique chez des patients infectés par le VIH et traités (288)(289). La persistance d'un ratio CD4/CD8 perturbé est associé à une morbidité accrue, identique à ce qui est observée chez des patients âgés, non infectés par le VIH (276). Helleberg *et al*. ont montré très récemment qu'un taux élevé de LT CD8 était associé à une plus grande occurrence d'évènements cliniques non classant SIDA, alors que les patients avec un taux plus bas présentaient plus d'évènements classant SIDA (290).

Une association entre épaisseur média-intima de la carotide et les taux de TNFα receptor 1 et de fibrinogène d'une part, et d'autre part entre l'existence d'une plaque carotidienne et le pourcentage de cellules CD8+CD38+HLADR+ a été retrouvée dans une population de 60 patients virologiquement contrôlés sous TARV (291). Cette association entre activation immune persistante à une plus grande morbidité cardiovasculaire est retrouvée par d'autres auteurs (292)(293).

L'activation immune pourrait également être associée à la survenue de troubles neurocognitifs chez les personnes infectés par le VIH, comorbidité plus fréquemment rencontrée que dans la population générale (294). D'une façon plus générale, il a été montré, dans une étude transversale réalisée chez des patients sous trithérapie avec suppression virologique, que (i) le pourcentage de LT CD8, (ii) le pourcentage de LT CD8 exprimant CD38 et HLA DR et que (iii) le taux plasmatique d'IL6 était plus élevé chez les patients présentant une altération du fonctionnement physiologique global (échelle de Fried)(236).

Aucun lien entre la densité minérale osseuse d'une population de patients sous trithérapie, activation immune et bio marqueur n'a pu être mis en évidence dans une étude transversale récente (295). Une autre étude a, par contre, retrouvé une association significative entre la densité minérale osseuse et le pourcentage de LT CD4 et LT CD8 exprimant HLA-DR, dans une population de patients infectés par le HIV, certains traités et d'autres non (296).

G. Réponse immunitaire à la TARV : effets sur les Treg

Quelques études se sont intéressées à l'évolution des Treg sous TARV. Il y est, de façon consensuelle, retrouvée une augmentation de leur valeur absolue, parallèlement à la diminution de la charge virale plasmatique et une diminution significative du pourcentage de Treg sous TARV (125)(297)(156)(171)(175)(298)(167)(251)(219)(172).

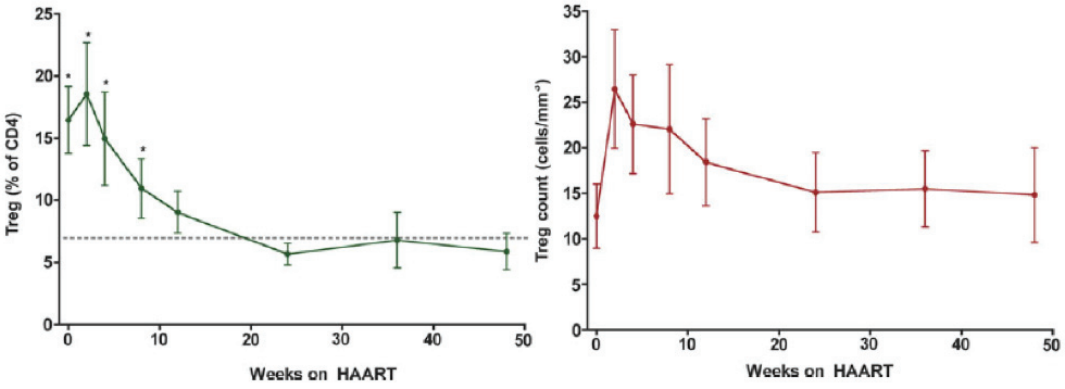


Figure 19. Evolution du pourcentage (**à gauche**) et de la valeur absolue (**à droite**) des Treg CD4+CD25+FoxP3+, dans une population de 18 patients infectés par le VIH débutant une TARV et suivis 48 semaines. La ligne brisée à gauche représente la valeur médiane du pourcentage de Treg dans une population contrôle de 17 sujets, non infectés par le VIH (125).

Pour certains auteurs, la TARV permet de ramener le pourcentage de Treg à des valeurs normales. Montes *et al.,* dans une étude prospective de 2011, ont inclus 18 patients suivis pendant 48 semaines (âge médian=37 ans, médiane de LT CD4=75/mm^3, pourcentage de Treg médian CD4+CD25+FoxP3+=13.3%)(125). A la fin du suivi, le pourcentage de Treg était comparable à celui de patients contrôles, en médiane 5.1%. Au moins une autre étude récente (transversale) a retrouvé des résultats similaires dans une population de patient sous TARV depuis de nombreuses années (plus de 6 ans de suppression virologique) (297).

Cependant, Gaardbo *et al* en 2008 ont retrouvé dans une étude prospective portant sur 26 patients débutants une TARV et suivis pendant 2 ans (âge médian=40 ans, médiane LT

CD4=208/mm^3, médiane Treg CD4+CD25++=2.2 %) une absence de diminution significative du pourcentage de Treg, mais également de l'expression de Foxp3 mesurée par la quantification de l'ARN messager de FoxP3 par RT-PCR (175). D'autres auteurs ont retrouvé la persistance d'une augmentation anormale du pourcentage de Treg parmi les LT CD4 chez des patients traités, par rapports à des sujets contrôles non infectés par le VIH (156)(171).

Ces différences peuvent s'expliquer par des populations étudiées non comparables (Ex: certains patients dans l'étude de Lim *et al* ne sont pas en suppression virologique, avec des niveaux d'activation immune qui restent élevés sous TARV), l'utilisation de marqueurs phénotypiques différents pour caractériser les Treg (CD4+CD25+FoxP3+, *vs* CD4+CD25++, quantification de l'ARNm de FoxP3), ou bien des durées de suivi différentes.

Zhou *et al.* ont réalisé une étude prospective publiée dans AIDS en 2013, incluant (de 2008 à 2011) 92 sujets contrôles, 13 patients avec une infection VIH aigue, et 57 patients débutant une TARV et suivis pendant 2 ans (298). Ils ont montré que le pourcentage de Treg « naïfs » CD4+CD25lowFoxP3lowCD45RA+ était normalisé en fin de suivi, mais que le pourcentage de Treg « activés » CD4+CD25HiFoxP3+CD45RA- restait élevé. Les pourcentages de Treg « naïfs » et « activés » étaient différents selon le groupe de patient considéré, et le taux de CD4 à l'introduction de la TARV. Ces résultats sont importants car ils montrent qu'il ne faut probablement pas considérer les Treg comme une population de cellules homogènes, et que les différents sous-types peuvent se comporter différemment selon le stade de la maladie (aigüe, chronique, traitée ou non, et en fonction du degré d'immunodépression). Ces sous-populations ont probablement différents mécanismes de régulations homéostatiques, et différentes capacités suppressives en fonction des différentes situations cliniques qui peuvent se rencontrer au cours d'une infection complexe comme l'infection par le VIH.

SYNTHESE DE LA PROBLEMATIQUE

Et introduction aux travaux réalisés

Le nombre de LT CD4 mesuré chez les patients sous TARV est un marqueur majeur pronostique de morbi-mortalité. Comprendre les mécanismes limitant la réponse immune au traitement est fondamental en 2015. Il existe de nombreuses études sur les liens possibles entre réponse immune, activation immune et Treg. La comparabilité des résultats est délicate, du fait de nombreuses différences dans les caractéristiques épidémiologiques, cliniques et biologiques des patients inclus, les durées de suivis, les phénotypes utilisés, et les définitions de la non-réponse immunologique. Il existe donc des discordances sur le rôle joué par l'activation immunitaire des LT CD4 et CD8, ainsi que des incertitudes sur celui des Treg, dans cette absence de récupération d'un taux normal de LT CD4.

Dans un contexte de recherche clinique et avec le but de clarifier les liens entre NRI, activation immunitaire et Treg, nous avons focalisé notre intérêt sur les Treg et avons formulé deux hypothèses :

H1. Il existe un lien entre le pourcentage de Treg, l'activation immune des LT CD4 et/ou LT CD8, et réponse immune discordante à la TARV ;
H2. Le pourcentage de Treg mesuré à l'introduction de la TARV est utilisable en tant que marqueur indépendant de risque de réponse immunitaire discordante à la TARV

Afin d'explorer ces deux hypothèses, nous avons mené deux études simultanées, après avoir au préalable développé et validé deux techniques de marquage des Treg.

Dans un premier temps, nous avons validé une nouvelle technique de marquage intracellulaire de FoxP3 « en une étape » à partir d'échantillons sanguins de patients infectés par le VIH, de patients de réanimation et des sujets sains, par rapport à la technique de référence. Cette technique permet désormais de marquer en intracellulaire FoxP3 en un temps,

avec un gain de temps important rendant l'identification des Treg et leur analyse faisable en pratique quotidienne (**étude 1**).

Nous avons utilisé ce nouveau marquage pour étudier les liens entre réponse immunitaire au traitement, activation immune, différentes sous populations de Treg et la détection d'une virémie résiduelle, au sein d'une population de patients relativement importante, sous TARV effective (CV<40 cp/mL) depuis de nombreuses années. Nous avons pu réaliser une analyse multivariée des facteurs prédictifs associée à la NRI (**étude 2**).

Enfin et parallèlement à ces travaux, nous avons conduit une étude prospective incluant tous les patients infectés par le VIH débutant une TARV à Lyon en 2011, avec un suivi de 2 ans, afin d'étudier l'impact pronostique du pourcentage de Treg mesurés à l'introduction du traitement, sur l'évolution du taux de LT CD4 (**étude 4**). Pour ce faire, et dans l'attente de la validation du nouveau marquage de Foxp3 intracellulaire « en une étape » (en cours d'étude au moment de l'inclusion des premiers patients), nous avons utilisé le marqueur CD4+CD25+CD127- pour caractériser les Treg, après avoir démontré sa pertinence chez des patients infectés par le VIH, virémiques et non virémiques (**étude 3**).

TRAVAIL PERSONNEL

Article 1. Validation d'une nouvelle technique de marquage de Foxp3 en une étape, à partir d'échantillons cliniques

DEMARET Julie*, SAISON Julien*, VENET Fabienne, MALCUS Christophe, POITEVIN-LATER Françoise, LEPAPE Alain, FERRY Tristan, MONNERET Guillaume, Lyon HIV Cohort Study Group

**** : contribution équivalente au travail***

La cytométrie en flux est un outil puissant qui permet d'isoler et d'étudier les phénotypes et les fonctions de sous populations cellulaires (299). Cependant, cette technique peut être chronophage, en particulier pour les marquages intracellulaires, rendant son utilisation parfois difficile en routine ou pour des cohortes importantes de patients en recherche clinique. Une nouvelle technique permettant de réaliser les marquages intracellulaires en une étape a récemment été développée (PerFix nc, BeckmanCoulter).

Compte tenu de l'importance croissante du monitorage des lymphocytes T régulateurs (Treg) en clinique, nous avons focalisé notre attention sur le marquage intracellulaire de FOXP3. L'objectif de ce travail était d'évaluer cette nouvelle méthode (PerFix nc) en la comparant avec la technique de référence (e-Bioscience) dans des échantillons cliniques.

Les échantillons de sang ont été marqués en parallèle avec les deux méthodes. Les pourcentages de Treg et les moyennes de fluorescence ont été mesurés par cytométrie en flux (Navios, BeckmanCoulter).

15 patients infectés par le VIH-1, 5 patients polytraumatisés pris en charge en réanimation et 5 sujets sains ont été inclus dans l'étude. En comparant les résultats obtenus avec les deux méthodes, aucune différence significative n'a été observée entre les pourcentages de cellules CD4+FOXP3+, CD4+CD25+FOXP3+ et CD4+CD25+CD127-FOXP3+. De plus, on note une forte corrélation entre les pourcentages de lymphocytes CD4+FOXP3+CD25+CD127- mesurés à l'aide des deux techniques ($r=0.843$, $p<0,001$,

ICC=0,820, p<0,001). La nouvelle méthode offre l'avantage de s'effectuer en 90 min alors qu'il en fallait 200 avec la technique de référence. Surtout, les marquages obtenus avec la nouvelle méthode sont très robustes avec une précision intra-test excellente (CV<6.4%), une meilleure discrimination, une stabilité et reproductibilité correctes du marquage après conservation des échantillons.

La bonne corrélation avec la méthode de référence, une meilleure qualité de marquage (le contrôle isotypique n'est plus utile) et un temps de manipulation largement raccourci nous font conclure que cette nouvelle procédure de marquage intracellulaire présente de multiples avantages. Si elle reste à être validée pour d'autres marquages intracellulaires et dans d'autres circonstances cliniques, ces résultats préliminaires sont néanmoins prometteurs quant à son développement futur dans les laboratoires de cytométrie en flux.

Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 84B:187–193 (2013)

Original Article

Assessment of a Novel Flow Cytometry Technique of One-Step Intracellular Staining: Example of FOXP3 in Clinical Samples

Julie Demaret,[1,2†] Julien Saison,[1,2,3,5†] Fabienne Venet,[1,2] Christophe Malcus,[1] Francoise Poitevin-Later,[1] Alain Lepape,[2,4] Tristan Ferry,[2,3,5] and Guillaume Monneret[1,2*]

[1]Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Laboratoire d'Immunologie, Lyon, F-69003, France
[2]Université Claude Bernard Lyon 1, Hospices civils de Lyon 1 -EAM 4174, Lyon, F-69008, France
[3]Hospices Civils de Lyon, Hôpital de la Croix Rousse, Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Lyon, F-69004, France
[4]Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Réanimation, Pierre-Bénite F-69495, France
[5]INSERM, U851, 21 avenue Tony Garnier, Lyon, F-69007, France

Background: By measuring multiple parameters on a single-cell basis, flow cytometry is a potent tool to dissect the phenotypes and functions of cell subsets. However, because this technique may be time-consuming, particularly for intracellular staining, it could be problematic for its use in daily routine or in large cohorts. Recently, a novel reagent has been developed to perform intracellular staining in one step. The objective of our study was thus to assess this new method in comparison with the reference technique by focusing on FOXP3 staining in clinical samples.

Methods: Peripheral blood was collected from 15 HIV-1-infected patients, 5 critically ill patients, and 5 healthy volunteers and stained using the two different methods. Different subsets of FOXP3 positive cells were investigated by flow cytometry.

Results: When comparing results obtained with the two techniques, no statistical differences between the percentages of CD4+FOXP3+, CD4+CD25+FOXP3+, and CD4+CD25+CD127−FOXP3+ cells were observed. Besides, a strong correlation between percentages of CD4+FOXP3+CD25+CD127− lymphocytes measured with both techniques was found in patients (r: 0.843, $P < 0.001$, intra-class correlation coefficient: 0.820, $P < 0.001$). Importantly, flow cytometry stainings obtained with the one-step method were very robust with an excellent intra-assay precision, a better discriminative power and correct stability and reproducibility of the staining even after blood storage.

Conclusions: With a strong correlation between the percentages of FOXP3+ Tregs when compared with the reference method, a better staining quality, a shorter realization time and no need of isotype control, this one step procedure may represent an important improvement for a daily routine use of intracellular staining. © 2013 International Clinical Cytometry Society

Key terms: flow cytometry; intracellular staining; CD4+CD25+; FOXP3; regulatory T cells

How to cite this article: Demaret J, Saison J, Venet F, Malcus C, Poitevin-Later F, Lepape A, Ferry T, Monneret G. Assessment of a novel flow cytometry technique of one-step intracellular staining: Example of FOXP3 in clinical samples. Cytometry Part B 2013; 84B: 187–193.

Grant sponsor: Beckman Coulter.
†Julie Demaret and Julien Saison contributed equally to the work.
*Correspondence to: Dr. Guillaume Monneret, Immunology Laboratory, Hopital E. Herriot, Hospices Civils de Lyon, 5 places d'Arsonval, 69437 Lyon Cedex 03, France.
E-mail: guillaume.monneret@chu-lyon.fr.

Received 5 September 2012; Revision 30 November 2012; Accepted 3 December 2012
Published online 16 January 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).
DOI: 10.1002/cyto.b.21070

© 2013 International Clinical Cytometry Society

Flow cytometry is considered as a powerful tool for cellular analysis, either for studying cell phenotypes or various immune cell functions (1). However, several issues exist when considering flow cytometric intracellular stainings, especially in the context of a daily routine use and in clinical research protocols including large cohorts of patients for whom samples need to be processed immediately (2). In particular, this technique is time-consuming due to permeabilization and multiple washing steps and most importantly, results are usually poorly reproducible and hardly standardizable. This renders intracellular flow cytometry use poorly suitable for multicentric clinical studies.

Recently, a novel reagent has been developed to perform flow cytometry intracellular staining in one step (including permeabilization and staining). The aim of this study was thus to test the robustness of this reagent in daily routine conditions in clinical samples.

Accumulated evidence suggests the essential functions of regulatory T cells (Treg) in the pathophysiology of many clinical conditions such as autoimmune diseases (3), transplantations (4), severe septic shock (5), cancer (6), HIV infection (7), and in the development and maintenance of immunologic tolerance (8). However, very few studies have been conducted in large prospective clinical cohorts. This could be partly explained as Treg can only be precisely identified by flow cytometry using intracellular FOXP3 staining, the key transcriptional factor for Treg (9,10). Even if other phenotypes (such as CD4+CD25+ or CD4+CD25+CD127−) are known to be good surrogate identification strategy for Treg (11), FOXP3 remains to date, the only marker to appropriately identify those cells (9,12).

In this study, we thus assessed the quality and reproducibility of FOXP3 intracellular staining by using this novel one-step protocol in comparison with the well-accepted reference method in clinical samples.

MATERIAL AND METHODS

Study Population

HIV-1-infected patients from the Hospices Civils de Lyon HIV cohort, located in Croix-Rousse Hospital and intensive care unit (ICU) patients from Lyon-Sud Hospital and Edouard Herriot Hospital (Hospices Civils de Lyon, Lyon, France) were included. Samples were collected in EDTA anticoagulant tubes. Analyses were performed on available residual blood after routine analyses were performed.

Fifteen HIV-1-infected patients [men = 10 (67%), median age = 50 years, inter-quartile range (IQR): 38–69] were included. They all received highly active anti-retroviral therapy (HAART) [median treatment duration = 7.65 years, IQR: 3.03–11.03] and were aviremic with a viral load (VL) at baseline below 50 copies/ml (Abbott RealTi*me* HIV-1 assay and *m2000* RT system platform). Their median CD4+ cell count at baseline was 573 cells/mm^3 [IQR: 391–761].

Five ICU patients were included [men = 2 (40%), median age = 70 years, IQR: 29–79]. Three of them met criteria for septic shock diagnosis of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine (13) and two were trauma patients (Injury Severity Score: ISS > 25).

Five healthy volunteers [men = 2 (40%), median age = 34, IQR: 26–56], all members of the laboratory staff, were also included after informed consent was given.

No statistical differences were observed in clinical data for age ($P = 0.317$) and gender ($P = 0.342$) among HIV patients, ICU patients, and healthy donors.

Reference Method of Intracellular Staining

Samples were stained with Anti-Human Foxp3 Staining Set following manufacturer's recommendations (eBioscience, San Diego, CA). As already described (14), samples were first stained using surface markers: anti human phycoerythrin (PE)-labeled anti-CD127, PE-Texas Red (ECD)-labeled anti-CD4 and PE-Cyanine5 (PC5)-labeled anti-CD25 antibodies (Beckman Coulter, Hialeah, FL) and incubated for 15 min. Samples were then lysed using Versalyse lysing solution (Beckman Coulter) for 15 min. After a washing step, permeabilization was performed using Fix/Perm Buffer for 40 min. Following three more washing steps with permeabilization buffer and incubation with this buffer and normal rat serum for 15 min (blocking step), the FoxP3 intracellular staining using anti human FoxP3-FITC antibody (clone PCH101, eBioscience) was performed for 30 min. Samples were finally washed two times with permeabilization buffer. Rat IgG2a isotype control was used to evaluate non-specific staining.

One-Step Method of Intracellular Staining

The PerFix-no centrifuge assay Kit from Beckman Coulter was assessed. Staining of fresh whole blood was performed using PE-labeled anti-CD25, PE-Cyanine7 (PC7)-labeled anti-CD127, Alexa fluor 647 (AF647)-labeled anti-FoxP3, and Pacific Blue (PB)-labeled anti-CD4 (Beckman Coulter). FoxP3-antibodies (clone 259D) were purchased from BioLegend (San Diego, CA). According to the manufacturer's instructions, samples were first fixed with the fixative reagent and incubated for 15 min. Then, aliquots were simultaneously permeabilized thanks to the permeabilizing reagent and stained with fluorochrome-conjugated antibodies. After 60 min of incubation, samples were washed once with PBS and secondly with a solution containing formaldehyde.

One-Step Method Robustness

To study intra-assay precision, two sets of analyses were performed: (i) one sample stained 10 times and analyzed 10 times (ii) one sample stained once and analyzed 10 times. To assess the stability of the staining, expression of the markers was measured immediately after staining, then 2 h and 24 h later for five patients. To assess the effect of blood storage before staining, results from fresh whole blood or obtained after blood storage for 24 h at 4°C and at room temperature for three patients were compared.

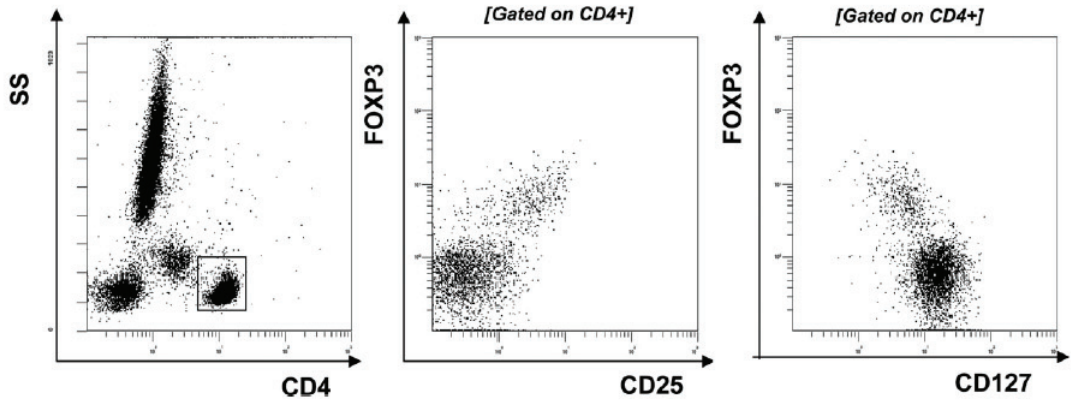


FIG. 1. Examples of plots representing co-expression of FOXP3 and CD25 or FOXP3 and CD127 in CD4+ cells. Cells were first gated on SSC/CD4 (left histogram).

Flow Cytometric Data Acquisition and Analysis

Cytometry analyses were performed on a NAVIOS flow cytometer using the NAVIOS software (Beckman Coulter). FOXP3 expression was examined in three different CD4+ subsets as followed: CD4+, CD4+CD25+, and CD4+CD25+CD127− lymphocytes.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using SPSS (version 17.0; SPSS, Chicago, IL) and GraphPad Prism (version 5.03, GraphPad Software, La Jolla, CA) software. Normality of the parameters was assessed using the Kolmogorov–Smirnov test. *T*-test, Wilcoxon test for continuous variables and exact Fisher test for categorical variables were performed. Correlations were studied using the Pearson's correlation coefficient test and the intra-class correlation coefficient (ICC). The Bland–Altman approach was also used to assess the agreement between the methods. *P*-values were considered significant when lower than 0.05.

RESULTS

As Treg, independently of FOXP3 expression, are usually described as either CD4+CD25+ or CD4+CD25+CD127− lymphocytes, FOXP3 expression was evaluated in these different subsets. Examples of plots representing co-expression of either FOXP3 and CD25 or FOXP3 and CD127 in CD4+ gated cells are shown in Figure 1.

No statistical differences between the percentages of CD4+FOXP3+, CD4+CD25+FOXP3+, and CD4+CD25+CD127−FOXP3+ lymphocytes measured with the two techniques were observed. This was true for the overall patient population as well as in each group individually (Table 1). In line, a strong correlation between percentages of CD4+FOXP3+ cells obtained with the two different techniques was identified in the global population (r: 0.763, $P < 0.001$, ICC: 0.759, $P < 0.001$). Likewise, percentages of CD4+CD25+FOXP3+ (r: 0.715, $P < 0.001$, ICC: 0.659, $P < 0.001$) and CD4+CD25+CD127−FOXP3+ lymphocytes (r: 0.843, $P < 0.001$, ICC: 0.820, $P < 0.001$) (Fig. 2) were nicely correlated between reference and one-step procedures. Moreover, Bland–Altman plots revealed good agreement between both methods regardless of the phenotype (Fig. 2).

We then compared the cell separation/discriminative power of these two techniques for FOXP3+ lymphocytes gating. The signal to noise ratio was calculated for each technique by comparing the mean of fluorescence intensity (MFI) of FOXP3 positive versus negative cells among CD4+ lymphocytes (MFI ratios and differences). Interestingly, significantly different discriminative power was identified between these two techniques in each study group and in the whole study population (Table 1). We indeed observed that FOXP3+ cell identification after one-step intracellular staining was largely easier than with the reference method (Fig. 3).

When testing intra-assay precision, we observed that coefficients of variation (CV) of the percentage of CD4+FOPX3+ cells measured with the one-step technique ranged from 4 to 5.8%. Similar results were obtained when percentages of CD4+CD25+FOXP3+ lymphocytes were measured (CV between 3.3 and 6.4%).

When testing stability of the staining, we did not observe any statistical difference. We observed in five patients that mean percentage of CD4+FOXP3+ cells was 7.6% (standard deviation, SD: 1.7) at *T*0, 7.1% (SD: 1.1) at *T*+2 h, and 7.4% (SD: 1.4) at T+24 h (Fig. 4a). In the same patients, the mean MFI ratio between FOXP3− and FOXP3+ cells among CD4+ lymphocytes was 10.5 (SD: 2.2) at *T*0, 10.3 (SD: 1.5) at *T*+2 h, and 9.6 (SD: 2) at *T*+24 h (Fig. 4b). Similar results were obtained with other phenotypes of Treg (CD4+CD25+FOXP3+ and CD4+CD25+CD127−FOXP3+). These results indicated an excellent staining stability.

Table 1
Percentages of Positive Cells Among CD4+ Lymphocytes and Mean of Fluorescence Intensity (MFI) of FOXP3 for Different Treg Phenotypes

		Reference method	One step method	*P*
Percentages among CD4+ cells				
FOXP3+	HIV	9.26 [7.09–10.44]	10.66 [9.62–12.27]	0.072
	ICU	11.85 [9.11–17.32]	12.65 [9.68–16.53]	0.98
	HV	11.92 [9.45–12.53]	11.65 [10–12.08]	0.99
	Total	10.08 [7.89–11.89]	11.29 [9.80–12.5]	0.257
FOXP3+ CD25+	HIV	7.27 [5.28–9.09]	6.91 [5.27–8.16]	0.492
	ICU	10.51 [6.96–14.86]	9.04 [5.85–10.32]	0.314
	HV	5.96 [5.69–7.83]	6.73 [6.41–8.11]	0.481
	Total	7.34 [5.63–9.44]	6.97 [5.97–8.59]	0.33
FOXP3+ CD25+ CD127−	HIV	5.62 [4.63–6.46]	6.32 [5.83–7.13]	0.192
	ICU	9 [6.07–12.7]	8.9 [6.35–10.68]	0.753
	HV	5.72 [5.03–6.83]	6.18 [5.22–7.28]	0.666
	Total	5.74 [4.83–7.92]	6.32 [5.84–8.46]	0.529
Mean of Fluorescence Intensity				
MFI Difference: FOXP3+ minus FOXP3−	HIV	1.81 [1.60–2.01]	7.40 [6.16–9.52]	<0.001
	ICU	2.6 [1.57–3.16]	10.59 [6.51–17.43]	0.019
	HV	1.27 [1.16–1.36]	9.94 [5.67–10]	0.003
	Total	1.63 [1.36–2.03]	7.52 [6.18–10.13]	<0.001
MFI Ratio: FOXP3+ versus FOXP3−	HIV	3.17 [2.71–3.46]	10.84 [9.82–12.19]	<0.001
	ICU	4.92 [3.3–5.35]	12.64 [11.24–17.29]	0.001
	HV	2.78 [2.64–2.94]	12.5 [10–12.76]	<0.001
	Total	3.17 [2.74–3.46]	11.81 [10.35–12.58]	<0.001

Results were obtained in HIV-infected patients (HIV, $n = 15$), critically ill patients (ICU, $n = 5$), healthy volunteers (HV, $n = 5$) and in the whole cohort (Total, $n = 25$). Results are presented as median and IQR (inter quartile range) between brackets. *P* values were calculated using student *T*-test.

Finally, when blood storage before staining was tested, we did not observe any statistical difference. The mean percentage of CD4+FOXP3+ cells for three patients were respectively, 7.0% (SD: 0.8) at *T*0, 6.9% (SD: 1.6) after storage for 24 h at 4°C, and 7.1% (SD: 0.9) after 24 h storage at room temperature (Fig. 4c). The mean MFI ratio between FOXP3− and FOXP3+ cells among CD4+ population for these patients was found to be very stable at 10.7 (SD: 3.1) at *T*0, 11.7 (SD: 3.2) after 24 h storage at 4°C, and 10.6 (SD: 2.1) after 24 h storage at room temperature (Fig. 4d). We obtained the same results considering other phenotypes of Treg (CD4+ CD25+FOXP3+ and CD4+CD25+CD127−FOXP3+).

DISCUSSION

The main result of our study is to show that Treg percentages obtained using reference and one-step techniques are well correlated. This was observed whatever the phenotype used for Treg identification (i.e., FOXP3+ cells among CD4+, CD4+CD25+, or CD4+CD25+CD127− lymphocytes). Another important result was that flow cytometry staining obtained by using one-step intracellular staining appeared as a robust technique with good intra-assay precision and adequate staining stability even after blood storage.

Interestingly, this novel technique presents with better advantages than reference technique.

Indeed, this one-step intracellular staining procedure offers several improvements. Intracellular FOXP3 staining with this technique takes about 90 min to complete (CD4, CD25, CD127, and FOXP3 stainings) whereas 200 min are needed for the usual reference method. This is due to the steps of permeabilization and staining (extra and intracellular) that are done at the same time in the one-step technique therefore shortening additional incubation times and wash/centrifugations cycles. Importantly, this diminished number of washing cycles did not impact the non-specific background fluorescence that could have been expected to be amplified. In contrast, the signal to noise ratio between FOXP3+ and FOXP3− cells was even improved with the one-step approach (Table 1). This enables for a better discrimination of the positive FOXP3 cells amongst CD4+ population with the one-step method. This is without the requirement of an isotype control use. In contrary, such specific cell separation appears as virtually impossible in some patients with the reference technique (Fig. 2).

Therefore, specifically regarding FOXP3 staining in clinical samples, our results open new perspectives of Treg investigation either in large prospective clinical studies or in daily routine. This could also be relevant for the study of different Treg subsets such as cells co-expressing CD45RA, CD38, or CTLA4 (15,16). Moreover, this new technique obviously allows for the staining of other intracellular markers whatever the cells/phenotypes considered and could be of major interest for various users of flow cytometry.

Our study presents some limitations. In particular, two different fluorochromes and two different clones were used for intracellular FOXP3 staining in the compared techniques. This could partly explain the difference in discriminative power between the methods. For example, some studies have pointed out that the clone used in the reference method was associated with a

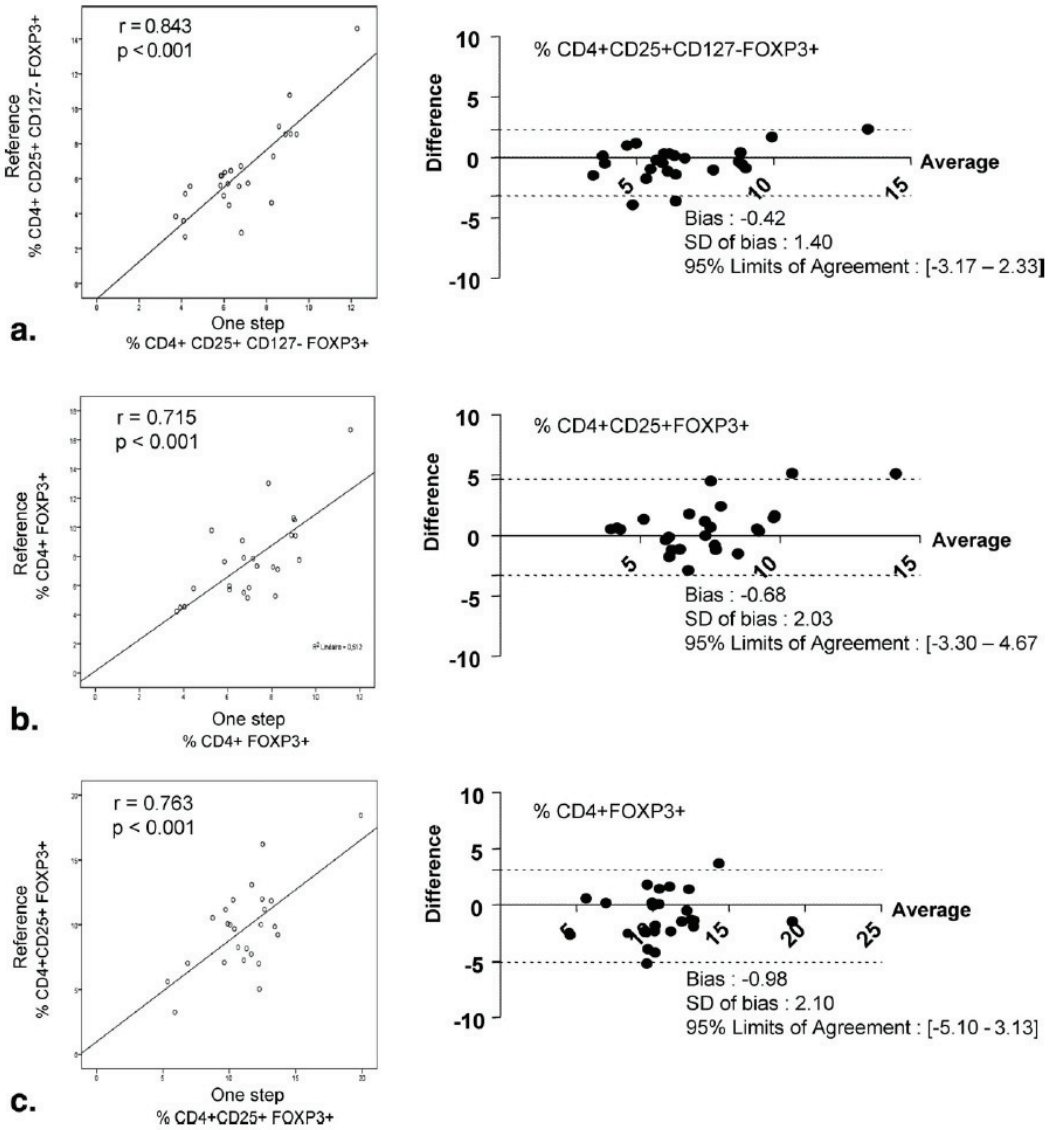


FIG. 2. Correlation and Bland–Altman plots between Treg percentages measured by using reference and one-step techniques. For each Treg phenotype, correlation (left side—Pearson's correlation coefficient test) and Bland–Altman plot (right side—the black line indicates the average value of the differences between the two methods; the two dotted lines form the 95% reference range) are represented as (**a**) CD4+CD25+CD127−FOXP3+cells; (**b**) CD4+CD25+FOXP3+ cells, and (**c**) CD4+FOXP3+ cells.

higher level of non-specific staining compared with other clones (17,18). This obviously needs to be confirmed in a subsequent study. Moreover, we only studied the correlation between the methods in three different pathologic situations. This novel method may therefore not be suitable in other clinical conditions. Thus, these preliminary results should be validated in a larger cohort of patients and in other clinical contexts. Besides, standardization of this novel technique should be elaborated on.

CONCLUSION

By comparing a one-step intracellular staining procedure with a reference protocol, we obtained a strong correlation between percentages of FOXP3+ Treg. Moreover, with a better staining quality, a shorter realization

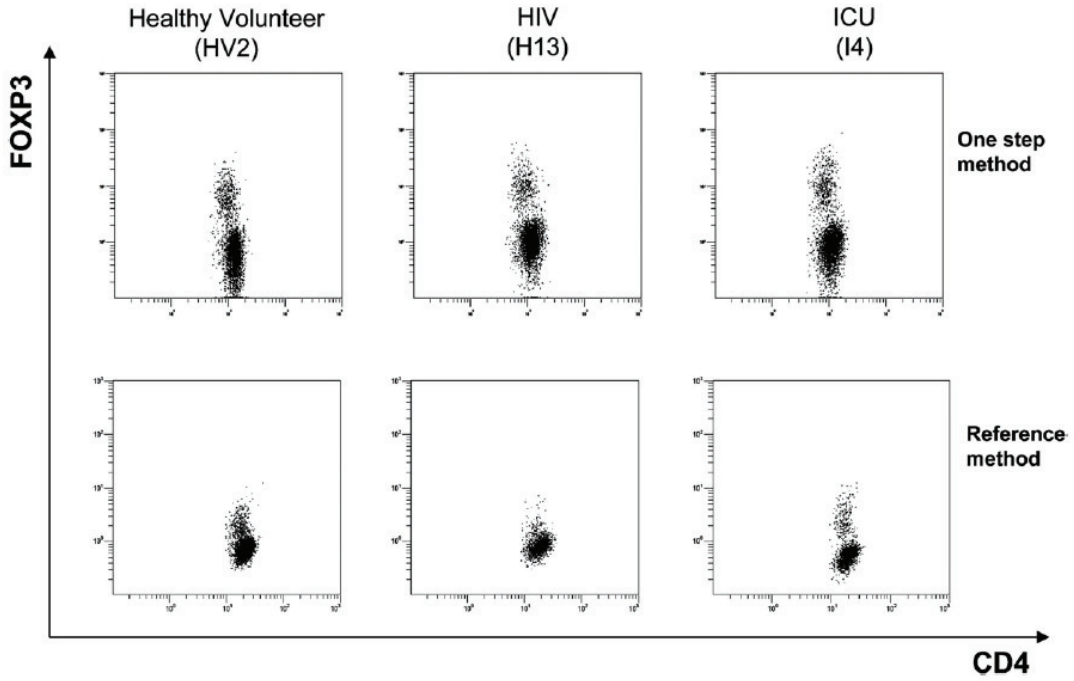


FIG. 3. Representative biparametric histograms of CD4+FOXP3+ cells for one-step and reference procedures. Both procedures were simultaneously used in one healthy volunteer, one HIV-infected patient, and one ICU patient.

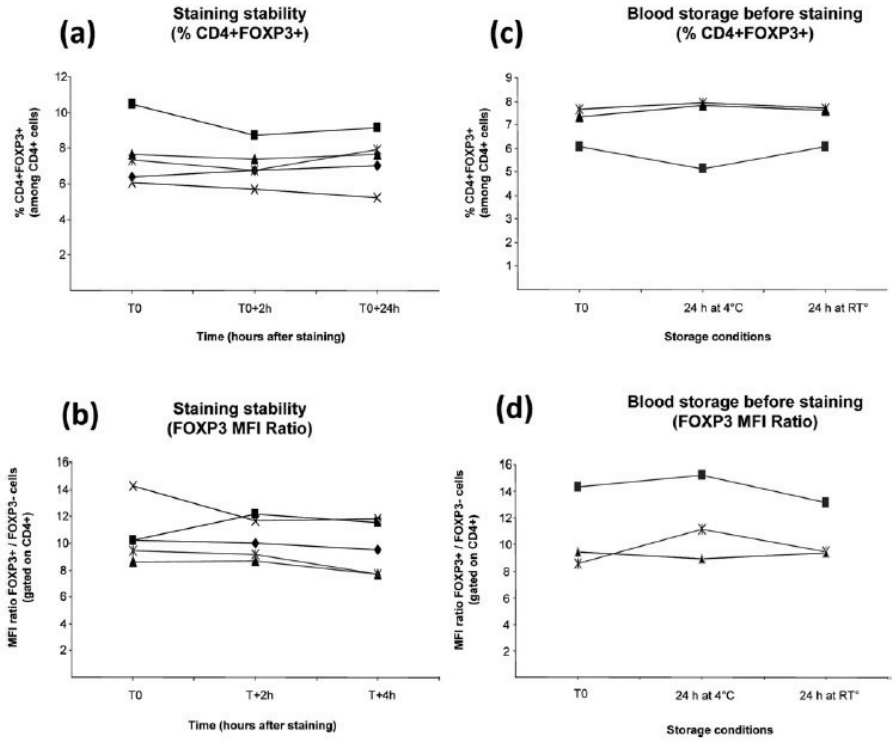


FIG. 4. One-step method robustness (example of CD4+FOXP3+ cells). (**a**,**b**) Staining stability was evaluated for the one-step technique at three time points (*T0*, *T*+2 h after staining, *T*+24 h after staining) in five HIV-infected patients for (a) % CD4+FOXP3+ cells and (b) MFI ratio between FOXP3+ and FOXP3- cells. (**c**,**d**). Effect of blood storage before staining was evaluated for (c) CD4+FOXP3+ cells and (d) MFI ratio between FOXP3+ and FOXP3− cells. The one-step technique was performed in three HIV-infected patients. Cells were stained at *T0* and after 24 h storage at 4°C and 24 h storage at room temperature (RT). For each graph, individual values are presented.

time and no isotype control requirement, this one-step procedure appears adequate for a daily routine use and in prospective clinical studies. This one-step procedure of intracellular staining therefore may represent an important improvement in the study of intracellular molecules by flow cytometry in clinical studies.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Anne Portier and Caroline Guignant for technical assistance.

DISCLOSURE

This study was supported by Beckman Coulter through donations of laboratory equipments and supplies. This private company had no role in the study design, the collection or interpretation of the data. Similarly, Beckman Coulter had no role in the preparation of the manuscript or the decision to submit it for publication. Conversely, eBioscience did not supply any of the reagents for the reference method.

LITERATURE CITED

1. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. Nat Rev Immunol 2012;12:191–200.
2. Perez OD, Mitchell D, Campos R, Gao GJ, Li L, Nolan GP. Multiparameter analysis of intracellular phosphoepitopes in immunophenotyped cell populations by flow cytometry. Curr Protoc Cytom 2005;Chapter 6:Unit 6 20.
3. Baecher-Allan C, Hafler DA. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. Immunol Rev 2006;212:203–216.
4. Wood KJ, Bushell A, Hester J. Regulatory immune cells in transplantation. Nat Rev Immunol 2012;12:417–430.
5. Monneret G, Venet F. Additional bad news from regulatory T cells in sepsis. Crit Care 2010;14:453.
6. Erfani N, Mehrabadi SM, Ghayumi MA, Haghshenas MR, Mojtahedi Z, Ghaderi A, Amani D. Increase of regulatory T cells in metastatic stage and CTLA-4 over expression in lymphocytes of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). Lung Cancer 2012;77:306–311.
7. Elahi S, Dinges WL, Lejarcegui N, Laing KJ, Collier AC, Koelle DM, McElrath MJ, Horton H. Protective HIV-specific CD8+ T cells evade Treg cell suppression. Nat Med 2011;17:989–995.
8. Fukaya T, Takagi H, Sato Y, Sato K, Eizumi K, Taya H, Shin T, Chen L, Dong C, Azuma M, et al. Crucial roles of B7-H1 and B7-DC expressed on mesenteric lymph node dendritic cells in the generation of antigen-specific CD4+Foxp3+ regulatory T cells in the establishment of oral tolerance. Blood 2010;116:2266–2276.
9. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. Nat Rev Immunol 2010;10:490–500.
10. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Nat Immunol 2003;4:330–336.
11. Saison J, Demaret J, Venet F, Chidiac C, Malcus C, Poitevin-Later F, Tardy JC, Ferry T, Monneret G. CD4+CD25+CD127- assessment as a surrogate phenotype for FOXP3+ regulatory T cells in HIV-1 infected viremic and aviremic subjects. Cytometry B Clin Cytom 2013;84B:50–54.
12. Lanza F. Toward standardization of Foxp3+ regulatory T-cell measurement in clinical settings. Cytometry B Clin Cytom 2009;76B:67–68.
13. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med 2003;31:1250–1256.
14. Venet F, Chung CS, Kherouf H, Geeraert A, Malcus C, Poitevin F, Bohe J, Lepape A, Ayala A, Monneret G. Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25 (+)CD127 (−)) contribute to lymphocyte energy in septic shock patients. Intensive Care Med 2009;35:678–686.
15. Duhen T, Duhen R, Lanzavecchia A, Sallusto F, Campbell DJ. Functionally distinct subsets of human FOXP3+ Treg cells that phenotypically mirror effector Th cells. Blood 2012;119:4430–4440.
16. Simonetta F, Lecuroux C, Girault I, Goujard C, Sinet M, Lambotte O, Venet A, Bourgeois C. Early and long-lasting alteration of effector CD45RA(−)Foxp3(high) regulatory T-cell homeostasis during HIV infection. J Infect Dis 2012;205:1510–1519.
17. Grant J, Bourcier K, Wallace S, Pan D, Conway A, Seyfert-Margolis V, Wallace PK. Validated protocol for FoxP3 reveals increased expression in type 1 diabetes patients.Cytometry B Clin Cytom 2009;76B:69–78.
18. Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. Blood 2007;110:2983–2990.

Article 2. Association entre réponse immunologique discordante à la trithérapie antirétrovirale, pourcentage de lymphocytes T régulateurs, activation immune et virémie résiduelle chez les patients infectés par le VIH

SAISON Julien, FERRY Tristan, DEMARET Julie, MAUCORT BOULCH Delphine, ADER Florence, ICARD Vinca, CHIDIAC Christian, MONNERET Guillaume, Lyon HIV Cohort Study Group

L'absence de récupération d'un taux normal de LT CD4 malgré une trithérapie antirétrovirale (TARV) est associée à une morbidité et une mortalité accrues chez les patients infectés par le VIH. L'activation immunitaire cellulaire (224)(213)(300)(246), les Treg (251)(167) ou l'existence d'une virémie résiduelle détectable (301) ont été incriminées. Cependant le rôle de chacun de ces paramètre est très discuté (126) (172) (302) (244)(251)(224). Les proportions de Treg effecteurs et Treg Terminaux effecteurs, tels que décrits par Sakaguchi *et al* (36) n'ont jamais été étudiées dans ce contexte.

Nous avons donc conduit une étude transversale monocentrique chez 87 patients en succès virologique depuis plusieurs années (hommes=62, moyenne des LT CD4=570/mm3, durée moyenne de la TARV=12 ans). Les patients avec des LT CD4>500/mm^3 ont été classés comme répondeurs immunologiques (RI), et les patients restants (LT CD4<500/mm^3) comme non répondeurs immunologiques (NRI). Les Treg ont été identifiés par le phénotype CD4+CD25++FoxP3+. Les Treg effecteurs et les Treg effecteurs terminaux ont été respectivement identifiés par les phénotypes CD4+CD25++FoxP3+CD45RA- et CD4+CD25++FoxP3+CD45RA-HLADR+. Les lymphocytes T activés ont été identifiés par l'expression (i) de HLADR pour les LT CD4, et (ii) de HLADR, ou de CD38, ou les deux (*i.e.* lymphocytes HLADR+CD38+) pour les LT CD8. La virémie résiduelle a été définie comme une virémie plasmatique détectable en dessous de 40 cp/mL (technique Abbott m2000rt). Une analyse univariée puis multivariée ont été effectuées pour identifier les facteurs associés à la RI.

Dans cette étude, trente-neuf patients présentaient une NRI, et 48 une RI. Les patients du groupe NRI étaient significativement plus âgés (55 *vs* 50 ans, p=0,027), et avaient des pourcentages (parmi les LT CD4) de Treg, Treg effecteurs, Treg effecteurs terminaux et de LT CD4 activés significativement plus élevés (respectivement 9% *vs* 7,5%, p=0,022; 8 *vs*

6,3%, p=0,01; 1,8 *vs* 1,3%, p=0,033; 5,3 *vs* 4 %, p=0,014). Les pourcentages de LT CD8 activés et le nombre de patients présentant une virémie résiduelle n'étaient pas différents entre les deux groupes. En analyse multivariée, le nadir de LT CD4 et le pourcentage de Treg étaient les deux seuls paramètres indépendamment associés à la réponse immunitaire (respectivement OR=2,339, p=0,001 et OR=0,803, p=0,041)(Cf tableau ci-dessous, non inclus dans l'article publié).

Paramater	**IR group (N=48)**		**INR group (N=39)**		**p (univariate model)**	**OR**	**95%CI**	**p (multivariate model)**
Age, in years (Mean, SD)	50.6	(10.8)	55.9	(10.6)	0.029	0.721	0.439-1.183	0.195
Nadir CD4 T cells/mm3 (Mean, SD)	256	(-169)	102	(-82)	<0.001	2.339	1.442-3.793	**0.001**
Zenith viral load, log10 copies/mL (Mean, SD)	4.7	(0.9)	4.9	(0.9)	p>0.15			
Treg cell percentage (Mean, SD)	7	(-2)	9	(-3)	0.024	0.803	0.651-0.991	**0.041**
CD8+CD38+ T cell percentage (Mean, SD)	13.5	(-8)	16.3	(-9)	0.140	0.962	0.908-1.021	0.201

Predictors of immunological response to ART. Statistical test used : univariate and multivariate logistic regression. SD = standard deviation; IR = immunological responder; INR = immunological non responder; OR = Odds ratio; CI = 95% confidence interval

Nos résultats sont donc en faveur d'un rôle délétère des Treg dans la reconstitution immune en LT CD4 plusieurs années après l'introduction de la TARV. Une meilleure compréhension de ce mécanisme pourrait permettre d'envisager des thérapeutiques complémentaires chez les patients NRI.

Clinical & Experimental Immunology
The Journal of Translational Immunology

Clinical and Experimental Immunology ORIGINAL ARTICLE doi:10.1111/cei.12278

Association between discordant immunological response to highly active anti-retroviral therapy, regulatory T cell percentage, immune cell activation and very low-level viraemia in HIV-infected patients

J. Saison,*†‡§ T. Ferry,†‡§ J. Demaret,* D Maucort Boulch,‡¶** F. Venet,*‡ T. Perpoint,† F. Ader,†‡§ V. Icard,††§ C. Chidiac†‡§ and G. Monneret*‡ on behalf of the Lyon HIV Cohort Study

*Immunology Laboratory, E. Herriot Hospital, †Infectious and Tropical Disease Unit and ††Virology Laboratory, Croix Rousse Hospital, ¶Service de Biostatistique, Hospices Civils de Lyon, ‡Lyon-1 University , §CIRI (Centre International de Recherche en Infectiologie), Lyon, and **Equipe Biostatistique Santé, Villeurbanne, France

Accepted for publication 18 January 2014

Correspondence: G. Monneret, Immunology Laboratory, Hopital E. Herriot, Hospices Civils de Lyon, 5 place d'Arsonval, 69437 Lyon Cedex 03, France.
E-mail: guillaume.monneret@chu-lyon.fr

Summary

The mechanisms sustaining the absence of complete immune recovery in HIV-infected patients upon long-term effective highly active anti-retroviral therapy (HAART) remain elusive. Immune activation, regulatory T cells (T_{regs}) or very low-level viraemia (VLLV) have been alternatively suspected, but rarely investigated simultaneously. We performed a cross-sectional study in HIV-infected aviraemic subjects (mean duration of HAART: 12 years) to concomitantly assess parameters associated independently with inadequate immunological response. Patients were classified as complete immunological responders (cIR, $n = 48$) and inadequate immunological responders (iIR, $n = 39$), depending on the $CD4^+$ T cell count (> or < 500/mm^3). Clinical and virological data (including very low-level viraemia) were collected. In parallel, immunophenotyping of $CD4^+$ lymphocytes, including T_{reg} subsets, and $CD8^+$ T cells was performed. Percentages of activated $CD4^+$ T cells, T_{regs}, effector T_{regs} and terminal effector T_{regs} were found to be significantly elevated in iIR. Neither the percentage of activated $CD8^+$ T cells nor VLLV were found to be associated with iIR. In the multivariate analysis, nadir of $CD4^+$ T cell count and percentage of T_{regs} were the only two parameters associated independently with iIR [odds ratio (OR) = 2·339, $P = 0·001$, and OR = 0·803, $P = 0·041$]. We present here the largest study investigating simultaneously the immune response to long-term HAART, activation of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells, T_{reg} percentages and very low-level viraemia. Causative interactions between T_{regs} and $CD4^+$ T cells should now be explored prospectively in a large patients cohort.

Keywords: HAART, immune activation, immunological response, regulatory T cells, very low-level viraemia

Introduction

It has been repeatedly described that approximately 5–30% of highly active anti-retroviral therapy (HAART)-treated patients fail to significantly improve their $CD4^+$ T cell numbers upon effective therapy after obtaining virological success [1–3]. Importantly, this incomplete immune recovery, also called inadequate immunological response [4] (iIR), is associated with increased morbidity and mortality [2,3,5–7]. In contrast, patients with a complete immunological response (i.e. a $CD4^+$ T cell count above 500 cells/mm^3) might present with the same mortality rate as the general population [6,7]. The mechanisms sustaining this inadequate immune recovery in patients with virological success remain elusive.

Many factors have been suspected (reviewed in [4]). Of these, immune cell activation is a hallmark of untreated HIV infection, and a strong prognostic factor of disease severity and progression [8]. In some patients, this phenomenon may persist despite, sustained anti-retroviral therapy and virological suppression [9]. Previous studies have shown higher immune activation (in particular increased percentages of $CD8^+CD38^+$ T cells) in iIR patients compared with patients with an appropriate immune recovery [10–13]. However, these results have been challenged recently [10,14,15].

In addition, among patients with virological success, some present with persistent very low-level viraemia (VLLV) that can still be detected although not quantified (i.e. when routine viral load (VL) is found between

quantitation limit and detection limit) [16]. This also represents one of the suspected causes of virological failure [17,18], immunological suboptimal gain [18] or persistent immune activation [19], but this is also currently debated [20–22].

Finally, regulatory T cells (T_{regs}) are considered as key regulators of the immune system, in particular during chronic viral infections [23–25]. However, their role in HIV aviraemic patients is still poorly understood. They may control $CD4^+$ T cell homeostasis and immune activation or specifically regulate the cellular immune response [26]. Recently, some authors postulated that they might play a role in iIR [14,27]. However, this subject is also currently the matter of intense debates [14,28–35]. Moreover, during HIV infection, the circulating proportion of effector T_{regs} and terminal effector T_{regs}, as described recently by Sakaguchi *et al.* [36], and interaction between T_{regs} and VLLV are not clearly established.

Overall, relationships between these above different parameters and immune response to long-term HAART have not been investigated simultaneously within a single study. Therefore, to obtain further insights into immunological disturbances observed in iIR upon effective long-term HAART, we conducted a cross-sectional study, concomitantly assessing circulating $CD4^+$ T cell count, $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell immune activation, percentages and subsets of T_{regs} and VLLV.

Materials and methods

Study population

We performed a cross-sectional study in a French cohort of HIV-infected subjects, located at the Croix Rousse Hospital (Hospices Civils de Lyon, Lyon, France). During 12 days, every HIV-1 infected asymptomatic patient on suppressive HAART for at least 1 year (virological success, VL < 50 copies/ml) was considered for inclusion. Patients were not included if routine biological analysis (i.e. VL measurement, $CD3^+$, $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells counts) were not performed on the same day as complementary flow cytometry staining included in this study, or if HIV RNA value was above 50 copies/ml. Patients with onco-haematological diseases, cancer, with history of chemotherapy or with clinical evidence of acute infectious disease were not included. Written informed consent was obtained from every subject and local Ethical Committee approval was received for the study.

Evaluation criteria

Patients with at least 500 $CD4^+$ T cells/mm^3 were classified as complete immunological responders (cIR group), whereas remaining patients constituted the inadequate immunological responder group (iIR group). A current VL (i) detected the day of inclusion between one and 39 copies/ml (i.e. below the quantitation limit) or (ii) quantified between 40 and 49 copies/ml was considered as VLLV. Indeed, using routine virological techniques, the detection of HIV RNA is still possible under the threshold of quantitation (i.e. one to 39 copies/ml) [37]. Patients with a confirmed VL above 50 copies/ml were excluded, as described previously.

Routine laboratory assessments

The absolute count of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in fresh peripheral ethylenediamine teraacetic acid (EDTA)-anti-coagulated blood were measured on a NAVIOS flow cytometer using NAVIOS software (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). VL were determined after extraction of 0·6 ml plasma using the Abbott Real Time HIV-1 assay under the dedicated m2000rt version 4·0 m2000rt software package (quantitation limit 40 HIV RNA copies/ml, detection limit one copy/ml).

Cellular immunophenotyping

Fresh EDTA-anti-coagulated whole blood samples were used to perform complementary cellular immunophenotyping of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells subtypes, including T_{regs}. We developed an eight-colour flow cytometry protocol, including intracellular forkhead box protein 3 (FoxP3) staining (CD4/CD8/CD45RA/human leucocyte antigen D-related (HLA-DR)/CD38/CD25/CD127/FoxP3). T_{reg} cells were characterized based on the $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ phenotype. Effector T_{regs} and terminal effectors T_{regs} were defined, respectively, as $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RA^-$ and $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RA^-HLA\text{-}DR^+$ phenotypes [36]. Activated T cells were identified using (i) increased HLA-DR expression for $CD4^+$ T cells and (ii) increased expressions of HLA-DR, CD38 or both ($HLA\text{-}DR^+$ $CD38^+$ cells) for $CD8^+$ T cells. The PerFix-no centrifuge assay kit from Beckman Coulter (Marseille, France) was used, as described previously [38]. Stainings were performed using anti-CD4-Pacific blue (PB), anti-CD8-AlexaFluor 750 (AF750), anti-$CD45RA^-$ fluorescein isothiocyanate (FITC), anti-HLA-DR-krome orange (KO), anti-$CD38^-$phycoerythrin-cyanin 5·5 (PE-Cy5·5), anti-CD25-PE and anti-CD127 (PC7), all from Beckman Coulter, and anti-FoxP3-Alexa Fluor647 (AF647) antibodies (clone 259D) were purchased from BioLegend (San Diego, CA, USA). Gating strategy is presented in Supporting information, Fig. S1.

Statistical analysis

Continuous variables were described using mean and standard deviation or median and interquartile values; categorical variables were described with number and percentage. Normality of continuous variables was assessed using

 © 2014 British Society for Immunology,

the Kolmogorov–Smirnov test; then *t*-tests, or Mann–Whitney *U*-tests when appropriate, were performed for continuous variables. Exact Fisher tests for categorical variables were performed. Correlations were studied using the Pearson's or Spearman's correlation coefficient tests, when appropriate. To assess predictors of immunological responses to HAART, univariate logistic regressions were first performed, and variables presenting with *P*-values < 0·15 were introduced in multivariate logistic regression models. Results were expressed as odds ratios (OR) and their 95% confidence intervals (CI). *P*-values were considered significant when lower than 0·05. Statistical analyses were performed using SPSS software (version 17·0; SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Study population and factors associated with immunological response

Eighty-seven patients (men = 62, women = 25) were included into the study. Among them, 48 were classified as cIR and 39 as iIR. Epidemiological, virological and immunological characteristics of this cohort are reported in Table 1. There were 14 men who have sex with men in the iIR group, and 18 in the cIR group ($P = 0·836$). Only two patients were intravenous drug users, and were in the cIR group. Five patients in each group were infected with hepatitis C and/or B viruses ($P = 0·748$). Boosted-protease inhibitor-based regimens were the most prescribed regimens ($n = 44$), whereas 30 patients were on non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based regimens (14 in the cIR group *versus* 16 in the iIR group, $P > 0·05$). Twenty-four patients had an integrase inhibitor (raltegravir) in their therapeutic combination, and two patients had an entry inhibitor (maraviroc).

The T_{reg} percentage was increased in iIR compared to cIR patients (mean: 9 *versus* 7%, respectively, $P = 0·022$, Fig. 1a). In line with this, there was a negative correlation between $CD4^+$ T cell absolute value and T_{reg} percentage ($P = 0·013$, $r = -0·267$, Fig. 1b). There was no difference between groups when considering parameters associated with $CD8^+$ T cell activation: (i) $CD8^+$ T cells (count, percentage); (ii) $CD8^+HLADR^+$ T cell percentages; or (iii) $CD8^+CD38^+$ $HLADR^+$ T cell percentages (although a trend for increased $CD8^+CD38^+$ T cell percentages in iIR was observed) (Table 1). Neither zenith VL nor VLLV in the current blood sample were associated with the immunological response to HAART (Table 1).

Association between $CD4^+$ T cell subsets, T_{reg} subsets and immunological response to HAART

As neither $CD8^+$ T cells subsets nor VLLV were associated with the immune response to HAART, we then focused

Table 1. Epidemiological, virological and immunological data of the 87 study participants, stratified according to the immunological response to highly active anti-retroviral therapy (HAART).

Parameter	cIR group ($n = 48$)	Lower limit	Upper limit	iIR group ($n = 39$)	Lower limit	Upper limit	*P*	Test
Age (years) (mean, s.d.)	50·6 (10·8)	25·7	77·8	55·9 (10·6)	35·6	77·8	0·027	†
Male sex (*n*, %)	34 (70)			28 (64)			n.s.	‡
CDC stage C (*n*, %)	7 (15)			21 (54)			0·012	‡
Time on HAART (years) (mean, s.d.)	12·3 (5·3)	1·48	23·47	12·1 (5·4)	2·9	21·1	n.s.	†
Time since virological success (years) (mean, s.d.)	7·4 (3·3)	1·02	15·7	7·1 (4·2)	1·5	15·6	n.s.	†
Nadir $CD4^+$ T cells/mm^3 (mean, s.d.)	256 (169)	1	686	102 (82)	0	272	<0·001	†
Zenith viral load, $\log_{10}$ copies/ml (mean, s.d.)	4·7 (0·9)	1·7	6·3	4·9 (0·9)	2·08	6·2	n.s.	†
Patients with very low-level viraemia in the current sample (*n*, %)	8 (17)			7 (18)			n.s.	‡
$CD4^+$ T cell count, cells/mm^3 (median, IQR)	644 (586–796)	500	1838	398 (326–459)	139	495	<0·001	§
$CD4^+$ T cell percentage (mean, s.d.)	37 (9)	20	61	28 (8)	12	44	<0·001	†
T_{reg} cell percentage (mean, s.d.)	7 (2)	3	13·2	9 (3)	3·4	22	0·022	†
$CD8^+$ T cell count, cells/mm^3 (mean, s.d.)	730 (325)	174	1735	636 (313)	129	1527	n.s.	†
$CD8^+$ T cell percentage (mean, s.d.)	44 (14)	26	80	45 (12)	18	69	n.s.	†
$CD8^+HLA\text{-}DR^+$ T cell percentage (mean, s.d.)	11·6 (6)	3·1	30·5	10·4 (5)	2·5	24·8	n.s.	†
$CD8^+CD38^+$ T cell percentage (mean, s.d.)	13·5 (8)	3·5	43·6	16·3 (9)	3	35·1	0·146	†
$CD8^+CD38^+HLA\text{-}DR^+$ T cell percentage (mean, s.d.)	4 (3)	0·8	15	4 (3)	0·6	11·9	n.s.	†

Statistical tests used: †Student's *t*-test, ‡Fisher's exact test, §Mann–Whitney *U*-test. % = percentage; cIR = complete immunological responder; iIR = inadequate immunological responder; INR = International normalized ratio; IQR = interquartile range; s.d. = standard deviation; HLA-DR = human leucocyte antigen D-related; T_{reg} = regulatory T cell; n.s. = not significant.

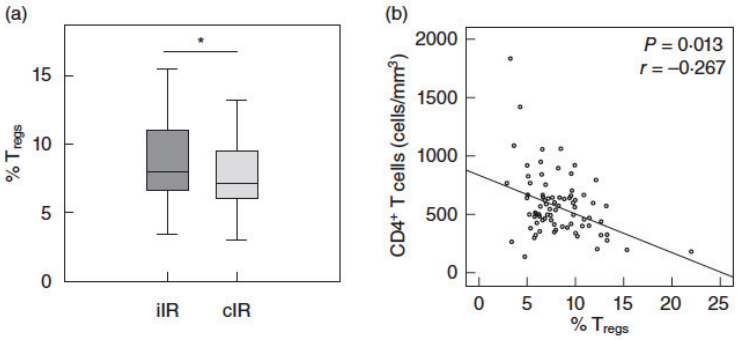


Fig. 1. Regulatory T cell (T_{reg}) percentages. (a) T_{reg} percentages in inadequate immunological responder (iIR, $n = 39$) and complete immunological responder (cIR, $n = 48$) groups. (b) Association between T_{reg} percentages and $CD4^+$ T cells for the 87 studied patients [$^*P < 0{\cdot}05$ Student's *t*-test and Spearman's correlation test for (a) and (b), respectively].

upon interactions between T_{regs} and $CD4^+$ T cell subsets. We observed a significant increase in every T_{reg} subsets in iIR compared with cIR (Table 2). In line with this, activated $CD4^+$ T cell and activated conventional effector $CD4^+$ T cell (i.e. $FoxP3^-$) percentages were increased significantly in the iIR group (Table 2). As shown in Fig. 2, in the whole population there was a significant negative correlation between $CD4^+$ T cell counts and activated $CD4^+$ T cell percentages ($CD4^+HLADR^+$ T cells, $r = -0{\cdot}212$, $P = 0{\cdot}049$).

Parameters associated with immunological response to HAART

In the univariate logistic regression model, age, nadir of $CD4^+$ T cell count, T_{regs} and $CD8^+CD38^+$ T cell percentages were found to be associated with IR to HAART with $P < 0{\cdot}15$ ($P = 0{\cdot}029$, $P < 0{\cdot}001$, $P = 0{\cdot}024$ and $P = 0{\cdot}14$, respectively). This agrees with previous results. In particular, an increased age has been found by others to be associated with IR [39,40]. Thus, a multivariate model adjusted on age, nadir of $CD4^+$ T cell count, T_{regs} and $CD8^+CD38^+$ T cell percentages was performed. Nadir of $CD4^+$ T cell counts and T_{reg} percentages were the only two parameters associated with immunological response to HAART (OR = 2·339, 95% CI = 1·442–3·793, $P = 0{\cdot}001$, and OR = 0·803, 95% CI = 0·651–0·991, $P = 0{\cdot}041$, respectively).

Association between T_{regs} and cellular immune activation

We next wanted to explore the association between T_{regs}, key regulatory cells of the immune system and immune activation of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in the whole population ($n = 87$).

There were strong positive correlations between percentages of $CD4^+HLA\text{-}DR^+$ T cells and percentages of: (i) T_{regs} ($r = 0{\cdot}566$, $P < 0{\cdot}001$, Fig. 3a); (ii) effector T_{regs}; and (iii) terminal effector T_{regs} ($r = 0{\cdot}589$, $P < 0{\cdot}001$, $r = 0{\cdot}839$, $P < 0{\cdot}001$, respectively, data not shown). No correlations were observed between respective proportions of T_{regs} and

Table 2. Descriptive analysis of $CD4^+$ T cells and regulatory T cell (T_{reg}) subsets according to the immune response to highly active anti-retroviral therapy (HAART) ($n = 87$). Total activated $CD4^+$ T cells: $CD4^+$ human leucocyte antigen D-related (HLA-DR)$^+$ T cells; T_{regs} $CD4^+CD25^+$forkhead box protein 3 (FoxP3)$^+$ T cells; effector T_{regs}: $CD4^+CD25^+FoxP3^+CD45RA^-$ T cells; terminal effector T_{regs}: $CD4^+CD25^+FoxP3^+CD45RA^-$ $HLA\text{-}DR^+$ T cells; effector (non-T_{regs}) $CD4^+$ T cells: $CD4^+FoxP3^-HLA\text{-}DR^+$ T cells; activated effector $CD4^+$ T cells: $CD4^+FoxP3^-HLA\text{-}DR^+$ T cells.

Paramater	cIR group ($n = 48$)	iIR group ($n = 39$)	*P*	Test
$CD4^+$ T cells				
CD4 T cell count, cells/mm^3 (median, IQR)	644 (586–796)	398 (326–459)	<0·001	¶
Total activated CD4 T cell percentage (mean, s.d.)	4 (1·7)	5·3 (3)	0·014	§
$CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T_{reg} cells				
T_{reg} cell percentage (mean, s.d.)	7·5 (2·3)	9 (3·5)	0·022	§
Effector T_{reg} cell percentage (mean, s.d.)	6·3 (2·3)	8 (3·4)	0·01	§
Terminal effector T_{reg} cell percentage (mean, s.d.)	1·3 (0·8)	1·8 (1·2)	0·033	§
Effector T_{reg} cell percentage, among T_{reg} cells (mean, s.d.)†	84·6 (14·5)	88·8 (6·8)	0·099	§
Terminal effector T_{reg} cell percentage, among T_{reg} cells (mean, s.d.)†	20·7 (9·928)	21·5 (8·8)	0·692	§
Terminal effector T_{reg} cell percentage, among effector T_{reg} cells (mean, s.d.)‡	20·8 (9·95)	21·7 (8·9)	0·660	§
$CD4^+FoxP3^-$ effector 'non-T_{reg}' cells				
Effector T cells percentage (mean, s.d.)	92·5 (2·3)	91 (3·4)	0·03	§
Activated effector T cells percentage (mean, s.d.)	2·6 (1·2)	4·6 (3·8)	0·001	§

Results are expressed as percentages of cells among $CD4^+$ T cells, except for † and ‡. Statistical tests used: §Student's *t*-test, ¶Mann–Whitney *U*-test. % = percentage; cIR = complete immunological responder; iIR = inadequate immunological responder; IQR = interquartile range; s.d. = standard deviation.

 © 2014 British Society for Immunology,

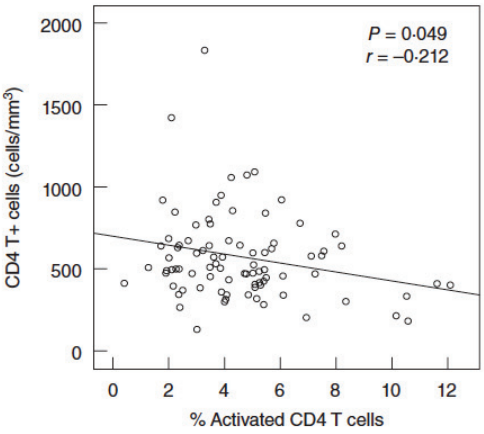


Fig. 2. Correlations between CD4⁺ T cell absolute count and activated CD4⁺ T cells (CD4⁺human leucocyte antigen D-related (HLA-DR)⁺) (Spearman's correlation test, $n = 87$ patients).

activated CD8⁺ T cells, whatever the phenotype used to characterize the latter [i.e. CD8⁺CD38⁺ T cells (Fig. 3b), CD8⁺HLA-DR⁺ or CD8⁺CD38⁺HLA-DR⁺ T cells (Table S1)].

Association between T_{regs} and VLLV

There were no differences in T_{reg} percentages between patients with a VLLV on the current blood sample and patients with no detection of viral RNA (8·8 *versus* 8%, $P = 0·38$). Similarly, there were no differences when considering CD4⁺ T cell absolute values or immune activation of CD8⁺ or CD4⁺ T cells between these two groups.

Discussion

This observational cross-sectional study is probably the largest study on T_{regs}, T cell activation and VLLV in HIV-infected patients with virological success under long-term HAART (mean time: 12 years). Our main result highlights the importance of CD4⁺ T cell nadir and activation as well as T_{regs} in CD4⁺ recovery. The present report is of crucial interest in clinical practice, as the clinical characteristics of this cohort are representative of the majority of HIV-infected patients followed in western countries. In this population of aviraemic patients upon long-term HAART, the immunological discordant response is currently the most relevant clinical outcome and the most frequently encountered problem. Indeed, in iIR, increased mortality has been shown and neurological, cardiovascular and malignant pathologies are most frequently observed [4,6,7].

The main result is to observe that independent factors associated with an iIR to HAART were a lower nadir of CD4⁺ T cell count and a higher T_{reg} percentage. Previous studies have highlighted relationships between a high percentage of T_{regs}, CD4⁺ T cell nadir and a poor immunological response to HAART [27,28,39,41,42]. In particular, Mendes-Lagares *et al.* have pointed out the role of T_{regs} in the control of naive CD4⁺ T cell homeostatic proliferation in 16 immunological non-responders, compared with 18 immunological responders [14]. In this study, in a multivariate analysis, we extend these results by showing the independent association of T_{regs} and CD4⁺ T cell nadir with iIR when including other immunological and viral parameters (i.e. activation status of T cells and VLLV) in a cohort of 87 HIV-infected patients under long-term HAART.

The CD4⁺ T cell count nadir is a well-known and well-validated predictor of immune response to HAART [41,43]. It is believed that an early diagnosis and suppression of HIV replication could increase the probability of achieving immunological response to HAART by limiting the magnitude of CD4⁺ T count nadir [44]. It may be speculated that the differences observed in T_{reg} percentages between the two groups only reflect differences in CD4⁺ lymphocyte nadir. Indeed, the complex pattern of immune dysfunctions observed in patients with incomplete immune reconstitution could be a cause, but also the consequence, of low CD4⁺ cell counts [39]. However, in the current observational cross-sectional study, both T_{reg} percentage and nadir of CD4⁺ T cells were independent predictors of immune response to long-term HAART. This indicates that they are both associated independently with iIR and are thus

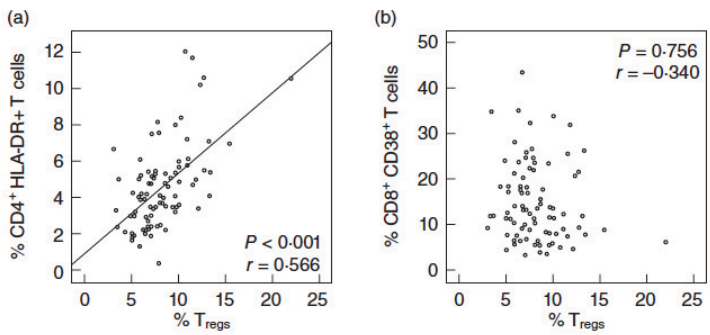


Fig. 3. Correlations between regulatory T cells (T_{regs}) and immune activation. (a) T_{regs} and activated CD4⁺ T cells (CD4⁺human leucocyte antigen D-related (HLA-DR)⁺). (b) T_{regs} and activated CD8⁺ T cells (CD8⁺CD38⁺) (Pearson's correlation test, $n = 87$ patients).

probably both actors in this clinical situation. This aspect deserves to be explored longitudinally.

The role of T_{regs} in HIV infection remains a matter of discussion [31,45,46]. Some recent studies highlighted the potential deleterious role of these cells in the case of suboptimal gain of $CD4^+$ T cell counts [13,14,25,42]. Our results confirm that increased T_{reg} frequency is an important factor associated with immunological discordant response to HAART. One explanation for previous discrepant results [32,47] might be the lack of a standardized protocol to assess T_{regs} and their related subsets in previous cohorts of patients. Indeed, as T_{regs} are identified precisely by flow cytometry using intracellular FoxP3 staining (the key transcriptional factor for T_{regs} [36]), until recently the technical difficulties (i.e. lengthy procedures) inherent in this intracellular staining were a limiting factor to the study of T_{regs} in clinical samples. Consequently, most published works were conducted in small cohorts and performed after cell cryopreservation/purification procedures known to modify cell activation status. That said, some phenotypes (such as $CD4^+CD25^{high}$ or $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$) are known to be good surrogate identification strategies for T_{reg} identification [47]. However, the most widely accepted phenotype for T_{regs} is the co-expression of CD4, CD25 (α-chain of the IL-2 receptor), and of FoxP3, even in HIV-infected patients [14,36,38,39,48,49]. We took advantage of recent progresses in intracellular FoxP3 staining in whole blood to reduce pre-analytical procedures that may interfere with interpretation of the results [38]. Moreover, this protocol allows for the analysis of specific T_{reg} subsets (e.g. effectors $CD45RA^-$ T_{regs} and terminal effector $CD45RA^-$HLA-DR+ T_{regs} (reviewed in [36]). We observed that effector and terminal effector T_{regs} were increased significantly in iIR compared to cIR, which was never pointed elsewhere. Very few data are available concerning those T_{reg} subsets in HIV-infected patients [39,50]. Effector T_{regs} have been studied in the peripheral blood mononuclear cells of 18 aviraemic patients with a good immunological response to HAART [50]. These results may indicate a specific role for T_{reg} subsets in the control of $CD4^+$ T cell homeostasis, but they need to be confirmed *in vitro* or in animal models in order to explore the chronological causative relationship between increased T_{regs} and the $CD4^+$ T cell count nadir. Overall, the present results reinforce our understanding of the complex role of T_{reg} subsets in immunological response to HAART and could lead to the development of novel therapeutic strategies targeting T_{reg} populations [51,52].

Immune activation has also been implicated in the occurrence of iIR [10,27]. Interestingly, in the current study, $CD8^+$ T cell immune activation was not associated with immune discordant response. Immune cell activation is a hallmark of HIV infection, especially when considering untreated viraemic patients [53]. Moreover, this immune activation is increased in HIV HAART-treated patients *versus* healthy control subjects [27]. However, the link between persistent activation of $CD8^+$ T cells and immune response to HAART is unclear. Here, in agreement with other studies [10,14,15], we found that the $CD8^+CD38^+$ T cell percentage was higher in iIR than in cIR, but did not reach statistical significance (Table 1). In contrast, previous studies showed an elevated immune activation (increased percentages of $CD8^+CD38^+$ T cells) in iIR compared with HIV-infected patients with a better immunological recovery [10]. There are some explanations for such discrepancies. First, this lack of statistical significance could be due simply to a lack of statistical power (only a trend for a higher $CD8^+CD38^+$ T cell percentage in iIR, Table 1). Secondly, this could be associated with different definitions of the complete immune recovery between studies. Here, the threshold of 500 $CD4^+$ T cells/mm^3 was used because of its clinical significance [6,7]. It is probably an excellent criterion for the evaluation of immunological response in such populations with an important virological suppression time (more than 7 years, not different between the two groups). As an example, this criterion has been used by Piconi *et al.* [39], with a similar study design, mean virological suppression time and proportion of cIR and iIR as our study. Lastly, and most importantly, median HAART durations (before immunological exploration) were shorter in previous studies: 4 years [13], 3 years [54,55] and 12 months [10,55,56]. In contrast, our patients were on HAART for 12 years, with virological success for 7 years. This duration is similar to that of the study by Mendez-Lagares *et al.*, which also failed to observe any statistical difference in $CD8^+$ $CD38^+$ T cell percentages between in iIR and cIR patients (11·7 *versus* 9·5, respectively, $P > 0{\cdot}05$) [15]. Thus, we cannot rule out the hypothesis that $CD8^+$ T cell activation may be a prognostic factor for $CD4^+$ T cell suboptimal gain despite virological suppression in the first years following HAART introduction. However, after several years on HAART, $CD4^+$ T cell lineage characteristics appear to be the most important parameters of immune recovery.

Some authors have found associations between T_{regs}, VL and immune activation at different disease stages [34,57–60]. Thus, we wanted to assess relationships between T_{regs}, a key regulator of the immune system, and immune cellular activation of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells. Once more, interactions between T_{regs} and $CD4^+$ T cells were highlighted. We observed a strong negative correlation between T_{regs} and immune activation of $CD4^+$ T cells (i.e. $CD4^+$HLA-DR^+ T cells, $CD4^+$HLA-DR^+FoxP3^- T cells), in agreement with the results of Del Pozo-Balado *et al.* ($r = 0{\cdot}685$, $P = 0{\cdot}016$) [32]. However, such interactions between T_{regs} and immune activation of $CD8^+$ T cells were not significant, as reported previously, in aviraemic or viraemic subjects [15,32]. Of note, in this last study subsets of participants were co-infected with HCV, and it has been shown that distribution of T_{regs} is altered after HCV infection [61]. That said, the percentages of patients infected by HCV were not different between the two groups.

 © 2014 British Society for Immunology,

Finally, we wanted to assess the relationship between VLLV and T_{regs} in this long-term HAART virologically suppressed population. To our knowledge, this association has not been investigated elsewhere. It is well known that patients with virological success may retain a VLLV that can still be detected even using routine VL quantitation assay [37]. This VLLV has been proposed to be associated with an increased risk of virological failure [17], immune activation [19] or immunological failure [18], while other groups did not confirm such observations [21]. In agreement with our results, Ostrowski *et al.* did not find any association between VLLV and $CD8^+$ T cells activation [22]. Importantly, we report here no apparent association between any T_{reg} subsets and VLLV. However, this needs to be confirmed in a larger cohort, especially in a longitudinal study, to exclude a potential lack of statistical power.

Conclusion

We present here the largest study investigating simultaneously immune activation of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells, T_{reg} percentages and VLLV upon long-term HAART. T_{regs} and nadir of $CD4^+$ T cell counts were the only two parameters associated independently with the immunological response to HAART. We did not observe any relationship between iIR and VLLV or $CD8^+$ T cell activation. In addition, there was no correlation between T_{reg} and $CD8^+$ T lymphocyte activation or VLLV after years of virological suppression. These results highlight the importance of monitoring $CD4^+$ lymphocyte lineage homeostasis and variations of its subsets (activated phenotypes, T_{reg} populations, etc.) over years to understand more clearly the putative mechanisms of immune recovery. This should be confirmed prospectively in a large cohort of patients, and may open innovative immunoadjuvant therapeutic strategies to shape an appropriate $CD4^+$ T cell response during HAART which could have long-term effects on decreasing morbidity and mortality.

Acknowledgements

The authors thank patients and all the members of the Lyon HIV Cohort Study: physicians: Professor D. Peyramond, Professor C. Chidiac, Dr T. Ferry, Dr F. Ader, Dr L. Cotte, Dr T. Perpoint, Dr P. Miailhes, Dr F. Biron, Dr A. Boibieux, Dr E. Braun, Dr H. Champagne, Dr F. Daoud, Dr V. Gueripel, Dr J. Koffi, Dr C. Longuet, Dr S. Pailhes, Dr B. Ponceau, Dr I. Schlienger, Dr A. Senechal, Dr A. Bouaziz and Dr J. Karsenty; virologists: Professor P. André, Dr M. A. Trabaud, Dr J. C. Tardy, Dr V. Icard and Dr C.Scholtes; and immunologists: Dr G. Monneret, Dr F. Poitevin and Dr C. Malcus. This work was supported by Hospices Civils de Lyon. In addition, the study was supported by Beckman Coulter through donations of laboratory equipments and supplies. This private company had no role in the study design, collection or interpretation of the data. Similarly, Beckman Coulter had no role in the preparation of the manuscript or the decision to submit it for publication.

Disclosure

The authors have no financial conflicts of interest.

Author contributions

J. S., T. F, G. M., F. V. and J. D. designed the study, performed the immunological laboratory assessment, the statistical analysis and the writing of the manuscript. D. M. B. supervised the statistical analysis; V. I. performed the virological assessment. J. S., T. F., T. P., F. A. and C. C. recruited the patients.

References

1 Grabar S, Le Moing V, Goujard C *et al.* Clinical outcome of patients with HIV-1 infection according to immunologic and virologic response after 6 months of highly active antiretroviral therapy. Ann Intern Med 2000; **133**:401–10.

2 Piketty C, Weiss L, Thomas F, Mohamed AS, Belec L, Kazatchkine MD. Long-term clinical outcome of human immunodeficiency virus-infected patients with discordant immunologic and virologic responses to a protease inhibitor-containing regimen. J Infect Dis 2001; **183**:1328–35.

3 Gilson RJ, Man SL, Copas A *et al.* Discordant responses on starting highly active antiretroviral therapy: suboptimal CD4 increases despite early viral suppression in the UK Collaborative HIV Cohort (UK CHIC) Study. HIV Med 2010; **11**:152–60.

4 Gaardbo JC, Hartling HJ, Gerstoft J, Nielsen SD. Incomplete immune recovery in HIV infection: mechanisms, relevance for clinical care, and possible solutions. Clin Dev Immunol 2012; **2012**:670957.

5 Li T, Wu N, Dai Y *et al.* Reduced thymic output is a major mechanism of immune reconstitution failure in HIV-infected patients after long-term antiretroviral therapy. Clin Infect Dis 2005; **53**:944–51.

6 Lewden C, Chene G, Morlat P *et al.* HIV-infected adults with a CD4 cell count greater than 500 cells/mm^3 on long-term combination antiretroviral therapy reach same mortality rates as the general population. J Acquir Immune Defic Syndr 2007; **46**:72–7.

7 Rodger AJ, Lodwick R, Schechter M *et al.* Mortality in well controlled HIV in the continuous antiretroviral therapy arms of the SMART and ESPRIT trials compared with the general population. AIDS 2013; **27**:973–9.

8 Levacher M, Hulstaert F, Tallet S, Ullery S, Pocidalo JJ, Bach BA. The significance of activation markers on CD8 lymphocytes in human immunodeficiency syndrome: staging and prognostic value. Clin Exp Immunol 1992; **90**:376–82.

9 Hunt PW. HIV and inflammation: mechanisms and consequences. Curr HIV/AIDS Rep 2012; **9**:139–47.

10 Marziali M, De Santis W, Carello R *et al.* T-cell homeostasis alteration in HIV-1 infected subjects with low CD4 T-cell count despite undetectable virus load during HAART. AIDS 2006; **20**:2033–41.

11 Erikstrup C, Kronborg G, Lohse N, Ostrowski SR, Gerstoft J, Ullum H. T-cell dysfunction in HIV-1-infected patients with impaired recovery of CD4 cells despite suppression of viral replication. J Acquir Immune Defic Syndr 2010; **53**: 303–10.

12 Delobel P, Nugeyre MT, Cazabat M *et al.* Naive T-cell depletion related to infection by X4 human immunodeficiency virus type 1 in poor immunological responders to highly active antiretroviral therapy. J Virol 2006; **80**:10229–36.

13 Nakanjako D, Ssewanyana I, Mayanja-Kizza H *et al.* High T-cell immune activation and immune exhaustion among individuals with suboptimal CD4 recovery after 4 years of antiretroviral therapy in an African cohort. BMC Infect Dis 2011; **11**:43.

14 Mendez-Lagares G, del Pozo Balado Mdel M, Genebat Gonzalez M, Perganeda Sanchez AG, Leal Noval M, Pacheco Lopez YM. Severe immune dysregulation affects CD4(+)CD25(hi)FoxP3(+) regulatory T cells in HIV-infected patients with low-level CD4 T-cell repopulation despite suppressive highly active antiretroviral therapy. J Infect Dis 2012; **205**:1501–9.

15 Mendez-Lagares G, Garcia-Perganeda A, Pozo-Balado M *et al.* Differential alterations of the CD4 and CD8 T cell subsets in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy with low CD4 T cell restoration. J Antimicrob Chemother 2012; **67**:1228–37.

16 Doyle T, Smith C, Vitiello P *et al.* Plasma HIV-1 RNA detection below 50 copies/ml and risk of virologic rebound in patients receiving highly active antiretroviral therapy. Clin Infect Dis 2012; **54**:724–32.

17 Maggiolo F, Callegaro A, Cologni G *et al.* Ultrasensitive assessment of residual low-level HIV viremia in HAART-treated patients and risk of virological failure. J Acquir Immune Defic Syndr 2012; **60**:473–82.

18 Gianotti N, Galli L, Racca S *et al.* Residual viraemia does not influence 1 year virological rebound in HIV-infected patients with HIV RNA persistently below 50 copies/mL. J Antimicrob Chemother 2012; **67**:213–7.

19 Bastard JP, Soulie C, Fellahi S *et al.* Circulating interleukin-6 levels correlate with residual HIV viraemia and markers of immune dysfunction in treatment-controlled HIV-infected patients. Antivir Ther 2012; **17**:915–9.

20 Widdrington J, Payne B, Medhi M, Valappil M, Schmid ML. The significance of very low-level viraemia detected by sensitive viral load assays in HIV infected patients on HAART. J Infect 2011; **62**:87–92.

21 Charpentier C, Landman R, Laouenan C *et al.* Persistent low-level HIV-1 RNA between 20 and 50 copies/mL in antiretroviral-treated patients: associated factors and virological outcome. J Antimicrob Chemother 2012; **67**:2231–5.

22 Ostrowski SR, Katzenstein TL, Thim PT, Pedersen BK, Gerstoft J, Ullum H. Low-level viremia and proviral DNA impede immune reconstitution in HIV-1-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. J Infect Dis 2005; **191**:348–57.

23 Fazekas de St Groth B, Landay AL. Regulatory T cells in HIV infection: pathogenic or protective participants in the immune response? AIDS 2008; **22**:671–83.

24 Kassiotis G, O'Garra A. Immunology. Immunity benefits from a little suppression. Science 2008; **320**:1168–9.

25 Lund JM, Hsing L, Pham TT, Rudensky AY. Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells. Science 2008; **320**:1220–4.

26 Moreno-Fernandez ME, Presicce P, Chougnet CA. Homeostasis and function of regulatory T cells in HIV/SIV infection. J Virol 2012; **86**:10262–9.

27 Horta A, Nobrega C, Amorim-Machado P *et al.* Poor immune reconstitution in HIV-infected patients associates with high percentage of regulatory CD4+ T cells. PLOS ONE 2013; **8**:e57336.

28 Foxall RB, Albuquerque AS, Soares RS *et al.* Memory and naive-like regulatory CD4+ T cells expand during HIV-2 infection in direct association with CD4+ T-cell depletion irrespectively of viremia. AIDS 2011; **25**:1961–70.

29 Nilsson J, Boasso A, Velilla PA *et al.* HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS. Blood 2006; **108**:3808–17.

30 Tenorio AR, Martinson J, Pollard D, Baum L, Landay A. The relationship of T-regulatory cell subsets to disease stage, immune activation, and pathogen-specific immunity in HIV infection. J Acquir Immune Defic Syndr 2008; **48**:577–80.

31 Lim A, Tan D, Price P *et al.* Proportions of circulating T cells with a regulatory cell phenotype increase with HIV-associated immune activation and remain high on antiretroviral therapy. AIDS 2007; **21**:1525–34.

32 Del Pozo-Balado Mdel M, Leal M, Mendez-Lagares G, Pacheco YM. CD4(+)CD25(+/hi)CD127(lo) phenotype does not accurately identify regulatory T cells in all populations of HIV-infected persons. J Infect Dis 2010; **201**:331–5.

33 Sachdeva M, Fischl MA, Pahwa R, Sachdeva N, Pahwa S. Immune exhaustion occurs concomitantly with immune activation and decrease in regulatory T cells in viremic chronically HIV-1-infected patients. J Acquir Immune Defic Syndr 2010; **54**:447–54.

34 Chase AJ, Yang HC, Zhang H, Blankson JN, Siliciano RF. Preservation of FoxP3+ regulatory T cells in the peripheral blood of human immunodeficiency virus type 1-infected elite suppressors correlates with low CD4+ T-cell activation. J Virol 2008; **82**: 8307–15.

35 Jiao Y, Fu J, Xing S *et al.* The decrease of regulatory T cells correlates with excessive activation and apoptosis of CD8+ T cells in HIV-1-infected typical progressors, but not in long-term non-progressors. Immunology 2009; **128**:e366–75.

36 Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. Nat Rev Immunol 2010; **10**:490–500.

37 Saison J, Tardy JC, Scholtes C *et al.* Low-level viremia is associated with non-B subtypes in patients infected with HIV with virological success following HAART introduction. J Med Virol 2013; **85**:953–8.

38 Demaret J, Saison J, Venet F *et al.* Assessment of a novel flow cytometry technique of one-step intracellular staining: example of FOXP3 in clinical samples. Cytometry B Clin Cytom 2013; **84**:187–93.

39 Piconi S, Trabattoni D, Gori A *et al.* Immune activation, apoptosis, and Treg activity are associated with persistently reduced CD4+ T-cell counts during antiretroviral therapy. AIDS 2010; **24**:1991–2000.

40 Andrade RM, Hygino J, Kasahara TM *et al.* High IL-10 production by aged AIDS patients is related to high frequency of Tr-1 phenotype and low *in vitro* viral replication. Clin Immunol 2012; **145**:31–43.

41 Casotti JA, Passos LN, Oliveira FJ, Cerutti C, Jr. Factors associated with paradoxical immune response to antiretroviral therapy in

HIV infected patients: a case control study. BMC Infect Dis 2011; **11**:306.

42 Arguello RJ, Balbaryski J, Barboni G, Candi M, Gaddi E, Laucella S. Altered frequency and phenotype of CD4+ forkhead box protein 3+ T cells and its association with autoantibody production in human immunodeficiency virus-infected paediatric patients. Clin Exp Immunol 2012; **168**:224–33.

43 Negredo E, Massanella M, Puig J *et al.* Nadir CD4 T cell count as predictor and high CD4 T cell intrinsic apoptosis as final mechanism of poor CD4 T cell recovery in virologically suppressed HIV-infected patients: clinical implications. Clin Infect Dis 2010; **50**:1300–8.

44 Le T, Wright EJ, Smith DM *et al.* Enhanced CD4+ T-cell recovery with earlier HIV-1 antiretroviral therapy. N Engl J Med 2013; **368**:218–30.

45 Gaardbo JC, Nielsen SD, Vedel SJ *et al.* Regulatory T cells in human immunodeficiency virus-infected patients are elevated and independent of immunological and virological status, as well as initiation of highly active anti-retroviral therapy. Clin Exp Immunol 2008; **154**:80–6.

46 Kared H, Lelievre JD, Donkova-Petrini V *et al.* HIV-specific regulatory T cells are associated with higher CD4 cell counts in primary infection. AIDS 2008; **22**:2451–60.

47 Saison J, Demaret J, Venet F *et al.* CD4+CD25+CD127- assessment as a surrogate phenotype for FOXP3+ regulatory T cells in HIV-1 infected viremic and aviremic subjects. Cytometry B Clin Cytom 2012; **84**:50–4.

48 Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Nat Immunol 2003; **4**:330–6.

49 Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. Nat Immunol 2005; **6**:353–60.

50 Simonetta F, Lecuroux C, Girault I *et al.* Early and long-lasting alteration of effector CD45RA(-)Foxp3(high) regulatory T-cell homeostasis during HIV infection. J Infect Dis 2012; **205**:1510–9.

51 Hodi FS, Butler M, Oble DA *et al.* Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. Proc Natl Acad Sci USA 2008; **105**:3005–10.

52 Colombo MP, Piconese S. Regulatory-T-cell inhibition versus depletion: the right choice in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer 2007; **7**:880–7.

53 Girard PM, Katlama C, Pialoux G. VIH. DOIN Editors. Rueil-Malmaison, France: Wolters Kluwer France, 2011.

54 Li T, Wu N, Dai Y *et al.* Reduced thymic output is a major mechanism of immune reconstitution failure in HIV-infected patients after long-term antiretroviral therapy. Clin Infect Dis 2011; **53**:944–51.

55 Benito JM, Lopez M, Lozano S *et al.* Differential upregulation of CD38 on different T-cell subsets may influence the ability to reconstitute CD4+ T cells under successful highly active antiretroviral therapy. J Acquir Immune Defic Syndr 2005; **38**:373–81.

56 Tiba F, Nauwelaers F, Traore S *et al.* Immune reconstitution during the first year of antiretroviral therapy of HIV-1-infected adults in rural Burkina Faso. Open AIDS J 2012; **6**:16–25.

57 Freguja R, Gianesin K, Mosconi I *et al.* Regulatory T cells and chronic immune activation in human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)-infected children. Clin Exp Immunol 2011; **164**:373–80.

58 Shaw JM, Hunt PW, Critchfield JW *et al.* Increased frequency of regulatory T cells accompanies increased immune activation in rectal mucosae of HIV-positive noncontrollers. J Virol 2011; **85**:11422–34.

59 Hunt PW, Landay AL, Sinclair E *et al.* A low T regulatory cell response may contribute to both viral control and generalized immune activation in HIV controllers. PLOS ONE 2011; **6**:e15924.

60 Prendergast A, O'Callaghan M, Menson E *et al.* Factors influencing T cell activation and programmed death 1 expression in HIV-infected children. AIDS Res Hum Retroviruses 2012; **28**:465–8.

61 Rallon NI, Lopez M, Soriano V *et al.* Level, phenotype and activation status of CD4+FoxP3+ regulatory T cells in patients chronically infected with human immunodeficiency virus and/or hepatitis C virus. Clin Exp Immunol 2009; **155**:35–43.

Supporting Information

Additional Supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Fig. S1. Gating strategy.

Table S1. Descriptive analysis of $CD4^+$ T cells and regulatory T cell (T_{reg}) subsets as absolute counts according to the immune response to highly active anti-retroviral therapy (HAART) ($n = 87$). Total activated $CD4^+$ T cells $CD4^+$human leucocyte antigen D-related $(HLA\text{-}DR)^+$ T cells; T_{regs} $CD4^+CD25^+$forkhead box protein 3 $(FoxP3)^+$ T cells; effector T_{regs}: $CD4^+CD25^+FoxP3^+CD45RA^-$ T cells; terminal effector T_{regs}: $CD4^+CD25^+FoxP3^+CD45RA^-$ $HLA\text{-}DR^+$ T cells; effectors (non-T_{regs}) $CD4^+$ T cells: $CD4^+FoxP3^-HLA\text{-}DR^+$ T cells; activated effector $CD4^+$ T cells: $CD4^+FoxP3^-$ $HLA\text{-}DR^+$ T cells. Results are expressed as absolute values.

Supplementary online data supplement

Clinical and Experimental Immunology

Table S1. Descriptive analysis of CD4+ T cells and Treg subsets as absolute counts according to the immune response to HAART (n=87). Total activated CD4+ T cells CD4+HLADR+ T cells; Treg CD4+CD25+FoxP3+ T cells; Effectors Treg: CD4+CD25+FoxP3+CD45RA- T cells; Terminal effectors Treg : CD4+CD25+FoxP3+CD45RA- HLADR+ T cells; Effectors « non Treg » CD4+ T cells : CD4+FoxP3-HLADR+ T cells; Activated Effectors CD4+ T cells : CD4+FoxP3-HLADR+ T cells. Results are expressed as absolut value.

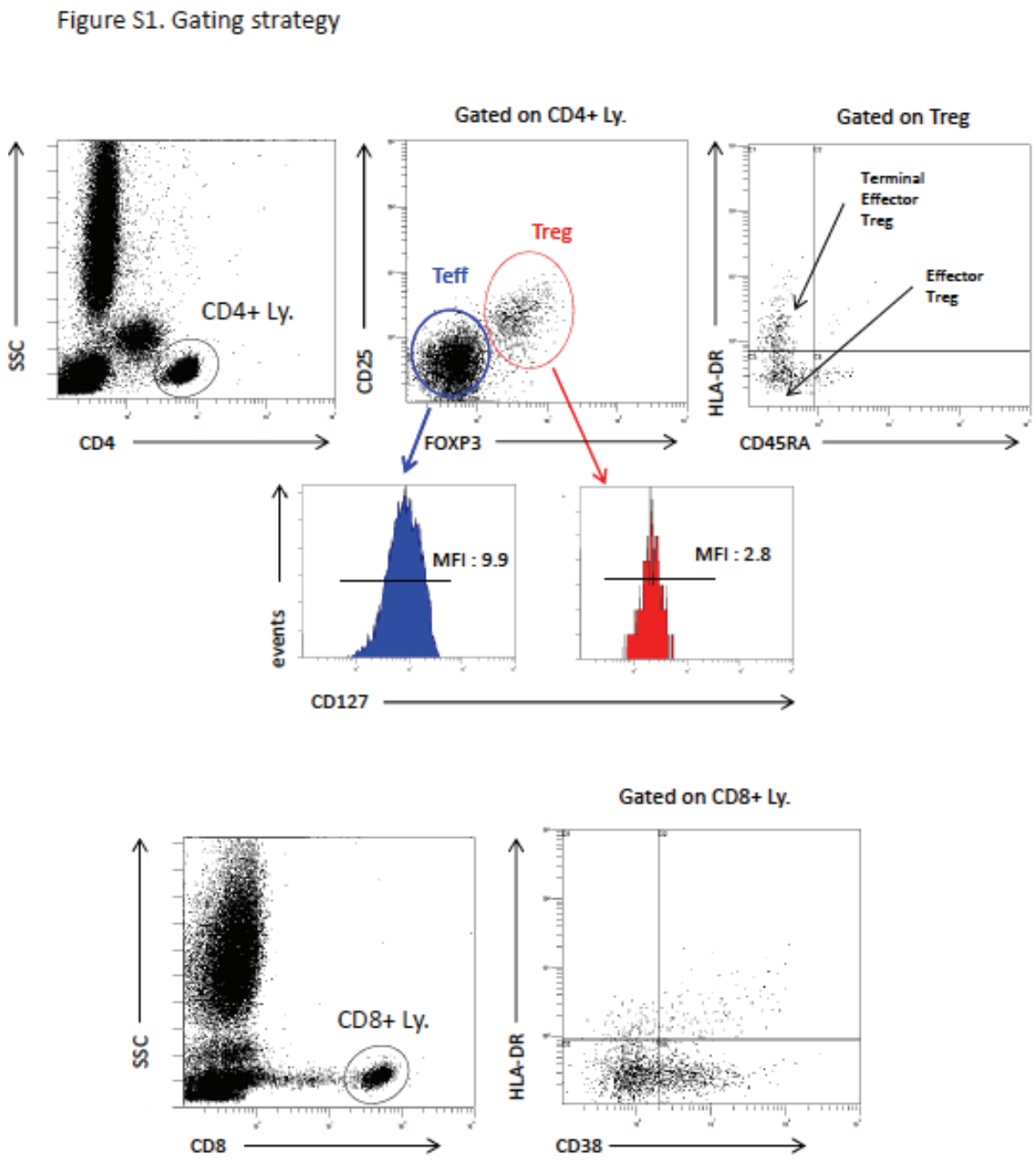
cIR Complete Immunological responder, iIR Inadequate Immunological Responder, SD standard deviation, % percentage, IQR interquartile range

Statistical test used: * Mann Whitney U Test, ** Student T test,

Paramater	cIR group (N=48)		iIR group (N=39)		p	Test
CD4+ T cells						
CD4+ T cell count, cells/mm3 (Median, IQR)	644,00	(586-796)	398,00	(326-459)	<0.001	*
Total activated CD4 T count, , cells/mm3 (Mean, SD)	29.2	(14.6)	19.5	(10.1)	<0.001	**
CD4+CD25+FoxP3+ Treg cells						
Treg cell count, cells/mm3 (Mean, SD)	52.6	(17.4)	33.2	(11)	<0.001	**
Effector Treg cell, cells/mm3 (Mean, SD)	44.8	(17.9)	29.6	(10.7)	<0.001	**
Terminal Effector Treg cell count, cells/mm3 (Mean, SD)	9.4	(6)	6.6	(4.2)	0.011	**
CD4+FoxP3- Effector "non Treg" cells						
Effector T cells count, cells/mm3 (Mean, SD)	676.1	(243.7)	345.4	(86.5)	<0.001	**
Activated effector T cells count, cells/mm3 (Mean, SD)	19.2	(10.8)	15.7	(8.4)	0.107	**
CD8+ T cells						
CD8+ T cell count, cells/mm3 (Mean, SD)	730,00	(325)	636,00	(313)	NS	**
CD8+HLADR+ T cell count, cells/mm3 (Mean, SD)	78.7	(48.4)	65.1	(53.6)	NS	**
CD8+CD38+ T cell count, cells/mm3 (Mean, SD)	96.1	(74.8)	92.8	(75.5)	NS	**
CD8+CD38+HLADR+ T cell count, cells/mm3 (Mean, SD)	25.7	(21.6)	24.5	(27.5)	NS	**

Figure S1. Gating strategy for T lymphocyte subsets' identification (illustrative example)

CD4+ T lymphocytes (CD4+ Ly), Effector CD4+ T lymphocytes (Teff, CD4+CD25-FOXP3), regulatory T lymphocytes (Treg, CD4+CD25+FOXP3+), effector Treg (CD45RA-), terminal effector Treg (CD45RA-, HLA-DR+), CD8+ T lymphocytes (CD8+Ly), Activated CD8+ T cells (HLA-DR+ and/or CD38+). MFI : mean fluorescence intensity.



Article 3. Validation d'un phénotype de substitution CD4+CD25++CD127- pour identifier les Treg chez les patients VIH, virémiques et avirémiques

SAISON Julien*, DEMARET Julie*, VENET Fabienne, CHIDIAC Christian, MALCUS Christophe, POITEVIN-LATER Françoise, TARDY Jean-Claude, FERRY Tristan, MONNERET Guillaume, Lyon HIV Cohort Study Group

**** : contribution équivalente au travail***

ET

Article 4. Utilisation de ce marqueur dans une étude prospective avec analyse pendant 2 ans de l'effet du pourcentage de Treg CD4+CD25++CD127- sur la valeur absolue des LT CD4 après avoir débuté une TARV

SAISON Julien, MAUCORT BOULCH Delphine, CHIDIAC Christian, DEMARET Julie, MALCUS Christophe, COTTE Laurent, POITEVIN-LATER Francoise, MIAILHES Patrick, VENET Fabienne, TRABAUD Mary Anne, MONNERET Guillaume, FERRY Tristan, Lyon HIV Cohort Study Group

Aucune étude ne s'est intéressée de façon prospective à l'effet, supposé délétère, d'un haut pourcentage de Treg à l'introduction du traitement, sur la restauration en LT CD4, et ce indépendamment de l'effet du nadir des LT CD4.

Cette étude a été conduite en parallèle de la validation clinique du nouveau marquage FoxP3 intracellulaire en un temps. Nous avons donc dû utiliser un phénotype de substitution pour identifier les Treg. Ce phénotype devait être simple, fiable, facilement réalisable en routine afin de pouvoir être utilisé sur de nombreux échantillons sanguins, en même temps que le phénotype standard des LT CD4 et CD8 au cours du suivi habituel d'un patient infecté par le VIH et débutant une TARV. Pour ces raisons, nous avons choisi le marquage CD4+CD25^{hi}CD127^{lo} qui a été utilisé dans de nombreux travaux pour identifier les Treg, chez des sujets sains (109)(110) ou non (124). Dans le cadre du VIH, une bonne corrélation a été retrouvée (125)(132) mais une étude récente a soulevé la possibilité que ce marqueur puisse ne pas identifier correctement les Treg chez les sujets virémiques (133).

Dans un premier temps, nous avons donc montré que ce phénotype corrélait parfaitement avec le phénotype de référence CD4+CD25+FoxP3+, chez 19 patients (11 virémiques non traités, 8 avirémiques sous TARV), et que 86% des CD4+CD25^{hi}CD127^{lo} exprimaient FoxP3 (**étude 3**). Ainsi, le phénotype CD4+CD25^{hi}CD127^{lo} est un marqueur substitutif acceptable, bien qu'imparfait, des Treg, et utilisable facilement en pratique clinique quotidienne.

Nous avons ensuite conduit une étude prospective chez les patients naïfs infectés par le VIH avec des LT CD4<500/mm3, inclus à l'introduction de la TARV de janvier 2011 à mars 2012, et suivis pendant 2 ans. Les Treg étaient identifiés à l'inclusion par le phénotype CD4+CD25^{hi}CD127^{lo}, et exprimés en pourcentage parmi les LT CD4. Les facteurs impactant la valeur absolue des CD4 à l'inclusion, puis au cours du temps (réponse immune), ont été analysés avec une régression de Poisson à effet mixte.

Cinquante-huit patients ont été inclus (médiane des LT CD4=293/mm3, médiane des Treg=6.1%). Le pourcentage de Treg et le nadir de LT CD4 étaient associés de façon indépendante à la valeur absolue des LT CD4. Pour un nadir de LT CD4 donné, une augmentation de 1% des Treg était associée à une diminution de 1.9% de la valeur des LT CD4. L'effet délétère des Treg sur la réponse immune était plus marqué chez les patients avec un nadir de LT CD4 bas. A l'inverse, pour un pourcentage de Treg donné, une augmentation du nadir de LT CD4 de 10 cellules/mm^3 était associée à une augmentation de 2.4% de la valeur des LT CD4. Ces effets, mesurés à l'inclusion, étaient stables et persistants au cours des 2 ans de suivi.

Nous avons ainsi montré que le pourcentage de Treg à l'introduction du traitement est un facteur indépendant de la réponse immune, en particulier chez les patients avec un nadir de LT CD4 bas.

Brief Communication

CD4+CD25+CD127− Assessment as A Surrogate Phenotype for FOXP3+ Regulatory T Cells in HIV-1 Infected Viremic and Aviremic Subjects

Julien Saison,[1,2,3†] Julie Demaret,[1,2†] Fabienne Venet,[1,2] Christian Chidiac,[2,3,4] Christophe Malcus,[1] Francoise Poitevin-Later,[1] Jean-Claude Tardy,[5] Tristan Ferry,[2,3,4] and Guillaume Monneret[1,2*]

[1]Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Laboratoire d'Immunologie, Lyon, F-69003, France

[2]Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, F-69008, France

[3]Hospices Civils de Lyon, Hôpital de la Croix Rousse, Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Lyon, F-69004, France

[4]INSERM, U851, 21 avenue Tony Garnier, Lyon, F-69007, France

[5]Hospices Civils de Lyon, Hôpital de la Croix Rousse, Laboratoire de Virologie, Lyon, F-69004, France

Background: Although likely pivotal, the role of regulatory T cells (Tregs) in HIV pathogenesis remains elusive. This can be partly explained by analytical issues regarding their phenotypic identification in clinical studies. Instead of intracellular FOXP3 staining, CD4+CD25+CD127− phenotype has been proposed as an alternative to identify Tregs in clinical samples. However, its use remains controversial in viremic patients. Therefore, the objective of the present study was to assess the correlation between frequencies of CD4+CD25+CD127− and CD4+CD25+FOXP3+ lymphocytes in viremic and matched aviremic HIV-infected patients.

Methods: Peripheral blood was collected from HIV-1 infected patients. Eleven viremic patients (Viral Load > 40 copies/mL) were matched (age, sex, CD4+ cell number) with 8 aviremic patients under highly active antiretroviral therapy (HAART). Fresh whole blood was immediately stained to analyze by flow cytometry the correlation between CD4+CD25+CD127− and the reference phenotype CD4+CD25+FOXP3+ lymphocytes in the same tube (four color staining CD4/CD25/CD127/FOXP3 for concomitant analysis of cell surface and intracellular markers).

Results: In both groups, no significant differences were observed when comparing CD4+CD25+CD127− and CD4+CD25+FOXP3+ cell frequencies. In line, a strong correlation between CD4+CD25+CD127− and CD4+CD25+FOXP3+ lymphocyte percentages was observed in the whole patient population (r: 0.948, $P < 0.001$) or each group separately: aviremic (r: 0.968, $P < 0.001$), viremic (r: 0.9, $P < 0.001$). Finally, we found that most CD4+FOXP3+ cells were indeed CD25+CD127−, both in viremic and aviremic groups (88.5% and 90.9%, respectively).

Conclusions: We observed that CD4+CD25+CD127− phenotype is a good and easy-to-perform surrogate identification strategy for FOXP3+ regulatory T cells in both viremic and aviremic HIV-1-infected subjects. Thus, it represents a useful tool for monitoring Tregs in clinical research studies based on large cohorts of patients prospectively monitored, including HIV-infected subjects. © 2012 International Clinical Cytometry Society

Key terms: CD4+CD25+; FOXP3; regulatory T cells; HIV; flow cytometry

How to cite this article: Saison J, Demaret J, Venet F, Chidiac C, Malcus C, Poitevin-Later F, Tardy J, Ferry T, Monneret G. CD4+CD25+CD127− assessment as a surrogate phenotype for FOXP3+ regulatory T cells in HIV-1 infected viremic and aviremic subjects. Cytometry Part B 2012; 00B: 000–000.

†Julien Saison and Julie Demaret contributed equally to this work.

*Correspondence to: Guillaume Monneret, Immunology Laboratory, Hopital E.Herriot, Hospices Civils de Lyon, 5 places d'Arsonval, 69437 Lyon Cedex 03, France.

E-mail: guillaume.monneret@chu-lyon.fr

Received 25 April 2012; Revision 31 July 2012; Accepted 4 September 2012

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/cyto.b.21047

© 2012 International Clinical Cytometry Society

HIV infection severely impacts immune response homeostasis, leading to development of chronic immune activation and gradual immune cell depletion. Regulatory T cells (Tregs) are known to modulate the host response to viral infections (1,2), but their role in HIV pathogenesis is still controversial. They are either supposed to suppress protective anti-HIV cell mediated immunity (3–5) or to control immune activation (6,7), which plays a major role in disease progression. More recently, Moreno et al. also reported that Tregs may control viral replication during the early phase of infection (8). Several reasons may explain these discrepancies. On the one hand, the heterogeneity of patients' population has to be taken into account (level of viremia, type of progressors, treatments duration ...). On the other hand, analytical issues may have contributed to discordances: markers used for Tregs phenotyping, staining of whole blood or purified cells, sample conservation (i.e., cryopreserved or not) (9,10).

Today the most widely accepted phenotype for Tregs is the coexpression of CD4, CD25 (α-chain of the IL-2 receptor), and of FOXP3 (11). FOXP3 is the key transcriptional factor for Tregs. However, its intracellular staining is hardly usable on a daily clinical routine basis in large series of samples (several steps of incubation/washing, long incubation times, use of isotype control). As a consequence, some authors took advantage of an alternatively described phenotype: the coexpression of CD4 and CD25 associated with the absence or the low expression of CD127 (α-chain of IL-7 receptor) (i.e., CD4+CD25+CD127−) (12). A good correlation between these two phenotypes was reported in healthy subjects (13) and in septic patients (14). However, a debate remains in HIV infected patients. Indeed, this correlation was found in aviremic patients but not in viremic ones (15). In contrast, other studies, based on cryopreserved or purified cells, found an acceptable correlation in viremic patients (16,17).

Considering the potential clinical interest of monitoring Tregs during HIV infection (18–20), and the need to further investigate their role in the different steps of disease progression, (especially during the phase of viremia), the objective of the present study was to assess in fresh samples the correlation between frequencies of CD4+CD25+CD127− and CD4+CD25+FOXP3+ lymphocytes in viremic and matched-aviremic HIV infected patients.

MATERIALS AND METHODS

Study Population and Blood Samples

HIV-1 infected patients from the Hospices Civils de Lyon HIV cohort, located in Croix-Rousse Hospital (Lyon, France) were consecutively included in the study between February 15th and 29th, 2012. These patients were concomitantly matched (sex, age, CD4+ cell number) with aviremic patients under highly active antiretroviral therapy (HAART). Analyses were performed on available residual blood after routine analysis (i.e., CD4+ lymphocyte count) at the Cellular Immunology Laboratory (Hôp. E. Herriot, Lyon, France).

Flow Cytometry

Expression of cell surface and intracellular markers was assessed on fresh whole EDTA-anticoagulated peripheral blood. Flow cytometry protocol has been previously described (14). Briefly, lymphocytes were stained with monoclonal antibodies according to manufacturer's recommendation: ECD-labeled anti-CD4, PE-labeled anti-CD127, PC5-labeled anti-CD25 (Beckman Coulter, Hialeah, FL), FITC-labeled anti-FOXP3 (eBioscience, San Diego, CA). Appropriate isotypic control (Rat IgG 2a-FITC, eBioscience) was used to evaluate nonspecific staining and set up positive threshold for FOXP3. A four color staining (CD4/CD25/CD127/FOXP3) for concomitant analysis of cell surface and intracellular markers was performed. Cell surface staining was performed first. Then, after fixing and permeabilizing, samples were stained for intracellular FOXP3. Red blood cells were lysed using Versalyse reagent (Beckman-Coulter, Miami, FL). Data were acquired on a NAVIOS flow cytometer and analyzed using the NAVIOS software (Beckman Coulter). Results are expressed as percentages of CD4+CD25+CD127− or CD4+CD25+FOXP3+ cells out of the total CD4+ lymphocytes.

Viral Load (VL) Quantification

After extraction of 0.6 mL of plasma, reverse transcription, PCR amplification, and detection/quantification reactions were performed using Abbott RealTi*me* HIV-1 assay and *m2000* system platform (Abbott Molecular, Des Plaines, IL). The detection limit was 40 copies/mL.

Statistical Analysis

Normality of the variables was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test. Exact Fisher test for categorical variables, and *T*-test for continuous variables were performed. Correlations between CD4+CD25+CD127− and CD4+CD25+FOXP3+ cell frequencies were studied using the Pearson's correlation coefficient test. The statistical analyses were performed using SPSS software (version 16.0, SPSS, Chicago, IL). A significance was assumed for $P < 0.05$.

RESULTS

Population at Baseline

Nineteen HIV-1 infected patients were included in the study. None of them were coinfected with hepatitis B or hepatitis C viruses. Of them, 11 viremic patients [men $n = 8$ (73%), median age = 33 years; Inter Quartile Range (IQR): 22-61, median CD4+ cell count = 363 cells/mm3, IQR: 115–482] were enrolled. In parallel, 8 patients receiving HAART [men $n = 6$ (75%), median age = 40 years, IQR: 24–59, median CD4+ cell count = 357 cells/mm3, IQR: 84–1196] were recruited and classified in the aviremic group. There were no statistical

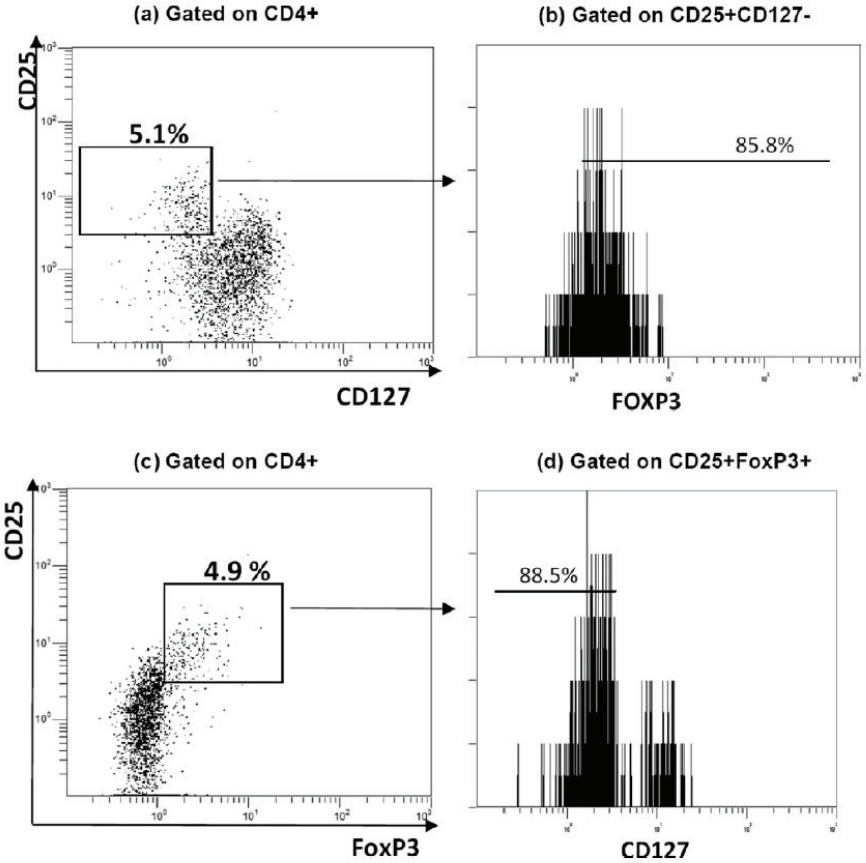


FIG. 1. Representative plots and histograms (Patient 2, viremic) of the two flow cytometry staining strategies for regulatory T cells (Tregs) identification (**a**) Tregs are identified as CD25+CD127− cells among CD4+ lymphocytes (5.1%) (**b**). Most of these CD4+CD25+CD127− cells also expressed FOXP3 (threshold set up with isotype control) (**c**). Tregs are identified as CD25+Foxp3+ cells among CD4+ lymphocytes (4.9%). (**d**). Most of these CD4+CD25+Foxp3+ cells did not express CD127.

differences at baseline between the two groups either for sex ($P = 0.91$), age ($P = 0.70$), or absolute CD4+ cell counts ($P = 0.33$). Aviremic patients had no detectable viremia (VL < 40copies/mL), whereas median VL in the viremic group was 27304 copies/mL (IQR 3,500–138,336) ($P < 0.001$).

Tregs Phenotypes

Gating strategy and illustrative examples of CD4-CD25-CD127 and CD4-CD25-FOXP3 stainings are shown in Figure 1. Respective phenotype frequencies, percentages of CD4+CD25+CD127− lymphocytes expressing FOXP3, and percentages of CD4+CD25+FOXP3+ cells not expressing CD127 are reported in Table 1, as individual values. Percentages of Tregs identified by the two phenotypes, i.e. CD4+CD25+CD127− and CD4+CD25+FOXP3+ cells were not statistically different in the viremic group ($P = 0.74$), in the aviremic group ($P = 0.36$), or in the whole population ($P = 0.45$). In line, we found a strong correlation between frequencies of CD4+CD25+CD127− and CD4+CD25+FOXP3+ cells, when considering the whole study population (r: 0.948, $P < 0.001$) or each group separately: aviremic (r: 0.968, $P < 0.001$), viremic (r: 0.94 $P < 0.001$). Another important observation was that most CD4+FOXP3+ cells were indeed found to be CD25+CD127−. Similar results were obtained for the viremic group and the aviremic group (88.5% and 90.9%, respectively, Table 1).

DISCUSSION

In this observational study we compared two Tregs phenotypes in an HIV-1-infected cohort. In both viremic and aviremic HIV-infected subjects, our purpose was to investigate whether CD4+CD25+CD127− phenotype identifies FOXP3+ Tregs in these particular clinical contexts.

Indeed, we observed that most CD4+CD25+CD127− cells expressed FOXP3 (Figs. 1a and 1b), either in the viremic (median: 88.50%, IQR: 84.10–92.90), or in the aviremic group (median: 90.9%, IQR: 80.80–97.70, Table 1).

Table 1
Percentages of Lymphocytes in Regard with Different Treg Phenotypes According to the Virologic Status of HIV-1 Infected Patients

Patient		% of CD25+CD127- (among CD4+)			% of CD25+FOXP3+ (among CD4+)			% of FOXP3+ (among CD4+CD25+CD127−)			% of CD127- (among CD4+CD25+FOXP3+)		
		Individual Values	Median (IQR)	*P*	Individual Values	Median (IQR)	*P*	Individual Values	Median (IQR)	*P*	Individual Values	Median (IQR)	*P*
Viremic group	1	5.80	5.50 (3.50–12.30)	0.71	5.40	5.40 (3.30–12.10)	0.59	88.50	88.50 (84.10–92.90)	0.26	78.80	76.70 (59.90–88.90)	0.42
	2	5.00			4.80			85.80			88.50		
	3	12.30			12.10			88.00			76.70		
	4	7.30			7.10			86.80			84.80		
	5	4.20			4.40			87.70			69.80		
	6	7.80			6.80			88.90			77.30		
	7	8.80			9.50			88.60			76.60		
	8	4.40			5.40			92.90			61.80		
	9	4.60			6.30			89.70			59.90		
	10	3.50			3.30			89.50			73.60		
	11	5.50			4.00			84.10			88.90		
Aviremic group	12	7.50	5.70 (3.60–9.50)		6.90	5.70 (3.10–9.10)		88.40	90.9 (80.80–97.70)		78.20	78.25 (70.50–90.20)	
	13	5.20			5.90			95.10			78.30		
	14	6.10			5.50			91.20			88.50		
	15	9.50			9.60			90.70			74.00		
	16	3.70			3.30			80.80			85.50		
	17	5.60			4.90			91.10			70.60		
	18	5.80			6.20			87.80			70.50		
	19	3.60			3.10			95.70			90.20		

IQR, inter quartile range; *P* values: viremic vs. aviremic groups (student *T* test).

Conversely, using a backgating strategy (Figs. 1c and 1d), we highlighted that most CD4+CD25+FOXP3+ cells were negative for CD127 expression (Table 1). Our results are consistent with two other studies (16,17), in which a close correlation (r: 0.81, $P < 0.001$, and r: 0.96 $P < 0.0001$, respectively) between the two phenotypes was observed in viremic patients. Nevertheless, these studies did not include aviremic patients. Overall, these results are important because some authors previously used the CD4+CD25+CD127− phenotype to characterize Tregs (without assessing the FOXP3+ intracellular staining). Our results confirmed that their conclusions on roles of Tregs in the pathophysiology of HIV infection are relevant for both the viremic and the aviremic subjects (21,22).

However, the present report contrasts with Del Pozo and colleagues' results (15). They observed a lack of correlation between the two phenotypes in viremic subjects. This discrepancy could be attributed to different study protocols (both analytical and regarding inclusion criteria). First, we used fresh whole blood samples rather than isolated peripheral blood mononuclear cells. Second, we included patients with lower absolute CD4+ value, and not only those presenting with CD4+ count higher than 350 cells/mm^3. Third, in our study, there was no statistical difference in age between the two groups while the aviremic group was older than the viremic one in Del Pozo's study (median age 43 and 31 years respectively, $P = 0.001$). This may explain the higher CD4+CD25+FOXP3+ frequency observed in the aviremic group (4.89 versus 3.90, $P = 0.039$).

Our study has some limitations. First, we did not specifically analyzed Tregs phenotypes and frequencies in long-term nonprogressors or in case of early HIV infection. We cannot rule out that some specificity may relate to these conditions. Second, the number of patients included is relatively modest. However, the very strong correlations between CD4+CD25+ FOXP3+ and CD4+CD25+CD127− percentages obtained in such small cohort tend to support our conclusion. Third, it has to be mentioned that a small percentage of FOXP3+ cells was not included in the CD4+CD25+CD127− cell population (around 10%, no significant difference between groups, Fig. 1d). These cells belong either to CD4+CD25+CD127+ or to CD4+CD25-CD127− populations for which published data remain very scarce. These cells deserve further investigation as their potential role in HIV pathophysiology has not yet been elucidated. In that sense, since FOXP3 is to date the universal marker for Tregs cells, development of a more practical technique to stain intracellular FOXP3 remains highly desirable to monitor those cells in clinical research dealing with large numbers of patients. An important step would be to shorten the intracellular FOXP3 staining in the future.

CONCLUSIONS

We confirm here that CD4+CD25+CD127− phenotype is a good surrogate phenotype for FOXP3+ regulatory T cells identification in both viremic and aviremic HIV-1-infected subjects. Awaiting for some robust and

rapid intracellular FOXP3 staining, we suggest that the CD4+CD25+CD127− phenotype remains a reliable and easy tool (whole blood, no wash, less than 30 min to be completed, isotype control not necessary) for Tregs measurement in clinical research on HIV-infected patients.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Anne Portier, Caroline Guignant, and Celine Griffon-Renoux for technical assistance.

LITERATURE CITED

1. Lund JM, Hsing L, Pham TT, Rudensky AY. Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells. Science 2008;320:1220–1224.
2. Li S, Gowans EJ, Chougnet C, Plebanski M, Dittmer U. Natural tregs and persistent viral infections. J Virol 2008;82:21–30.
3. Kinter A, McNally J, Riggin L, Jackson R, Roby G, Fauci AS. Suppression of HIV-specific T cell activity by lymph node CD25+ regulatory T cells from HIVinfected individuals. Proc Natl Acad Sci USA 2007;104:3390–3395.
4. Kinter AL, Horak R, Sion M, Riggin L, McNally J, Lin Y, Jackson R, O'Shea A, Roby G, Kovacs C, Connors M, Migueles SA, Fauci AS. CD25_ regulatory T cells isolated from HIV-infected individuals suppress the cytolytic and nonlytic antiviral activity of HIV-specific CD8_ T cells in vitro. AIDS Res Hum Retroviruses 2007;23:438–450.
5. Shaw JM, Hunt PW, Critchfield JW, McConnell DH, Garcia JC, Pollard RB, Somsouk M, Deeks SG, Shacklett BL. Increased frequency of regulatory T cells accompanies increased immune activation in rectal mucosae of HIV-positive noncontrollers. J Virol 2011;85:11422–11434.
6. Prendergast A, O'Callaghan M, Menson E, Hamadache D, Walters S, Klein N, Goulder P. Factors influencing T cell activation and programmed death 1 expression in HIV-infected children. AIDS Res Hum Retroviruses. 2012;28:465–468.
7. Chase AJ, Yang HC, Zhang H, Blankson JN, Siliciano RF. Preservation of FoxP3R regulatory T cells in the peripheral blood of human immunodeficiency virus type 1-infected elite suppressors correlates with low CD4R T-cell activation. J Virol 2008;82:8307–8315.
8. Moreno-Fernandez ME, Rueda CM, Rusie LK, Chougnet CA. Regulatory T cells control HIV replication in activated T cells through a cAMP-dependent mechanism. Blood 2011;117:5372–5380.
9. Sattui S, de la Flor C, Sanchez C, Lewis D, Lopez G, Rizo-Patrón E, White AC Jr, Montes M. Cryopreservation modulates the detection of regulatory T cell markers. Cytometry B Clin Cytom 2012;82B:54–58.
10. Venet F, Malcus C, Ferry T, Poitevin F, Monneret G. Percentage of regulatory T cells CD4+CD25+CD127− in HIV-infected patients is not reduced after cryopreservation. J Immunol Methods 2010;357:55–58.
11. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. Nat Rev Immunol 2010;10:490–500.
12. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ Treg cells. J Exp Med 2006;203:1701–1711.
13. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. J Exp Med 2006;203:1693–1700.
14. Venet F, Chung CS, Kherouf H, Geeraert A, Malcus C, Poitevin F, Bohe J, Lepape A, Ayala A, Monneret G. Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25 (+)CD127 (-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. Intensive Care Med 2009;35:678–686.
15. Del Pozo-Balado Mdel M, Leal M, Méndez-Lagares G, Pacheco YM. CD4+CD25+/hiCD127lo Phenotype Does Not Accurately Identify Regulatory T Cells in All Populations of HIV Infected Persons. J Infect Dis 2010;201:331–335.
16. Montes M, Sanchez C, Lewis DE, Graviss EA, Seas C, Gotuzzo E, White AC Jr. Normalization of FoxP3(+) regulatory T cells in response to effective antiretroviral therapy. J Infect Dis 2011;203:496–499.
17. Schulze Zur Wiesch J, Thomssen A, Hartjen P, Tóth I, Lehmann C, Meyer-Olson D, Colberg K, Frerk S, Babikir D, Schmiedel S, Degen O, Mauss S, Rockstroh J, Staszewski S, Khaykin P, Strasak A, Lohse AW, Fätkenheuer G, Hauber J, van Lunzen J. Comprehensive analysis of frequency and phenotype of T regulatory cells in HIV infection: CD39 expression of FoxP3+ T regulatory cells correlates with progressive disease. J Virol 2011;85:1287–1297.
18. Méndez-Lagares G, Del Mar Del Pozo-Balado M, Genebat González M, García-Pergañeda Sánchez A, Leal Noval M, Pacheco López YM. Severe immune dysregulation affects CD4+CD25hiFoxP3+ regulatory T-cells in HIV-infected patients with low-level CD4 T-cell repopulation despite suppressive HAART. J Infect Dis 2012;205:1501–1509.
19. Elahi S, Dinges WL, Lejarcegui N, Laing KJ, Collier AC, Koelle DM, McElrath MJ, Horton H. Protective HIV-specific CD8+ T cells evade Treg cell suppression. Nat Med 2011;17:989–995.
20. Simonetta F, Lecuroux C, Girault I, Goujard C, Sinet M, Lambotte O, Venet A, Bourgeois C. Early and long lasting alteration of Effector CD45RA-Foxp3high Regulatory T cells homeostasis during HIV infection. J Infect Dis 2012;205:1510–1519.
21. Hunt PW, Landay AL, Sinclair E, Martinson JA, Hatano H, Emu B, Norris PJ, Busch MP, Martin JN, Brooks C, McCune JM, Deeks SG. A low T regulatory cell response may contribute to both viral control and generalized immune activation in HIV controllers. PLoS One 2011;6.
22. Tenorio AR, Spritzler J, Martinson J, Gichinga CN, Pollard RB, Lederman MM, Kalayjian RC, Landay AL. The effect of aging on T-regulatory cell frequency in HIV infection. Clin Immunol 2009;130:298–303.

Major article (accepted for publication in Open Forum of Infectious Diseases)

Increased Treg percentage contributes to poor CD4+ lymphocytes recovery: A 2-year prospective study following introduction of antiretroviral therapy

Running Title

Treg and immune response to HAART

SAISON Julien[1 2 3 4], MD, MAUCORT BOULCH Delphine[3 5 6] MD, PhD, CHIDIAC Christian[2 3 4], MD, DEMARET Julie[1], MALCUS Christophe[1], PharmD, PhD, COTTE Laurent [2], MD, POITEVIN-LATER Francoise[1], PharmD, MIAILHES Patrick[2], MD, VENET Fabienne[1 3], PharmD, PhD, TRABAUD Mary Anne [7], PharmD, MONNERET Guillaume, PharmD, PhD[1 3], FERRY Tristan[2 3 4], MD PhD, on behalf of the Lyon HIV Cohort Study Group

1. Immunology Laboratory, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France
2. Infectious and Tropical Disease Unit, Hôpital de la Croix-Rouse, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France
3. Lyon-1 University, Lyon, France
4. Centre International de Recherche en Infectiologie, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France
5. Service de Biostatistique, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France
6. Equipe Biostatistique Santé, Unité médicale de Santé 5558, Villeurbanne, France;
7. Virology Laboratory, Hôpital de la Croix-Rousse, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

Footnote page

(1) All the authors declare they have no conflict of interest (e.g., pharmaceutical stock ownership, consultancy, advisory board membership, relevant patents, or research funding).

(2) This work was supported by Hospices Civils de Lyon.

(3) Results from this study have not been presented at any meeting.

(4) Person to whom correspondence and requests for reprints should be addressed:

Prof. Tristan FERRY, Infectious and Tropical Disease Unit, Hospices Civils de Lyon, Hopital de La Croix-Rousse, 103 Grande Rue de la Croix Rousse, 69317 Cedex 04, Lyon, France.

Telephone number (33) 4 72 07 11 07

Fax number (33) 4 72 07 24 41

E-mail: tristan.ferry@chu-lyon.fr.

Abstract (198 words)

Introduction

The aim was to determine the impact of Treg percentage on immune recovery in HIV-infected patients following ART introduction.

Materials and methods

A 2-year prospective study was conducted in HIV-1 chronically infected naive patients with CD4 count <500 cells/mm^3. Treg were identified as CD4+CD25^{high}CD127^{low} cells among CD4+ lymphocytes. Effect of Treg percentage at inclusion on CD4 evolution overtime was analysed using a mixed effect Poisson regression for count data.

Results

Fifty-eight patients were included (Median CD4=293/mm^3, median Treg percentage=6.1 %). Percentage of Treg at baseline and CD4 nadir were independently related to the evolution of CD4 absolute value according to time: (i) at any given nadir CD4 count, 1% increase of initial Treg was associated with a 1.9% lower CD4 absolute value at month 24; (ii) at any given Treg percentage at baseline, 10 cell/mm^3 increase of CD4 nadir was associated with a 2.4% increase of CD4 at month 24; and (iii) both effect did not attenuate with time. The effect of Treg at baseline on CD4 evolution was as lower as the CD4 nadir was higher.

Conclusion

Treg percentage at baseline is a strong independent prognostic factors of immune recovery, in particular among patients with low CD4 nadir.

Introduction

The mechanisms sustaining the absence of immune recovery in HIV-infected patients upon effective antiretroviral therapy (ART) remain elusive (1). In most studies, 20 to 30 percent of patients are concerned by a discordant response to ART, depending on the definition of the immunological failure (2–5). In patients with abnormal T lymphocytes CD4+ (CD4) count despite virological success, an increased mortality has been shown and cardiovascular and malignant pathologies are frequently observed (6–9). Regulatory T cells (Treg) are known to modulate the host response to viral infections (10,11), but their role in HIV pathogenesis is still controversial (12,13).

Some recent cross sectional studies highlighted the potential deleterious role of these cells in case of suboptimal gain of CD4 count (14–18). All included patients with many years of suppressive ART and compared the clinical and immunologic characteristics of immune responders (i.e., with appropriate CD4 recovery) with non-responders. Therefore, it was unknown if the elevated Treg percentage observed in non-responders was a cause or a consequence of the disease duration and CD4 loss before ART introduction. To date, no data are available concerning the impact of Treg on the evolution of CD4 count during the two years after ART introduction.

The aim of this study was to prospectively analyse if Treg percentage measured at ART introduction could be independently associated with lack of immune recovery after two years.

Materials and methods

Population

We performed a 2-year prospective cohort study including chronically HIV-1 infected naive patients with CD4 count <500/mm^3 who started ART between January 2011 and March 2012. Patients were included the first day of ART, and followed for two years. The frequency of follow up visits and immunovirological control was based on french recommendation (19). Patients with onco-haematological diseases, cancer, and/or recent history of chemotherapy or treatment with hydroxyuree were not included. The following patients were excluded during the two year follow-up: (i) patients lost to follow-up; (ii) patients experiencing virological failure (*i.e*. two successive HIV RNA above 50 cp/mL) (19); (iii) patients with lack of follow up (i.e. less than 4 biological measurements per year) in order to minimize the possibility of a viral load rebound between two measurements impacting the CD4 recovery. CD4, Treg (determined as CD4+CD25+CD127- cells) and viral load were measured at baseline and were prospectively recorded for one year after ART introduction. During the second year of follow up, only CD4 count and viral load were prospectively recorded. Written informed consent was obtained from every subject and local Ethical Committee approval was received for the study.

Routine laboratory assessments

Viral loads were determined after extraction of 0.6 mL plasma using the Abbott Real Time HIV-1 assay under the dedicated m2000rt version 4.0 m2000rt software 4.0 package (quantitation limit 40 HIV RNA copies/mL).

Cellular Immunophenotyping

The absolute count of CD4 and complementary expression of cell surface were assessed on fresh whole EDTA-anticoagulated peripheral blood, and measured on a FC500 flow cytometer using the FC500 software V2 (Beckman Coulter, California, USA). Lymphocytes were stained with monoclonal antibodies according to manufacturer's recommendation: ECD-labeled anti-CD4, PE-labeled anti-CD127, PC5-labeled anti-CD25 (Beckman Coulter, Hialeah, FL). Treg were determined as CD25+CD127- cells among total CD4+ lymphocytes and results are expressed as percentages of CD4+CD25+CD127- cells out of CD4+ lymphocytes. A minimum number of 2000 CD4+ cellular events wasrecorded .

Statistical analysis

Variables were described with medians, first and third quartiles for continuous variables, counts and percentages for categorical variables. Correlations between CD4 count and Treg were explored with Spearman tests. Impact of Treg percentage on CD4 count evolution along the 2 first years following ART introduction was studied using a mixed effect Poisson regression. All the prospectively recorded CD4 measurements per patient were used in the model. Time was introduced as third order polynomial. Random intercept, slope and quadratic term for time were included to allow for subject specific initial CD4 value, slope and curvature of CD4 evolution through time. Age at treatment onset and nadir of CD4 (*i.e.* the lowest value of CD4 measured before ART introduction) were considered as main confounding variables of Treg percentage and thus were studied. Non-adjusted models were fitted before mutual adjustment. Effect sizes were represented with 95% confidence interval as multiplicative factor on CD4 cell count. Interactions of Treg and CD4 nadir respectively with time were tested in order to detect time-dependent slope of those variables on CD4 count. Interaction between Treg percentage and CD4 nadir was also tested to detect different effect of one according to the level of the other one. Those interactions were kept in the model

when p-value reached 10%. To illustrate the model, we considered patients according to the level of immunosuppression (nadir CD4 < or > 350/mm^3), and Treg percentage, (< or > 9%) (Figure 2). These values approximately correspond to the top quartile of participants based on the CD4 nadir and Treg percentage distribution (table 1). Results were considered as significant when p values were less than 5%. Analyses were performed with R software (software 3.0.2, 2013). (ref: R Development Core Team. R: A Language Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. URL: http: // 2013.)

Results

Population description

One hundred and one patients were included, and 43 patients were excluded during the follow-up (**figure 1**). Finally, 58 patients were followed during 26.2 months (Interquartile range IQR 24.5-27.3). Characteristic of the population is described in **table 1**. Six patients were CDC Stage C (10%), 10 CDC B (17%), and 42 CDC A (73%). Median Zenith viral load was 4.7 (IQR 4.4-5.2). Half of the patients were infected with HIV-1 B subtype viruses (n=30). Only two patients were co-infected with an hepatitis virus (HBV=1, HCV=1). All patients received a nucleoside reverse transcriptase inhibitor's backbone (tenofovir-emtricitabine or abacavir-lamivudine) combined with (i) a protease inhibitor's based regimen (atazanivir, darunavir or lopinavir, all boosted with ritonavir; n=48, 82%), or with (ii) efavirenz (n=5, 9%), or with (iii) raltegravir (n=5, 9%).

Correlation between CD4, Treg and viral load at ART introduction, M12 and M24

At ART introduction, there was a significant positive correlation between Treg percentage and HIV viral load measured at ART introduction (Spearman $\rho=0.27$, $p=0.04$). On the contrary, there was a significant negative correlation between Treg percentage and CD4 nadir count ($R=-0.43$, $p<0.001$), and between Treg percentage and CD4 count ($R=-0.47$, $p<0.001$).

At month 12, the correlation between CD4 count and Treg percentage was lost ($R=-0.33$, $p=0.06$).

Impact of Treg percentage on CD4 reconstitution

In the unadjusted models, both percentage of Treg at ART introduction and CD4 nadir were statistically related to the CD4 absolute value at baseline and during follow up. On average, 1% increase of Treg at baseline was associated with 4.2% (95% Confidence interval CI 5.9-

2.5, p<0.001) decrease of CD4 absolute value. Similarly, patients with 10/mm^3 increase of CD4 nadir had on average 5.7% higher CD4 (95% CI 5.0-6.4; p<0.001). There was no significant effect of age on CD4 reconstitution.

In the adjusted model, both Treg percentage at baseline and CD4 nadir were related to the evolution of CD4 absolute value overtime. At any given nadir CD4 count, for each 1% of Treg more at ART introduction, a 1.9% (95% CI 2.9-0.8, p<0.001) lower CD4 absolute value is expected at month 24. Similarly, at any given Treg percentage at baseline, a 10/mm^3 higher CD4 nadir was associated with 2.4% (95% CI 1.8-3.0, p<0.001) higher CD4 absolute value at month 24. For both variables, the effect on CD4 does not significantly attenuate over the 2 years of the follow up (p>0.05, table 2). Treg percentage at baseline has different effect size according to the CD4 nadir, *i.e.* it decreased when CD4 nadir increased: the impact of 1% increase of Treg on CD4 evolution was 0.14% lower for each additional 10/mm^3 increase of CD4 nadir (table 2).

Figure 2 shows that CD4 nadir >350/mm^3 is a strong prognostic factor of immunological recovery (there were no patients with CD4 nadir >350/mm^3 and Treg percentage>9%). But among patients with CD4 nadir <350/mm3, patients with Treg percentage <9% at baseline had a better immunological recovery than patients with Treg >9% (Figure 2A and 2C).

Discussion

In western countries, the discordant immunological response to ART is a very frequently encountered problem and is associated with increased risk of death or cardiovascular and malignant pathologies (2–5). In this context, CD4 nadir is known as an important prognostic factor of CD4 count reconstitution (17,20). Here, we extend these results by describing, in a prospective cohort study, that Treg percentage, as CD4 nadir, was as an independent predictor of low CD4 recovery despite virological success. However, we found an interaction between Treg percentage and CD4 nadir, which showed that the effect of Treg percentage was attenuated for increasing values of CD4 nadir.

Recent cross-sectional observational studies described an association between Treg percentage and immunological non response to HAART. They included patients under suppressive ART since many years, and compared clinical and immunological characteristics of immunological responders vs. non responders. This clearly suggests that a high Treg percentage could be an important factor associated with immunological discordant response to ART. However, it was argued that the differences observed in Treg percentage between the two groups (patients with immune recovery *vs*. non-responders) in such studies only reflect differences in CD4 nadir. In fact, a strong negative correlation between Treg percentage, CD4 count and CD4 nadir has been frequently reported in viremic untreated patients (14,21–24). Thus, in other words, the complex pattern of immune dysfunctions (including increased Tregs) observed in patients with incomplete immune reconstitution could be the consequence of low CD4 nadir, not the cause (16). This is an important limitation to these previous cross sectional studies (14–18). To our knowledge, only one prospective study evaluated the impact of Tregs in immune response to ART. Its results suggest a possible prognostic value of a high Treg percentage in immunological non responder patients (r^2=0.17, $p<0.05$) **(25).** However, in this study, patients were followed during 1 year but have been on suppressive ART for many

years (at least 2 years), which strongly limits the interpretation of the results. Importantly, it has to be highlighted that the definition used in the literature for the immunological response to ART is highly variable. The different classical outcomes such as slope of CD4 absolute value evolution overtime (14), fixed absolute value objective or CD4 gain at end of follow up (26–28) could be impacted by CD4 count at ART introduction, and by the duration of follow up (few months or many years). In the current study, CD4 reconstitution was analysed using a non-linear model. Using the mixed effect Poisson regression for count data model used here, we were able to investigate the role of Treg and CD4 nadir on immune reconstitution without misclassifying patients in groups of immunological responder, or inadequate responder. Every CD4 values recorded during the prospective follow up were used in the model. This allowed analysis of interaction between CD4 absolute value evolution, CD4 nadir and Treg percentage at baseline with time. Using this model, we describe a negative impact of a high Treg percentage at ART introduction on immunological response, therefore confirming results of previous cross sectional studies (14–18). Importantly, we highlighted that this effect does not attenuate with time.

We believe that our results are of major importance. First, Treg percentage should now be used to detect patients at risk of immunological non-response to ART, *i.e.* with CD4 nadir less than 350/mm3 and Tregs of more than 9% (Figure 2). On the contrary, it is probable that patients with high CD4 nadir (whatever the Treg percentage), or with a low Treg percentage at ART introduction, have a high probability of achieving a normal reconstitution of CD4 count. Such high-risk patients (CD4 nadir<350/mm^3 and Treg percentage >9-10%) should be preferentially included in therapeutics assays which are conducted to improve the immune response.

Secondly, these results raise the question of the interest of directly targeting Treg, in complement with ART, in patients with low nadir and high Treg percentages. However, the

direct pathogenic role of this CD4 subset in the immunological non-response is not yet proven. Pion *et al*. have shown that HIV infection down regulates Foxp3 expression in Treg, which is followed by the loss of their suppressive capacity and alterations in suppressive cytokine secretion pattern (29). We can hypothesize that once virological suppression is obtained under ART, free-viruses/uninfected Treg could disrupt CD4 homeostasis. This has been suggested by others (15). It would now be interesting to perform in vitro functional assays of Treg from aviremic patients under long term ART, in order to compare results from immunological responders versus patients with a persistently low CD4 repopulation. If a deleterious effect is confirmed in aviremic treated patients, new therapeutics strategy targeting Treg should be elaborated, as already proposed in cancer (30,31).

Our study has some limitations. In particular, we did not observe a statistical relationship between age and immunological response. Indeed, previous studies found that increasing age is associated with a smaller CD4 gain (4,32). This can probably be explained in the current study by a lack of statistical power due to the relatively low duration of ART and the low number of patients studied.

As a conclusion, in this population of HIV infected naïve patients, a high Treg percentage measured at ART introduction was associated with a lower CD4 + T cell recovery during the two following years. The percentage of Treg could be used in clinical practice in association with CD4 nadir to detect patients at-risk for immunological non response to ART.

Author Contributions

SAISON Julien, FERRY Tristan, MONNERET Guillaume, VENET Fabienne, DEMARET Julie designed the study, performed immunological laboratory assessment, statistical analysis, and the writing of the manuscript.

MALCUS Christophe and POITEVIN Francoise performed immunological laboratory assessment.

MAUCORT BOULCH Delphine performed statistical analysis and the writing of the manuscript.

SAISON Julien, FERRY Tristan, COTTE Laurent, MIALHES Patrick and CHIDIAC Christian included patients.

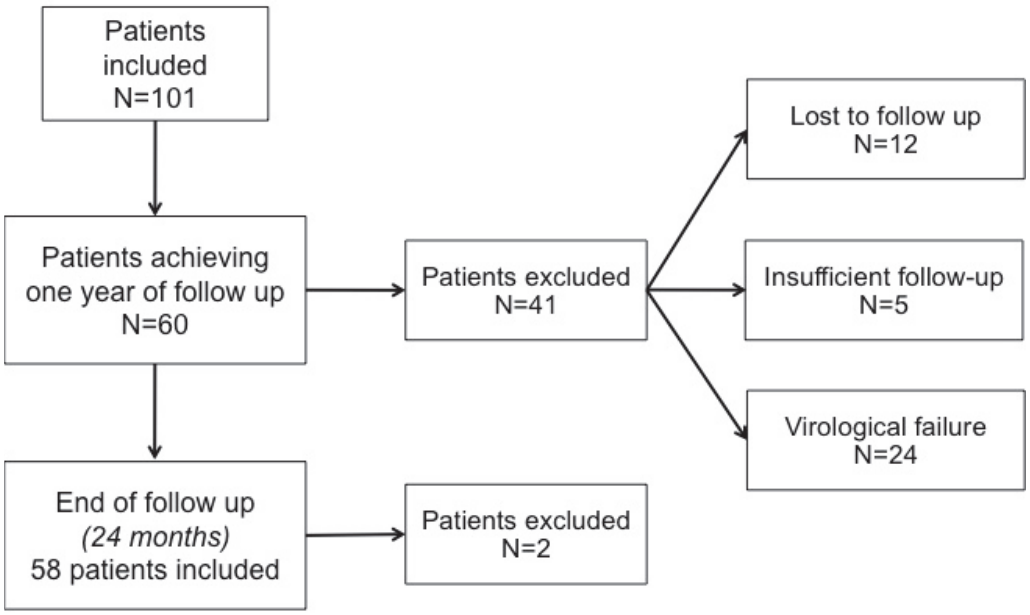
Disclosure

The authors have no financial conflicts of interest. This work was supported by Hospices Civils de Lyon that received a grant from MSD France to perform the cellular immunophenotyping.

Acknowledgements

The authors thank patients and all the members of the Lyon HIV Cohort Study: Physicians: Pr. C. Chidiac, Pr. T. Ferry, Dr. F. Ader, Dr. L. Cotte, Dr. T. Perpoint, Dr. P. Miailhes, Dr. F. Biron, Dr. A. Boibieux, Pr. D. Peyramond, Dr. E. Braun, Dr. H. Champagne, Dr. F. Daoud, Dr. V. Gueripel, Dr. J. Koffi, Dr. C. Longuet, Dr. S. Pailhes, Dr. B. Ponceau, Dr. I. Schlienger, Dr. A. Senechal, Dr. A. Bouaziz, Dr. J. Karsenty, Dr. F. Valour, Dr. J. Saison. Virologists: Pr P. André, Dr. MA. Trabaud, Dr. JC. Tardy, Dr. V. Icard. Dr C.Scholtes, Immunologists: Pr. G. Monneret, Dr. F. Poitevin, Dr. C. Malcus.

Figure 1. Study flow chart. Inclusion criteria: chronically HIV-1 infected patients; no history of HAART; TL CD4 count < 500/mm3; no onco-haematological diseases, cancer, and/or recent history of chemotherapy or treatment with Hydroxyuree. Insufficient follow up: < 4 CD4 T lymphocytes measurements per year.



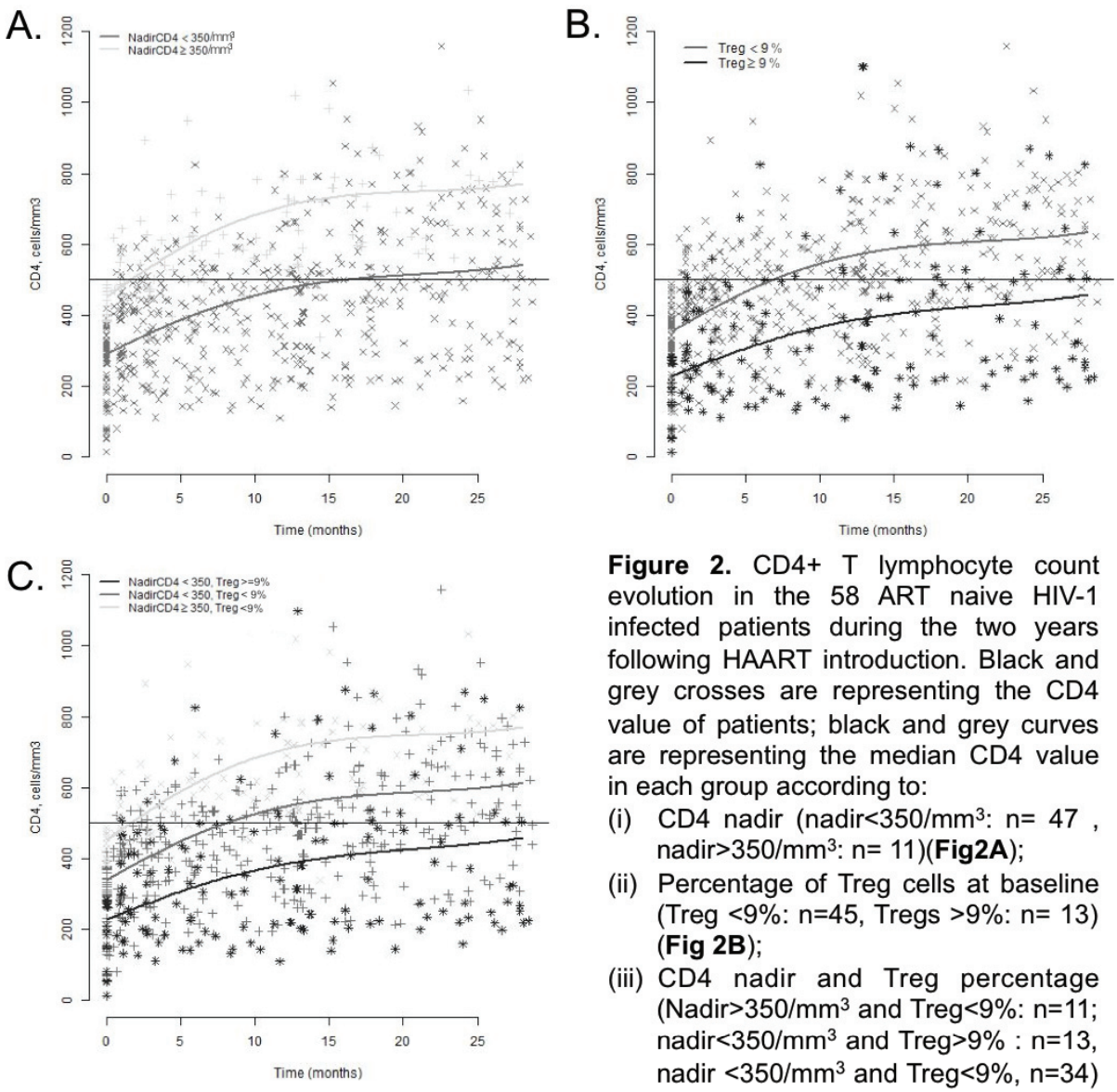


Figure 2. CD4+ T lymphocyte count evolution in the 58 ART naive HIV-1 infected patients during the two years following HAART introduction. Black and grey crosses are representing the CD4 value of patients; black and grey curves are representing the median CD4 value in each group according to:

(i) CD4 nadir (nadir<350/mm^3: n= 47 , nadir>350/mm^3: n= 11)(**Fig2A**);

(ii) Percentage of Treg cells at baseline (Treg <9%: n=45, Tregs >9%: n= 13) (**Fig 2B**);

(iii) CD4 nadir and Treg percentage (Nadir>350/mm^3 and Treg<9%: n=11; nadir<350/mm^3 and Treg>9% : n=13, nadir <350/mm^3 and Treg<9%, n=34) (**Fig2C**).

Table 1. Baseline characteristics of the 58 naïve HIV-1 infected patients studied. N=Number; IQR=Inter Quartile range

Variable	N or median	% or 1st-3rd quartiles
Man (%)	47	(81)
Men who have sex with men (%)	41	(70)
Age at baseline, in year (IQR)	39.9	(31.2- 47.7)
CDC stage C (%)	6	(10)
CD4 nadir, cells/mm3 (IQR)	267	(150- 325)
Viral Load, log10 cp/mL (IQR)	4.4	(3.8- 5)
Protease inhibitor Base regimen (%)	48	(83)
Time to viral indetectability, in days (IQR)	103	(61- 168)
Duration of follow up, in months (IQR)	26.2	(24.5- 27.3)
CD4, cells/mm3 (IQR)	293	(161- 375)
Treg, cells/mm3 (IQR)	17,5	(12.2- 22)
Treg, % of CD4 (IQR)	6.1	(4.6- 8.78)

Table 2. Effect sizes from adjusted model including interactions with time, Treg and T lymphocytes CD4 (CD4) nadir on CD4 absolute value.

Variable	**Effect size**	**95% CI**	**p**
Treg at baseline (per additional percent)	0.981	0.971- 0.992	<0.001
Interaction with time (per month)	1	0.999 – 1.001	0.192
CD4 nadir (per 10/mm^3)	1.024	1.018 - 1.03	<0.001
Interaction with time (per month)	0.999	0.999 - 1.00	0.072
Interaction of Treg with CD4 nadir (per additional **percent** of Treg and 10/mm^3 CD4 nadir)	1.001	1.001 - 1.002	<0.001

References

1. Gaardbo JC, Hartling HJ, Gerstoft J, Nielsen SD. Incomplete immune recovery in HIV infection: mechanisms, relevance for clinical care, and possible solutions. Clin Dev Immunol. 2012;2012:670957.
2. Grabar S, Le Moing V, Goujard C, Leport C, Kazatchkine MD, Costagliola D, et al. Clinical outcome of patients with HIV-1 infection according to immunologic and virologic response after 6 months of highly active antiretroviral therapy. Ann Intern Med. 2000 Sep 19;133(6):401–10.
3. Piketty C, Weiss L, Thomas F, Mohamed AS, Belec L, Kazatchkine MD. Long-term clinical outcome of human immunodeficiency virus-infected patients with discordant immunologic and virologic responses to a protease inhibitor-containing regimen. J Infect Dis. 2001 May 1;183(9):1328–35.
4. Kaufmann GR, Furrer H, Ledergerber B, Perrin L, Opravil M, Vernazza P, et al. Characteristics, determinants, and clinical relevance of CD4 T cell recovery to <500 cells/microL in HIV type 1-infected individuals receiving potent antiretroviral therapy. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2005 Aug 1;41(3):361–72.
5. Kelley CF, Kitchen CMR, Hunt PW, Rodriguez B, Hecht FM, Kitahata M, et al. Incomplete peripheral CD4+ cell count restoration in HIV-infected patients receiving long-term antiretroviral treatment. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2009 Mar 15;48(6):787–94.
6. Loutfy MR, Genebat M, Moore D, Raboud J, Chan K, Antoniou T, et al. A CD4+ cell count <200 cells per cubic millimeter at 2 years after initiation of combination antiretroviral therapy is associated with increased mortality in HIV-infected individuals with viral suppression. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2010 Dec;55(4):451–9.
7. Van Lelyveld SFL, Gras L, Kesselring A, Zhang S, De Wolf F, Wensing AMJ, et al. Long-term complications in patients with poor immunological recovery despite virological successful HAART in Dutch ATHENA cohort. AIDS Lond Engl. 2012 Feb 20;26(4):465–74.
8. Engsig FN, Gerstoft J, Kronborg G, Larsen CS, Pedersen G, Røge B, et al. Long-term mortality in HIV patients virally suppressed for more than three years with incomplete CD4 recovery: a cohort study. BMC Infect Dis. 2010;10:318.
9. Pacheco YM, Jarrín I, Del Amo J, Moreno S, Iribarren JA, Viciana P, et al. Risk factors, CD4 long-term evolution and mortality of HIV-infected patients who persistently maintain low CD4 counts, despite virological response to HAART. Curr HIV Res. 2009 Nov;7(6):612–9.
10. Lund JM, Hsing L, Pham TT, Rudensky AY. Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells. Science. 2008 May 30;320(5880):1220–4.
11. Li S, Gowans EJ, Chougnet C, Plebanski M, Dittmer U. Natural regulatory T cells and persistent viral infection. J Virol. 2008 Jan;82(1):21–30.
12. Moreno-Fernandez ME, Presicce P, Chougnet CA. Homeostasis and function of regulatory T cells in HIV/SIV infection. J Virol. 2012 Oct;86(19):10262–9.
13. Chevalier MF, Weiss L. The split personality of regulatory T cells in HIV infection. Blood. 2013 Jan 3;121(1):29–37.
14. Horta A, Nobrega C, Amorim-Machado P, Coutinho-Teixeira V, Barreira-Silva P, Boavida S, et al. Poor immune reconstitution in HIV-infected patients associates with high percentage of regulatory CD4+ T cells. PloS One. 2013;8(2):e57336.
15. Méndez-Lagares G, Pozo-Balado MM, del Mar del Pozo Balado M, Genebat M, Genebat González M, García Pergañeda A, et al. Severe immune dysregulation affects $CD4^{+}CD25(hi)FoxP3^{+}$ regulatory T cells in HIV-infected patients with low-level CD4 T-cell repopulation despite suppressive highly active antiretroviral therapy. J Infect Dis. 2012 May

15;205(10):1501–9.
16. Piconi S, Trabattoni D, Gori A, Parisotto S, Magni C, Meraviglia P, et al. Immune activation, apoptosis, and Treg activity are associated with persistently reduced CD4+ T-cell counts during antiretroviral therapy. AIDS Lond Engl. 2010 Aug 24;24(13):1991–2000.
17. Saison J, Ferry T, Demaret J, Maucort Boulch D, Venet F, Perpoint T, et al. Association between discordant immunological response to highly active anti-retroviral therapy, regulatory T cell percentage, immune cell activation and very low-level viraemia in HIV-infected patients. Clin Exp Immunol. 2014 Jun;176(3):401–9.
18. Foxall RB, Albuquerque AS, Soares RS, Baptista AP, Cavaleiro R, Tendeiro R, et al. Memory and naive-like regulatory CD4+ T cells expand during HIV-2 infection in direct association with CD4+ T-cell depletion irrespectively of viremia. AIDS Lond Engl. 2011 Oct 23;25(16):1961–70.
19. Morlat P. Prise en charge médicale des personnes vivants avec le VIH-recommandations du groupe d'expert. La documentation francaise; 2013.
20. Negredo E, Massanella M, Puig J, Pérez-Alvarez N, Gallego-Escuredo JM, Villarroya J, et al. Nadir CD4 T cell count as predictor and high CD4 T cell intrinsic apoptosis as final mechanism of poor CD4 T cell recovery in virologically suppressed HIV-infected patients: clinical implications. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2010 May 1;50(9):1300–8.
21. Angin M, Kwon DS, Streeck H, Wen F, King M, Rezai A, et al. Preserved function of regulatory T cells in chronic HIV-1 infection despite decreased numbers in blood and tissue. J Infect Dis. 2012 May 15;205(10):1495–500.
22. Bi X, Suzuki Y, Gatanaga H, Oka S. High frequency and proliferation of CD4+ FOXP3+ Treg in HIV-1-infected patients with low CD4 counts. Eur J Immunol. 2009 Jan;39(1):301–9.
23. Lim A, Tan D, Price P, Kamarulzaman A, Tan H-Y, James I, et al. Proportions of circulating T cells with a regulatory cell phenotype increase with HIV-associated immune activation and remain high on antiretroviral therapy. AIDS Lond Engl. 2007 Jul 31;21(12):1525–34.
24. Tsunemi S, Iwasaki T, Imado T, Higasa S, Kakishita E, Shirasaka T, et al. Relationship of CD4+CD25+ regulatory T cells to immune status in HIV-infected patients. AIDS Lond Engl. 2005 Jun 10;19(9):879–86.
25. Gaardbo JC, Hartling HJ, Ronit A, Springborg K, Gjerdrum LMR, Ralfkiær E, et al. Regulatory T cells in HIV-infected immunological nonresponders are increased in blood but depleted in lymphoid tissue and predict immunological reconstitution. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2014 Aug 1;66(4):349–57.
26. Goicoechea M, Smith DM, Liu L, May S, Tenorio AR, Ignacio CC, et al. Determinants of CD4+ T cell recovery during suppressive antiretroviral therapy: association of immune activation, T cell maturation markers, and cellular HIV-1 DNA. J Infect Dis. 2006 Jul 1;194(1):29–37.
27. Gilson RJC, Man S-L, Copas A, Rider A, Forsyth S, Hill T, et al. Discordant responses on starting highly active antiretroviral therapy: suboptimal CD4 increases despite early viral suppression in the UK Collaborative HIV Cohort (UK CHIC) Study. HIV Med. 2010 Feb;11(2):152–60.
28. Erikstrup C, Kronborg G, Lohse N, Ostrowski SR, Gerstoft J, Ullum H. T-cell dysfunction in HIV-1-infected patients with impaired recovery of CD4 cells despite suppression of viral replication. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2010 Mar;53(3):303–10.
29. Pion M, Jaramillo-Ruiz D, Martínez A, Muñoz-Fernández MA, Correa-Rocha R. HIV infection of human regulatory T cells downregulates Foxp3 expression by increasing DNMT3b levels and DNA methylation in the FOXP3 gene. AIDS Lond Engl. 2013 Aug 24;27(13):2019–29.
30. Colombo MP, Piconese S. Regulatory-T-cell inhibition versus depletion: the right choice

in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer. 2007 Nov;7(11):880–7.
31. Needham DJ, Lee JX, Beilharz MW. Intra-tumoural regulatory T cells: a potential new target in cancer immunotherapy. Biochem Biophys Res Commun. 2006 May 12;343(3):684–91.
32. Moore RD, Keruly JC. CD4+ cell count 6 years after commencement of highly active antiretroviral therapy in persons with sustained virologic suppression. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2007 Feb 1;44(3):441–6.

Résultats complémentaires, non publiés :

Tableau 3 : Evolution of CD4+ T cells and Treg at Month 12 and Month 24, in the 58 HAART naive HIV-1 infected patients who achieved the two year follow up after HAART introduction. Statistical test used : Wilcoxon rank test. * p<0.001, compared with baseline; ** p=0.013, compared with Month 12; $ Treg absolut value and percentages were available at month 12 for 37 patients.

	At HAART introduction		At month 12		p	At month 24		p
CD4, cells/mm3 (IQR)	293	(161- 375)	500	(372- 581)	*	582	(447- 724)	*, **
Treg, cells/mm3 (IQR)	17.5	(12.2- 22)	30.3$	(25.3- 37.2)	*			
Treg, % of CD4 T cells (IQR)	6.1	(4.6- 8.78)	6.2$	(4.8- 7.5)	0.6			

DISCUSSION

I. SYNTHESE DES RESULTATS

A. Les marqueurs de réponse immune à la TARV : pourcentage de Treg et nadir de LT CD4

La récupération d'un taux normal de LT CD4 est un élément crucial de la prise en charge des patients infectés par le VIH.

A notre connaissance, nos travaux sont les premiers à montrer une association indépendante entre nadir des LT CD4, pourcentage de Treg, et reconstitution immune en LT CD4. Un rôle important des Treg dans la restauration du taux de LT CD4 sous TARV avait déjà été suggéré par d'autres auteurs (167)(251)(219)(172). Nous avons vu les associations controversées entre activation immune des LT CD4, LT CD8 et réponse immune. Seules 3 autres études se sont intéressées simultanément aux liens entre taux de LT CD4, activation immune, et Treg (219)(244)(251). Il n'existe aucune autre étude prospective analysant le rôle pronostique du nadir de LT CD4 et du pourcentage de Treg à l'introduction de la TARV sur la réponse immune.

Il a été montré que seulement 46% des patients qui avaient un taux de LT CD4 à l'introduction du traitement inférieur à 100/mm^3 récupéraient un taux de CD4 au dessus de 500/mm3, contre 75% et 95% pour ceux avec un taux de LT CD4 entre 100 et 200/mm3, et au dessus de 350/mm3, respectivement. (216). L'utilisation d'un marqueur prédictif complémentaire du nadir de LT CD4 est nécessaire, pour distinguer les patients à haut risque de NRI parmi ceux avec un nadir de LT CD4 bas. Nous montrons ici que l'impact pronostique du pourcentage de Treg est différent selon le nadir de LT CD4 du patient concerné : il est d'autant plus important que le nadir de LT CD4 est bas. Ce résultat est d'une importance majeure, et incite à utiliser le pourcentage de Treg à l'introduction du traitement chez les patients avec un nadir bas (<200/mm^3).

Du fait du rôle suppresseur des Treg en physiologie, il serait logique de penser que les Treg pourraient être associés au contrôle de l'activation immune qui peut persister chez les patients sous TARV. Or, nous avons retrouvé une association entre activation immune des LT CD4 (phénotype CD4+HLA-DR+) et le pourcentage de Treg, mais pas de lien entre activation immune des LT CD8 et pourcentage de Treg. Ceci est en accord avec les résultats de Méndes-lagares *et al.* dans une autre étude transversale (251).

Il semble donc exister des perturbations homéostasiques au sein de la population LT CD4 surtout, qui persistent après de nombreuses années de trithérapie efficace, faisant intervenir au moins les LT CD4 activés et les Treg, et impactant la restauration immunitaire. Ceci semble d'autant plus vrai que les pourcentages de Treg effecteurs et Treg effecteurs terminaux (sous populations jusqu'alors jamais étudiées dans ce contexte de réponse immune à la TARV), sont toutes augmentées de façon significative chez les patients non répondeurs immunologiques.

Peu d'études se sont intéressées aux liens entre activation immune lymphocytaire et virémie résiduelle. Nous n'avons pas non plus mis en évidence de lien entre la détection d'une virémie résiduelle détectable <40 cp/mL et le pourcentage de Treg, de LT CD4 ou CD8 activés. Ce résultat est en accord avec ceux d'Ostrowski *et al* (303). Cependant ils sont limités par le possible manque de puissance pour mettre en évidence un effet qui peut être minime (87 patients dans notre cas, 32 pour Ostrowski *et al*). Il a par contre été retrouvé un lien entre activation immune soluble (IL6 et CRP) et virémie résiduelle (304), mais une étude plus récente ne retrouve pas cette association (305). Il faut remarquer que la détection d'une virémie résiduelle sous TARV sur un seul prélèvement ne présage pas du caractère permanent ou intermittent de la virémie, comme nous avons pu l'observer dans un travail antérieur (306). Enfin, malgré leur utilisation par de nombreuses équipes pour étudier les virémies résiduelles (307)(308)(309), il faut souligner le manque de reproductibilité des techniques de routine pour détecter les virémies résiduelles en dessous du seuil de quantification (ici, 40 cp/mL)(310).

B. Réflexion sur la définition de la réponse immune à la TARV

Nous avons vu dans la revue bibliographique l'existence de nombreuses définitions de la NRI. Il était donc important d'utiliser des définitions adaptées à nos hypothèses et aux études que nous avons conduites. Le classement d'un patient dans un groupe NRI ou RI sur la base d'un taux de LT CD4 < ou > à 500/mm3 après 7 ans de trithérapie (étude 2) nous a paru être pertinente, car il s'agit d'une valeur seuil de LT CD4 à partir de laquelle il a été montré une normalisation de la morbi-mortalité, comparé à la population générale (11). Surtout, s'il a été montré la possibilité pour un patient traité de conserver une pente positive de récupération de LT CD4 dans les premières années de traitement, les données de la littérature sont en faveur d'une tendance à la stagnation de cette pente après 5 ans de trithérapie (10)(206)(207)(208)(209).

A l'inverse, il est probable que certains patients classés NRI dans les études évaluant la réponse immune sur la base d'une valeur seuil de LT CD4 dans les 2 premières années de traitement l'auraient été quelques mois ou année après. Les patients avec un taux très bas de LT CD4 (par ex. <200/mm^3) auront besoin d'une plus grande période de temps pour parvenir à une valeur cible de LT CD4 (par exemple 500/mm^3). De même, les pentes de récupération de LT CD4 sont différentes en fonction de la valeur de départ (plus importante initialement pour les patients les plus immunodéprimés), et en fonction du délais de mesure des LT CD4 par rapport à l'introduction de la TARV (pentes plus importantes dans les 4 premiers mois de traitement)(202). Pour ces raisons, nous avons choisis d'analyser les facteurs associés à la NRI dans les deux ans suivant l'introduction de la TARV en utilisant un modèle de régression non linéaire à effet mixte. Ceci nous a permis d'évaluer de façon prospective l'effet du pourcentage de Treg et du nadir de LT CD4, en utilisant toutes les valeurs de LT CD4 disponibles pour chacun des patients, sans risque d'erreur de classement d'un patient dans un groupe RI ou NRI.

C. Amélioration du phénotypage des Treg

Cet axe de travail a permis de montrer la robustesse et la reproductibilité du nouveau marquage intracellulaire de FoxP3 « en une étape », rendant l'utilisation du phénotype de référence CD4+CD25+FoxP3+ plus facile (article 1). Nous avons également mis en évidence un gain de temps (90 *vs* 200 min), une meilleure capacité de discrimination (probablement par diminution de l'activation cellulaire non spécifique induite antérieurement par les étapes successives de lavage et de perméabilisation), et une stabilité après une conservation 24h à température ambiante, ou bien à 4°C. La généralisation de cette technique devrait donc permettre de réaliser des études de plus grande envergure, avec donc une plus grande puissance statistique, et une plus grande homogénéité entre les études. L'utilisation d'un cytomètre Navios 3 lasers (Beckmann Coulter) permet de plus d'utiliser le marquage FoxP3 sur différentes sous populations lymphocytaires, à partir du même échantillon de sang frais périphérique, et dans le même tube à essais. Ceci permet de limiter les manipulations pour analyser les Treg effecteurs, les LT CD4 naïfs, les LT CD8 mémoires activés....Enfin, cette technique pourrait être généralisée à l'étude d'autres marqueurs intracellulaires comme CTLA-4, ou certains Toll-like récepteurs.

Parallèlement à la validation de cette technique, nous avons utilisé dans une étude prospective (article 4) un phénotype Treg « de substitution » : CD4+CD25++CD127-. En 2011, une étude espagnole avait montré que ce phénotype ne corrélait pas avec le phénotype CD4+CD25+FoxP3+, chez les sujets VIH virémiques (corrélation par contre retrouvée chez les patients avirémiques sous TARV). Ceci était une limitation importante à notre travail, car à l'inclusion dans l'étude les patients étaient non traités, et donc virémiques. Cependant d'autre auteurs ne retrouvaient pas cette perte de corrélation (125)(132). Les résultats de l'étude 3, présentés dans ce travail, sont effectivement en faveur de l'utilisation de ce phénotype pour étudier les Treg, chez les patients virémiques aussi bien que chez les non virémiques.

L'une des explications avancée par Del Pozo *et al*. est que l'utilisation du phénotype CD4+CD25+CD127- surestime les Treg du fait de la régulation négative du récepteur à l'IL-7 en cas d'activation immune (avec donc une diminution de l'expression du CD127 par les LT CD4 conventionnels « non Treg »)(311)(312). Ceci est effectivement une limitation théorique importante à l'utilisation de ce marquage, chez les patients les plus lymphopéniques,

présentant une importante activation immune et des dysfonctionnement majeurs de régulation de l'IL-7 et de son récepteur. Cependant, l'un des critères d'inclusion dans cette étude espagnole était un taux de LT CD4 >350/mm^3, alors que nous avons inclus des patients avec des taux de LT CD4 médian de 360/mm^3. Malgré l'inclusion de patients plus lymphopéniques, nous montrons une excellente corrélation entre les 2 phénotypes, chez les patients avirémiques comme attendu, mais également chez les patients virémiques, et ce malgré un très faible nombre de patients.

Un autre résultat surprenant de l'étude de Del-Pozo *et al* est l'augmentation significative de pourcentage de Treg CD4+CD25+FoxP3+ dans la population de patients avirémiques, par rapport à la population de patient virémique (4.9 vs 3.9, $p<0.05$), malgré des niveaux d'activation immune moins importants et une charge virale plus basse (ce qui est par contre bien attendu dans une population de patients sous TARV).

Une explication possible aux différences de résultats observés entre notre étude et celle-ci est le marquage des lymphocytes à partir de sang total, et non à partir de cellules périphériques mononuclées (PBMC), respectivement. Cependant, d'autres équipes retrouvent des résultats similaires aux nôtres, en ayant utilisé cette technique (125)(132).

Enfin, nous montrons également que malgré l'excellente corrélation observée entre les deux phénotypes, environ 10% des cellules CD4+CD25++CD127- n'expriment pas FoxP3 (résultats comparables entre les patients virémiques et les patients traités avirémiques). Ceci justifiait bien la mise au point et la validation d'une nouvelle technique de marquage de FoxP3 facilement utilisable en pratique quotidienne.

D. Evolution du pourcentage de Treg sous TARV

Dans l'étude prospective (étude 4), nous avons montré que le pourcentage médian de Treg ne diminuait pas après un an de TARV, alors qu'il était observé une augmentation significative de la valeur absolue (Tableau 3). Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres équipes (175)(156)(171).

II. LIMITES

Malgré les associations retrouvées entre la réponse immune à la TARV, le pourcentage de Treg, et l'expression des marqueurs d'activation lymphocytaire sur les LT CD4, le caractère observationnel de ces travaux ne permet pas de conclure sur des liens de causalité.

Un rôle physiopathologique propre des Treg chez les patients NRI et chez des patients RI devra être étudié, par exemple *ex-vivo*, en utilisant des test fonctionnels comme le niveau de production d'IL-2, d'interféron gamma, d'IL-7 ainsi que le niveau d'expression de CD127, en présence et en l'absence de Treg, dans chacune de ces 2 populations. Les mêmes réflexions pourront être menées en travaillant sur les différentes sous populations de Treg (naturels, induits, naïfs, activés, effecteurs ou terminaux effecteurs…) car il exercent probablement un rôle différent, et sont régulés par différentes voies de régulations homéostasiques (121)(103).

Malgré le fait que les études 3 et 4 soient, parmi les études actuellement publiées sur les Treg au cours de l'infection par le VIH traitée, celles ayant inclus le plus de patients, les effectifs étudiés restent faibles. Ceci limite la puissance statistique, et explique peut-être l'absence de résultats concernant l'impact de l'activation immune des LT CD8, ou de la virémie résiduelle, sur la NRI.

Enfin, il s'agit d'études monocentriques, toutes réalisées entre 2011 et 2013 sur Lyon, avec le risque de biais de recrutement inhérent à ce type d'étude.

III. OUVERTURES

A. Meilleur dépistage des personnes à risques de NRI : pour une meilleure prévention des risques liés à l'immunodépression

Nos résultats sont en faveur d'un effet délétère d'un pourcentage de Treg élevé et d'un nadir de LT CD4 bas sur la restauration des LT CD4. Nous montrons que cet effet des Treg est lié au nadir de LT CD4 : il est d'autant plus important que le nadir de LT CD4 est bas. La mesure du pourcentage de Treg est donc un outil simple et réalisable en routine quotidienne pour identifier, en association avec le nadir de LT CD4, les personnes les plus à risque de réponse immune discordante.

Ces patients pourraient ainsi être surveillés de façon plus rapprochée, et bénéficier de mesures renforcées de prévention de la morbi-mortalité. Les autres facteurs de NRI pourraient être particulièrement recherchés et pris en charge (inobservance, éviction des traitements myélotoxiques). Ces patients pourraient bénéficier de séances d'éducation thérapeutique plus rapprochées et systématiques, ou de consultations médicales plus fréquentes axées sur la prévention des risques liés à l'immunosuppression (proctologie, dermatologie, radiographies thoraciques...). Une information particulière sur les risques de l'immunodépression pourrait leur être délivrée, avec un renforcement des consignes hygiéno-diététiques (vaccinations, limiter les comptages infectieux..) ou un accompagnement plus actif pour l'arrêt du tabac Effectivement, la survenue de cancer est corrélée au degré d'immunodépression chez les personnes vivants avec le VIH (313), et les cancers sont la première cause de mortalité chez ces patients, au premier rang desquels se trouve le cancer du poumon (314).

Enfin, l'identification des personnes les plus à risque de NRI devrait permettre une meilleure sélection des patients à inclure dans les protocoles interventionnels d'immunostimulation et d'immunomodulation (315)(316)(317)(318)(319).

B. Perturbations homéostatiques des LT CD4 chez les NRI : vers une meilleure compréhension de la NRI, et le développement de traitement adaptés ?

En accord avec les données d'autres études, nous n'avons pas mis en évidence de lien entre NRI et activation des LT CD8, mais avec NRI et expression de HLA-DR par les LT CD4, après de nombreuses années de TARV (251)(250).

Hatano *et al* ont mis en évidence en 2013, chez des patients sous TARV, des associations entre fréquence des LT CD4 activés, expression de PD-1, et importance du réservoir viral (250). La persistance d'un environnement inflammatoire dans certains sites pourrait permettre la persistance et même l'accroissement progressif du réservoir viral, malgré une TARV « suppressive » (i.e. ARN plasmatique <40 cp/mL) (**Figure 20**). Ce mécanisme a même été proposé récemment, dans la revue « Science », comme étant probablement l'un des plus important pour expliquer la stabilité du réservoir (317).

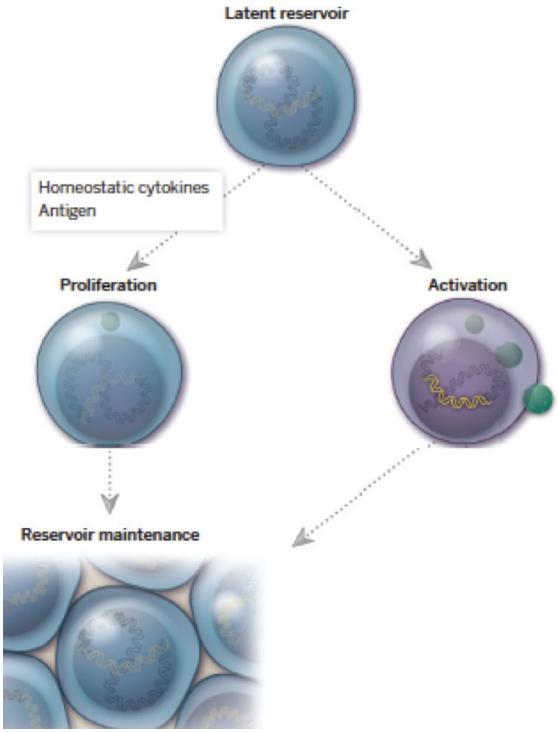


Figure 20. La prolifération et l'activation des lymphocytes T infectés de façon latente, médiées par un environnement cytokinique pro inflammatoire et les stimulations antigéniques, contribuent à la production de virus et au maintien du réservoir. Adapté de (317).

Cet état d'inflammation chronique pourrait entrainer la surexpression de mécanismes anti inflammatoires régulateurs, comme l'augmentation du pourcentage de Treg (en accord avec nos résultats, article 2) et conduire à la fibrose des organes lymphoïdes secondaires par augmentation de la sécrétion de TGF b et des dépôts de collagènes (177)(277). Il a été montré que ces désordres architecturaux pouvaient être inversement corrélé au taux de LT CD4 sous TARV (320)(321). Une meilleure compréhension de ces mécanismes permettrait le développement de thérapeutiques immunomodulatrices avec pour but la diminution du réservoir, mais également la diminution de l'activation immune et donc de l'immunosuppression induite (**Figure 21**).

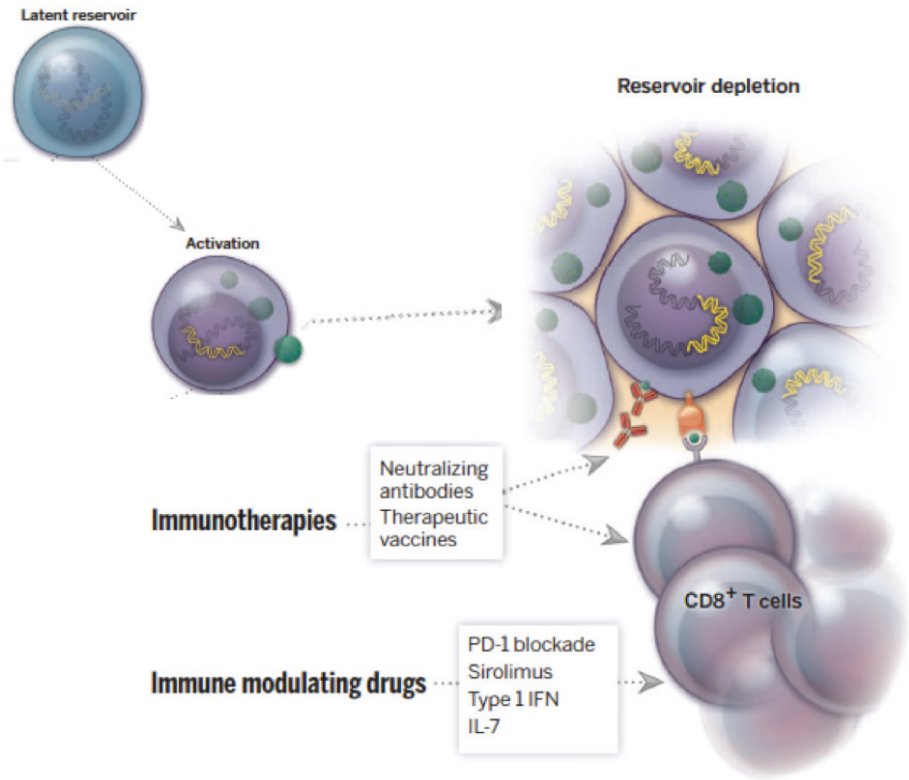


Figure 21. Les stratégies d'immunothérapie (anticorps neutralisants, vaccins thérapeutiques), et/ou d'immunomodulation (inhibition de PD-1, sirolimus…) permettraient de lutter contre l'activation des cellules infectés de façon latent, et donc de réduire la taille du réservoir. Adapté de (317).

C. Les Treg dans la réponse immune discordante : une cible thérapeutique ?

Si un rôle physiopathologique propre des Treg était mis en évidence, des thérapeutiques ciblées pourraient alors être développées, comme dans le cadre du cancer (322). L'administration d'IL-7 chez des patients infectés par le VIH a montré (en plus d'une augmentation dose dépendante du taux de LT CD4 chez les patients lymphopéniques, et d'une augmentation du répertoire lymphocytaire T)(315), une augmentation de la valeur absolue des Treg, mais la diminution de leur pourcentage (316)(323). De plus, l'IL-7 permettrait le contrôle du VIH (comme d'autres infections virales chroniques), en augmentant le nombre et la fonctionnalité des LT effecteurs (324). Cependant, il a été montré un dysfonctionnement dans le système de contrôle de l'homéostasie des LT CD4 impliquant l'IL-7, et le récepteur CD127/IL7Rα (210). Ceci fait remettre en question, au moins chez certains patients, l'intérêt de l'administration d'IL-7 en cas de NRI.

De plus, il faut souligner la diversité des sous populations de Treg, et leur différentes fonctionnalité et mécanismes de régulation homéostatique (103). Ces sous populations et leurs fonctionnalités respectives au cours de l'infection par le VIH ont été très peu étudiées. Par exemple, Younas *et al* ont montré, *in vitro*, que l'administration d'IL-7 pouvait réguler négativement fortement les activités suppressives des Treg mémoires, et beaucoup moins celles des Treg naïfs (325). Donc l'identification, et la caractérisation, des mécanismes cellulaires et moléculaires en jeu dans la différentiation/spécialisation des Treg sont nécessaires, pour pouvoir cibler de façon sélective l'une des sous populations, en particulier chez les patients non répondeurs immunologiques.

IV. PROJETS

Un suivi de la cohorte présentée dans l'étude 4 sera réalisé, afin de confirmer ces effets à plus long terme, et notamment d'évaluer si la mesure des Treg à l'introduction de la TARV peut être associée au risque de ne plus présenter à long terme une pente positive de récupération de LT CD4 (10). L'association du pourcentage de Treg à la survenue d'évènements cliniques cardio vasculaires, neurocognitifs (tests de dépistage en consultation) et néoplasiques pourra être étudié.

L'effet du pourcentage de Treg à l'introduction de la TARV sur la réponse immune sera étudié dans une seconde étude prospective, éventuellement multicentrique, incluant uniquement des patients avec des LT CD4<200/mm^3 (environ 40 par an sur Lyon). Plusieurs sous populations lymphocytaires T seront analysées à l'introduction du traitement. Nous prévoyons dans cette étude de nous intéresser aux facteurs cliniques, immunologiques (incluant les Treg) et virologiques prédictifs de la survenue d'un syndrome de restauration immune.

Enfin, nous souhaitons nous intéresser aux associations entre système immunitaire et vieillissement, du fait de l'augmentation de la moyenne d'âge de la population générale, et des patients VIH en particulier. En collaboration avec des équipes de gériatrie, nous comparerons, dans un premier temps de façon transversale, la survenue d'évènements cliniques (neuro cognitifs, cardiovasculaires, néoplasiques), radiologiques (IRM cérébrale, dopplers artériels et échographie cardiaque), et biologique (fonction rénale, hépatique), chez des patients infectés par le VIH, et des sujets âgés « sains », en fonction de l'âge, et de plusieurs autres paramètres, notamment immunologiques phénotypiques et éventuellement solubles.

CONCLUSION

Plus de 30 ans après la découverte du VIH, et malgré un arsenal thérapeutique large actuellement, entre 20 et 30% des patients sous TARV ne récupèrent pas un taux normal de LT CD4, ce qui est associé à une morbi-mortalité augmentée. Les causes de cette non réponse immunologique au traitement sont nombreuses et pas complètement élucidées.

Nous montrons dans ce travail que le pourcentage de Treg et le nadir de LT CD4 sont deux facteurs indépendants pronostiques de NRI. De plus, nous confirmons que les causes de NRI chez des patients traitées depuis de nombreuses années sont probablement dues à des anomalies homéostatiques au sein des LT CD4, faisant notamment intervenir l'activation de ces cellules, dont on sait qu'elles sont la cible principale du VIH, et les Treg.

Nous suggérons que la mesure du pourcentage de Treg à l'introduction du traitement pourrait être un outil simple et facilement utilisable en routine pour mieux cibler les patients à risque de NRI, en association avec la mesure du nadir des LT CD4. Ceci devrait permettre d'améliorer leur prise en charge, afin de prévenir efficacement les complications liées à l'immunodépression chronique, ou de les inclure de façon préférentielle dans des protocoles d'essai thérapeutique à visée d'immunostimulation. Le rôle pathogène propre des Treg et de leurs différents sous-types cellulaires chez les patients NRI restent à étudier. De la même façon, l'activation immune des LT CD4, les Treg, et le réservoir viral devront être étudiées, dans le sang périphérique mais également dans les sites « sanctuaires » du VIH, afin de mieux comprendre leurs associations avec la NRI, et pouvoir développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Un suivi de la cohorte permettra de confirmer ces résultats à plus long terme. D'autres études devront être conduites, en se focalisant sur les patients avec un nadir de LT CD4 bas, ainsi que chez des patients plus âgés, afin d'explorer les interactions entre immunosénescence, activation immune et Treg.

BIBLIOGRAPHIE

1. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. N Engl J Med. 1981 Dec 10;305(24):1425–31.

2. Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, Santiago ML, et al. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. Science. 2006 Jul 28;313(5786):523–6.

3. Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. N Engl J Med. 1993 Feb 4;328(5):327–35.

4. UNAIDSWHO. Report on the global AIDS epidemic. Report 2013. http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_Global_Report_2013_en_1.pdf;

5. Rosenberg ZF, Fauci AS. Immunopathogenesis of HIV infection. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. 1991 Jul;5(10):2382–90.

6. Hazenberg MD, Otto SA, van Benthem BHB, Roos MTL, Coutinho RA, Lange JMA, et al. Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. AIDS Lond Engl. 2003 Sep 5;17(13):1881–8.

7. Elahi S, Dinges WL, Lejarcegui N, Laing KJ, Collier AC, Koelle DM, et al. Protective HIV-specific CD8+ T cells evade Treg cell suppression. Nat Med. 2011 Aug;17(8):989–95.

8. Eggena MP, Barugahare B, Jones N, Okello M, Mutalya S, Kityo C, et al. Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. J Immunol Baltim Md 1950. 2005 Apr 1;174(7):4407–14.

9. Mocroft A, Vella S, Benfield TL, Chiesi A, Miller V, Gargalianos P, et al. Changing patterns of mortality across Europe in patients infected with HIV-1. EuroSIDA Study Group. Lancet. 1998 Nov 28;352(9142):1725–30.

10. Kaufmann GR, Perrin L, Pantaleo G, Opravil M, Furrer H, Telenti A, et al. CD4 T-lymphocyte recovery in individuals with advanced HIV-1 infection receiving potent antiretroviral therapy for 4 years: the Swiss HIV Cohort Study. Arch Intern Med. 2003 Oct 13;163(18):2187–95.

11. Lewden C, Chene G, Morlat P, Raffi F, Dupon M, Dellamonica P, et al. HIV-infected adults with a CD4 cell count greater than 500 cells/mm3 on long-term combination antiretroviral therapy reach same mortality rates as the general population. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2007 Sep 1;46(1):72–7.

12. Clerici M, Stocks NI, Zajac RA, Boswell RN, Lucey DR, Via CS, et al. Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human

immunodeficiency virus-seropositive patients. Independence of CD4+ cell numbers and clinical staging. J Clin Invest. 1989 Dec;84(6):1892–9.

13. Fahey JL, Prince H, Weaver M, Groopman J, Visscher B, Schwartz K, et al. Quantitative changes in T helper or T suppressor/cytotoxic lymphocyte subsets that distinguish acquired immune deficiency syndrome from other immune subset disorders. Am J Med. 1984 Jan;76(1):95–100.

14. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. Nature. 1995 Jan 12;373(6510):117–22.

15. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. Nature. 1995 Jan 12;373(6510):123–6.

16. Wolthers KC, Bea G, Wisman A, Otto SA, de Roda Husman AM, Schaft N, et al. T cell telomere length in HIV-1 infection: no evidence for increased CD4+ T cell turnover. Science. 1996 Nov 29;274(5292):1543–7.

17. Tissot O, Viard JP, Rabian C, Ngo N, Burgard M, Rouzioux C, et al. No evidence for proliferation in the blood CD4+ T-cell pool during HIV-1 infection and triple combination therapy. AIDS Lond Engl. 1998 May 28;12(8):879–84.

18. Sachsenberg N, Perelson AS, Yerly S, Schockmel GA, Leduc D, Hirschel B, et al. Turnover of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in HIV-1 infection as measured by Ki-67 antigen. J Exp Med. 1998 Apr 20;187(8):1295–303.

19. Wolthers KC, Schuitemaker H, Miedema F. Rapid CD4+ T-cell turnover in HIV-1 infection: a paradigm revisited. Immunol Today. 1998 Jan;19(1):44–8.

20. Haase AT. Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. Annu Rev Immunol. 1999;17:625–56.

21. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. Nature. 1998 Dec 17;396(6712):690–5.

22. Scadden DT, Zon LI, Groopman JE. Pathophysiology and management of HIV-associated hematologic disorders. Blood. 1989 Oct;74(5):1455–63.

23. Mbita Z, Hull R, Dlamini Z. Human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)-mediated apoptosis: new therapeutic targets. Viruses. 2014 Aug;6(8):3181–227.

24. Sharma JR, Dodgen C, Skepu A, Meyer M. Targeted destruction of HIV-positive cells. J Int AIDS Soc. 2014;17(4 Suppl 3):19707.

25. Gougeon ML, Laurent-Crawford AG, Hovanessian AG, Montagnier L. Direct and indirect mechanisms mediating apoptosis during HIV infection: contribution to in vivo CD4 T cell depletion. Semin Immunol. 1993 Jun;5(3):187–94.

26. Fauci AS. AIDS: immunopathogenic mechanisms and research strategies. Clin Res.

1987 Oct;35(6):503–10.

27. Kawamura T, Gulden FO, Sugaya M, McNamara DT, Borris DL, Lederman MM, et al. R5 HIV productively infects Langerhans cells, and infection levels are regulated by compound CCR5 polymorphisms. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jul 8;100(14):8401–6.

28. Meng G, Wei X, Wu X, Sellers MT, Decker JM, Moldoveanu Z, et al. Primary intestinal epithelial cells selectively transfer R5 HIV-1 to CCR5+ cells. Nat Med. 2002 Feb;8(2):150–6.

29. McKeating JA, Willey RL. Structure and function of the HIV envelope. AIDS Lond Engl. 1989;3 Suppl 1:S35–41.

30. Laurent-Crawford AG, Krust B, Rivière Y, Desgranges C, Muller S, Kieny MP, et al. Membrane expression of HIV envelope glycoproteins triggers apoptosis in CD4 cells. AIDS Res Hum Retroviruses. 1993 Aug;9(8):761–73.

31. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science. 1983 May 20;220(4599):868–71.

32. Walker BD, Plata F. Cytotoxic T lymphocytes against HIV. AIDS Lond Engl. 1990 Mar;4(3):177–84.

33. Savill J, Dransfield I, Hogg N, Haslett C. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. Nature. 1990 Jan 11;343(6254):170–3.

34. Fauci AS. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. Science. 1988 Feb 5;239(4840):617–22.

35. Jewett A, Cavalcanti M, Giorgi J, Bonavida B. Concomitant killing in vitro of both gp120-coated CD4+ peripheral T lymphocytes and natural killer cells in the antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) system. J Immunol Baltim Md 1950. 1997 Jun 1;158(11):5492–500.

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

37. Hellerstein MK, Hoh RA, Hanley MB, Cesar D, Lee D, Neese RA, et al. Subpopulations of long-lived and short-lived T cells in advanced HIV-1 infection. J Clin Invest. 2003 Sep;112(6):956–66.

38. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. Science. 1996 Mar 15;271(5255):1582–6.

39. Leng Q, Borkow G, Weisman Z, Stein M, Kalinkovich A, Bentwich Z. Immune activation correlates better than HIV plasma viral load with CD4 T-cell decline during HIV infection. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2001 Aug 1;27(4):389–97.

40. Herbeuval J-P, Grivel J-C, Boasso A, Hardy AW, Chougnet C, Dolan MJ, et al. CD4+ T-cell death induced by infectious and noninfectious HIV-1: role of type 1 interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis. Blood. 2005 Nov 15;106(10):3524–31.

41. Petit F, Corbeil J, Lelièvre JD, Moutouh-de Parseval L, Pinon G, Green DR, et al. Role of CD95-activated caspase-1 processing of IL-1beta in TCR-mediated proliferation of HIV-infected CD4(+) T cells. Eur J Immunol. 2001 Dec;31(12):3513–24.

42. Oyaizu N, Adachi Y, Hashimoto F, McCloskey TW, Hosaka N, Kayagaki N, et al. Monocytes express Fas ligand upon CD4 cross-linking and induce CD4+ T cells apoptosis: a possible mechanism of bystander cell death in HIV infection. J Immunol Baltim Md 1950. 1997 Mar 1;158(5):2456–63.

43. Hansjee N, Kaufmann GR, Strub C, Weber R, Battegay M, Erb P, et al. Persistent apoptosis in HIV-1-infected individuals receiving potent antiretroviral therapy is associated with poor recovery of CD4 T lymphocytes. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2004 Jun 1;36(2):671–7.

44. Silvestri G, Paiardini M, Pandrea I, Lederman MM, Sodora DL. Understanding the benign nature of SIV infection in natural hosts. J Clin Invest. 2007 Nov;117(11):3148–54.

45. Harris LD, Tabb B, Sodora DL, Paiardini M, Klatt NR, Douek DC, et al. Downregulation of robust acute type I interferon responses distinguishes nonpathogenic simian immunodeficiency virus (SIV) infection of natural hosts from pathogenic SIV infection of rhesus macaques. J Virol. 2010 Aug;84(15):7886–91.

46. Hazenberg MD, Stuart JW, Otto SA, Borleffs JC, Boucher CA, de Boer RJ, et al. T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: a longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). Blood. 2000 Jan 1;95(1):249–55.

47. Bentwich Z, Kalinkovich A, Weisman Z, Grossman Z. Immune activation in the context of HIV infection. Clin Exp Immunol. 1998 Jan;111(1):1–2.

48. Vanham G, Kestens L, Penne G, Goilav C, Gigase P, Colebunders R, et al. Subset markers of CD8(+) cells and their relation to enhanced cytotoxic T-cell activity during human immunodeficiency virus infection. J Clin Immunol. 1991 Nov;11(6):345–56.

49. Mahalingam M, Peakman M, Davies ET, Pozniak A, McManus TJ, Vergani D. T cell activation and disease severity in HIV infection. Clin Exp Immunol. 1993 Sep;93(3):337–43.

50. Peakman M, Mahalingam M, Pozniak A, McManus TJ, Phillips AN, Vergani D. Markers of immune cell activation and disease progression. Cell activation in HIV disease. Adv Exp Med Biol. 1995;374:17–26.

51. Landay AL, Mackewicz CE, Levy JA. An activated CD8+ T cell phenotype correlates with anti-HIV activity and asymptomatic clinical status. Clin Immunol Immunopathol. 1993 Oct;69(1):106–16.

52. Benito JM, Zabay JM, Gil J, Bermejo M, Escudero A, Sánchez E, et al. Quantitative

alterations of the functionally distinct subsets of CD4 and CD8 T lymphocytes in asymptomatic HIV infection: changes in the expression of CD45RO, CD45RA, CD11b, CD38, HLA-DR, and CD25 antigens. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirology Off Publ Int Retrovirology Assoc. 1997 Feb 1;14(2):128–35.

53. Roederer M. Getting to the HAART of T cell dynamics. Nat Med. 1998 Feb;4(2):145–6.

54. Autran B, Carcelain G, Li TS, Blanc C, Mathez D, Tubiana R, et al. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. Science. 1997 Jul 4;277(5322):112–6.

55. Roederer M, Dubs JG, Anderson MT, Raju PA, Herzenberg LA, Herzenberg LA. CD8 naive T cell counts decrease progressively in HIV-infected adults. J Clin Invest. 1995 May;95(5):2061–6.

56. Gorochov G, Neumann AU, Kereveur A, Parizot C, Li T, Katlama C, et al. Perturbation of CD4+ and CD8+ T-cell repertoires during progression to AIDS and regulation of the CD4+ repertoire during antiviral therapy. Nat Med. 1998 Feb;4(2):215–21.

57. Palmer LD, Weng N, Levine BL, June CH, Lane HC, Hodes RJ. Telomere length, telomerase activity, and replicative potential in HIV infection: analysis of CD4+ and CD8+ T cells from HIV-discordant monozygotic twins. J Exp Med. 1997 Apr 7;185(7):1381–6.

58. Harris PJ, Candeloro PD, Bunn JE. HIV infection of the adult thymus: an even more conventional theory explaining CD4 cell decrease and CD8 cell increase in AIDS. Med Hypotheses. 1991 Dec;36(4):379–80.

59. Prince HE, Jensen ER. Three-color cytofluorometric analysis of CD8 cell subsets in HIV-1 infection. J Acquir Immune Defic Syndr. 1991;4(12):1227–32.

60. Giorgi JV, Detels R. T-cell subset alterations in HIV-infected homosexual men: NIAID Multicenter AIDS cohort study. Clin Immunol Immunopathol. 1989 Jul;52(1):10–8.

61. Fahey JL, Taylor JM, Manna B, Nishanian P, Aziz N, Giorgi JV, et al. Prognostic significance of plasma markers of immune activation, HIV viral load and CD4 T-cell measurements. AIDS Lond Engl. 1998 Sep 10;12(13):1581–90.

62. Messele T, Brouwer M, Girma M, Fontanet AL, Miedema F, Hamann D, et al. Plasma levels of viro-immunological markers in HIV-infected and non-infected Ethiopians: correlation with cell surface activation markers. Clin Immunol Orlando Fla. 2001 Feb;98(2):212–9.

63. Zangerle R, Steinhuber S, Sarcletti M, Dierich MP, Wachter H, Fuchs D, et al. Serum HIV-1 RNA levels compared to soluble markers of immune activation to predict disease progression in HIV-1-infected individuals. Int Arch Allergy Immunol. 1998 Jul;116(3):228–39.

64. Van Noesel CJ, Gruters RA, Terpstra FG, Schellekens PT, van Lier RA, Miedema F. Functional and phenotypic evidence for a selective loss of memory T cells in asymptomatic human immunodeficiency virus-infected men. J Clin Invest. 1990

Jul;86(1):293–9.

65. Ascher MS, Sheppard HW. AIDS as immune system activation: a model for pathogenesis. Clin Exp Immunol. 1988 Aug;73(2):165–7.

66. Ascher MS, Sheppard HW. AIDS as immune system activation. II. The panergic imnesia hypothesis. J Acquir Immune Defic Syndr. 1990;3(2):177–91.

67. Zagury D, Bernard J, Leonard R, Cheynier R, Feldman M, Sarin PS, et al. Long-term cultures of HTLV-III--infected T cells: a model of cytopathology of T-cell depletion in AIDS. Science. 1986 Feb 21;231(4740):850–3.

68. Fauci AS. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. Science. 1993 Nov 12;262(5136):1011–8.

69. Stebbing J, Gazzard B, Douek DC. Where does HIV live? N Engl J Med. 2004 Apr 29;350(18):1872–80.

70. Deeks SG, Kitchen CMR, Liu L, Guo H, Gascon R, Narváez AB, et al. Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. Blood. 2004 Aug 15;104(4):942–7.

71. Somsouk M, Estes JD, Deleage C, Dunham RM, Albright R, Inadomi JM, et al. Gut epithelial barrier and systemic inflammation during chronic HIV infection. AIDS Lond Engl. 2015 Jan 2;29(1):43–51.

72. Mutlu EA, Keshavarzian A, Losurdo J, Swanson G, Siewe B, Forsyth C, et al. A compositional look at the human gastrointestinal microbiome and immune activation parameters in HIV infected subjects. PLoS Pathog. 2014 Feb;10(2):e1003829.

73. Assimakopoulos SF, Dimitropoulou D, Marangos M, Gogos CA. Intestinal barrier dysfunction in HIV infection: pathophysiology, clinical implications and potential therapies. Infection. 2014 Dec;42(6):951–9.

74. Alpdogan O, van den Brink MRM. IL-7 and IL-15: therapeutic cytokines for immunodeficiency. Trends Immunol. 2005 Jan;26(1):56–64.

75. Fry TJ, Mackall CL. Interleukin-7 and immunorestoration in HIV: beyond the thymus. J Hematother Stem Cell Res. 2002 Oct;11(5):803–7.

76. Mazzucchelli R, Durum SK. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. Nat Rev Immunol. 2007 Feb;7(2):144–54.

77. Boyman O, Purton JF, Surh CD, Sprent J. Cytokines and T-cell homeostasis. Curr Opin Immunol. 2007 Jun;19(3):320–6.

78. Bradley LM, Haynes L, Swain SL. IL-7: maintaining T-cell memory and achieving homeostasis. Trends Immunol. 2005 Mar;26(3):172–6.

79. Beq S, Delfraissy J-F, Theze J. Interleukin-7 (IL-7): immune function, involvement in the pathogenesis of HIV infection and therapeutic potential. Eur Cytokine Netw. 2004 Dec;15(4):279–89.

80. Napolitano LA, Grant RM, Deeks SG, Schmidt D, De Rosa SC, Herzenberg LA, et al. Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. Nat Med. 2001 Jan;7(1):73–9.

81. Zubkova I, Mostowski H, Zaitseva M. Up-regulation of IL-7, stromal-derived factor-1 alpha, thymus-expressed chemokine, and secondary lymphoid tissue chemokine gene expression in the stromal cells in response to thymocyte depletion: implication for thymus reconstitution. J Immunol Baltim Md 1950. 2005 Aug 15;175(4):2321–30.

82. Jiang Q, Li WQ, Hofmeister RR, Young HA, Hodge DR, Keller JR, et al. Distinct regions of the interleukin-7 receptor regulate different Bcl2 family members. Mol Cell Biol. 2004 Jul;24(14):6501–13.

83. Albuquerque AS, Cortesão CS, Foxall RB, Soares RS, Victorino RMM, Sousa AE. Rate of increase in circulating IL-7 and loss of IL-7Ralpha expression differ in HIV-1 and HIV-2 infections: two lymphopenic diseases with similar hyperimmune activation but distinct outcomes. J Immunol Baltim Md 1950. 2007 Mar 1;178(5):3252–9.

84. Fluur C, Rethi B, Thang PH, Vivar N, Mowafi F, Lopalco L, et al. Relationship between serum IL-7 concentrations and lymphopenia upon different levels of HIV immune control. AIDS Lond Engl. 2007 May 11;21(8):1048–50.

85. Malaspina A, Moir S, Ho J, Wang W, Howell ML, O'Shea MA, et al. Appearance of immature/transitional B cells in HIV-infected individuals with advanced disease: correlation with increased IL-7. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Feb 14;103(7):2262–7.

86. Lelièvre JD, Lévy Y. Perspectives on interleukin-7 therapy in HIV infection. Curr Opin HIV AIDS. 2007 May;2(3):228–33.

87. Jiang Q, Li WQ, Aiello FB, Mazzucchelli R, Asefa B, Khaled AR, et al. Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. Cytokine Growth Factor Rev. 2005 Oct;16(4-5):513–33.

88. Alves NL, van Leeuwen EMM, Derks IAM, van Lier RAW. Differential regulation of human IL-7 receptor alpha expression by IL-7 and TCR signaling. J Immunol Baltim Md 1950. 2008 Apr 15;180(8):5201–10.

89. Park J-H, Yu Q, Erman B, Appelbaum JS, Montoya-Durango D, Grimes HL, et al. Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival. Immunity. 2004 Aug;21(2):289–302.

90. Bani L, Pasquier V, Kryworuchko M, Salamero J, Thèze J. Unstimulated human CD4 lymphocytes express a cytoplasmic immature form of the common cytokine receptor gamma-chain. J Immunol Baltim Md 1950. 2001 Jul 1;167(1):344–9.

91. Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, Lefrançois L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. Nat Immunol. 2000 Nov;1(5):426–32.

92. Jourdan P, Vendrell JP, Huguet MF, Segondy M, Bousquet J, Pène J, et al. Cytokines and cell surface molecules independently induce CXCR4 expression on CD4+ CCR7+

human memory T cells. J Immunol Baltim Md 1950. 2000 Jul 15;165(2):716–24.

93. Schmitt N, Chêne L, Boutolleau D, Nugeyre M-T, Guillemard E, Versmisse P, et al. Positive regulation of CXCR4 expression and signaling by interleukin-7 in CD4+ mature thymocytes correlates with their capacity to favor human immunodeficiency X4 virus replication. J Virol. 2003 May;77(10):5784–93.

94. Zambrano-Zaragoza JF, Romo-Martínez EJ, Durán-Avelar M de J, García-Magallanes N, Vibanco-Pérez N. Th17 cells in autoimmune and infectious diseases. Int J Inflamm. 2014;2014:651503.

95. Bouchery T, Kyle R, Ronchese F, Le Gros G. The Differentiation of CD4(+) T-Helper Cell Subsets in the Context of Helminth Parasite Infection. Front Immunol. 2014;5:487.

96. Prezzemolo T, Guggino G, La Manna MP, Di Liberto D, Dieli F, Caccamo N. Functional Signatures of Human CD4 and CD8 T Cell Responses to Mycobacterium tuberculosis. Front Immunol. 2014;5:180.

97. Brodsky IE, Medzhitov R. Targeting of immune signalling networks by bacterial pathogens. Nat Cell Biol. 2009 May;11(5):521–6.

98. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. Nature. 2007 Oct 18;449(7164):819–26.

99. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. J Immunol Baltim Md 1950. 2001 Aug 1;167(3):1245–53.

100. Malek TR. The biology of interleukin-2. Annu Rev Immunol. 2008;26:453–79.

101. Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. J Exp Med. 2005 Mar 7;201(5):723–35.

102. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. Nat Immunol. 2005 Nov;6(11):1142–51.

103. Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. Nat Rev Immunol. 2011 Feb;11(2):119–30.

104. Liu G, Burns S, Huang G, Boyd K, Proia RL, Flavell RA, et al. The receptor S1P1 overrides regulatory T cell-mediated immune suppression through Akt-mTOR. Nat Immunol. 2009 Jul;10(7):769–77.

105. Bollyky PL, Falk BA, Wu RP, Buckner JH, Wight TN, Nepom GT. Intact extracellular matrix and the maintenance of immune tolerance: high molecular weight hyaluronan promotes persistence of induced CD4+CD25+ regulatory T cells. J Leukoc Biol. 2009 Sep;86(3):567–72.

106. Davidson TS, DiPaolo RJ, Andersson J, Shevach EM. Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. J Immunol Baltim Md 1950. 2007 Apr 1;178(7):4022–6.

107. Izcue A, Hue S, Buonocore S, Arancibia-Cárcamo CV, Ahern PP, Iwakura Y, et al. Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis. Immunity. 2008 Apr;28(4):559–70.

108. Cobbold SP, Castejon R, Adams E, Zelenika D, Graca L, Humm S, et al. Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. J Immunol Baltim Md 1950. 2004 May 15;172(10):6003–10.

109. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. J Exp Med. 2006 Jul 10;203(7):1701–11.

110. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. J Exp Med. 2006 Jul 10;203(7):1693–700.

111. Bayer AL, Lee JY, de la Barrera A, Surh CD, Malek TR. A function for IL-7R for CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells. J Immunol Baltim Md 1950. 2008 Jul 1;181(1):225–34.

112. Josefowicz SZ, Rudensky A. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. Immunity. 2009 May;30(5):616–25.

113. Mazzucchelli R, Hixon JA, Spolski R, Chen X, Li WQ, Hall VL, et al. Development of regulatory T cells requires IL-7Ralpha stimulation by IL-7 or TSLP. Blood. 2008 Oct 15;112(8):3283–92.

114. Yuan X, Cheng G, Malek TR. The importance of regulatory T-cell heterogeneity in maintaining self-tolerance. Immunol Rev. 2014 May;259(1):103–14.

115. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. Annu Rev Immunol. 2004;22:531–62.

116. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. Nat Immunol. 2010 Jan;11(1):7–13.

117. Lahl K, Loddenkemper C, Drouin C, Freyer J, Arnason J, Eberl G, et al. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. J Exp Med. 2007 Jan 22;204(1):57–63.

118. Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. Nat Immunol. 2007 Feb;8(2):191–7.

119. Haribhai D, Lin W, Relland LM, Truong N, Williams CB, Chatila TA. Regulatory T cells dynamically control the primary immune response to foreign antigen. J Immunol Baltim Md 1950. 2007 Mar 1;178(5):2961–72.

120. Losikoff PT, Self AA, Gregory SH. Dendritic cells, regulatory T cells and the pathogenesis of chronic hepatitis C. Virulence. 2012 Nov 15;3(7):610–20.

121. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. Nat Rev Immunol. 2010 Jul;10(7):490–500.

122. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol Baltim Md 1950. 1995 Aug 1;155(3):1151–64.

123. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Nat Immunol. 2003 Apr;4(4):330–6.

124. Venet F, Chung C-S, Kherouf H, Geeraert A, Malcus C, Poitevin F, et al. Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25 (+)CD127 (-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. Intensive Care Med. 2009 Apr;35(4):678–86.

125. Montes M, Sanchez C, Lewis DE, Graviss EA, Seas C, Gotuzzo E, et al. Normalization of FoxP3(+) regulatory T cells in response to effective antiretroviral therapy. J Infect Dis. 2011 Feb 15;203(4):496–9.

126. Gaardbo JC, Hartling HJ, Ronit A, Springborg K, Gjerdrum LMR, Ralfkiær E, et al. Regulatory T cells in HIV-infected immunological nonresponders are increased in blood but depleted in lymphoid tissue and predict immunological reconstitution. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2014 Aug 1;66(4):349–57.

127. Jago CB, Yates J, Câmara NOS, Lechler RI, Lombardi G. Differential expression of CTLA-4 among T cell subsets. Clin Exp Immunol. 2004 Jun;136(3):463–71.

128. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science. 2003 Feb 14;299(5609):1057–61.

129. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, et al. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. Int Immunol. 2007 Apr;19(4):345–54.

130. Walker MR, Kasprowicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. J Clin Invest. 2003 Nov;112(9):1437–43.

131. Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, Huehn J, Floess S, Wieczorek G, et al. Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation. Eur J Immunol. 2009 Apr;39(4):1088–97.

132. Schulze Zur Wiesch J, Thomssen A, Hartjen P, Tóth I, Lehmann C, Meyer-Olson D, et al. Comprehensive analysis of frequency and phenotype of T regulatory cells in HIV infection: CD39 expression of FoxP3+ T regulatory cells correlates with progressive disease. J Virol. 2011 Feb;85(3):1287–97.

133. Del Pozo-Balado MDM, Leal M, Méndez-Lagares G, Pacheco YM. CD4(+)CD25(+/hi)CD127(lo) phenotype does not accurately identify regulatory T cells in all populations of HIV-infected persons. J Infect Dis. 2010 Feb 1;201(3):331–5.

134. Read S, Malmström V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. J Exp Med. 2000 Jul 17;192(2):295–302.

135. Fisson S, Darrasse-Jèze G, Litvinova E, Septier F, Klatzmann D, Liblau R, et al. Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state. J Exp Med. 2003 Sep 1;198(5):737–46.

136. Sather BD, Treuting P, Perdue N, Miazgowicz M, Fontenot JD, Rudensky AY, et al. Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. J Exp Med. 2007 Jun 11;204(6):1335–47.

137. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. Nat Immunol. 2002 Feb;3(2):135–42.

138. Tran DQ, Andersson J, Wang R, Ramsey H, Unutmaz D, Shevach EM. GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Aug 11;106(32):13445–50.

139. Holmes D, Jiang Q, Zhang L, Su L. Foxp3 and Treg cells in HIV-1 infection and immuno-pathogenesis. Immunol Res. 2008;41(3):248–66.

140. Nascimento DC, Alves-Filho JC, Sônego F, Fukada SY, Pereira MS, Benjamim C, et al. Role of regulatory T cells in long-term immune dysfunction associated with severe sepsis. Crit Care Med. 2010 Aug;38(8):1718–25.

141. Chen X, Zhou B, Li M, Deng Q, Wu X, Le X, et al. CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. Clin Immunol Orlando Fla. 2007 Apr;123(1):50–9.

142. He X-Y, Xiao L, Chen H-B, Hao J, Li J, Wang Y-J, et al. T regulatory cells and Th1/Th2 cytokines in peripheral blood from tuberculosis patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. 2010 Jun;29(6):643–50.

143. Palermo ML, Pagliari C, Trindade MAB, Yamashitafuji TM, Duarte AJS, Cacere CR, et al. Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy. Am J Trop Med Hyg. 2012 May;86(5):878–83.

144. Saini C, Ramesh V, Nath I. Increase in TGF-β secreting $CD4^{+}CD25^{+}$ $FOXP3^{+}$ T regulatory cells in anergic lepromatous leprosy patients. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(1):e2639.

145. Bobosha K, Wilson L, van Meijgaarden KE, Bekele Y, Zewdie M, van der Ploeg-van Schip JJ, et al. T-cell regulation in lepromatous leprosy. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Apr;8(4):e2773.

146. Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C, et al. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. Hepatol Baltim Md. 2004 Nov;40(5):1062–71.

147. Li S, Floess S, Hamann A, Gaudieri S, Lucas A, Hellard M, et al. Analysis of FOXP3+ regulatory T cells that display apparent viral antigen specificity during chronic hepatitis C virus infection. PLoS Pathog. 2009 Dec;5(12):e1000707.

148. Langhans B, Braunschweiger I, Arndt S, Schulte W, Satoguina J, Layland LE, et al. Core-specific adaptive regulatory T-cells in different outcomes of hepatitis C. Clin Sci Lond Engl 1979. 2010 Jul;119(2):97–109.

149. Smyk-Pearson S, Golden-Mason L, Klarquist J, Burton JR, Tester IA, Wang CC, et al. Functional suppression by FoxP3+CD4+CD25(high) regulatory T cells during acute hepatitis C virus infection. J Infect Dis. 2008 Jan 1;197(1):46–57.

150. Heeg MHJ, Ulsenheimer A, Grüner NH, Zachoval R, Jung M-C, Gerlach JT, et al. FOXP3 expression in hepatitis C virus-specific CD4+ T cells during acute hepatitis C. Gastroenterology. 2009 Oct;137(4):1280–8.e1–6.

151. Aalaei-Andabili SH, Alavian SM. Regulatory T cells are the most important determinant factor of hepatitis B infection prognosis: a systematic review and meta-analysis. Vaccine. 2012 Aug 17;30(38):5595–602.

152. Lund JM, Hsing L, Pham TT, Rudensky AY. Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells. Science. 2008 May 30;320(5880):1220–4.

153. Lanteri MC, O'Brien KM, Purtha WE, Cameron MJ, Lund JM, Owen RE, et al. Tregs control the development of symptomatic West Nile virus infection in humans and mice. J Clin Invest. 2009 Nov;119(11):3266–77.

154. Lühn K, Simmons CP, Moran E, Dung NTP, Chau TNB, Quyen NTH, et al. Increased frequencies of CD4+ CD25(high) regulatory T cells in acute dengue infection. J Exp Med. 2007 May 14;204(5):979–85.

155. Chevalier MF, Weiss L. The split personality of regulatory T cells in HIV infection. Blood. 2013 Jan 3;121(1):29–37.

156. Angin M, Kwon DS, Streeck H, Wen F, King M, Rezai A, et al. Preserved function of regulatory T cells in chronic HIV-1 infection despite decreased numbers in blood and tissue. J Infect Dis. 2012 May 15;205(10):1495–500.

157. Becker C, Taube C, Bopp T, Becker C, Michel K, Kubach J, et al. Protection from graft-versus-host disease by HIV-1 envelope protein gp120-mediated activation of human CD4+CD25+ regulatory T cells. Blood. 2009 Aug 6;114(6):1263–9.

158. Moreno-Fernandez ME, Zapata W, Blackard JT, Franchini G, Chougnet CA. Human regulatory T cells are targets for human immunodeficiency Virus (HIV) infection, and their susceptibility differs depending on the HIV type 1 strain. J Virol. 2009 Dec;83(24):12925–33.

159. Thorborn GS, Pomeroy L, Ishohanni H, Peters BS, Vyakarnam A. Elevated effector cell sensitivity to Treg-cell suppression that is not associated with reduced Th17-cell expression distinguishes HIV+ asymptomatic subjects from progressors. Eur J Immunol. 2012 Jan;42(1):138–46.

160. Weiss L, Donkova-Petrini V, Caccavelli L, Balbo M, Carbonneil C, Levy Y. Human immunodeficiency virus-driven expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells, which suppress HIV-specific CD4 T-cell responses in HIV-infected patients. Blood. 2004

Nov 15;104(10):3249–56.

161. Shaw JM, Hunt PW, Critchfield JW, McConnell DH, Garcia JC, Pollard RB, et al. Increased frequency of regulatory T cells accompanies increased immune activation in rectal mucosae of HIV-positive noncontrollers. J Virol. 2011 Nov;85(21):11422–34.

162. Kinter A, McNally J, Riggin L, Jackson R, Roby G, Fauci AS. Suppression of HIV-specific T cell activity by lymph node CD25+ regulatory T cells from HIV-infected individuals. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Feb 27;104(9):3390–5.

163. Kinter AL, Hennessey M, Bell A, Kern S, Lin Y, Daucher M, et al. CD25(+)CD4(+) regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4(+) and CD8(+) HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status. J Exp Med. 2004 Aug 2;200(3):331–43.

164. Aandahl EM, Michaëlsson J, Moretto WJ, Hecht FM, Nixon DF. Human CD4+ CD25+ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. J Virol. 2004 Mar;78(5):2454–9.

165. Suchard MS, Mayne E, Green VA, Shalekoff S, Donninger SL, Stevens WS, et al. FOXP3 expression is upregulated in CD4T cells in progressive HIV-1 infection and is a marker of disease severity. PloS One. 2010;5(7):e11762.

166. Nilsson J, Boasso A, Velilla PA, Zhang R, Vaccari M, Franchini G, et al. HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS. Blood. 2006 Dec 1;108(12):3808–17.

167. Horta A, Nobrega C, Amorim-Machado P, Coutinho-Teixeira V, Barreira-Silva P, Boavida S, et al. Poor immune reconstitution in HIV-infected patients associates with high percentage of regulatory CD4+ T cells. PloS One. 2013;8(2):e57336.

168. Montes M, Lewis DE, Sanchez C, Lopez de Castilla D, Graviss EA, Seas C, et al. Foxp3+ regulatory T cells in antiretroviral-naive HIV patients. AIDS Lond Engl. 2006 Aug 1;20(12):1669–71.

169. Bi X, Suzuki Y, Gatanaga H, Oka S. High frequency and proliferation of CD4+ FOXP3+ Treg in HIV-1-infected patients with low CD4 counts. Eur J Immunol. 2009 Jan;39(1):301–9.

170. Tsunemi S, Iwasaki T, Imado T, Higasa S, Kakishita E, Shirasaka T, et al. Relationship of CD4+CD25+ regulatory T cells to immune status in HIV-infected patients. AIDS Lond Engl. 2005 Jun 10;19(9):879–86.

171. Lim A, Tan D, Price P, Kamarulzaman A, Tan H-Y, James I, et al. Proportions of circulating T cells with a regulatory cell phenotype increase with HIV-associated immune activation and remain high on antiretroviral therapy. AIDS Lond Engl. 2007 Jul 31;21(12):1525–34.

172. Foxall RB, Albuquerque AS, Soares RS, Baptista AP, Cavaleiro R, Tendeiro R, et al. Memory and naive-like regulatory CD4+ T cells expand during HIV-2 infection in direct association with CD4+ T-cell depletion irrespectively of viremia. AIDS Lond

Engl. 2011 Oct 23;25(16):1961–70.

173. Card CM, McLaren PJ, Wachihi C, Kimani J, Plummer FA, Fowke KR. Decreased immune activation in resistance to HIV-1 infection is associated with an elevated frequency of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells. J Infect Dis. 2009 May 1;199(9):1318–22.

174. Card CM, Keynan Y, Lajoie J, Bell CP, Dawood M, Becker M, et al. HIV controllers are distinguished by chemokine expression profile and HIV-specific T-cell proliferative potential. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2012 Apr 15;59(5):427–37.

175. Gaardbo JC, Nielsen SD, Vedel SJ, Ersbøll AK, Harritshøj L, Ryder LP, et al. Regulatory T cells in human immunodeficiency virus-infected patients are elevated and independent of immunological and virological status, as well as initiation of highly active anti-retroviral therapy. Clin Exp Immunol. 2008 Oct;154(1):80–6.

176. Carrington M, O'Brien SJ. The influence of HLA genotype on AIDS. Annu Rev Med. 2003;54:535–51.

177. Estes JD, Wietgrefe S, Schacker T, Southern P, Beilman G, Reilly C, et al. 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. 2007 Feb 15;195(4):551–61.

178. Juffroy O, Bugault F, Lambotte O, Landires I, Viard J-P, Niel L, et al. Dual mechanism of impairment of interleukin-7 (IL-7) responses in human immunodeficiency virus infection: decreased IL-7 binding and abnormal activation of the JAK/STAT5 pathway. J Virol. 2010 Jan;84(1):96–108.

179. Li S, Gowans EJ, Chougnet C, Plebanski M, Dittmer U. Natural regulatory T cells and persistent viral infection. J Virol. 2008 Jan;82(1):21–30.

180. Méndez-Lagares G, Jaramillo-Ruiz D, Pion M, Leal M, Muñoz-Fernández MA, Pacheco YM, et al. HIV infection deregulates the balance between regulatory T cells and IL-2-producing CD4 T cells by decreasing the expression of the IL-2 receptor in Treg. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2014 Mar 1;65(3):278–82.

181. Gaardbo JC, Ronit A, Hartling HJ, Gjerdrum LMR, Springborg K, Ralfkiær E, et al. Immunoregulatory T cells may be involved in preserving CD4 T cell counts in HIV-infected long-term nonprogressors and controllers. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2014 Jan 1;65(1):10–8.

182. Antons AK, Wang R, Oswald-Richter K, Tseng M, Arendt CW, Kalams SA, et al. Naive precursors of human regulatory T cells require FoxP3 for suppression and are susceptible to HIV infection. J Immunol Baltim Md 1950. 2008 Jan 15;180(2):764–73.

183. Oswald-Richter K, Grill SM, Shariat N, Leelawong M, Sundrud MS, Haas DW, et al. HIV infection of naturally occurring and genetically reprogrammed human regulatory T-cells. PLoS Biol. 2004 Jul;2(7):E198.

184. Zaunders JJ, Ip S, Munier ML, Kaufmann DE, Suzuki K, Brereton C, et al. Infection of CD127+ (interleukin-7 receptor+) CD4+ cells and overexpression of CTLA-4 are

linked to loss of antigen-specific CD4 T cells during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. J Virol. 2006 Oct;80(20):10162–72.

185. Weiss L, Piketty C, Assoumou L, Didier C, Caccavelli L, Donkova-Petrini V, et al. Relationship between regulatory T cells and immune activation in human immunodeficiency virus-infected patients interrupting antiretroviral therapy. PloS One. 2010;5(7):e11659.

186. Selliah N, Zhang M, White S, Zoltick P, Sawaya BE, Finkel TH, et al. FOXP3 inhibits HIV-1 infection of CD4 T-cells via inhibition of LTR transcriptional activity. Virology. 2008 Nov 25;381(2):161–7.

187. Ganesh L, Burstein E, Guha-Niyogi A, Louder MK, Mascola JR, Klomp LWJ, et al. The gene product Murr1 restricts HIV-1 replication in resting CD4+ lymphocytes. Nature. 2003 Dec 18;426(6968):853–7.

188. Grant C, Oh U, Fugo K, Takenouchi N, Griffith C, Yao K, et al. Foxp3 represses retroviral transcription by targeting both NF-kappaB and CREB pathways. PLoS Pathog. 2006 Apr;2(4):e33.

189. Bandera A, Ferrario G, Saresella M, Marventano I, Soria A, Zanini F, et al. CD4+ T cell depletion, immune activation and increased production of regulatory T cells in the thymus of HIV-infected individuals. PloS One. 2010;5(5):e10788.

190. Ji J, Cloyd MW. HIV-1 binding to CD4 on CD4+CD25+ regulatory T cells enhances their suppressive function and induces them to home to, and accumulate in, peripheral and mucosal lymphoid tissues: an additional mechanism of immunosuppression. Int Immunol. 2009 Mar;21(3):283–94.

191. Hsieh S-M, Chen M-Y, Pan S-C, Hung C-C, Chang S-C. Aberrant induction of regulatory activity of CD4+CD25+ T cells by dendritic cells in HIV-infected persons with amebic liver abscess. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2007 Jan 1;44(1):6–13.

192. Krathwohl MD, Schacker TW, Anderson JL. Abnormal presence of semimature dendritic cells that induce regulatory T cells in HIV-infected subjects. J Infect Dis. 2006 Feb 15;193(4):494–504.

193. Moreno-Fernandez ME, Presicce P, Chougnet CA. Homeostasis and function of regulatory T cells in HIV/SIV infection. J Virol. 2012 Oct;86(19):10262–9.

194. Chaisson RE, Allain JP, Leuther M, Volberding PA. Significant changes in HIV antigen level in the serum of patients treated with azidothymidine. N Engl J Med. 1986 Dec 18;315(25):1610–1.

195. Battegay M, Nüesch R, Hirschel B, Kaufmann GR. Immunological recovery and antiretroviral therapy in HIV-1 infection. Lancet Infect Dis. 2006 May;6(5):280–7.

196. Perelson AS, Essunger P, Cao Y, Vesanen M, Hurley A, Saksela K, et al. Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. Nature. 1997 May 8;387(6629):188–91.

197. Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JA, Baseler M, et al. Presence of an

inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Nov 25;94(24):13193–7.

198. Morlat P. Prise en charge médicale des personnes vivants avec le VIH-recommandations du groupe d'expert. La documentation francaise; 2013.

199. Sax PE, Tierney C, Collier AC, Daar ES, Mollan K, Budhathoki C, et al. Abacavir/Lamivudine Versus Tenofovir DF/Emtricitabine as Part of Combination Regimens for Initial Treatment of HIV: Final Results. J Infect Dis. 2011 Oct 15;204(8):1191–201.

200. Raffi F, Rachlis A, Brinson C, Arasteh K, Górgolas M, Brennan C, et al. Dolutegravir efficacy at 48 weeks in key subgroups of treatment-naive HIV-infected individuals in three randomized trials. AIDS Lond Engl. 2015 Jan 14;29(2):167–74.

201. Staszewski S, Miller V, Sabin C, Schlecht C, Gute P, Stamm S, et al. Determinants of sustainable CD4 lymphocyte count increases in response to antiretroviral therapy. AIDS Lond Engl. 1999 May 28;13(8):951–6.

202. LeMoing V, Thiébaut R, Chêne G, Leport C, Cailleton V, Michelet C, et al. Predictors of Long-Term Increase in CD4+ Cell Counts in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients Receiving a Protease Inhibitor-Containing Antiretroviral Regimen. J Infect Dis. 2002 Feb 15;185(4):471–80.

203. Soria A, Trabattoni D, Squillace N, Rainone V, Gnudi F, Clerici M, et al. Prospective immune dynamics during the first 24 weeks of efavirenz based-antiretroviral therapy in HIV-1-infected subjects, according to CD4+ T-cell counts at presentation: the IMMUNEF clinical trial. PloS One. 2015;10(2):e0117118.

204. Wolbers M, Battegay M, Hirschel B, Furrer H, Cavassini M, Hasse B, et al. CD4+ T-cell count increase in HIV-1-infected patients with suppressed viral load within 1 year after start of antiretroviral therapy. Antivir Ther. 2007;12(6):889–97.

205. Mocroft A, Phillips AN, Gatell J, Ledergerber B, Fisher M, Clumeck N, et al. Normalisation of CD4 counts in patients with HIV-1 infection and maximum virological suppression who are taking combination antiretroviral therapy: an observational cohort study. Lancet. 2007 Aug 4;370(9585):407–13.

206. García F, de Lazzari E, Plana M, Castro P, Mestre G, Nomdedeu M, et al. Long-term CD4+ T-cell response to highly active antiretroviral therapy according to baseline CD4+ T-cell count. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2004 Jun 1;36(2):702–13.

207. Moore RD, Keruly JC. CD4+ cell count 6 years after commencement of highly active antiretroviral therapy in persons with sustained virologic suppression. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2007 Feb 1;44(3):441–6.

208. Tarwater PM, Margolick JB, Jin J, Phair JP, Detels R, Rinaldo C, et al. Increase and plateau of CD4 T-cell counts in the 3(1/2) years after initiation of potent antiretroviral therapy. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2001 Jun 1;27(2):168–75.

209. Gras L, Kesselring AM, Griffin JT, van Sighem AI, Fraser C, Ghani AC, et al. CD4 cell counts of 800 cells/mm3 or greater after 7 years of highly active antiretroviral

therapy are feasible in most patients starting with 350 cells/mm3 or greater. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2007 Jun 1;45(2):183–92.

210. Ferraris L, Bellistri GM, Pegorer V, Tincati C, Meroni L, Galli M, et al. Untangling the Immunological Implications of Nadir on CD4+ Cell Recovery during Suppressive Highly Active Antiretroviral Therapy. Clin Infect Dis. 2008 Jan 1;46(1):149–50.

211. Benveniste O, Flahault A, Rollot F, Elbim C, Estaquier J, Pédron B, et al. 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. 2005 May 15;191(10):1670–9.

212. Marchetti G, Gori A, Casabianca A, Magnani M, Franzetti F, Clerici M, et al. Comparative analysis of T-cell turnover and homeostatic parameters in HIV-infected patients with discordant immune-virological responses to HAART. AIDS Lond Engl. 2006 Aug 22;20(13):1727–36.

213. Erikstrup C, Kronborg G, Lohse N, Ostrowski SR, Gerstoft J, Ullum H. T-cell dysfunction in HIV-1-infected patients with impaired recovery of CD4 cells despite suppression of viral replication. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2010 Mar;53(3):303–10.

214. Negredo E, Massanella M, Puig J, Pérez-Alvarez N, Gallego-Escuredo JM, Villarroya J, et al. Nadir CD4 T cell count as predictor and high CD4 T cell intrinsic apoptosis as final mechanism of poor CD4 T cell recovery in virologically suppressed HIV-infected patients: clinical implications. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2010 May 1;50(9):1300–8.

215. Lederman MM, Calabrese L, Funderburg NT, Clagett B, Medvik K, Bonilla H, et al. Immunologic failure despite suppressive antiretroviral therapy is related to activation and turnover of memory CD4 cells. J Infect Dis. 2011 Oct 15;204(8):1217–26.

216. Kelley CF, Kitchen CMR, Hunt PW, Rodriguez B, Hecht FM, Kitahata M, et al. Incomplete peripheral CD4+ cell count restoration in HIV-infected patients receiving long-term antiretroviral treatment. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2009 Mar 15;48(6):787–94.

217. Kaufmann GR, Furrer H, Ledergerber B, Perrin L, Opravil M, Vernazza P, et al. Characteristics, determinants, and clinical relevance of CD4 T cell recovery to <500 cells/microL in HIV type 1-infected individuals receiving potent antiretroviral therapy. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2005 Aug 1;41(3):361–72.

218. Le Moing V, Thiébaut R, Chêne G, Sobel A, Massip P, Collin F, et al. Long-term evolution of CD4 count in patients with a plasma HIV RNA persistently <500 copies/mL during treatment with antiretroviral drugs. HIV Med. 2007 Apr;8(3):156–63.

219. Piconi S, Trabattoni D, Gori A, Parisotto S, Magni C, Meraviglia P, et al. Immune activation, apoptosis, and Treg activity are associated with persistently reduced CD4+ T-cell counts during antiretroviral therapy. AIDS Lond Engl. 2010 Aug 24;24(13):1991–2000.

220. Ruimin Tan AOW. Clinical outcome of HIV-infected antiretroviral-naive patients with discordant immunologic and virologic responses to highly active antiretroviral therapy. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2008;47(5):553–8.

221. Florence E, Lundgren J, Dreezen C, Fisher M, Kirk O, Blaxhult A, et al. Factors associated with a reduced CD4 lymphocyte count response to HAART despite full viral suppression in the EuroSIDA study. HIV Med. 2003 Jul;4(3):255–62.

222. Tiba F, Nauwelaers F, Traoré S, Coulibaly B, Ouedraogo T, Compaoré A, et al. Immune Reconstitution During the First Year of Antiretroviral Therapy of HIV-1-Infected Adults in Rural Burkina Faso. Open AIDS J. 2012;6:16–25.

223. Li T, Wu N, Dai Y, Qiu Z, Han Y, Xie J, et al. Reduced thymic output is a major mechanism of immune reconstitution failure in HIV-infected patients after long-term antiretroviral therapy. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2011 Nov;53(9):944–51.

224. Marziali M, De Santis W, Carello R, Leti W, Esposito A, Isgrò A, et al. T-cell homeostasis alteration in HIV-1 infected subjects with low CD4 T-cell count despite undetectable virus load during HAART. AIDS Lond Engl. 2006 Oct 24;20(16):2033–41.

225. Li T, Tubiana R, Katlama C, Calvez V, Mohand HA, Autran B. Long-lasting recovery in CD4 T-cell function and viral-load reduction after highly active antiretroviral therapy in advanced HIV-1 disease. The Lancet. 1998 juin;351(9117):1682–6.

226. Engsig FN, Gerstoft J, Kronborg G, Larsen CS, Pedersen G, Røge B, et al. Long-term mortality in HIV patients virally suppressed for more than three years with incomplete CD4 recovery: a cohort study. BMC Infect Dis. 2010;10:318.

227. Loutfy MR, Genebat M, Moore D, Raboud J, Chan K, Antoniou T, et al. A CD4+ cell count <200 cells per cubic millimeter at 2 years after initiation of combination antiretroviral therapy is associated with increased mortality in HIV-infected individuals with viral suppression. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2010 Dec;55(4):451–9.

228. Van Lelyveld SFL, Gras L, Kesselring A, Zhang S, De Wolf F, Wensing AMJ, et al. Long-term complications in patients with poor immunological recovery despite virological successful HAART in Dutch ATHENA cohort. AIDS Lond Engl. 2012 Feb 20;26(4):465–74.

229. Piketty C, Weiss L, Thomas F, Mohamed AS, Belec L, Kazatchkine MD. Long-term clinical outcome of human immunodeficiency virus-infected patients with discordant immunologic and virologic responses to a protease inhibitor-containing regimen. J Infect Dis. 2001 May 1;183(9):1328–35.

230. Baker JV, Peng G, Rapkin J, Abrams DI, Silverberg MJ, MacArthur RD, et al. CD4+ count and risk of non-AIDS diseases following initial treatment for HIV infection. AIDS Lond Engl. 2008 Apr 23;22(7):841–8.

231. Lichtenstein KA, Armon C, Buchacz K, Chmiel JS, Buckner K, Tedaldi EM, et al. Low CD4+ T Cell Count Is a Risk Factor for Cardiovascular Disease Events in the HIV Outpatient Study. Clin Infect Dis. 2010 Aug 15;51(4):435–47.

232. Triant VA, Regan S, Lee H, Sax PE, Meigs JB, Grinspoon SK. Association of immunologic and virologic factors with myocardial infarction rates in a US healthcare system. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2010 Dec 15;55(5):615–9.

233. Yong MK, Elliott JH, Woolley IJ, Hoy JF. Low CD4 count is associated with an increased risk of fragility fracture in HIV-infected patients. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2011 Jul 1;57(3):205–10.

234. Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO, Vajdic CM. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. Lancet. 2007 Jul 7;370(9581):59–67.

235. Silverberg MJ, Chao C, Leyden WA, Xu L, Tang B, Horberg MA, et al. HIV infection and the risk of cancers with and without a known infectious cause. AIDS Lond Engl. 2009 Nov 13;23(17):2337–45.

236. Fried LP, Tangen CM, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J, et al. Frailty in older adults: evidence for a phenotype. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2001 Mar;56(3):M146–56.

237. Desquilbet L, Margolick JB, Fried LP, Phair JP, Jamieson BD, Holloway M, et al. Relationship between a frailty-related phenotype and progressive deterioration of the immune system in HIV-infected men. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2009 Mar 1;50(3):299–306.

238. Erlandson KM, Allshouse AA, Jankowski CM, Lee EJ, Rufner KM, Palmer BE, et al. Association of functional impairment with inflammation and immune activation in HIV type 1-infected adults receiving effective antiretroviral therapy. J Infect Dis. 2013 Jul 15;208(2):249–59.

239. Hunt PW, Deeks SG, Rodriguez B, Valdez H, Shade SB, Abrams DI, et al. Continued CD4 cell count increases in HIV-infected adults experiencing 4 years of viral suppression on antiretroviral therapy. AIDS Lond Engl. 2003 Sep 5;17(13):1907–15.

240. Hejdeman B, Lenkei R, Leandersson AC, Hultström AL, Wahren B, Sandström E, et al. Clinical and immunological benefits from highly active antiretroviral therapy in spite of limited viral load reduction in HIV type 1 infection. AIDS Res Hum Retroviruses. 2001 Mar 1;17(4):277–86.

241. Grabar S, Le Moing V, Goujard C, Leport C, Kazatchkine MD, Costagliola D, et al. Clinical outcome of patients with HIV-1 infection according to immunologic and virologic response after 6 months of highly active antiretroviral therapy. Ann Intern Med. 2000 Sep 19;133(6):401–10.

242. Egger M, May M, Chêne G, Phillips AN, Ledergerber B, Dabis F, et al. Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies. Lancet. 2002 Jul 13;360(9327):119–29.

243. Anthony KB, Yoder C, Metcalf JA, DerSimonian R, Orenstein JM, Stevens RA, et al. Incomplete CD4 T cell recovery in HIV-1 infection after 12 months of highly active antiretroviral therapy is associated with ongoing increased CD4 T cell activation and turnover. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2003 Jun 1;33(2):125–33.

244. Méndez-Lagares G, García-Pergañeda A, del Mar del Pozo-Balado M, Genebat M, Ruiz-Mateos E, García García M, et al. Differential alterations of the CD4 and CD8 T cell subsets in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy with low CD4 T cell restoration. J Antimicrob Chemother. 2012 May;67(5):1228–37.

245. Robbins GK, Spritzler JG, Chan ES, Asmuth DM, Gandhi RT, Rodriguez BA, et al. Incomplete reconstitution of T cell subsets on combination antiretroviral therapy in the AIDS Clinical Trials Group protocol 384. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2009 Feb 1;48(3):350–61.

246. Nakanjako D, Ssewanyana I, Mayanja-Kizza H, Kiragga A, Colebunders R, Manabe YC, et al. High T-cell immune activation and immune exhaustion among individuals with suboptimal CD4 recovery after 4 years of antiretroviral therapy in an African cohort. BMC Infect Dis. 2011;11:43.

247. Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Bredt B, Hagos E, Lampiris H, et al. T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. J Infect Dis. 2003 May 15;187(10):1534–43.

248. Gandhi RT, Spritzler J, Chan E, Asmuth DM, Rodriguez B, Merigan TC, et al. Effect of baseline- and treatment-related factors on immunologic recovery after initiation of antiretroviral therapy in HIV-1-positive subjects: results from ACTG 384. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2006 Aug 1;42(4):426–34.

249. Benito JM, López M, Lozano S, Ballesteros C, Martinez P, González-Lahoz J, et al. Differential upregulation of CD38 on different T-cell subsets may influence the ability to reconstitute CD4+ T cells under successful highly active antiretroviral therapy. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2005 Apr 1;38(4):373–81.

250. Hatano H, Jain V, Hunt PW, Lee T-H, Sinclair E, Do TD, et al. Cell-based measures of viral persistence are associated with immune activation and programmed cell death protein 1 (PD-1)-expressing CD4+ T cells. J Infect Dis. 2013 Jul;208(1):50–6.

251. Méndez-Lagares G, Pozo-Balado MM, del Mar del Pozo Balado M, Genebat M, Genebat González M, García Pergañeda A, et al. Severe immune dysregulation affects $CD4^{+}CD25(hi)FoxP3^{+}$ regulatory T cells in HIV-infected patients with low-level CD4 T-cell repopulation despite suppressive highly active antiretroviral therapy. J Infect Dis. 2012 May 15;205(10):1501–9.

252. Fernandez S, Tanaskovic S, Helbig K, Rajasuriar R, Kramski M, Murray JM, et al. CD4+ T-cell deficiency in HIV patients responding to antiretroviral therapy is associated with increased expression of interferon-stimulated genes in CD4+ T cells. J Infect Dis. 2011 Dec 15;204(12):1927–35.

253. Saison J, Ferry T, Demaret J, Maucort Boulch D, Venet F, Perpoint T, et al. Association between discordant immunological response to highly active anti-retroviral therapy, regulatory T cell percentage, immune cell activation and very low-level viraemia in HIV-infected patients. Clin Exp Immunol. 2014 Jun;176(3):401–9.

254. Isgrò A, Leti W, De Santis W, Marziali M, Esposito A, Fimiani C, et al. Altered

clonogenic capability and stromal cell function characterize bone marrow of HIV-infected subjects with low CD4+ T cell counts despite viral suppression during HAART. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2008 Jun 15;46(12):1902–10.

255. Beq S, Rannou M-T, Fontanet A, Delfraissy J-F, Thèze J, Colle J-H. HIV infection: pre-highly active antiretroviral therapy IL-7 plasma levels correlate with long-term CD4 cell count increase after treatment. AIDS Lond Engl. 2004 Feb 20;18(3):563–5.

256. Colle J-H, Moreau J-L, Fontanet A, Lambotte O, Joussemet M, Jacod S, et al. Regulatory dysfunction of the interleukin-7 receptor in CD4 and CD8 lymphocytes from HIV-infected patients--effects of antiretroviral therapy. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2006 Jul;42(3):277–85.

257. Hartling HJ, Thørner LW, Erikstrup C, Harritshøj LH, Kronborg G, Pedersen C, et al. Polymorphism in interleukin-7 receptor α gene is associated with faster $CD4^+$ T-cell recovery after initiation of combination antiretroviral therapy. AIDS Lond Engl. 2014 Jul 31;28(12):1739–48.

258. 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 Sep 20;200(6):761–70.

259. Marchetti G, Tincati C, Silvestri G. Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS. Clin Microbiol Rev. 2013 Jan;26(1):2–18.

260. Klatt NR, Funderburg NT, Brenchley JM. Microbial translocation, immune activation, and HIV disease. Trends Microbiol. 2013 Jan;21(1):6–13.

261. Vinikoor MJ, Joseph J, Mwale J, Marx MA, Goma FM, Mulenga LB, et al. Age at antiretroviral therapy initiation predicts immune recovery, death, and loss to follow-up among HIV-infected adults in urban Zambia. AIDS Res Hum Retroviruses. 2014 Oct;30(10):949–55.

262. Mocroft A, Phillips AN, Ledergerber B, Katlama C, Chiesi A, Goebel F-D, et al. Relationship between antiretrovirals used as part of a cART regimen and CD4 cell count increases in patients with suppressed viremia. AIDS Lond Engl. 2006 May 12;20(8):1141–50.

263. Lacombe K, Pacanowski J, Meynard J-L, Trylesinski A, Girard P-M. Risk factors for CD4 lymphopenia in patients treated with a tenofovir/didanosine high dose-containing highly active antiretroviral therapy regimen. AIDS Lond Engl. 2005 Jul 1;19(10):1107–8.

264. Barrios A, Rendón A, Negredo E, Barreiro P, Garcia-Benayas T, Labarga P, et al. Paradoxical CD4+ T-cell decline in HIV-infected patients with complete virus suppression taking tenofovir and didanosine. AIDS Lond Engl. 2005 Mar 24;19(6):569–75.

265. Negredo E, Moltó J, Burger D, Viciana P, Ribera E, Paredes R, et al. Unexpected CD4 cell count decline in patients receiving didanosine and tenofovir-based regimens despite undetectable viral load. AIDS Lond Engl. 2004 Feb 20;18(3):459–63.

266. Bartlett JA, Fath MJ, Demasi R, Hermes A, Quinn J, Mondou E, et al. An updated systematic overview of triple combination therapy in antiretroviral-naive HIV-infected adults. AIDS Lond Engl. 2006 Oct 24;20(16):2051–64.

267. Khanna N, Opravil M, Furrer H, Cavassini M, Vernazza P, Bernasconi E, et al. CD4+ T cell count recovery in HIV type 1-infected patients is independent of class of antiretroviral therapy. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2008 Oct 15;47(8):1093–101.

268. Kawana-Tachikawa A, Llibre JM, Bravo I, Escrig R, Mothe B, Puig J, et al. Effect of Maraviroc Intensification on HIV-1-Specific T Cell Immunity in Recently HIV-1-Infected Individuals. PLoS ONE [Internet]. 2014 Jan 27 [cited 2015 Apr 25];9(1). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3903883/

269. Wilkin TJ, Lalama CM, McKinnon J, Gandhi RT, Lin N, Landay A, et al. A Pilot Trial of Adding Maraviroc to Suppressive Antiretroviral Therapy for Suboptimal CD4+ T-Cell Recovery Despite Sustained Virologic Suppression: ACTG A5256. J Infect Dis. 2012 Aug 15;206(4):534–42.

270. Dyrhol-Riise AM, Voltersvik P, Olofsson J, Asjö B. Activation of CD8 T cells normalizes and correlates with the level of infectious provirus in tonsils during highly active antiretroviral therapy in early HIV-1 infection. AIDS Lond Engl. 1999 Dec 3;13(17):2365–76.

271. Deeks SG, Phillips AN. HIV infection, antiretroviral treatment, ageing, and non-AIDS related morbidity. BMJ. 2009;338:a3172.

272. Beran O, Holub M, Spála J, Kalanin J, Stanková M. Cd38 expression on Cd8+ T cells in Human immunodeficiency virus 1-positive adults treated with HAART. Acta Virol. 2003;47(2):121–4.

273. Valdez H, Connick E, Smith KY, Lederman MM, Bosch RJ, Kim RS, et al. Limited immune restoration after 3 years' suppression of HIV-1 replication in patients with moderately advanced disease. AIDS Lond Engl. 2002 Sep 27;16(14):1859–66.

274. Marchetti G, Merlini E, Sinigaglia E, Iannotti N, Bai F, Savoldi A, et al. Immune reconstitution in HIV+ subjects on lopinavir/ritonavir-based HAART according to the severity of pre-therapy CD4+. Curr HIV Res. 2012 Oct;10(7):597–605.

275. Mudd JC, Lederman MM. CD8 T cell persistence in treated HIV infection. Curr Opin HIV AIDS. 2014 Sep;9(5):500–5.

276. Serrano-Villar S, Sainz T, Lee SA, Hunt PW, Sinclair E, Shacklett BL, et al. HIV-infected individuals with low CD4/CD8 ratio despite effective antiretroviral therapy exhibit altered T cell subsets, heightened CD8+ T cell activation, and increased risk of non-AIDS morbidity and mortality. PLoS Pathog. 2014 May;10(5):e1004078.

277. Zheng L, Taiwo B, Gandhi RT, Hunt PW, Collier AC, Flexner C, et al. Factors associated with CD8+ T-cell activation in HIV-1-infected patients on long-term antiretroviral therapy. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2014 Oct 1;67(2):153–60.

278. Benito JM, López M, Lozano S, Martinez P, González-Lahoz J, Soriano V. CD38

expression on CD8 T lymphocytes as a marker of residual virus replication in chronically HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. AIDS Res Hum Retroviruses. 2004 Feb;20(2):227–33.

279. Mavigner M, Delobel P, Cazabat M, Dubois M, L'faqihi-Olive F-E, Raymond S, et al. HIV-1 residual viremia correlates with persistent T-cell activation in poor immunological responders to combination antiretroviral therapy. PloS One. 2009;4(10):e7658.

280. Chun T-W, Nickle DC, Justement JS, Meyers JH, Roby G, Hallahan CW, et al. Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy. J Infect Dis. 2008 Mar 1;197(5):714–20.

281. Liang EC, Sceats L, Bayless NL, Strauss-Albee DM, Kubo J, Grant PM, et al. Association between latent proviral characteristics and immune activation in antiretrovirus-treated human immunodeficiency virus type 1-infected adults. J Virol. 2014 Aug;88(15):8629–39.

282. Wittkop L, Bitard J, Lazaro E, Neau D, Bonnet F, Mercie P, et al. Effect of cytomegalovirus-induced immune response, self antigen-induced immune response, and microbial translocation on chronic immune activation in successfully treated HIV type 1-infected patients: the ANRS CO3 Aquitaine Cohort. J Infect Dis. 2013 Feb 15;207(4):622–7.

283. Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Epling L, Teague J, Jacobson MA, et al. Valganciclovir reduces T cell activation in HIV-infected individuals with incomplete CD4+ T cell recovery on antiretroviral therapy. J Infect Dis. 2011 May 15;203(10):1474–83.

284. Duprez DA, Kuller LH, Tracy R, Otvos J, Cooper DA, Hoy J, et al. Lipoprotein particle subclasses, cardiovascular disease and HIV infection. Atherosclerosis. 2009 Dec;207(2):524–9.

285. Breen EC, Hussain SK, Magpantay L, Jacobson LP, Detels R, Rabkin CS, et al. B-cell stimulatory cytokines and markers of immune activation are elevated several years prior to the diagnosis of systemic AIDS-associated non-Hodgkin B-cell lymphoma. Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol. 2011 Jul;20(7):1303–14.

286. Burdo TH, Weiffenbach A, Woods SP, Letendre S, Ellis RJ, Williams KC. Elevated sCD163 in plasma but not cerebrospinal fluid is a marker of neurocognitive impairment in HIV infection. AIDS Lond Engl. 2013 Jun 1;27(9):1387–95.

287. Hunt PW, Cao HL, Muzoora C, Ssewanyana I, Bennett J, Emenyonu N, et al. Impact of CD8+ T-cell activation on CD4+ T-cell recovery and mortality in HIV-infected Ugandans initiating antiretroviral therapy. AIDS Lond Engl. 2011 Nov 13;25(17):2123–31.

288. Ford ES, Greenwald JH, Richterman AG, Rupert A, Dutcher L, Badralmaa Y, et al. Traditional risk factors and D-dimer predict incident cardiovascular disease events in chronic HIV infection. AIDS Lond Engl. 2010 Jun 19;24(10):1509–17.

289. Tenorio AR, Zheng Y, Bosch RJ, Krishnan S, Rodriguez B, Hunt PW, et al. Soluble markers of inflammation and coagulation but not T-cell activation predict non-AIDS-defining morbid events during suppressive antiretroviral treatment. J Infect Dis. 2014 Oct 15;210(8):1248–59.

290. Helleberg M, Kronborg G, Ullum H, Ryder LP, Obel N, Gerstoft J. Course and Clinical Significance of CD8+ T-Cell Counts in a Large Cohort of HIV-Infected Individuals. J Infect Dis. 2014 Dec 8;

291. Longenecker CT, Funderburg NT, Jiang Y, Debanne S, Storer N, Labbato DE, et al. Markers of inflammation and CD8 T-cell activation, but not monocyte activation, are associated with subclinical carotid artery disease in HIV-infected individuals. HIV Med. 2013 Jul;14(6):385–90.

292. Krikke M, van Lelyveld SFL, Tesselaar K, Arends JE, Hoepelman IM, Visseren FLJ. The role of T cells in the development of cardiovascular disease in HIV-infected patients. Atherosclerosis. 2014 Sep 6;237(1):92–8.

293. Stein JH, Hsue PY. Inflammation, immune activation, and CVD risk in individuals with HIV infection. JAMA. 2012 Jul 25;308(4):405–6.

294. Chen MF, Gill AJ, Kolson DL. Neuropathogenesis of HIV-associated neurocognitive disorders: roles for immune activation, HIV blipping and viral tropism. Curr Opin HIV AIDS. 2014 Nov;9(6):559–64.

295. Erlandson KM, O'Riordan M, Labbato D, McComsey GA. Relationships between inflammation, immune activation, and bone health among HIV-infected adults on stable antiretroviral therapy. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2014 Mar 1;65(3):290–8.

296. Gazzola L, Bellistri GM, Tincati C, Ierardi V, Savoldi A, del Dole A, et al. Association between peripheral T-Lymphocyte activation and impaired bone mineral density in HIV-infected patients. J Transl Med. 2013;11:51.

297. Serana F, Chiarini M, Quiros-Roldan E, Gotti D, Zanotti C, Sottini A, et al. Modulation of Regulatory T-Cell Subsets in Very Long-Term Treated Aviremic HIV(+) Patients and Untreated Viremic Patients. Open AIDS J. 2014;8:1–6.

298. Zhou H, Zhao H, Hao Y, Song C, Han J, Zhang J, et al. Excessive conversion and impaired thymic output contribute to disturbed regulatory T-cell homeostasis in AIDS patients with low CD4 cell counts. AIDS Lond Engl. 2013 Apr 24;27(7):1059–69.

299. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. Nat Rev Immunol. 2012 Mar;12(3):191–200.

300. Delobel P, Nugeyre M-T, Cazabat M, Sandres-Sauné K, Pasquier C, Cuzin L, et al. Naive T-cell depletion related to infection by X4 human immunodeficiency virus type 1 in poor immunological responders to highly active antiretroviral therapy. J Virol. 2006 Oct;80(20):10229–36.

301. Gianotti N, Galli L, Racca S, Salpietro S, Cossarini F, Spagnuolo V, et al. Residual viraemia does not influence 1 year virological rebound in HIV-infected patients with

HIV RNA persistently below 50 copies/mL. J Antimicrob Chemother. 2012 Jan;67(1):213–7.

302. Tenorio AR, Martinson J, Pollard D, Baum L, Landay A. The relationship of T-regulatory cell subsets to disease stage, immune activation, and pathogen-specific immunity in HIV infection. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2008 Aug 15;48(5):577–80.

303. Ostrowski SR, Katzenstein TL, Thim PT, Pedersen BK, Gerstoft J, Ullum H. Low-level viremia and proviral DNA impede immune reconstitution in HIV-1-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. J Infect Dis. 2005 Feb 1;191(3):348–57.

304. Bastard J-P, Soulié C, Fellahi S, Haïm-Boukobza S, Simon A, Katlama C, et al. Circulating interleukin-6 levels correlate with residual HIV viraemia and markers of immune dysfunction in treatment-controlled HIV-infected patients. Antivir Ther. 2012;17(5):915–9.

305. Reus S, Portilla J, Sánchez-Payá J, Giner L, Francés R, Such J, et al. Low-level HIV viremia is associated with microbial translocation and inflammation. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2013 Feb 1;62(2):129–34.

306. Saison J, Tardy J-C, Scholtes C, Icard V, Trabaud M-A, Perpoint T, et al. Low-level viremia is associated with non-B subtypes in patients infected with HIV with virological success following HAART introduction. J Med Virol. 2013 Jun;85(6):953–8.

307. Doyle T, Smith C, Vitiello P, Cambiano V, Johnson M, Owen A, et al. Plasma HIV-1 RNA detection below 50 copies/ml and risk of virologic rebound in patients receiving highly active antiretroviral therapy. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2012 Mar 1;54(5):724–32.

308. Widdrington J, Payne B, Medhi M, Valappil M, Schmid ML. The significance of very low-level viraemia detected by sensitive viral load assays in HIV infected patients on HAART. J Infect. 2011 Jan;62(1):87–92.

309. Martin-Blondel G, Sauné K, Vu Hai V, Marchou B, Delobel P, Izopet J, et al. Factors associated with a strictly undetectable viral load in HIV-1-infected patients. HIV Med. 2012 Oct;13(9):568–73.

310. Ruelle J, Debaisieux L, Vancutsem E, De Bel A, Delforge M-L, Piérard D, et al. HIV-1 low-level viraemia assessed with 3 commercial real-time PCR assays show high variability. BMC Infect Dis. 2012;12:100.

311. Aerts NE, Dombrecht EJ, Ebo DG, Bridts CH, Stevens WJ, De Clerck LS. Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis. Cell Immunol. 2008 Feb;251(2):109–15.

312. Kiazyk SAK, Fowke KR. Loss of CD127 expression links immune activation and CD4(+) T cell loss in HIV infection. Trends Microbiol. 2008 Dec;16(12):567–73.

313. Reekie J, Kosa C, Engsig F, Monforte A d'Arminio, Wiercinska-Drapalo A, Domingo P, et al. Relationship between current level of immunodeficiency and non-acquired

immunodeficiency syndrome-defining malignancies. Cancer. 2010 Nov 15;116(22):5306–15.

314. Roussillon C, Henard S, Hardel L et al. Causes de décès des patients infectés par le VIH en France en 2010 : Étude ANRS EN20 Mortalité 2010. BEH 2012 ; 46-47 : 541-5.

315. Lévy Y, Sereti I, Tambussi G, Routy JP, Lelièvre JD, Delfraissy JF, et al. Effects of recombinant human interleukin 7 on T-cell recovery and thymic output in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy: results of a phase I/IIa randomized, placebo-controlled, multicenter study. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2012 Jul;55(2):291–300.

316. Levy Y, Lacabaratz C, Weiss L, Viard J-P, Goujard C, Lelièvre J-D, et al. Enhanced T cell recovery in HIV-1-infected adults through IL-7 treatment. J Clin Invest. 2009 Apr;119(4):997–1007.

317. Barouch DH, Deeks SG. Immunologic strategies for HIV-1 remission and eradication. Science. 2014 Jul 11;345(6193):169–74.

318. Jacobson JM, Wang H, Bordi R, Zheng L, Gross BH, Landay AL, et al. A randomized controlled trial of palifermin (recombinant human keratinocyte growth factor) for the treatment of inadequate CD4+ T-lymphocyte recovery in patients with HIV-1 infection on antiretroviral therapy. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2014 Aug 1;66(4):399–406.

319. Routy J-P, Angel JB, Patel M, Kanagaratham C, Radzioch D, Kema I, et al. Assessment of chloroquine as a modulator of immune activation to improve CD4 recovery in immune nonresponding HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. HIV Med. 2015 Jan;16(1):48–56.

320. Schacker TW, Nguyen PL, Beilman GJ, Wolinsky S, Larson M, Reilly C, et al. Collagen deposition in HIV-1 infected lymphatic tissues and T cell homeostasis. J Clin Invest. 2002 Oct;110(8):1133–9.

321. Schacker TW, Nguyen PL, Martinez E, Reilly C, Gatell JM, Horban A, et al. Persistent abnormalities in lymphoid tissues of human immunodeficiency virus-infected patients successfully treated with highly active antiretroviral therapy. J Infect Dis. 2002 Oct 15;186(8):1092–7.

322. Whiteside TL. Clinical Impact of Regulatory T cells (Treg) in Cancer and HIV. Cancer Microenviron Off J Int Cancer Microenviron Soc. 2014 Nov 12;

323. Rosenberg SA, Sportès C, Ahmadzadeh M, Fry TJ, Ngo LT, Schwarz SL, et al. IL-7 administration to humans leads to expansion of CD8+ and CD4+ cells but a relative decrease of CD4+ T-regulatory cells. J Immunother Hagerstown Md 1997. 2006 Jun;29(3):313–9.

324. Pellegrini M, Calzascia T, Toe JG, Preston SP, Lin AE, Elford AR, et al. IL-7 engages multiple mechanisms to overcome chronic viral infection and limit organ pathology. Cell. 2011 Feb 18;144(4):601–13.

325. Younas M, Hue S, Lacabaratz C, Guguin A, Wiedemann A, Surenaud M, et al. IL-7 modulates in vitro and in vivo human memory T regulatory cell functions through the CD39/ATP axis. J Immunol Baltim Md 1950. 2013 Sep 15;191(6):3161–8.