Implication des cellules Natural Killer dans la physiopathologie des infections chroniques VIH et VHC : application à des stratégies thérapeutiques

Olivier Lucar

▶ **To cite this version:**

Olivier Lucar. Implication des cellules Natural Killer dans la physiopathologie des infections chroniques VIH et VHC : application à des stratégies thérapeutiques. Immunologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066471 . tel-01786959

HAL Id: tel-01786959

https://theses.hal.science/tel-01786959

Submitted on 7 May 2018

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.

Université Pierre et Marie Curie

École doctorale ED394 :

CIMI-Paris / Cellules NK et Pathologies

Implication des cellules Natural Killer dans la physiopathologie des infections chroniques VIH et VHC : Application à des stratégies thérapeutiques

Par Olivier LUCAR

Thèse de doctorat d'Immunologie

Dirigée par Vincent Vieillard

Présentée et soutenue publiquement le Jeudi 07 décembre 2017

Devant un jury composé de :

Dr. Vincent Vieillard, Directeur

Dr. Morgane Bomsel, Rapporteur

Dr. Nabila Jabrane-Ferrat, Rapporteur

Dr Abdelhakim Ahmed-Belkacem, Examinateur

Dr. Anne Couedel-Courteille, Examinateur

Pr. Vincent Calvez, Président du jury

Except where otherwise noted, this work is licensed under
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

Dédicace

À ma DanDan.

« Siempre ir más allá. Nunca te rindas. Ser un orgullo. Ser honesto y trabajador. Siempre comportarse bien en casa ajena. »

Consejos de vida de **Juan Manuel LÚCAR VIDAL & Emilia Enorfila VARGAS ESPEJO**

Remerciements

Pourquoi faire une thèse ? Pourquoi emprunter une voie inconnue, tortueuse et longue ? Pourquoi on attend toujours la fin pour faire sa biblio ? A part pour qu'on nous appelle docteur, pourquoi faire une thèse ? C'est une question que je me suis souvent poser jusqu'au jour où j'ai obtenu ma thèse. Et ce jour là je me suis plutôt demandé comment j'ai réussi à obtenir ma thèse ? Tout simplement grâce à beaucoup de personnes qui m'ont fais confiance et dont je serais infiniment reconnaissant.

A Vincent, qui par sa gentillesse et sa grande connaissance, m'a offert des sujets de recherches qui m'ont permis de devenir le scientifique que je suis aujourd'hui et que je serais demain. Merci de m'avoir donné ta confiance absolue et d'avoir été le chef dont j'avais besoin.

A Nadine et Baptiste qui m'ont apporté constamment leur soutien et leur disponibilité pour mes questions scientifiques et de vie. Merci pour votre amitié.

A Zineb avec qui, depuis la L2, nous avions le rêve d'un jour être des chercheurs et de vraiment faire une différence. Merci pour ton amitié indéfectible et de m'avoir accompagné dans cette galère. Un jour on l'écrira ce papier commun !

A Michaël, même si on est loin et qu'on ne se voit presque plus, merci de toujours être là sans même que je te le demande. Tu es mon meilleur ami depuis toujours et pour toujours j'en suis sûr !

A Adélie, ma collègue de pause, qui au fil de ma thèse est devenue une grande amie avec de toujours de très bons conseils.

A Nancy et Myriam qui depuis la fac m'ont toujours donner du bonheur à leur façon.

A Patrice, Rima, Mélie, Vero, Anne, Assia, Guislaine Karim et Christophe qui toujours apporté de précieux conseils, de la motivation et du soutien nécessaire à cette réussite.

A l'ensemble du CIMI et surtout du CERVI pour leur bienveillance et leur aide.

A mes parents qui ont sacrifié énormément pour que j'arrive à accomplir le meilleur. Gracias de ser mi mama y mi papa, que pase lo que pase, los quiero muchissimo y pueden ser orgullosos de ustedes.

A mon frère pour toujours être là pour tout ou n'importe quoi.

A Mamamilla, ma grand-mère. Merci d'avoir fait l'homme que je suis. Gracias por siempre poner tu familia antes de ti y de siempre dar tanto amor. Te quiero mucho.

A Papa Juan, mon grand-père. J'espère t'avoir rendu fier. Este logro lo debo a ti y tus consejos. Y sobre todo a tu amor. Te extraño mucho.

A Claudia qui m'as appris tellement sur tout. Je suis tellement heureux d'avoir été « ton petit frère ».

A mis tios Luis y Juan-Carlos et a mis tias Pocha y Nancy que decir a parte gracias de su apoyo y amor.

A toute ma famille maternelle, paternelle et d'amitié qui ont toujours été là pour moi sans faille. Promis je donnerai des nouvelles !

A ma femme Dan. J'ai réussi à te conquérir en te disant que j'allais devenir docteur. Et 3 ans plus tard c'est grâce à ton amour, ton soutien, ta malice et ta folie que je le suis aujourd'hui. Merci de m'aimer autant et d'avoir tant travailler pour notre famille. Je t'aime, te amo, 我爱你, I love you pour toujours et encore plus.

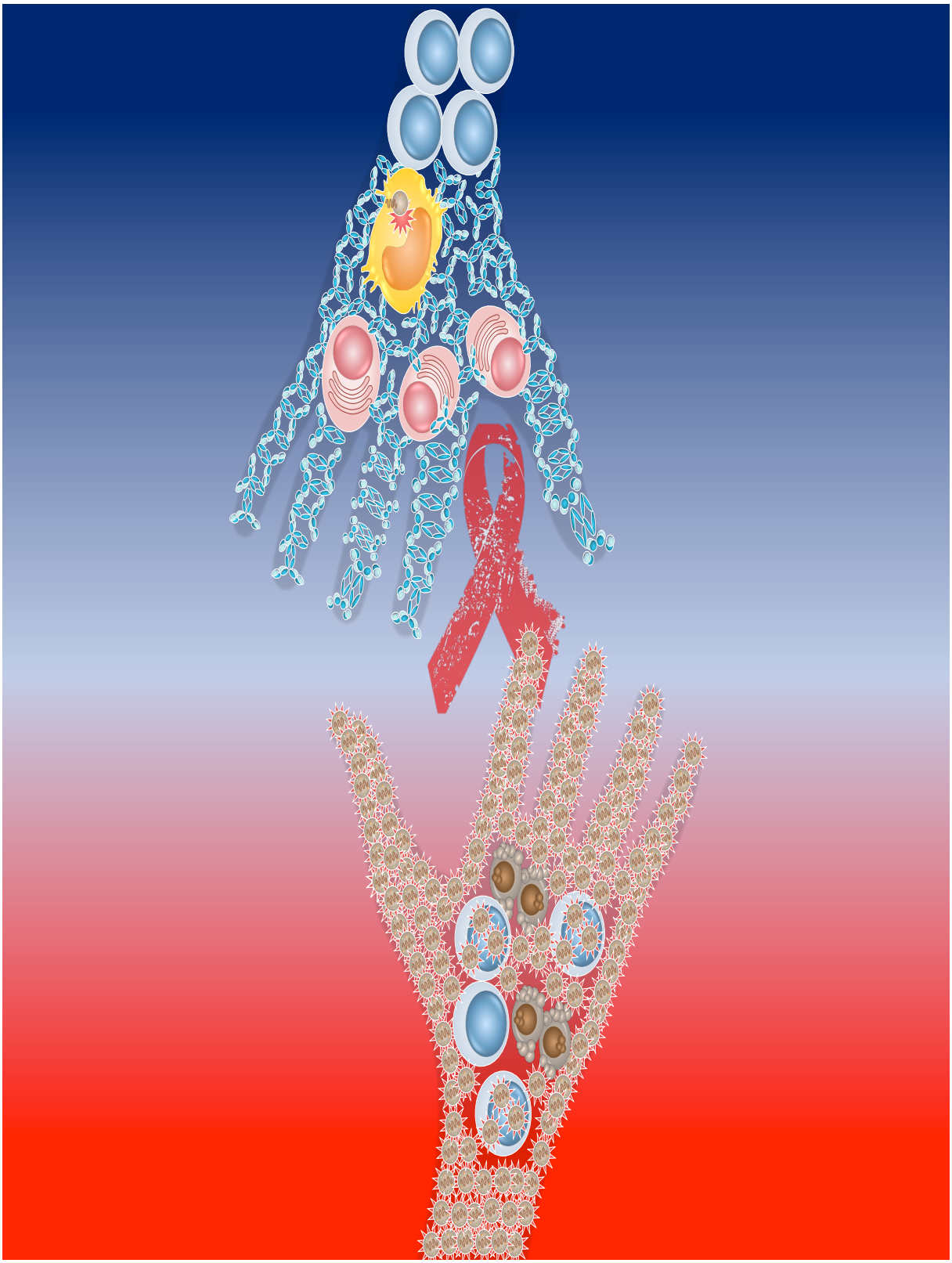
Finalement je le sais maintenant pourquoi j'ai fais une thèse ...

Sommaire

Remerciements 2
Sommaire 4
Introduction 8
A. Les infections chroniques virales 9
1. Virus de l'Immunodéficience Humaine. 9
1.1. Genèse du VIH 10
1.2. Histoire d'une pandémie moderne 12
1.3. De l'infection au SIDA 13
1.3.1 Structure du VIH-1 (Figure 2) 13
1.3.2 L'entrée virale (Figure 3) 14
1.3.3 Phase précoce (figure 5, panneau de gauche) 16
1.3.4 Phase tardive (figure 5, panneau de droite) 16
1.3.5 La physiopathologie du VIH-1 17
1.3.6 Particularités du VIH-2 18
1.4. Traitements et objectifs actuels 19
1.4.1 Évolution des traitements 19
1.4.2. Les réservoirs du VIH-1 20
1.4.3 Objectifs 90-90-90 21
1.5. Recherche vaccinale 22
1.5.1 Les anticorps neutralisants (AcNs) à large spectre 23
1.5.2 Essais cliniques actuels 25
2. Virus de l'Hépatite C 28
2.1 Découverte du VHC : histoire d'une pandémie oubliée 28
2.2. La physiopathologie d'une maladie persistante. 29
2.2.1 Morphologie du VHC 29
2.2.2 Cycle viral (Figure 9) 31
2.2.3 La physiopathologie du VHC 32
2.3 Les Antiviraux à Action Directe : La fin de l'Hépatite C ? 33
2.4. Recherche vaccinale 34
3. Le système immunitaire au centre de la chronicité 35
3.1. Mécanisme de contrôle viral 35
3.1.1 Lors de l'infection VIH-2 35
3.1.2 Les caractéristiques des « contrôleurs » du VIH 36
3.1.3 Lors de l'infection VHC 38
3.2 Mécanisme d'échappement viraux : Installation de la chronicité 39
3.2.1 Lors de l'infection VIH 39
3.2.2 Lors de l'infection VHC 40
B. Les cellules Natural Killers 42
1. Un tueur né 42
1.1 Définition des cellules NK 42
1.2. Répartition dans l'organisme. 44
1.3 Mode de régulation de l'activité NK 44
1.3.1 Marqueurs d'activation 44
1.3.2 Marqueurs d'inhibition 48
1.3.3 Education des cellules NK 50
1.4 Autres récepteurs des cellules NK 50
1.5 Récepteurs aux cytokines et aux chimiokines 51

1.6. Fonctions des cellules NK 53
1.6.1 Modes d'induction de la cytotoxicité 53
1.6.2 Mécanismes effecteurs de la cytotoxicité 54
1.6.3 Production de chimiokines et cytokines 55
2. Cellules NK et infections virales chroniques 56
2.1. Mémorisation par les cellules NK 56
2.2. Phénomène d'exhaustion des cellules NK 57
2.3. Les cellules NK dans l'infection VHC 58
2.3.1 Rôle dans la protection ou la clairance du virus 58
2.3.2 Rôle dans la phase chronique (Figure 12) 59
2.4. Cas de l'infection VIH 60
2.4.1 Rôle dans la protection 60
2.4.2 Rôle dans le contrôle viral 61
2.4.3 Rôle dans la phase chronique 61
Objectifs 65
Résultats 67
Projet 1 : Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK chez des patients contrôleurs du VIH-2 68
Introduction 68
Article 1 69
Analyse et Perspectives 101
Projet 2a : Étude du profil des cellules NK intra-hépatiques chez des patients infectés chroniquement par le VHC 102
Introduction 102
Article 2 103
Analyse et perspectives 116
Projet 2b : Implication d'un mécanisme mettant en jeu la liaison entre une région conservée de la protéine Core et le gC1qR permettant d'induire le NKp44L à la surface de cellules hépatiques 118
Introduction 118
Matériels & Méthodes 118
Résultats 121
Discussion & Perspectives 127
Projet 3a : Étude de la fonction d'AcNs anti-3S dans le contrôle de l'infection VIH-1 dans une cohorte de patients LTNP 129
Introduction 129
Article 3 130
Analyse et perspectives 149
Projet 3b : Approche vaccinale par un vaccin peptidique induisant une réponse neutralisante dans différents modèles animaux 151
Introduction 151
Matériels & Méthodes 153
Résultats 155
Discussion & Perspectives 164
Discussions générales et perspectives 165
I. Impact des infections chroniques sur la fonctionnalité des cellules NK : mise en évidence de nouvelles stratégies d'échappements 165
1. Conséquence de la diminution de l'expression du récepteur NKp30 sur les cellules NK de patients infectés par le VIH-2 165

2. Implication des cellules NK-NKp44^{+} dans l'infection chronique par le VHC et la dégradation du foie (Projet 2a) 167
3. Implication du mécanisme NKp44/NKp44L dans l'infection chronique par le VHC : comparaison à l'infection chronique par le VIH-1 (Projet 2b) 170
4. Récapitulatif 171
II. Mise en place de thérapies contre le VHC et le VIH-1 172
1. Le motif P7/P8 du VHC : nouvelle cible thérapeutique ? (Projet 2b) 172
2. Les anticorps neutralisants W614A-3S : nouveau candidat pour une vaccination anti-VIH-1 (Projet 3a) 173
3. La formulation vaccinale (Projet 3b) 174
Conclusion 176
Résumé 177
Abstract 178
Bibliographie 179
Annexe 1 199



Introduction

A. Les infections chroniques virales

Les infections virales chroniques sont un véritable enjeu pour la santé publique. Les traitements à vie et le développement de comorbidités sont très difficiles à gérer pour les patients et coûteuses pour les pouvoirs publics. Le développement de meilleures méthodes de prévention, de dépistage et surtout de traitement s'améliorent avec le temps. Mais la recherche de vaccins thérapeutiques ou prophylactiques reste la meilleure option pour combattre ces maladies et prévenir leur développement à long terme. Les virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) et de l'Hépatite C (VHC) sont deux exemples de chronicités virales. En effet, celles-ci ont généralement un développement infectieux lent et paucisymptomatique (qui présente peu de symptômes qui sont non spécifiques tel que de la fièvre ou des douleurs articulaires), ce qui rend difficile leur détection et conduit à la persistance de la maladie. Ces deux infections touchent une très large population mondiale qui ne peut être traitée que par des médicaments lourds et/ou coûteux en fonction des pays. Environ 35 ans après l'identification de ces pathogènes, de nombreuses questions sur les relations entre ces virus et le système immunitaire restent à résoudre, afin d'accélérer la recherche de vaccins qui font toujours défaut.

1. Virus de l'Immunodéficience Humaine.

La majorité des nouvelles infections virales ont une origine zoonotique (maladie qui se transmet de l'animal à l'homme ou vice-versa) et le VIH de type 1 (VIH-1) est une des infections les plus décrites à ce jour. Le VIH est responsable du Syndrome d'Immunodéficience Acquise (SIDA) qui a été identifié au début des années 1980. En 2016, on dénombre encore 36,7 millions de personnes séropositives et 1 million de décès liés à l'infection VIH (ONUSIDA, rapport annuel 2017). Presque 40 ans après et avec plus de 60 millions de personnes infectées, l'impact mondial qu'a eu le VIH-1/SIDA sur la société a permis de réduire le nombre de nouvelles infections et d'augmenter le nombre de personne sous traitement. Ainsi l'objectif principal serait qu'en 2030 le VIH, ne soit plus considéré comme une menace.

1.1. Genèse du VIH

Le SIDA est dû à deux types de VIH appartement au genre des *Lentivirus* de la famille des *Retroviridae* : le VIH-1 et le VIH-2. Le VIH-1 a été le premier à avoir été identifié formellement par microscopie électronique sur une culture de cellules provenant de ganglions de malades présentant les premiers signes cliniques d'une immunodéficience (Barré-Sinoussi et al., 1983). Et c'est en 1986, en recherchant l'origine de cette épidémie que le VIH-2 a été identifié en Afrique de l'Ouest (Clavel et al., 1986). Il est morphologiquement similaire mais se distingue par des antigènes différents. Surtout, il est génétiquement éloigné du VIH-1 mais très proche d'un virus de simien (VIS) causant une immunodéficience chez des macaques (Guyader et al., 1987). Très rapidement, d'autres VIS ont été mis en évidence chez différents primates non humains d'Afrique subsaharienne (Keele et al., 2006). Il est ainsi très probable que l'émergence du VIH provient d'infections entre des VIS de différentes espèces de primates jusqu'à obtenir la capacité d'infecter l'Homme. Précisément, le VIH-1 est la résultante d'au moins 4 transmissions entre espèces de Chimpanzés ou de Gorilles vers l'Homme regroupant 4 groupes : P, N, O et surtout M qui est le groupe responsable de l'épidémie mondiale. Le VIH-2 provient lui de 8 transmissions entres espèces de Sooty Mangabeys vers l'Homme comprenant 8 groupes de A à H mais seuls les groupes A et B jouent un rôle prépondérant dans la transmission principalement limitée à l'Afrique de l'Ouest (D'arc et al., 2015 ; Tebit and Arts, 2011) **(Figure 1)**.

Les hypothèses expliquant le saut du VIS chez l'Homme sont nombreuses mais en se basant sur la biologie du virus, la transmission a pu se produire pendant la chasse de gibier où des coupures ou morsures auraient exposées la membrane cutanée à du sang ou des fluides corporelles de singes infectés (Peeters et al., 2002). Le VIS s'est ensuite adapté à l'hôte en développant des mécanismes d'échappement au système immunitaire. En particulier, il a évolué au contact de facteurs de restrictions exprimés de manière ubiquitaire et qui ciblent le cycle viral. L'un de ces facteurs cellulaires, la theterine qui inhibe le bourgeonnement et le relargage de nouvelles particules virales, semble être la protéine ayant eu le plus grand impact sur l'évolution du VIS en VIH (Sauter et al., 2009). Le VIH-1 a adapté l'une de ses protéines virales (protéine Nef) afin qu'elle inhibe la theterine; ces adaptations sont principalement observées chez les virus du groupe M, responsable de la pandémie (Kirchhoff, 2010).

Cette forte capacité adaptative et l'évolution génétique rapide du VIH-1 sont expliquées par les fonctions de la transcriptase inverse (TI), protéine essentielle pour la

synthèse de l'ADN viral. Cette protéine produit un taux élevé d'erreurs dû à l'absence d'une activité de relecture, ce qui a pour conséquence une grande variabilité du génome viral. En effet, celle-ci atteint un taux de mutation d'environ $1{,}4.10^{-5}$ mutations (contre environ 1.10^{-8} chez l'Homme) par paire de base et par cycle de réplication dans un même hôte (Abram et al., 2010). La variabilité génétique du VIH-1 a permis un établissement mondial du pathogène. Le groupe majeur M est ainsi subdivisé en 9 sous-types (A-D, F-H, J, K), avec un taux de variation d'environ 20% entre eux. Ces groupes englobent également plus de 40 différentes formes recombinantes circulantes (CRF), qui sont générés quand de multiples sous-types infectent la même population (Taylor et al., 2008) **(Figure 1)**.

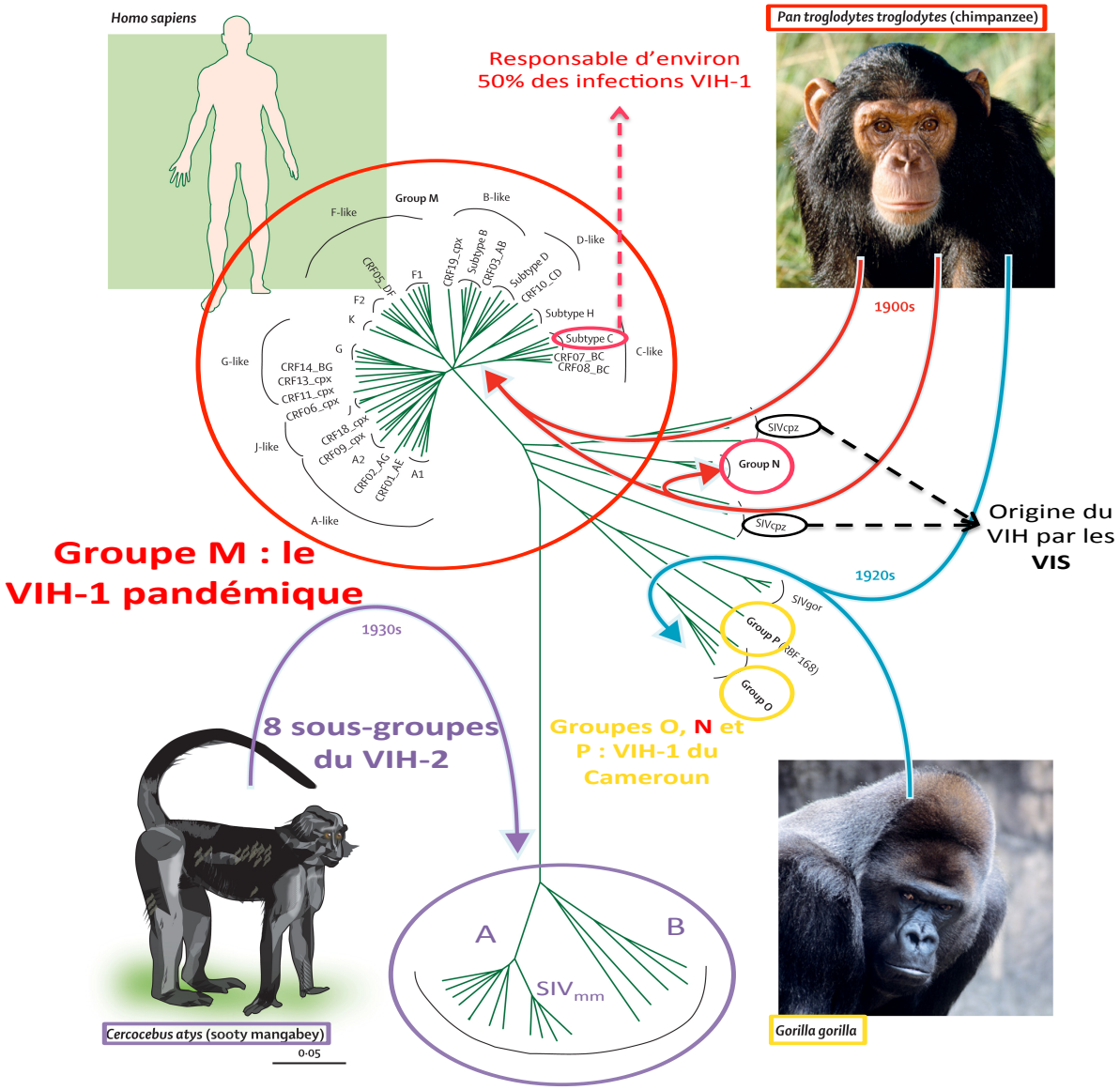


Figure 1 : Relation phylogénétique entre le VIS, le VIH-1 et le VIH-2 (d'après Tebit and Arts, 2011) : Les flèches pleines représentent les transmissions zoonotiques ayant fait émerger le VIH-1 et le VIH-2. On observe une grande distance entre les souches de VIH-1 et de VIH-2.

Ceci met en lumière la grande adaptabilité de ces virus à l'hôte afin d'y survivre et s'y multiplier et pourrait expliquer comment un virus simien originaire d'Afrique de l'Ouest a pu infecter le monde entier.

1.2. Histoire d'une pandémie moderne

En 1981, les premiers cas d'immunodéficience ont été décrits chez des hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes (HSH) aux États-Unis (Greene, 2007). Ils présentaient tous des infections rares et normalement bénignes ; mais elles étaient associées à une altération de l'ensemble du système immunitaire. Avant l'appellation officielle de SIDA par le « Center for Disease Control and Prevention » en 1982, on l'appelait le « cancer gay » ou encore la maladie des 4H : Homosexuel, Hémophile (infectés par des transfusions de sang contaminé par le VIH-1), Héroïnomane (contaminé par le partage de seringue usagée) et Haïtien. En effet la prévalence de la maladie était très élevée chez les immigrés haïtiens aux USA, laissant penser que Haïti pouvait être le point de départ de l'infection (Gallo, 2006).

Des études phylogénétiques ont placé l'ancêtre commun au VIH-1 du groupe M au Cameroun au début des années 1900. Alors que l'épicentre de la maladie se trouve à 1000Km, c'est-à-dire à Kinshasa, Congo. Une des hypothèses qui a émergé met en cause la colonisation de l'Afrique pendant la première moitié du 20ème siècle qui aurait favorisé le développement du VIH-1 jusqu'à arriver dans la capitale congolaise. Son urbanisation a fait exploser la démographie de la ville vers 1950. La latence de l'infection et l'amélioration des transports et des échanges aurait alors favorisé une grande propagation du VIH-1 à toute l'Afrique (Faria et al., 2014; Parris, 2007; Smallman-Raynor and Cliff, 1992). Après la fin de la colonisation, l'ONU a apporté son aide en Afrique pour assurer la transition en envoyant entre autres des milliers de travailleurs haïtiens. Une fois leur mission accomplie, ces travailleurs seraient rentrés dans leur pays en portant l'infection. Haïti était, à la fin des années 1970, un lieu bienveillant pour les HSH. Ceci pourrait ainsi expliquer pourquoi la communauté des HSH fut la première touchée et fut celle responsable du transport du VIH-1 aux États-Unis. L'immigration a également permis la propagation de l'infection au reste de la population. La stigmatisation des populations infectées et le déni politique total ont également fait le jeu du VIH-1 qui a pu se propager mondialement entre les années 1980 et 1990 (Tebit and Arts, 2011). En effet en 1984, 7700 cas ont été ainsi répertoriés aux USA et 762 en Europe, pour passer en 1990 à environ 10 millions de personnes infectées dans le monde. Il aura fallu un changement de mentalité conjuguée à d'importantes améliorations dans les traitements pour

permettre enfin un contrôle efficace de l'épidémie. L'apparition de la tri-thérapie antirétrovirale à partir de 2005 a permis de voir les premiers signes de diminution de la prévalence mondiale (Greene, 2007).

1.3. De l'infection au SIDA

1.3.1 Structure du VIH-1 (Figure 2)

Le VIH-1 est un rétrovirus mesurant 120 nm de diamètre. Il est composé de deux copies d'ARN simple brin mesurant 9749 nucléotides, protégés par une capside conique typique des *Lentivirus*, et qui encode pour 15 protéines. L'ARN viral est lié à la protéine p7 de la nucléocapside qui lui permet d'être protégé des nucléases présentes dans le cytoplasme de la cellule hôte. Dans la capside se trouve également la transcriptase inverse (TI) et l'integrase (IN), enzymes essentielles pour le cycle viral, ainsi que des protéine virales Vif (essentielle pour la réplication du virus en inhibant en particulier le facteur de restriction APOBEC3G), Vpr (nécessaire pour la réplication dans les macrophages et pour le transport nucléaire) ou encore Nef (essentielle dans le « piratage » de la machinerie cellulaire pour assurer un cycle viral persistant). Une matrice, constituée de la protéine virale p17, entoure la capside et contient les protéases, une enzyme qui clive les polyprotéines du VIH-1. Enfin, le virion est protégé par une membrane lipidique qui contient du cholestérol, héritée de la membrane de la cellule infectée d'où bourgeonne le virus. Des oligomères de glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41, essentiels pour l'entrée virale, sont insérés dans la membrane virale. Enfin des molécules de HLA de classe I et II ont été décrites à la surface des virions dont leur rôle n'est pas encore résolu (Campbell and Hope, 2015).

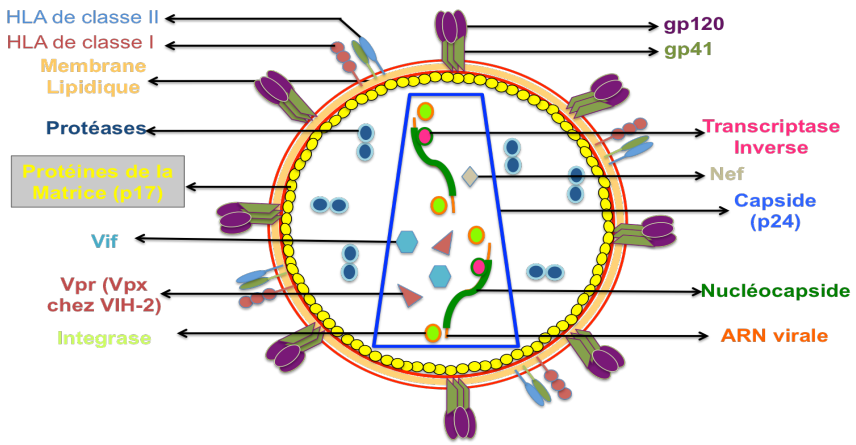


Figure 2 : Schéma de la particule virale du VIH-1 et de ses principaux composants

1.3.2 L'entrée virale (Figure 4)

Le VIH-1 a plusieurs voies d'infection : de la mère à l'enfant au moment de la naissance, par le partage de seringues usagées, et par les relations sexuelles. L'ARN viral est retrouvé en quantité plus importante dans le sang comparativement à d'autres fluides corporels comme le sperme, les sécrétions vaginales ou le lait maternel. La force du virus est de cibler les cellules centrales à une réponse immunitaire efficace : les lymphocytes T $CD4^+$ (LT $CD4^+$).

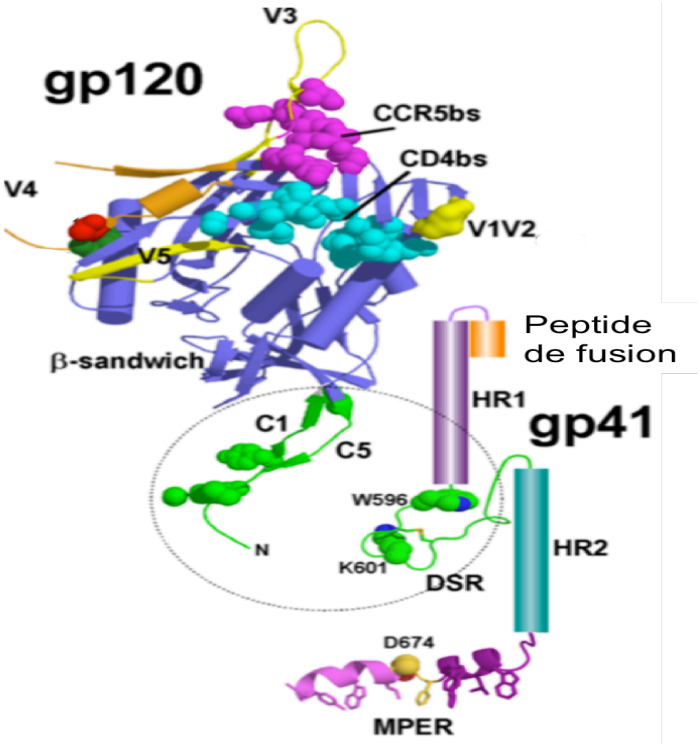


Figure 3 : Structure protéique des glycoprotéines gp120 et gp41 du VIH-1 : La gp120 est composée de cinq régions constantes (C1-C5) et variables (V1-V5). La gp41 est composée du peptide de fusion, de HR1, du DSR (pont disulfure), HR2 et MPER (Khasawneh et al., 2013)

L'entrée du virus fait intervenir sa glycoprotéine d'enveloppe qui est capable de se fixer à la cellule et de fusionner à sa membrane. Les protéines gp120 et gp41 sont associées de manières non-covalentes sous forme de hétérotrimères. La gp120 est responsable de l'attachement initial au récepteur CD4 et de l'interaction ultérieure avec un corécepteur. Elle est constituée de cinq régions constantes (C1-C5) séparées par autant de régions variables (V1-V5). Sa conformation en quatre brins β antiparallèles est composée d'un domaine interne protégé par un domaine externe. Ce dernier interagit avec le CD4 et les co-récepteurs (dont les principaux sont CCR5 et CXCR4) et peut être la cible d'anticorps neutralisants (**voir**

partie A-1.5.1). La gp41 permet l'ancrage de la gp120 à la particule virale et est responsable du mécanisme de fusion membranaire. Elle possède un ectodomaine, correspondant à la partie N-terminale de la protéine, une des régions les plus conservées entre les multiples souches de VIH-1 et qui forme le peptide de fusion. La gp41 comprend également deux domaines en hélices alpha HR-1 et HR-2, liés entre eux par des ponts disulfures (DSR). HR2 est en amont d'une région appelé MPER (Membrane Proximal External Region), qui est une cible privilégiée pour bloquer le virus **(Figure 3)** (Engelman and Cherepanov, 2012).

Comme décrit sur la **figure 4**, la première étape de l'entrée virale est donc l'interaction entre le gp120 et le CD4 qui va amorcer un changement de conformation notamment dans l'agencement de ses domaines internes et externes. La flexibilité du CD4 va permettre à la particule virale d'interagir avec les co-récepteurs par sa boucle variable V3. Ce dernier est le principal déterminant du tropisme viral qui conditionne le choix du co-récepteur qui est généralement CCR5 ou CXCR4. Cette interaction va permettre l'émergence d'un trimère de gp41 qui exposera son peptide de fusion : c'est la structure de pré-fusion ou de « pré-hairpin ». D'autres changements de conformation vont avoir lieu impliquant le HR-1 et HR-2 qui conduira à la formation d'une structure complexe et thermostable : « six-helix bundle ». Pendant ce processus, la fusion des membranes a lieu permettant au virus de libérer son contenu viral dans le cytoplasme de la cellule. C'est l'étape finale nommée post-fusion (Engelman and Cherepanov, 2012; Nisole and Saïb, 2004; Wilen et al., 2012).

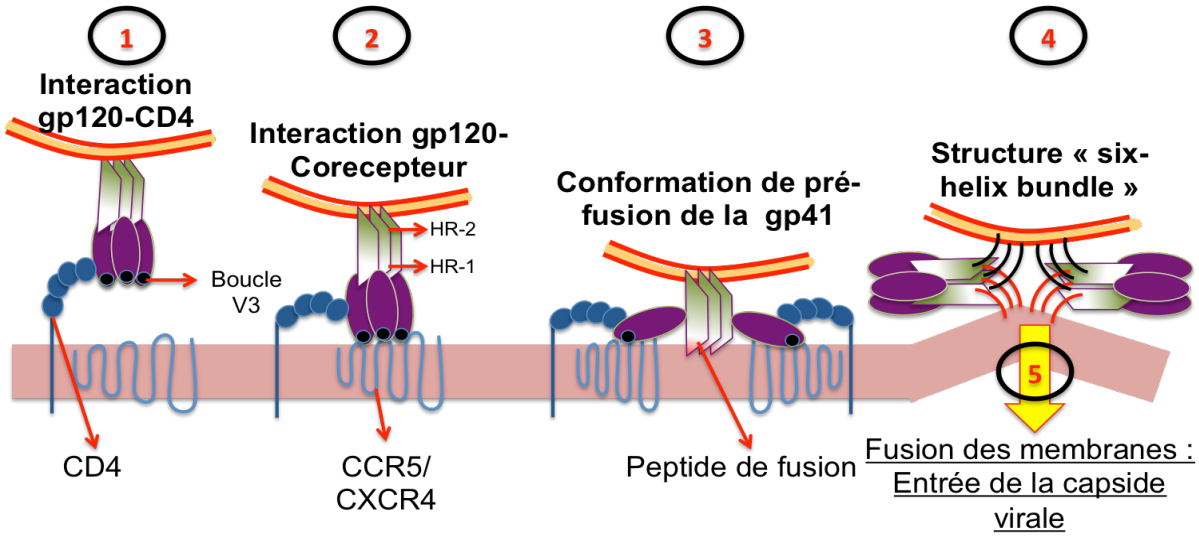


Figure 4 : Schéma des mécanismes d'entrée du VIH-1 dans la cellule cible : L'entrée virale peut être schématiquement résumé en 4 étapes. **(1)** L'interaction entre la gp120 et le CD4 **(2)** puis son interaction avec un des co-récepteurs du VIH-1 **(3)** qui permet d'exposer le peptide de fusion de la gp41 **(4)** afin de former la structure de fusion. **(5)** La post-fusion correspond à la libération du contenu viral dans le cytoplasme.

1.3.3 Phase précoce (figure 5, panneau de gauche)

La capside virale va subir une décapsidation qui génère des sous-particules virales nommées Complexe de Transcription Inverse (CTI) où a lieu la synthèse des brins d'ADN à partir de l'ARN viral. En fin de transcription, le CTI va devenir un Complexe de PréIntégration (CPI) qui est composé principalement de l'ADN viral néoformé, de l'IN, de la protéase, de la TI et de Vpr. Ce complexe va permettre le transport de l'ADN vers le noyau en utilisant vraisemblablement le réseau des microtubules afin d'intégrer l'ADN viral dans les chromosomes. Contrairement à la plupart des rétrovirus, la particule virale du VIH-1 ne doit pas nécessairement attendre la mitose de la cellule et donc l'ouverture du noyau pour s'y introduire. En effet, les protéines du CPI (principalement Vpr) ont des propriétés particulières permettant le passage par les pores du noyau. Une fois à l'intérieur, le CIP se dirige vers la chromatine où l'ADN viral est introduit à l'aide de l'IN et d'autres molécules de la cellule hôte (Nisole and Saïb, 2004; Wilen et al., 2012). Il peut alors persister **(voir partie A-1.4.2)** ou être transcrit pour former de nouveaux virions.

1.3.4 Phase tardive (figure 5, panneau de droite)

La transcription fait intervenir la protéine virale Tat pour la production de multiples ARN messagers viraux de tailles différentes. Les plus petits sont directement exportés du noyau vers le cytoplasme tandis que les autres font intervenir la protéine virale Rev pour être exportés. Dans le cytoplasme, l'ARN viral est traduit en glycoprotéine de l'enveloppe (la gp160, précurseur des protéines d'enveloppes gp120 et gp41), en un précurseur de la protéine Gag (contenant les protéines de la matrice, la capside et la nucléocapside) et en polyprotéine GagPol (contenant en plus la protéase, la TI et l'IN). La protéine d'enveloppe est conduite vers la membrane cellulaire dans une vésicule. Gag recrute l'ARN viral génomique, se multimerise et rejoint à son tour la membrane plasmique. GagPol rejoint le nouveau complexe formé par la protéine Gag et l'ARN viral et incorpore Env pour recruter des protéines cellulaires afin d'être libéré par bourgeonnement. Enfin la maturation du virion s'effectue en clivant la protéine Gag et GagPol formant ainsi la capside conique (Freed, 2015).

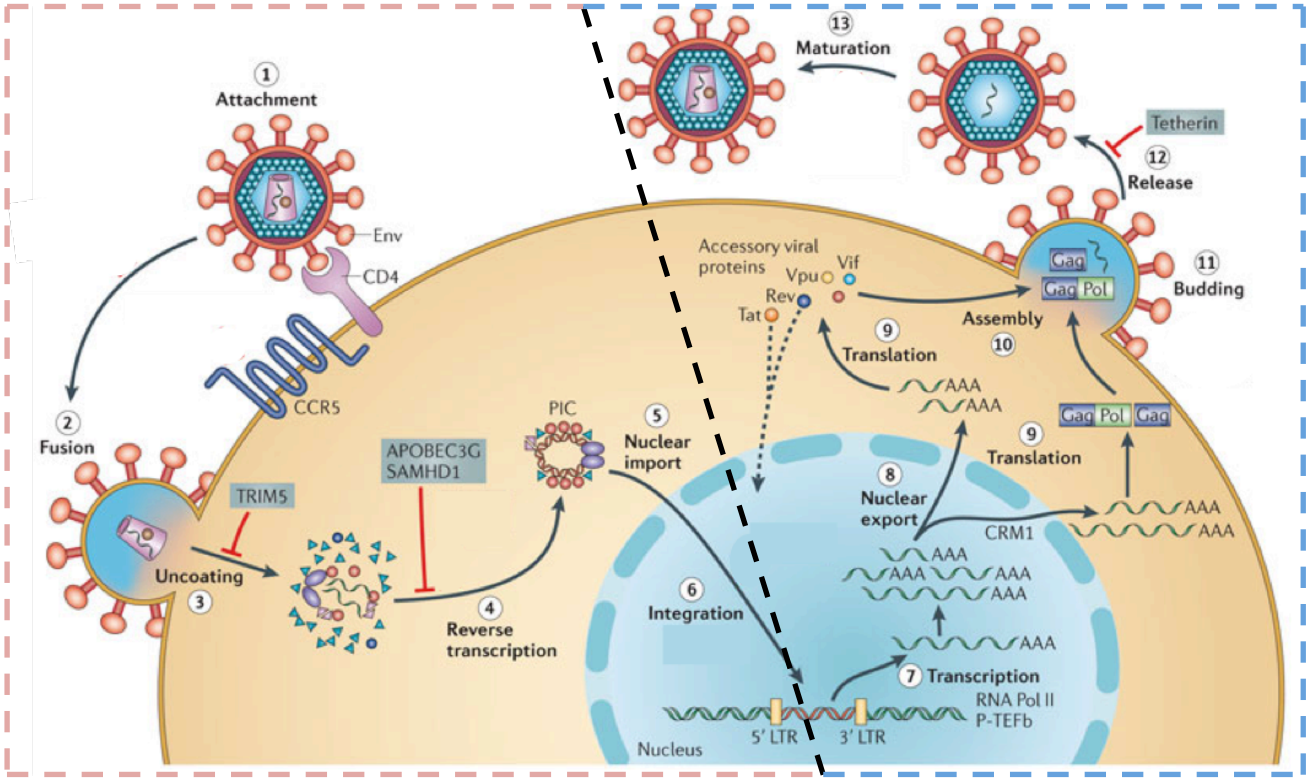


Figure 5 : Schéma du cycle viral du VIH-1 : Après la fusion de la particule virale à la membrane cellulaire, les produits de la capside sont libérés dans le cytoplasme. Des CTI vont se former afin de synthétiser l'ADN viral, qui est transporté dans le noyau cellulaire sous forme de PIC et intégré dans la chromatine. Des ARNm sont transcrits et exportés dans le cytoplasme. Ils sont traduits en plusieurs protéines afin de former les nouveaux virions à la membrane cellulaire. Les particules virales vont bourgeonner dans le milieu extérieur. L'étape de maturation, par le clivage des polyprotéines, permet de former la capside. Les molécules encadrées, inhibant des étapes du cycle viral, sont des facteurs de restriction viraux innés à la cellule. (Engelman and Cherepanov, 2012)

1.3.5 La physiopathologie du VIH-1

L'infection par la voie sexuelle représente plus de 80% des infections du VIH-1. Au niveau des muqueuses génitales, le virus peut traverser la barrière muqueuse par transcytose après laquelle il entre généralement en contact avec des cellules dendritiques (DC). Le VIH-1 se fixe à la surface des DC par le biais du récepteur DC-SIGN qui permet au virus d'atteindre les LT $CD4^+$ (Hertoghs et al., 2017; McMichael et al., 2010). De plus, l'inflammation induite par l'infection va favoriser le recrutement d'autres LT $CD4^+CCR5^+$. Suite à ces évenements, une phase « d'éclipse » a lieu pendant environ 10 jours au cours desquels l'ARN viral n'est pas détecté. À la fin de cette phase, le virus et/ou les cellules infectées rejoignent la circulation lymphatique puis les ganglions. Le virus se propage alors rapidement à d'autres tissus lymphoïdes et spécifiquement dans le GALT (Gut-Associated Lymphoid Tissue) où des LT mémoires activés $CD4^+CCR5^+$ sont présents en grande quantité. Environ 80% des LT $CD4^+$ dans le GALT sont détruits en trois semaines. La réplication virale atteint alors un pic

avec plus d'un million de copies d'ARN par millilitre de sang. Le taux de LT $CD4^+$ diminue de façon parfois importante lors du pic viral mais il revient à un niveau normal dans le sang mais pas dans le GALT. Les cellules B sont indirectement touchées car plus de 50% des centres germinatifs dans l'intestin sont perdus trois mois après l'infection (McMichael et al., 2010). Le virus n'étant pas encore entré dans une phase d'échappement par mutation, la charge virale va diminuer et se stabiliser. Cette phase de latence peut durer entre 5 à 10 ans, en l'absence de traitements antirétroviraux. Durant cette période, la pression exercée par la réponse immunitaire adaptative sur la réplication du virus va engendrer l'apparition de nouveaux mutants. De plus, l'activation chronique du système immunitaire a pour conséquence son affaiblissement et donc la résurgence d'une réplication virale forte. Avant la mise en place de traitement antirétroviraux efficaces, les maladies opportunistes apparaissaient lors du stade SIDA et elles entrainaient rapidement la mort. Actuellement, la prise de ces traitements permet même aux personnes étant au stade SIDA de revenir à une phase de latence, avec une remontée du taux de LT $CD4^+$ (Brenchley and Douek, 2008; McMichael et al., 2010).

1.3.6 Particularités du VIH-2

La principale différence entre les infections associées aux VIH-1 et VIH-2 est que la progression vers le stade SIDA est beaucoup plus lente chez les personnes infectées par le VIH-2. De plus, l'infection par le VIH-2 se limite principalement à l'Afrique de l'Ouest. Une grande proportion des individus infectés par le VIH-2 contrôle leur infection et restent asymptomatique tout en maintenant une charge virale indétectable. Une plus grande espérance de vie est ainsi observé chez ces individus (Thiébaut et al., 2011).

Les caractéristiques biologiques principales de l'infection par le VIH-2 sont une charge virale beaucoup plus basse que celle du VIH-1 à des périodes similaires de l'infection (Gottlieb et al., 2006) et une diminution des LT $CD4^+$ beaucoup plus lente. En revanche, lorsque la maladie progresse pour les individus infectés par le VIH-2, synonyme d'une charge virale haute, la sévérité du SIDA est comparable à celle observée avec le VIH-1 avec cependant des infections opportunistes différentes. La prise de traitement anti-VIH-1 est moins efficace pour les patients VIH-2 probablement du fait de la grande variabilité génétique entre les deux virus. En effet, ils ne partagent que 60% d'homologie entre leur protéine Gag, leur protéase diffère de plus de 50% et le VIH-2 a une protéine Vpx en plus de la protéine Vpr (Nyamweya et al., 2013). Vpx est l'inhibiteur du facteur de restriction SAMHD1 qui peut

inhiber le cycle viral chez les cellules dendritiques, myéloïdes (Laguette et al., 2011) et les LT $CD4^+$ quiescents (Descours et al., 2012). Le VIH-2 peut utiliser un plus grand nombre de co-récepteurs pour entrer dans la cellule et son taux de mutation est beaucoup plus élevé (Nyamweya et al., 2013). Enfin, *in vitro,* les deux virus sont tout aussi infectieux mais le taux de réplication du VIH-2 est 100 fois plus lent que celui du VIH-1 (Schramm et al., 2000). Ainsi, toutes ces caractéristiques suggèrent que le VIH-2 devrait échapper plus efficacement au système immunitaire. Paradoxalement, les réponses immunes ont une action plus efficace dans le contrôle de l'infection par le VIH-2. Ceci pourrait partiellement s'expliquer par le fait que la boucle V3 de la gp120 possède beaucoup moins de sites de glycosylation, ce qui pourrait permettre une meilleure induction de la réponse immunitaire capable de bloquer l'entrée virale (Shi et al., 2005). **(Voir partie A-3.1.1)**. Actuellement, la prévalence pour cette infection diminue et est remplacée par le VIH-1 en Afrique de l'Ouest (Peeters et al., 2014). L'infection par le VIH-2 reste malheureusement un modèle peu exploré alors qu'il pourrait permettre de mieux appréhender les mécanismes associés au contrôle de l'infection VIH.

1.4. Traitements et objectifs actuels

1.4.1 Évolution des traitements

Lors de la découverte du SIDA, seules les infections opportunistes pouvaient être traitées mais cela avait peu d'effet sur le devenir du patient. Après l'identification du VIH-1, l'AZT fut le premier traitement antirétroviral mis en place en 1987. Il bloquait la transcription inverse du VIH-1 et permettait de réduire la mortalité ainsi que l'apparition d'infections opportunistes. Mais rapidement, le VIH-1 devint résistant au médicament. En 1996, la thérapie par combinaison de plusieurs antiviraux (cARV) fut mise au point. Avec les progrès de la recherche et l'identification de nouvelles cibles contre le VIH, les cARV ont été améliorés pour le bien être des patients et surtout permettre un meilleur contrôle du VIH. Ils peuvent être classés en six groupes en fonction de l'étape du cycle viral ciblé : les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse, les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse, les anti-protéases, les inhibiteurs de fusion, les inhibiteurs de l'intégrase et les inhibiteurs d'entrée. Ces multitudes de drogues permettent de s'adapter à la variabilité des infections entre les individus. Elles peuvent être prises en une seule dose par jour ce qui facilite leur prise en charge par le patient. Surtout, ces molécules sont désormais accessibles financièrement. Il est cependant important de noter que des problèmes de résistance peuvent

être associé à ces traitements s'ils sont mal suivis par exemple (Calvez et al., 2017; Todesco et al., 2015).

Le principal problème lié à ce virus est qu'il est actuellement impossible à éradiquer car les cARV ne font que contrôler la réplication virale. De plus, les drogues n'ont pas accès à tous les sites infectés par le VIH-1. C'est donc un traitement à vie qui est responsable de l'apparition de comorbidités comme des pathologies cardiovasculaires, hépatiques, rénales, métaboliques ou de certains cancers et ce d'autant plus chez des patients ayant été traités à un stade avancé de l'infection (Guiguet et al., 2009; Taiwo et al., 2013).

Plus récemment, une nouvelle stratégie ciblant les personnes à risques a été mise en place : « Pre-Exposure Prophylaxis » ou PrEP. Il s'agit d'un traitement en prévention (ou prophylaxie) pour les communautés les plus touchées par l'infection (HSH, travailleurs du sexe, consommateurs de drogues, ...). De récents essais cliniques ont montré que la prise quotidienne de PrEP permet de se protéger de la transmission du VIH-1 lors de rapports risqués. Mais cela reste une solution à court terme pour endiguer la propagation du virus. De plus, il est envisageable que le VIH-1 échappe à l'action de ces drogues à long terme (Nikolopoulos et al., 2017; Parikh and Mellors, 2016).

1.4.2. Les réservoirs du VIH-1

L'ADN viral du VIH-1 persiste dans des LT $CD4^+$ mémoires au repos et est inaccessible aux traitements actuels. Ces réservoirs sont donc un frein au développement d'une « cure » pour le VIH-1. De plus, il a été démontré dans un modèle macaque infecté par le VIS que malgré l'initiation d'un traitement 3 jours après l'infection, l'établissement du réservoir reste possible (Whitney et al., 2014). Malgré le traitement par cARV, l'activation immunitaire et l'inflammation chronique persistent, permettant au virus de se répliquer et de remplir les réservoirs (Lorenzo-Redondo et al., 2016). Récemment le récepteur CD32a (FcγRIIa) a été identifié comme un marqueur spécifique du principal réservoir LT $CD4^+$ du VIH-1, pouvant même être observé précocement dans l'infection (Descours et al., 2017; Martin et al., 2017). Ces récentes découvertes pourraient permettre d'éradiquer ce réservoir en ciblant cette population, bien que ce récepteur soit également présent sur beaucoup d'autres populations cellulaires.

Le cas unique d'une éradication totale du VIH-1 est connu comme le « patient de Berlin » infecté par le VIH-1 et qui avait été diagnostiqué avec une leucémie myéloïde aiguë. Ce patient a alors été greffé avec des cellules souches $CD34^+$ allogéniques qui étaient homozygotes pour la mutation CCR5Δ32. Apres la greffe, la réplication virale n'a pas repris malgré l'arrêt du cARV. Malgré cette réussite, une greffe de cellules souches hématopoïétiques n'est techniquement pas envisageable comme un traitement du VIH-1 (trop de risque, couteux et complexe) (Hütter et al., 2009; Symons et al., 2014).

Enfin, une stratégie nommée « shock & kill » a été envisagée avec notamment l'apparition d'inhibiteurs de l'histone deacétylase et d'autres molécules pouvant « réveiller » le virus latent afin de le signaler au système immunitaire. Malheureusement, les effets cliniques de la réactivation du virus semblent très modestes avec un réservoir VIH toujours présent. (Barton et al., 2016; Katlama et al., 2013)

Ces différents points ont fait l'objet d'un article de synthèse, dont je suis co-auteur, qui est présenté en Annexe 1.

1.4.3 Objectifs 90-90-90

Pour en finir totalement avec le VIH et en absence d'un résultat significatif dans le domaine vaccinal, un objectif nommé 90-90-90 a été mis en place par l'ONUSIDA en 2014 afin que d'ici à 2020, 90% de personnes soient dépistées, dont 90% sous traitement et 90% avec une charge virale indétectable. En effet, un traitement rapide avec les cARV pour supprimer la charge virale permet de réduire la mortalité liée au VIH-1 ainsi que sa transmission, tout en garantissant une meilleure qualité de vie. Au niveau mondial, les résultats récents sont extrêmement encourageants : la mortalité continue à diminuer pour atteindre 1 million de décès en 2016. Particulièrement en Afrique de l'Est et du Sud, le taux de décès a diminué de 62%. En revanche, le Moyen-Orient et l'Afrique du Nord ainsi que des régions de l'Europe de l'Est et d'Asie centrale ont vu leur taux de mortalité augmenter respectivement de 48% et 38%. En ce qui concerne les nouvelles infections par an, depuis 2010 leur nombre a diminué de 16%, un rythme trop faible pour atteindre le 90-90-90 en 2020. En Europe de l'Est et en Asie Centrale ce taux a dramatiquement augmenté de 60% **(Figure 6)**. Ainsi en 2017, les données communiquées par l'ONUSIDA font rapport de 70% de personnes infectées connaissant leur statut séropositif, dont 77% sont sous cARV et dont 82% ont une charge virale indétectable. Des pays ont en revanche déjà atteint l'objectif 90-90-

90 principalement en Europe de l'Ouest et en Amérique du Nord. Pour atteindre cet objectif à un niveau planétaire des efforts supplémentaires, particulièrement financiers, devront être réalisés (ONUSIDA, rapport 2017). L'objectif 95-95-95 (envisagé pour 2030) pourrait permettre une protection complète vis-à-vis de cette infection et ainsi que son éradication à moyen terme. Un échappement viral est toujours envisageable et le facteur social ne peut être contrôlé de la même façon dans chaque pays. Ainsi, il semble encore que le vaccin pouvant cibler le VIH-1 et l'éliminer totalement reste la meilleure solution pour éradiquer ce virus, comme cela fut le cas pour d'autres infections telle que la variole.

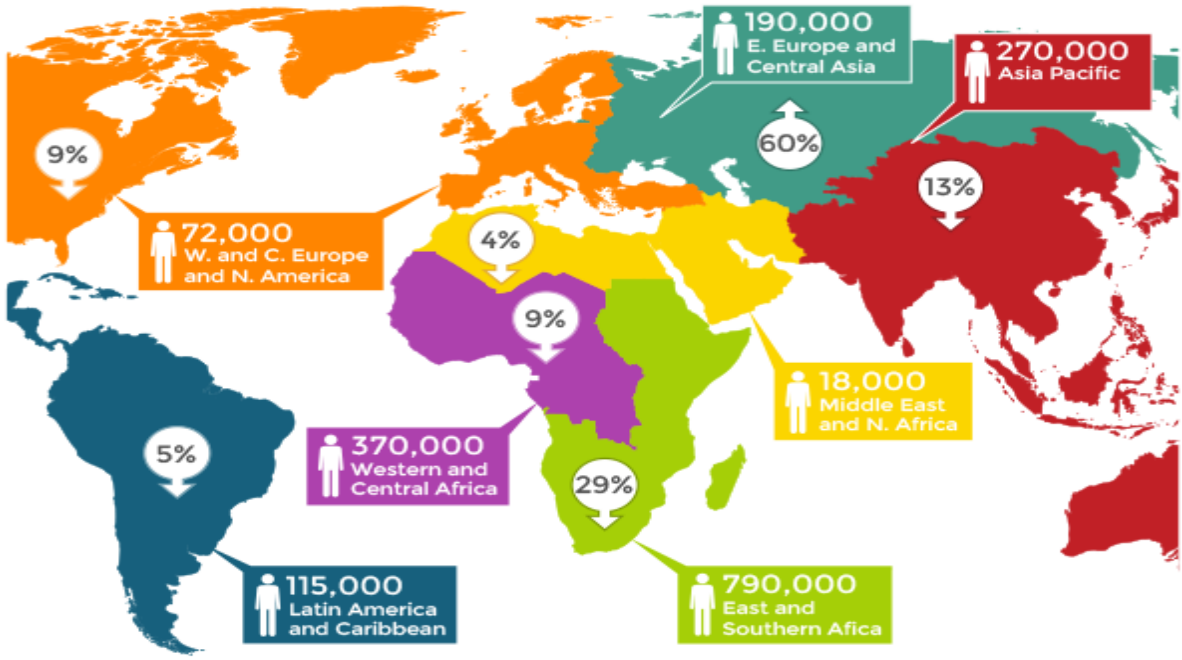


Figure 6 : Nombre de nouvelles infections VIH-1 en 2016 (encadré) et évolution des nouvelles infections depuis 2010 (entouré) (d'après AVERT, source des données ONUSIDA 2017)

1.5. Recherche vaccinale

Depuis presque 30 ans, la recherche de vaccin contre le VIH-1 n'a pas vraiment abouti. Seuls six vaccins prophylactiques anti-VIH-1 ont atteint les essais d'efficacité dits de phase III. Le seul résultat clinique encourageant fut en 2009 l'essai clinique RV144 en Thaïlande qui a montré la possibilité de protéger 31% des patients à risque enrôlés dans l'étude (Rerks-Ngarm et al., 2009). L'étude des réponses immunitaires dans cet essai a mis en évidence l'absence de réponses T spécifiques et d'anticorps neutralisants, mais la présence d'anticorps non neutralisants ciblant la région V2 et qui induisent une forte réponse ADCC (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity) contre les LT $CD4^+$ infectés par le VIH-1

(Kim et al., 2015). En partant de ces données, des nouveaux essais cliniques sont menés consistant à changer le régime de vaccination, les composants antigéniques (Cohen and Frahm, 2017) ou encore les adjuvants (Rao and Alving, 2016).

La vaccination doit éduquer le système immunitaire en induisant une réponse cellulaire T et humorale très spécifique et efficace, afin de produire des anticorps pouvant neutraliser l'entrée virale. La difficulté d'induire de telles réponses est au cœur de la recherche vaccinale. Jusqu'à récemment, la majorité des stratégies vaccinales qui ont été développées étaient plus particulièrement dirigées vers la mise en place d'une réponse T spécifique. À présent, les nouvelles stratégies semblent plus particulièrement cibler les anticorps neutralisants ou non neutralisants capable d'ADCC.

1.5.1 Les anticorps neutralisants (AcNs) à large spectre

Des AcNs efficaces obtenus par vaccination permettent la protection vis-à-vis de maladies infectieuses telles que la fièvre jaune ou la variole (Amanna et al., 2008). Leur rôle central dans la protection contre le VIH-1 reste un débat encore ouvert. L'unique cible des AcNs est la glycoprotéine ENV (gp120 et gp41), une structure complexe protégée par des glycosylations (Munro et al., 2014; Pancera et al., 2014). En effet, beaucoup de personnes infectées développent des AcNs qui peuvent cibler plusieurs sites sur la gp120 et la gp41 après plusieurs années d'infection. En revanche seulement 10 à 25 % des individus infectés développent des AcNs puissants et à large spectre contre une multitude de souches VIH-1 (Hraber et al., 2014; Mikell et al., 2011; West et al., 2014). Des anticorps monoclonaux (Acm) ont été isolés de patients infectés par le VIH-1 et capables de neutraliser *in vitro* un large panel de virus circulants. On peut citer comme exemple le 3BNC117 et le PGT121 qui pendant une courte période sont capables de bloquer l'infection et de supprimer la virémie après injection chez des macaques infectés par le Simien/VIH (SVIH) (Barouch et al., 2013). De plus, une étude chez des individus infectés a montré qu'une simple immunisation passive de 3BNC117, ciblant le site de liaison de la gp120 au CD4, permet de diminuer la charge virale pendant 28 jours (Caskey et al., 2015). Un autre AcNs à large spectre puissant nommé 35O22, neutralise 62% des 181 souches de VIH-1 testées avec une IC50 médiane (concentration nécessaire pour au moins bloquer 50% de l'infection virale) de 0.03 µg/ml (Huang et al., 2014). Il est cependant important de noter que tous ces AcNs reconnaissent des épitopes conformationnels et ne peuvent actuellement pas être générés à partir d'une séquence peptidique ; ce qui limite leur utilisation dans une stratégie vaccinale **(figure 7A)**.

Afin de reproduire ces effets neutralisants avec un vaccin, une connaissance plus approfondie de la génération d'AcNs pendant l'infection VIH-1 est nécessaire. Les caractéristiques de maturation particulière des AcNs les rendent extrêmement difficiles à induire. En effet, la réponse neutralisante à large spectre se développe entre 2 à 4 ans après l'infection et seuls les AcNs isolés chez des patients en phase chronique sont efficaces, suggérant qu'ils sont produits après une sélection continue en réponse à la réplication et à des hyper-mutations du VIH-1. Les AcNs ont des mutations somatiques très nombreuses dans les régions CDR (Complementarity Determining Regions = régions les plus variables des anticorps déterminant leurs avidités) et Frameworks (régions plus constantes entourant les CDR). De plus, des modifications post-traductionnelles complexifient les AcNs expliquant leur rareté (Corti and Lanzavecchia, 2013) **(figure 7B)**. Une autre caractéristique de certains AcNs est de présenter de longues régions CDR H3 (jusqu'à 33 AA) spécifiquement lorsqu'ils ciblent les régions V1/V2, V3, MPER ou encore les régions liant la gp120 et la gp41 (Yu and Guan, 2014). Une étude chez la vache a été mise en place sachant que leurs anticorps ont de très longs CDR H3 (jusqu'à plus de 70 AA). L'immunisation avec une glycoprotéine de l'enveloppe virale, a montré qu'une rapide et puissante génération d'AcNs est possible chez les quatre vaches testées. L'un des Acm isolés est capable de neutraliser 72% des 117 souches testées avec une IC50 médiane de 0,028 µg/ml (Sok et al., 2017). Néanmoins, des AcNs à large spectre ont été décrit avec des CDR H3 courts tel que le BG18, avec une fonction proche du PGT121, et qui est présent chez un « contrôleur virémique » (Freund et al., 2017).

Afin de stimuler la génération d'AcNs, il faut surtout identifier et construire des immunogènes qui miment les épitopes (Sadanand et al., 2016). Des protéines mimant le trimère gp120/gp41 telle que BG505 SOSIP.664 permettent de présenter de multiples épitopes inducteurs d'AcNs (Sanders et al., 2013). En revanche, la sous-unité gp41 est beaucoup plus conservée que la gp120, dû au mécanisme de fusion commun à toutes les souches. En particulier, une région spécifique et très conservée de la gp41 nommée 3S, a été mise en évidence dans le laboratoire (Vieillard et al., 2005). Une étude par mutagenèse dirigée de type « alanine scanning » (mutation ponctuelle de chaque acide aminé par une alanine) sur le motif 3S a été effectuée et a mis en évidence que l'intégrité de certains des résidus est nécessaire à l'infection et plus particulièrement un résidu tryptophane (W). L'immunisation de souris avec le peptide modifié de cette région nommé W614A-3S (avec la substitution du résidu tryptophane par une alanine) a permis de générer des anticorps présentant une activité neutralisante vis-à-vis d'un vaste panel de souches virales provenant de différents clades. Il

est important de noter que ces anticorps sont naturellement présents dans environ 5% de patients infectés de type progressseur (Petitdemange et al., 2013). En lien avec cette étude, il a été récemment décrit que des changements d'acides aminés dans la région MPER induit une sensibilité à la neutralisation (Bradley et al., 2016).

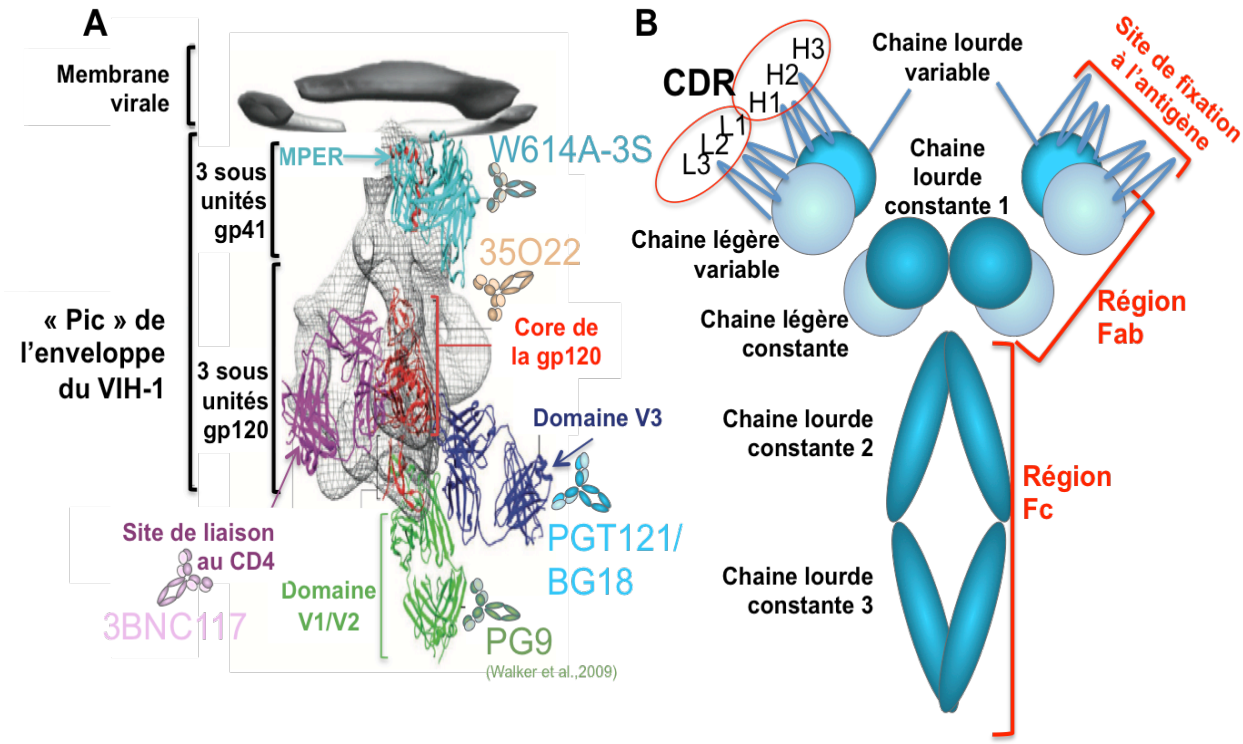


Figure 7 : Régions de la protéine d'enveloppe du VIH-1 ciblées par la réponse anticorps neutralisante : **(A)** Schéma des régions du VIH-1 sensible à certains anticorps neutralisants. On peut noter la boucle V1/V2 (Walker et al., 2009) et V3 ainsi que la région de liaison au CD4 et le MPER de la gp41. D'autres régions sont immunogènes mais moins accessibles et donc moins génératrices d'AcNs (d'après Kwong et al., 2013) **(B)** Schéma d'un anticorps et de ses multiples régions.

1.5.2 Essais cliniques actuels

Un essai clinique peut être décomposé en trois ou quatre phases, après plusieurs études précliniques intenses *in vitro* et *in vivo* réalisées dans différents modèles d'animaux. La phase I sur une petite population de sujets sert à démontrer la sécurité du vaccin. La phase II sur une population de sujets plus importante sert à chercher la dose optimale et à démontrer l'efficacité du vaccin. La phase III est réalisée sur une très large population pour tester la sécurité, l'efficacité et la reproductibilité des résultats obtenus en phase II. Après cette phase, le vaccin peut être validé par les instances de contrôle pour être commercialisé. Malgré tout, une phase IV est menée afin de confirmer la sécurité et identifier d'autres effets secondaires non détectés précédemment. Un essai clinique va durer au minimum une dizaine d'années et

avoir un coût très important. Dans le cas du vaccin anti-VIH-1, seuls quelques vaccins prophylactiques ont atteints la phase III, dont le RV144 précédemment cité.

Actuellement, de nouveaux essais cliniques pour des vaccins thérapeutiques et prophylactiques sont en cours. Les composants du vaccin (principalement l'antigène (peptides, protéines virales, virus inactivé), les agents de conservation et l'adjuvant) doivent être rigoureusement sélectionnés. Ils permettent de définir la préparation vaccinale optimale pour obtenir une immunisation efficace avec un minimum de risque pour l'individu. En effet en fonction des composants, le vaccin peut orienter vers un certain profil immunitaire en recrutant des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et/ou en stimulant la production de certaines cytokines et/ou chimiokines. Actuellement les recherches s'orientent plutôt vers l'optimisation des adjuvants car ils sont primordiaux dans l'induction de la réponse immunitaire et le maintien de l'antigène dans l'organisme lors de l'injection. Il a également été proposé que des mélanges de différents adjuvants peuvent favoriser la réponse immunitaire et diminuer le ratio risque/bénéfice (Awate et al., 2013; Rao and Alving, 2016).

a) Vaccins thérapeutiques

Contrairement au vaccin prophylactique, aucun vaccin thérapeutique n'a atteint la phase III. Le but d'un tel vaccin est de traiter les personnes infectées sous cARV ou non, en éduquant le système immunitaire pour qu'il élimine efficacement le virus. Ces vaccins peuvent être composés de vecteurs viraux dérivés d'adénovirus ou de cytomegalovirus (CMV) combinés à des protéines ou de l'ADN viral afin d'induire une réponse immunitaire de type LT $CD8^+$ associée à une réponse B spécifique (Barouch and Picker, 2014). Une autre stratégie implique l'utilisation d'épitopes très conservés de la protéine d'enveloppe du VIH-1 sous forme de peptides. Cela permet d'éviter des complications observées avec les complexes viraux et permet un schéma de vaccination relativement simple. Pour rappel, on peut utiliser la gp41 qui est la protéine la plus conservée du VIH-1 avec très peu de sites de glycosylation contrairement à la gp120. Le motif 3S de la gp41 a permis de développer le vaccin VAC-3S afin de bloquer l'interaction entre le motif 3S et le récepteur de la forme globulaire du facteur du complément C1q (gC1qR) qui induit un déclin des LT $CD4^+$ **(Voir également partie B-3.3.3)** (Vieillard et al., 2005; Fausther-Bovendo et al., 2010). Des expériences d'immunisation chez le macaque par un peptide de 15 acides aminés couvrant la région 3S ont montré un effet majeur sur les macaques en réduisant la déplétion en LT $CD4^+$ (Vieillard et al., 2008a, 2008b, 2012). Ainsi, bloquer l'interaction 3S/gC1qR chez des patients infectés par le VIH-1

permettrait de protéger les LT $CD4^+$ et de diminuer l'activation chronique permettant la restauration de l'homéostasie immunitaire. Un essai de phase I/II sur 33 patients infectés par le VIH-1 sous cARV a montré que le vaccin administré par voie intramusculaire (à 0, 4 et 8 semaines) était sans danger et immunogène. De plus six mois après la première immunisation, il a été observé chez les patients immunisés une augmentation du pourcentage de LT $CD4^+$ et du ratio LT $CD4^+/CD8^+$. Les données d'un essai de phase II sur 90 patients sont en cours d'analyse (Vieillard et al., 2016, Article en Annexe 1).

b) Vaccins prophylactiques

Le but d'un vaccin prophylactique est de prévenir la transmission de l'infection en induisant une réponse mémoire efficace contre les multitudes de souches VIH-1. Cela permettrait de prévenir de nouvelle infection et d'éliminer le virus à long terme au niveau de la population. On peut citer le projet APPROACH qui est un vaccin contenant une mosaïque d'épitopes viraux délivrés par un vecteur adénovirus. Les résultats montrent une immunogénécité de 100%, ce qui suggère que l'immunité acquise pourrait protéger d'une infection par le VIH-1 (Barouch et al., IAS PARIS 2017).

Sachant que l'entrée du VIH-1 se fait principalement par les voies sexuelles au niveau des muqueuses génitales ou rectales, le but est d'y développer une réponse immunitaire anti-VIH-1 pour bloquer la transmission au partenaire sain. Il a été observé que chez des patients séronégatifs fortement exposés à l'infection sexuelle par le VIH-1 que l'induction d'IgA dimériques participe à la protection au niveau des muqueuses (Tudor et al., 2009). En effet, le VIH-1 doit traverser la barrière muqueuse par la voie de transcytose en interagissant avec le Galactosyl Céramide (GalCer) présent à la surface des cellules épithéliales pour atteindre ses cellules hôtes. Le virus interagit avec le GalCer au niveau d'une région conservée de la gp41 nommée P1 (résidus 650 à 685) (Alfsen and Bomsel, 2002). Par étapes successives le potentiel anti-VIH-1 de ce motif a été montré par une immunisation peptidique chez la souris qui induit des IgA bloquant la trancytose du virus *in vitro* (Matoba et al., 2006). Ceci a été confirmé dans un modèle de lapin (Matoba et al., 2008) et finalement chez le singe. Chez le singe la formulation vaccinale est différente : un virosome (particule virale non réplicative qui stimule efficacement les CPA) est utilisé comme vecteur de deux antigènes du VIH-1 : le peptide P1 et une gp41 trimérique délétée de ces régions immuno-dominantes afin de favoriser une réponse protectrice contre les épitopes de l'enveloppe du VIH-1. Plusieurs vaccinations par voie intramusculaire et intranasale permettent une protection totale contre 13

épreuves avec du Simien/VIH au niveau de la muqueuse vaginale grâce à l'induction des IgA anti-gp41 bloquant la transcytose (Bomsel et al., 2011). Enfin, une étude de phase I a montré le caractère non toxique et immunogène de ce vaccin et l'acquisition d'une activité antivirale médiée par des IgA spécifiques de la gp41 au niveau des muqueuses (Leroux-Roels et al., 2013). Des études complémentaires sont actuellement en cours. Ces vaccins prophylactiques, comme pour le RV144, devront être testés sur des populations à risques pour véritablement mesurer leur niveau de protection.

2. Virus de l'Hépatite C

Le VHC est un pathogène ciblant principalement les hépatocytes (cellules du foie) et conduisant à de graves pathologies comme l'hépato-carcinome ou la cirrhose. Il a été caractérisé à la fin des années 1980 et a déjà infecté 71,1 millions de personnes dans le monde (une prévalence de 1% contre 0.5% pour l'infection VIH) (Polaris Observatory HCV Collaborators, 2017). Contrairement au VIH, le virus peut être éliminé par l'hôte. Mais cela ne se produit que naturellement dans 25% des cas. En effet dans les 75% restants, il échappe à la réponse immunitaire pour perdurer dans le foie. Heureusement en 2013, des nouveaux traitements permettant une élimination totale du virus ont été mis à disposition. Quatre ans plus tard, ces traitements ont confirmé leur haut potentiel thérapeutique avec 99% des patients traités totalement guéris du VHC (Grebely et al., 2017; Polaris Observatory HCV Collaborators, 2017). L'objectif des instances publiques est ainsi d'éliminer l'hépatite C avant 2030.

2.1 Découverte du VHC : histoire d'une pandémie oubliée

Les premiers signes du VHC furent identifiés en 1975 suite à une transfusion sanguine et l'apparition d'une hépatite qui n'était due à aucun des virus de l'Hépatite A ou B. Cette nouvelle pathologie fut donc nommée hépatite Non-A Non-B (NANBH). Il fallut plus de 10 ans pour l'identifier formellement malgré la mise en place rapide d'un modèle d'infection aiguë et chronique chez le chimpanzé. La difficulté à caractériser le VHC s'explique par une différence au niveau protéique et génétique avec les virus déjà décris. Finalement en 1988, en mettant en contact plusieurs sérums humains infectés par le NANBH avec une grande banque d'ADN bactérien construite à partir du matériel génétique présent dans le plasma de singes infectés, l'équipe du Pr. Houghton a pu enfin détecter un clone d'anticorps spécifique du VHC. Ceci a surtout permis de mettre en place les tests diagnostiques (Houghton, 2009).

Le VHC reste encore mal décrit du point de vue phylogénétique. Il est le seul représentant de la famille des *Hepacivirus* appartenant à la famille des *Flaviviridae* composée de virus à ARN linéaire simple brin positif comme les virus de la dengue ou de la fièvre jaune, deux virus transmis par des moustiques. Les études phylogénétiques ont montré que le VHC est présent depuis 500 à 2000 ans (Pybus et al., 2001; Smith et al., 1997). Son expansion a commencé au 20ème siècle avec l'avènement des interventions médicales et les transfusions, on parle alors de transmission iatrogénique (Markov et al., 2009).

Le VHC est un virus extrêmement variable qui possède à ce jour 7 génotypes différents et 67 sous-génotypes. Les génotypes 1-4 et 6 ont la plus forte prévalence et ont moins de 15% de différences entre leur génome (Smith et al., 2014). En particulier, les génotypes 1 et 2 sont présents mondialement tandis que les autres sont restreints à différentes régions (Gower et al., 2014). Son plus proche parent a été découvert chez le cheval ; il est nommé NPHV (Non Primate HepaciViruses). C'est également un virus capable d'établir une infection chronique (Gather et al., 2016; Scheel et al., 2015). Le modèle chimpanzé n'étant plus disponible du fait des règles de protection de l'espèce et le modèle souris humanisée restant encore éloigné de la réalité, la découverte du NPHV pourrait permettre d'avoir un nouveau modèle d'infection aiguë et chronique du HCV (Pfaender et al., 2017). Le modèle *in vitro* fut difficile à mettre en place et il fallut attendre 2005 pour obtenir un système de culture robuste permettant un cycle viral complet d'une souche de VHC dans une lignée cellulaire Huh-7 (Wakita et al., 2005). D'autres souches virales et des mutations dans la lignée cellulaire ont permis d'améliorer le système pour étudier la fitness du virus et la réponse à de nouvelles drogues (Li et al., 2012; Serre et al., 2016; Shirasago et al., 2015). En mettant en parallèle l'impact socio-politico-scientifique du VIH, le VHC est souvent passé au deuxième plan. Actuellement, les usagers de drogues sont la communauté la plus touchée. Le manque de prévention, de dépistage et de prise en charge permettent de nos jours à l'infection d'avoir encore une prévalence très élevée (Grebely et al., 2017).

2.2. La physiopathologie d'une maladie persistante.

2.2.1 Morphologie du VHC

Le VHC est un virus enveloppé de 40-80 diamètre contenant un ARN viral de 9,6kb entouré d'une capside icosaédrique formée par la protéine Core et une enveloppe lipidique riche en triglycérides et des apolipoprotéines (apo) B et E. À la surface du virus, deux

glycoprotéines E1 et E2 vont permettre l'attachement et l'entrée du virus. Le VHC a une nature hybride avec des composants viraux et cellulaires qu'on appelle lipoparticules virales (LVP). Sa structure complète a été observée pour la première fois par microscopie électronique en 2017. Cette étude a également confirmé que plusieurs formes virales pouvaient circuler dans le sang de patients infectés, comme suggéré précédemment (Maillard et al., 2001; Piver et al., 2017) **(figure 8)**. Le génome du VHC encode pour trois protéines structurales (Core, E1 et E2) qui composent la particule virale et sept protéines non structurales (p7, NS2, NS3, NS4A/B, NS5A/B) impliquées dans la réplication virale, l'assemblage et la régulation des mécanismes cellulaires.

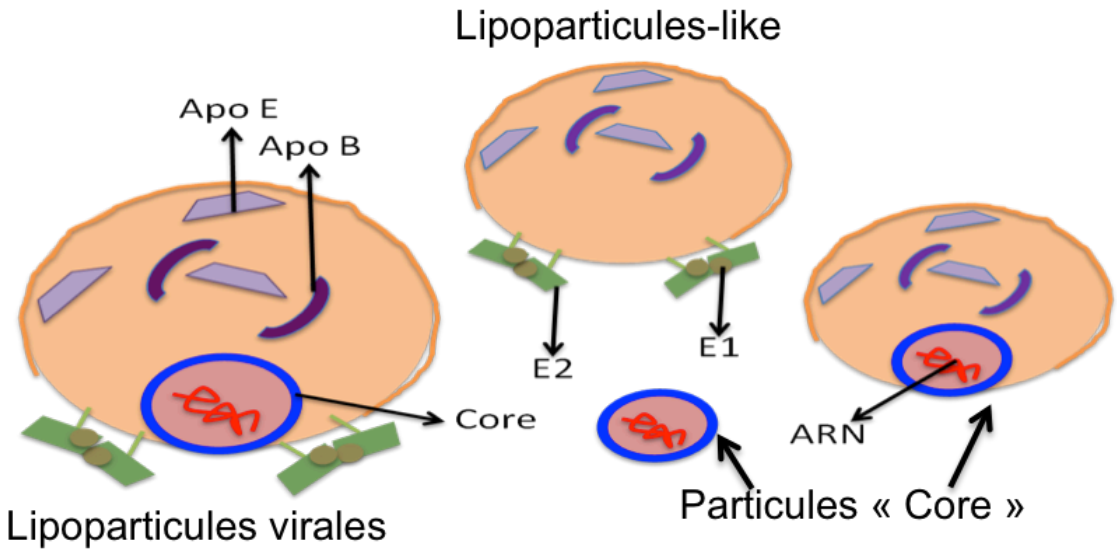


Figure 8 : Schéma des particules virales du VHC : Mise à part la structure classique du VHC nommée lipoparticule virale, deux autres structures altérées sont présentes : Les lipoparticules-like qui ne possèdent que les protéines d'enveloppe, et la protéine Core sans protéine d'enveloppe avec ou sans lipoparticules **(voir partir A-3.2.2)**

Le VHC a un tropisme ciblé vers les cellules hépatiques, mais peut également, dans une très faible mesure, infecter les lymphocytes T via le récepteur CD5 (Sarhan et al., 2012). Il ne s'agit pas d'un virus cytolytique : les défaillances du foie observées chez les patients chroniquement infectés, généralement après une dizaine d'années, sont principalement dues à la réponse immunitaire cytotoxique et inflammatoire liée à l'infection virale **(Voir partie A-3.2.2/B-2.2.2)**.

2.2.2 Cycle viral (Figure 9)

L'entrée du VHC dans les hépatocytes s'effectue par une endocytose en faisant intervenir la clathrine, normalement utilisée lors du bourgeonnement des endosomes dans le cytoplasme. Beaucoup de virus utilisent ce mécanisme d'entrée qui ne nécessite qu'un faible nombre de récepteurs. Le VHC exige cependant plusieurs facteurs pour son entrée. Tout d'abord, la LVP va s'attacher via l'apoE à des récepteurs de lipoprotéine présents à la surface des hépatocytes (HSPG, LDLR). Pour son entrée, cinq récepteurs sont nécessaires : SRB1, CD81, CLDN1, OCLN et NPC1L1 qui interagissent avec les récepteurs d'enveloppe E1 et E2. En particulier, l'interaction entre E2 et le CD81 engendre un mouvement latéral vers les jonctions serrées (domaines spécialisés de la membrane plasmique reliant deux cellules adjacentes) et CLDN1. L'interaction CD81/CLDN1 induit l'endocytose de la particule virale. Elle est alors transportée vers le réticulum endoplasmique où le pH bas induit la fusion des membranes virales et endosomales. L'ARN viral est libéré dans le cytoplasme où il est directement traduit en protéines virales (Lindenbach and Rice, 2013).

La polyprotéine néosynthétisée est clivée par une combinaison de protéases cellulaires et virales. La protéine Core est homodimerisée et rejoint des adiposomes (organites cellulaires riches en lipides). Les protéines non structurales servent à synthétiser les nouveaux ARN viraux. Une copie d'ARN négatif est synthétisée pour servir de matrice à la synthèse de plusieurs brins d'ARN positifs. Les protéines E1 et E2 sont recrutées par les protéines NS afin de former les nouvelles nucléocapsides virales contenant la protéine Core et l'ARN néoformé. Les protéines E1 et E2 subissent alors des modifications post-traductionnelles et vont bourgeonner à partir du réticulum endoplasmique. Elles suivent la voie sécrétoire où elles interagissent avec des lipoprotéines contenant de l'apoE et sont protégées du pH bas par la protéine p7. Ces particules virales sont alors transportées jusqu'à la membrane plasmique où elles rejoignent la circulation sanguine afin d'infecter d'autres hépatocytes **(Figure 8)**. Les particules virales peuvent alternativement passer directement à un hépatocyte adjacent pour éviter de signaler leur présence au système immunitaire (Lindenbach and Rice, 2013).

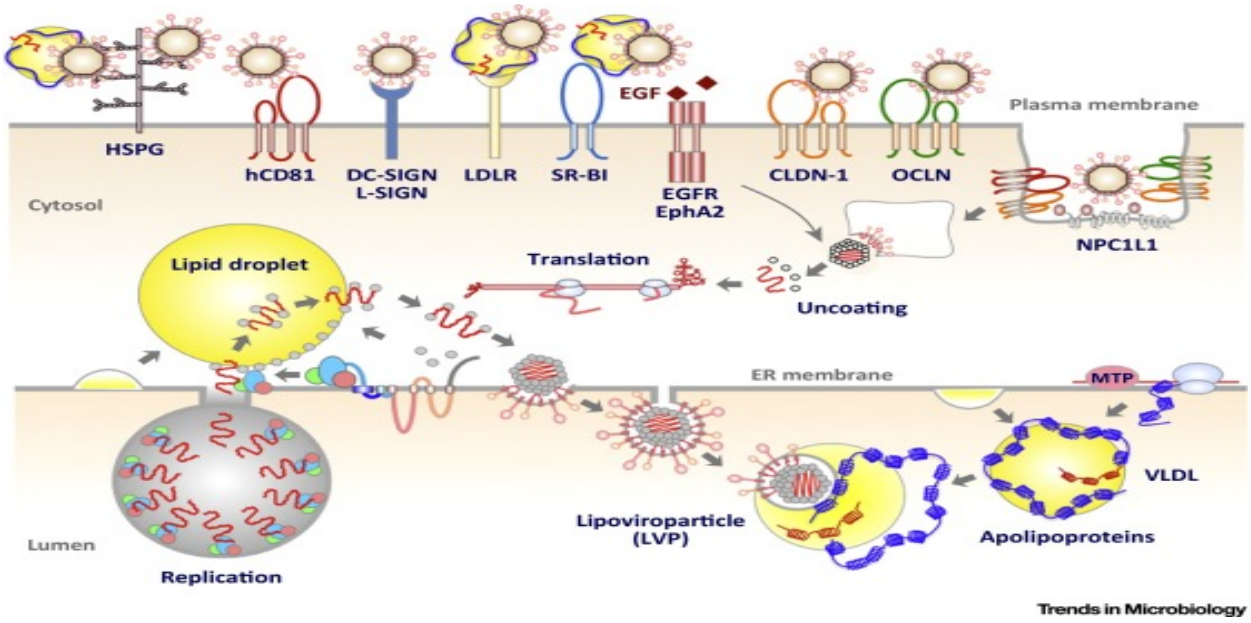


Figure 9 : Schéma du cycle viral du VHC : Le cycle se déroule en trois étapes majeures : l'attachement et l'entrée virale ; la traduction de l'ARN en protéines virales dans le cytosol ; la réplication et l'assemblage de nouveaux virions qui s'effectue au niveau du réticulum endoplasmique (Fukuhara et al., 2015).

2.2.3 La physiopathologie du VHC

La possibilité pour le VHC de provoquer une infection chronique est d'environ 75%. La phase aiguë correspond aux 6 premiers mois de l'infection et peut être asymptomatique (70 à 85%) ou paucisymptomatiques (15 à 30%), ce qui rend difficile une prise en charge rapide de la maladie. La détection dans le sang est possible dès la première semaine environ après une exposition avec le pathogène. Une augmentation d'enzymes hépatiques est également observée après environ deux mois. Dans tous les cas, les enzymes hépatiques reviennent à un taux normal deux mois plus tard. Seule la détection de l'ARN viral du VHC reste un indicateur de l'infection. L'élimination totale ou la persistance du virus chez l'individu infecté dépend de plusieurs facteurs (sexe féminin, réponse immune forte, présence d'anticorps neutralisants et facteurs génétiques). Le facteur associé le plus fort est le polymorphisme dans le gène IL28B qui encode pour l'IFN-λ3. Les personnes développant une chronicité s'exposent à de graves pathologies au bout de 10 à 15 ans telle que la fibrose (environ 12% des cas). Il est intéressant de noter que la fibrose (processus cicatriciel du foie qui entraîne une perte d'élasticité du tissu hépatique) est décrite en 5 stades différents allant de F0 à F4. Le stade F4 correspond à la cirrhose qui peut survenir dans 16% des cas au bout de 20 ans et peut augmenter à 41% au bout de 30 ans d'infection. La cirrhose prédispose à la

survenue d'un cancer du foie ou hépato-carcinome qui intervient dans 1 à 3% des cas après 30 ans d'infection (Bukh, 2016; Hajarizadeh et al., 2013).

2.3 Les Antiviraux à Action Directe : La fin de l'Hépatite C ?

Lors de la découverte du NANBH, les patients étaient traités par de l'IFN-α mais seulement 20% développaient une réponse virologique soutenue (SVR=patients sans ARN viral détectable deux ans après l'arrêt du traitement). De plus, ce type de traitements est associé à de graves effets secondaires. À la fin des années 1990, un traitement quotidien d'IFN-α avec de la ribavirine, un analogue nucléosidique de la guanosine permettant de bloquer la synthèse de l'ARN viral, a permis d'augmenter la SVR à 38%. En 2001, ce taux augmenta de 15% avec l'apparition d'IFN-α pegylé, permettant un meilleur effet antiviral et un traitement hebdomadaire moins contraignant grâce à la une demi-vie plus longue de la molécule (Bukh, 2016; Heim, 2013).

Une meilleure compréhension du cycle viral du VHC a permis de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques qui agissent directement sur la machinerie virale pour inhiber la réplication. De nombreux antiviraux à action directe (AAD) ont été développés dont les deux premiers sont le Boceprevir et le Telaprevir, des inhibiteurs de protéases. En 2011, ces molécules étaient prescrites en combinaison avec l'IFN-α pegylé et la Ribavirine permettant d'atteindre une SVR de plus de 75% avec des effets secondaires diminués. En 2014, des AAD ont été utilisés sans IFN-α pegylé ou Ribavirine tels que le Sofosbuvir, Ledispasvir ou encore le Paritaprevir qui ciblent différents acteurs de la réplication virale (NS5A, NS5B, NS3/4a) (Chayama and Hayes, 2015). Encore plus récemment en 2017, une combinaison de Sofosbuvir et Velpatasvir qui a été approuvé pour un usage chez l'Homme permet de traiter de façon définitive, par une seule prise orale quotidienne et pendant 12 semaines, tous les patients infectés sans aucune discrimination de leur stade d'infection, du génotype viral ou d'autres infections (VHB ou VIH). Le taux de réussite est proche de 100% tandis que les effets secondaires apparaissent chez moins de 10% des patients et sont peu néfastes (Miller, 2017). Ainsi en moins de cinq ans, les AAD se sont imposés comme la solution efficace pour guérir de l'hépatite C. Des études sur de possibles échappements viraux ne remettent pas en cause l'efficacité de ces AAD étant donné qu'il en existe actuellement plusieurs et qu'ils peuvent être adaptés au besoin du patient. En revanche, le manque de prévention et de dépistage font que malgré la présence de ces AAD, l'hépatite C ne pourra être éliminée sans une vraie coopération entre les différents acteurs (chercheurs, politiques, associations,

compagnies pharmaceutiques, ...). Enfin, un autre frein à un futur sans HCV est le prix du traitement qui reste actuellement élevé avec un coût de 75 000 dollars par patient (Grebely et al., 2017) bien qu'il soit en train de diminuer. Ainsi, cliniquement des solutions thérapeutiques efficaces existent pour contrer l'infection par le VHC bien qu'il reste de nombreuses questions d'intérêt surtout en physiopathologie.

2.4. Recherche vaccinale

Actuellement aucun vaccin n'existe pour le VHC et il se peut qu'il n'y en ait jamais aucun avec l'avènement des AAD. La difficulté de la mise en place d'un vaccin est due à une mauvaise connaissance de la réponse immunitaire contre le VHC (par manque d'un bon modèle animal et de connaissances limitées sur les mécanismes associés à la propagation du virus) et des mécanismes d'échappement à la réponse anticorps et aux réponses cellulaires des LT. En revanche, même si les AAD peuvent éliminer le VHC il ne protège pas de réinfections et des données manquent en ce qui concerne un rétablissement normal de la réponse immunitaire dans le temps (Hengst et al., 2016).

Ainsi la recherche vaccinale est toujours nécessaire et il est important de noter que le premier essai d'un vaccin préventif est en cours chez les personnes à risque. Le vaccin a pour but de stimuler l'immunité des cellules T avec un vecteur adénovirus contenant de l'ADN codant pour des protéines NS afin d'induire une forte réponse LT $CD4^+$ et $CD8^+$ contre le virus et qui peut évoluer vers une population mémoire. Après avoir été testé avec succès chez des chimpanzés, l'immunogénécité et la protection du vaccin contre le VHC sont en train d'être évaluées chez des personnes naïves (mais à risque car consommateur de drogues par injection). Les résultats complets de l'étude sont attendus pour juillet 2018 (Barnes et al., 2012; Swadling et al., 2014; Walker, 2017). Un autre vaccin a pour but d'induire une réponse par des anticorps neutralisants. Il est composé d'une protéine recombinante comprenant E1/E2 afin d'empêcher l'entrée virale. Une réponse anticorps neutralisante forte contre tous les génotypes ainsi qu'une réponse LT $CD4^+$ spécifique ont été observées chez l'Homme. Les récentes avancées ont permis de mieux connaitre la structure de E1/E2 et peuvent servir à améliorer la synthèse de protéines recombinantes. De futurs tests chez l'Homme devront être réalisés afin de confirmer le potentiel d'une réponse anticorps neutralisante pour bloquer l'infection (Houghton, 2011). D'autres approches sont également étudiées comme des vaccins avec des peptides synthétiques ou des vaccins ciblant les DC mais des études complémentaires pour évaluer le risque, la tolérance et l'immunogénécité de ces vaccins

doivent être menées. Dans tous les cas, les recherches d'immuno-physiopathologie peuvent apporter de nouvelles données bénéfiques pour le développement de vaccins efficaces (Abdelwahab and Ahmed Said, 2016; Liang, 2013; Walker, 2017).

3. Le système immunitaire au centre de la chronicité

Afin d'améliorer les traitements et/ou les vaccins contre ces infections persistantes, une compréhension claire des mécanismes impliqués dans la détérioration immunitaire est nécessaire. La mise en place de la phase chronique va principalement dépendre de la réponse immunitaire face au virus. Si la réponse immunitaire échoue dans le contrôle et surtout la clairance du virus lors de la phase de primo-infection, ce dernier pourra se développer et/ou perdurer dans l'hôte. L'état de chronicité a un résultat néfaste pour l'hôte car le système immunitaire est en constante activation, ce qui engendre des dommages collatéraux à l'hôte. De plus, cela favorise l'établissement du virus dans ses populations cibles. Malgré tout, on observe chez certains individus un contrôle efficace (VIH) voir une élimination totale (VHC) de l'infection par la réponse immunitaire, ce qui fait de ces individus de bons modèles pour comprendre les mécanismes sous-jacents à ces phénomènes.

3.1. Mécanisme de contrôle viral

3.1.1 Lors de l'infection VIH-2

Comme discuté dans la **partie A-1.3.6**, l'infection par le VIH-2, comparée à l'infection par le VIH-1 progresse plus lentement vers le stade SIDA et les patients survivent ainsi plus longtemps avec une charge virale basse et un nombre de LT $CD4^+$ qui décline plus lentement. De manière similaire à des observations faites chez le Sooty Mangabeys infecté par le VIS, une forte réplication virale n'induira pas une véritable augmentation de l'activation ou de l'inflammation (Silvestri et al., 2003). C'est la réponse immunitaire qui semble être plus efficace dans le contrôle de cette infection. En effet, les LT $CD4^+$ ont de plus fortes capacités prolifératives et induisent de meilleures réponses polyfonctionnelles comparées au LT $CD4^+$ lors de l'infection par le VIH-1 (Alatrakchi et al., 2006). Dans une étude récente, il a été observé que malgré une certaine réplication du VIH-2 dans le GALT, on observe une homéostasie normale. Les populations immunes sont préservées et on détecte l'expression de chimiokines induisant le recrutement des LT $CD4^+$ (Fernandes et al., 2017). La réponse LT $CD8^+$ productrice d'INF-γ est similaire entre les infections par le VIH-2 et le

VIH-1. En revanche, une hétérogénécité plus grande des TCR (récepteur des LT) et une polyfonctionnalité plus importante sont observées dans l'infection par le VIH-2 par rapport à l'infection par le VIH-1 (Nyamweya et al., 2013). Récemment, il a été montré que les LT $CD8^+$ ont une forte capacité à éliminer les LT $CD4^+$ infectés de la périphérie (Angin et al., 2016). Contrairement à l'infection par le VIH-1, il semblerait que la réponse médiée par des anticorps neutralisants soit plus efficace dans le contrôle du VIH-2. Cette différence peut être expliquée par la protéine d'enveloppe du VIH-2 qui est beaucoup plus immunogénique suite à une glycosylation plus faible sur ces régions V3 et V4 (Makvandi-Nejad and Rowland-Jones, 2015). La réponse innée contre le VIH-2 est moins décrite, bien que des facteurs de restrictions tels que TRIM5α semblent jouer un rôle dans le contrôle du cycle viral. En effet, le VIH-2 et l'étape de décapsidation est plus facilement inhibé par cette protéine que le VIH-1, en lien avec des motifs spécifiques de sa capside (Nyamweya et al., 2013). Nous pouvons émettre l'hypothèse que de multiples mécanismes immunologiques impliqués dans l'infection par le VIH-2 pourraient contrôler sans traitement cette infection pendant de longue période, contrairement aux patients infectés par le VIH-1.

3.1.2 Les caractéristiques des « contrôleurs » du VIH

Une très faible proportion de la population infectée par le VIH-1 (inférieure à 1%) peut contrôler naturellement l'infection virale sans avoir recours à un traitement. Le phénotype de ces individus est crucial dans la compréhension des mécanismes immunophysiopathologiques impliqués dans un contrôle du VIH. De même des phénotypes de progression rapide sont également observés.

Ces phénotypes particuliers sont classés en plusieurs groupes de patients en fonction uniquement de critères clinico-biologiques : absence de symptômes, niveau de charge virale ARN et/ou ADN, taux de CD4 et/ou l'absence de prise de cARV. L'étude de ces populations particulières apporte de nouvelles perspectives sur la biologie de l'infection. Mais l'hétérogénéité dans les critères définissant ces groupes se traduisent par de l'inconstance dans l'interprétation des données à travers les multiples études. Plusieurs groupes ont ainsi été nommés afin de les différencier de la vaste majorité des individus infectés par le VIH : les non progresseurs à long terme (LTNP), les élites contrôleurs (EC), les progresseurs lents, les contrôleurs du VIH (HICs), les contrôleurs virémiques, les non contrôleurs (NC) et les progresseurs rapides. Ces groupes sont définis principalement sur des critères virologiques ou immunologiques. En effet les LTNP et les rapides progresseurs s'opposent surtout sur le taux

de LT CD4$^+$ (maintient ou diminution rapide) tandis que les EC et les NC s'opposent sur le contrôle du virus (charge virale indétectable ou très haute). Dû à ces critères très larges, un même individu peut passer d'un groupe à l'autre ou même appartenir à deux groupes. Dans la littérature, les LTNP sont le groupe de patients les plus étudiés et dont la définition est respectée dans 60% des études menées. Les LTNP sont définis comme étant suivi depuis au moins 10 ans, avec un taux de CD4 supérieur ou égal à 500 cellules/uL, l'absence de symptômes et dans une moindre mesure un taux d'ARN viral indétectable. Côté critères virologiques, les EC sont les plus étudiés et la définition est respectée dans 43% des études menées. Ils sont sélectionnés dans toutes les études, sur le taux d'ARN viral inférieure à 50 copies/mL en moyenne pendant un an sans prise de cARV. Enfin, on peut également citer les HIC qui sont une population très rare de patients définis principalement par le suivi des mesures d'ARN viral dont au moins 90% doivent être inférieur à 400 copies/mL et ceux depuis au moins 10 ans (Gurdasani et al., 2014). Ce groupe représente 9,1% des individus infectés par le VIH-2 (Thiébaut et al., 2011), contre moins de 0,2% des individus infectés par le VIH-1 (Grabar et al., 2009). On observe également une grande proportion de LTNP chez les patients VIH-2 mais en comparaison des VIH-1 LTNP leurs caractéristiques immunologiques et virologiques diffèrent.

Ces individus particuliers ont donc été étudiés afin d'identifier les caractéristiques immuno-virologiques impliqués dans le contrôle du VIH-1. On peut mettre en avant la génétique particulière du virus et particulièrement le gène de la protéine Nef qui est associé à des faibles niveaux de réplication. Plus récemment, une étude a montré que la protéine Nef de patients EC est moins efficace pour diminuer l'expression du CD4 et l'expression de marqueur de stress, rendant les LT CD4$^+$ infectés susceptibles à l'ADCC (Alsahafi et al., 2017). Cette caractéristique du virus est minoritairement retrouvée dans les patients contrôleurs. En revanche, différents paramètres génétiques comme l'expression d'allèles spécifiques des HLA de classe I, dits « protecteurs » (HLA-B*57, HLA-B*27, HLA-B*13 et HLA-B*58:01), sont associés à un contrôle de l'infection. En effet, ces HLA particuliers sont exprimés chez 67% des individus EC mais sont également détectés chez 37% des individus progresseurs. Ils sont donc nécessaires mais pas suffisants pour permettre le contrôle de l'infection. L'expression de ces allèles particuliers semble cependant être le critère le plus fort associé à un contrôle réussi. Ils sont également associés à une fréquence plus élevée de LT CD8$^+$ polyfonctionnelles (producteurs de granules cytotoxiques et de cytokines), spécifiquement dans les tissus lymphoïdes rectaux et intestinaux. Ces allèles « protecteurs »

sont moins susceptibles aux signaux inhibiteurs et induisent ainsi une sélection de clones LT antiviraux plus spécifiques et efficaces (Walker and Yu, 2013). Enfin, les AcNs semblent plus rares chez les individus EC comparés aux progresseurs virémiques, ce qui est attendu étant donné que la génération d'AcNs est stimulée par la charge virale. Néanmoins, il a été observé que des AcNs peuvent être générés malgré des taux bas ou indétectable de virus (Freund et al., 2017; Walker and Yu, 2013). Il semblerait que malgré une faible diversité antigénique, c'est un profil inflammatoire particulier (CXCL13, SCD40L, IP10, RANTES et TNF-α) qui stimule la génération d'AcNs (Dugast et al., 2017). La réponse immunitaire innée est considérée comme moins pertinente que l'immunité adaptative dans le contrôle du VIH-1, mais des phénotypes particuliers sont observés. Les cellules dendritiques myéloïdes (mDC) présentent mieux les antigènes tandis que leur fonction inflammatoire est diminuée. En revanche, les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) ont un profil fonctionnel et une fréquence similaire comparée aux pDC chez des individus séronégatifs indiquant que les pDC ne participent pas au contrôle de l'infection (Walker and Yu, 2013).

Ainsi, ces individus contrôlant l'infection VIH-1 présentent des phénotypes cliniques variés ainsi qu'une diversité des réponses immunologiques impliquées dans ce contrôle. Il semble que de multiples caractéristiques de l'hôte soient nécessaires pour contrôler efficacement le virus sans cARV pendant de très longues périodes. Malgré le contrôle viral, des cas de progression vers le SIDA sont observés et sont associés à une exhaustion des lymphocytes (Sauce et al., 2011).

3.1.3 Lors de l'infection VHC

Dans 25% des cas, l'infection VHC est contrôlée et éliminée au cours de la phase aiguë. De la même manière que l'infection VIH-1, le polymorphisme HLA et HLA-DR de classe II est associé à la clairance virale en particulier les allèles HLA-DQB1*03/*03:04 et HLA-DRB1*11/11:01. Tandis que la réponse immunitaire innée, particulièrement les cellules Natural Killer (NK), sont au centre de la physiopathologie, les réponses adaptatives cellulaires T et humorales B jouent un rôle important dans la clairance du virus et la protection contre de nouvelles réinfections. En effet, les LT $CD4^+$ prolifèrent et produisent de l'IFN-γ, du TNF-α et de l'IL-17A, qui sont des cytokines inflammatoires et antivirales. De plus, une production d'IL-2 et d'IL-21 permet d'activer les LT $CD8^+$ afin qu'ils participent à l'élimination des hépatocytes infectés (Park and Rehermann, 2014). De nombreuses études ont montré des AcNs dirigés contre des régions très conservées de l'enveloppe virale et curieusement leurs

générations précoces sont associées à la clairance du virus (Osburn et al., 2014). Récemment, une étude a isolé pour la première fois des AcNs monoclonaux d'individus ayant éliminés l'infection 25 ans plus tôt. Ces AcNs ont la particularité d'avoir peu de mutations somatiques, c'est-à-dire que durant la phase aiguë, ils ont pu identifier suffisamment de variant de l'enveloppe virale pour induire la sélection et la maturation d'AcNs (Bailey et al., 2017). Ces nouvelles données montrent que la vaccination contre le VHC reste possible et accessible.

3.2 Mécanismes d'échappement viral : Installation de la chronicité

Le VIH-1 et le VHC sont deux virus très différents mais engendre tous les deux des infections chroniques à long terme. Ces deux virus utilisent des mécanismes d'échappement aux réponses immunitaires (innée et adaptative) afin de persister dans leurs cellules hôtes. De plus, l'activation constante des réponses immunes les font rentrer dans un cercle vicieux en favorisant les mécanismes d'échappement du virus.

3.2.1 Lors de l'infection VIH

Le VIH-1 a dû, dans un premier temps, évoluer pour échapper aux réponses innées comme les facteurs de restrictions et avoir la possibilité de persister. Une étude chez le macaque a permis, en quatre passages du virus, à le rendre aussi infectieux que chez l'Homme grâce à des mécanismes d'échappement ou d'inhibition de facteurs de restrictions. Ces mécanismes déterminent une colonisation réussie de l'hôte. Dans ce scénario, la réponse LT $CD8^+$ est déterminante pour induire un profil néfaste ou bénéfique de la réponse immune face au pathogène (Hatziioannou et al., 2014). L'infection des LT $CD4^+$, qui coordonnent la réponse immune, permet au VIH-1 d'établir une stratégie d'échappement et de développement unique. La réponse de l'hôte à cette infection pro-inflammatoire forte dès la phase aiguë détermine la chronicité de l'infection, qui est difficilement contrée par les cARV. Une réponse immune importante va favoriser l'installation du VIH-1 en créant un environnement très inflammatoire et donc en activation constante. C'est ainsi que de nouveaux LT $CD4^+$ activés sont recrutés et deviennent des cibles privilégiées pour la propagation de l'infection. En particulier, l'activation et la prolifération de LT $CD4^+$ mémoire-effecteur exprimant le CCR5 (LT $CD4^+_{ME}$) est accéléré dans ces conditions. Les LT $CD4^+$ centraux mémoires (LT $CD4^+_{CM}$), sont épargnés, afin de pouvoir migrer dans les sites de réplication virale pour régénérer la population LT $CD4^+_{ME}$ favorisant l'infection. Les LT $CD4^+_{CM}$ sont à terme incapables de maintenir une réponse immune fonctionnelle dû à leur

exhaustion. Comme il a été montré chez des singes infectés par le VIS, l'efficacité et le maintien de LT $CD4^+_{CM}$ est suffisant pour tolérer l'infection (Okoye and Picker, 2013; Silvestri et al., 2003).

L'activation cellulaire est donc bien centrale dans l'installation de l'infection chronique. Dans un modèle macaque, le blocage de l'activation cellulaire des LT $CD4^+$ par des anticorps a montré une baisse des pics de virémie. En revanche les réponses LT $CD8^+$ et LB spécifique du virus sont également réduites. Cependant après l'arrêt du traitement, l'infection reprend son cours normal, indiquant que l'activation est l'un des facteurs déterminant dans le passage à la chronicité (Garber et al., 2004). On peut également pointer le fait que le VIH-1, pouvant évoluer rapidement, échappe au contrôle des LT $CD8^+$ et des LB car leurs TCR et BCR (récepteur des LB) ne s'adaptent pas aussi rapidement. Le virus peut donc s'installer, créer des réservoirs et persister dans l'hôte avant qu'une réponse adaptative soutenue ne soit mise en place.

3.2.2 Lors de l'infection VHC

Tout comme le VIH-1, le VHC est un virus qui se multiplie très rapidement (10^{12} virions sont produits chaque jour chez des patients infectés chroniquement) et qui mute rapidement dû au manque de relecture de son ARN polymérase. Ces caractéristiques ont pour conséquence un échec de l'expansion de LT spécifique du virus. Précisément, l'échappement du VHC est déterminé lors de l'infection aiguë liée à la balance entre l'activation de gènes stimulant la production d'IFN et les mécanismes d'échappement du virus. La réponse IFN produite par les hépatocytes infectés active la réponse innée (cellules NK, macrophages et DC) et la réponse cellulaire des LT. Le VHC va tenter de bloquer la réponse IFN à l'aide de ses protéines virales, principalement NS3/4A, en ciblant les facteurs de transcription des gènes IFN sauf chez les macrophages et les DC. L'IFN de type II (IFN-γ) est spécifiquement produit par les cellules NK et par certaines populations de LT. Alors qu'une clairance efficace du virus est liée à une activité des LT $CD4^+$ forte, l'échec de la clairance est dû à un dysfonctionnement de cette population, qui maintient les LT $CD8^+$ dans un état d'exhaustion. De plus, les réponses cellulaires des LT régulateurs augmentent dans le foie et participe également au mauvais fonctionnement des réponses cytotoxiques et cytokiniques des LT. Un tel phénotype permet au virus de persister et maintient une activation constante du système immunitaire responsable de la dégradation du foie (Park and Rehermann, 2014).

Les principales stratégies d'échappement du virus modulant la réponse immunitaire impliquent la protéine Core du VHC. La protéine Core non entourée d'enveloppe lipidique peut être sécrété dans un système Bacculovirus et absorbée par des lignées hépatiques (Katsarou et al., 2009; Tsitoura et al., 2007). D'autres données montrent que des particules virales défectueuses n'exprimant pas les protéines d'enveloppe sont retrouvés dans le sérum de patients infectés et sont associées à une mauvaise SVR (Iwai et al., 2006; Yagi et al., 2005). En particulier, Maillaird et al ont observé des taux très élevés de protéine Core et d'anticorps anti-Core dans le sang périphérique. Dans ce cas, la protéine Core n'est entourée que de lipide sauf une région exposée (résidus 24 à 68) spécifique des anticorps anti-Core (Maillard et al., 2001). A ce jour la présence de la protéine Core sans enveloppe dans le sang reste débattue. Piver et al n'ont pu ni confirmer ni infirmer la possibilité que cette forme du virus existe (Piver et al., 2017). Néanmoins, plusieurs données montrent le rôle immunomodulatoire de cette protéine. En effet, l'équipe de Y. Hahn a montré par plusieurs études que la protéine Core est impliquée dans l'inhibition des fonctions antivirales des LT $CD8^+$ (Large et al., 1999). Surtout, les auteurs ont observé que ce mécanisme nécessite l'interaction de la protéine Core avec le gC1qR. Ce dernier est un récepteur ubiquitaire qui interagit avec plusieurs molécules physiologiques mais avec également différents pathogènes. Des effets comparables sur la fonction LT sont observés avec le C1q, un des ligands naturels du gC1qR, et montrent que ce récepteur est primordial. En effet, l'inhibition des fonctions cytotoxiques et cytokiniques des LT peut être levée avec un Ac anti-gC1qR qui se fixe au niveau de la région d'interaction (Kittlesen et al., 2000). Cette interaction spécifique engendre l'inhibition du cycle cellulaire des LT (Yao et al., 2003), avec un effet plus important sur les LT $CD8^+$ que les LT $CD4^+$ (Yao et al., 2004). Curieusement dans des expériences *ex vivo*, les auteurs ont observé que la fréquence de LT $CD4^+$ exprimant le gC1qR augmente lors de l'infection (Cummings et al., 2009). Enfin, au niveau des DC, l'interaction Core/gC1qR inhibe la production d'IL-12 et active la voie STAT-3 inhibant ainsi la différenciation des LT Helper 1, producteur d'IFN-γ (Tacke et al., 2011; Waggoner et al., 2007). Des études par d'autres laboratoires montrent que l'expression de PD-1, marqueur d'exhaustion, à la surface des LT $CD8^+$ est stimulée par la protéine Core (Frazier et al., 2010), et que le mécanisme Core/gC1qR touche également les macrophages pour produire des cytokines inflammatoires favorisant l'infection chronique (Song et al., 2016). Curieusement, Liu et al. ont montré que la protéine Core de génotype 1b n'a pas d'effet immunomodulateur sur les LT par rapport au génotype 1a utilisés dans les précédentes études (Liu et al., 2002).

B. Les cellules Natural Killers

Les cellules NK sont des cellules lymphoïdes appartenant au système immunitaire inné. Ce sont des lymphocytes granuleux de grande taille qui, selon la définition historique, ont la capacité de tuer une cible sans sensibilisation préalable par un antigène. Elles ciblent les cellules qui présentent une diminution ou une perte de l'expression des molécules de CMH-I et/ou qui expriment des molécules de stress. Les cellules NK sont considérées comme les principales cellules effectrices de la réponse innée et représentent l'une des premières lignes de défense contre les cancers et les infections virales. Chez l'Homme, elles sont classiquement définies, en cytométrie en flux, par le phénotype $CD3^-CD56^+$ sur la population lymphocytaire. Cependant, la mise en évidence des différentes sous-populations font que les cellules NK conventionnelles doivent être définies par la présence ou l'absence d'autres récepteurs de surface. L'expression de ces récepteurs à la surface des cellules NK est fortement modulée lors d'infections virales, jouant un rôle sur le contrôle ou l'établissement de l'infection.

1. Un tueur né

1.1 Définition des cellules NK

Tout comme les lymphocytes T et B, les cellules NK sont issues de cellules souches hématopoïétiques (CSH) $CD34^+$ de la moelle osseuse. Le processus de différenciation des cellules NK est continu, c'est à dire qu'il permet l'acquisition séquentielle de marqueurs de surface caractéristiques, de fonctions cytolytiques ou de production de cytokines. De manière générale, au cours du temps, une cellule NK voit une diminution de son seuil d'activation et une augmentation de ses capacités cytotoxiques (Freud and Caligiuri, 2006).

En cytométrie en flux, la cellule NK est historiquement mise en évidence par un phénotype $CD3^-CD56^+$. Le CD56 (Neural Cell-Adhesion Molecule-1) est une molécule non spécifique aux cellules NK, impliquée dans les phénomènes d'adhésion et de migration. Elle permet de différencier deux grandes sous-populations nommées en fonction du niveau d'expression du CD56 : les cellules NK $CD56^{dim}$ et NK $CD56^{bright}$ **(figure 10A)**. Elles représentent environ respectivement 90 % et 10% des cellules NK circulantes. Ce taux est inversé dans les tissus. De plus elles ont des fonctions bien distinctes. Les cellules NK

CD56^{dim} ont un rôle essentiellement cytotoxique mais leurs capacités de prolifération et de production de cytokines sont faibles. À l'inverse, les cellules NK CD56^{bright} ont un fort potentiel prolifératif et une grande capacité de production de cytokines, mais une cytotoxicité moindre (Cooper et al., 2001a). Il a été suggéré que les CD56^{bright} répondent mieux aux facteurs solubles alors que les CD56^{dim} répondent mieux aux interactions récepteurs/ligands d'où leur profil respectif (Long et al., 2013). De plus, cinq sous-populations peuvent être distinguées grâce au degré d'expression du récepteur CD16 (récepteur du fragment Fc des Ig) : (1) CD56^{bright}CD16^{-} (50 à 70% des CD56^{bright}), (2) CD56^{bright}CD16^{dim} (30 à 50 % des CD56^{bright}), (3) CD56^{dim}CD16$^{-/dim}$, (4) CD56^{dim}CD16^{+} et (5) CD56^{-}CD16^{+}. Chez les individus sains, les populations (3) et (5) sont numériquement minoritaires. En revanche, la population (5) est élargie lors d'infections virales chroniques et est un signe de déficience des cellules NK **(figure 10B)** (Amand et al., 2017; Poli et al., 2009).

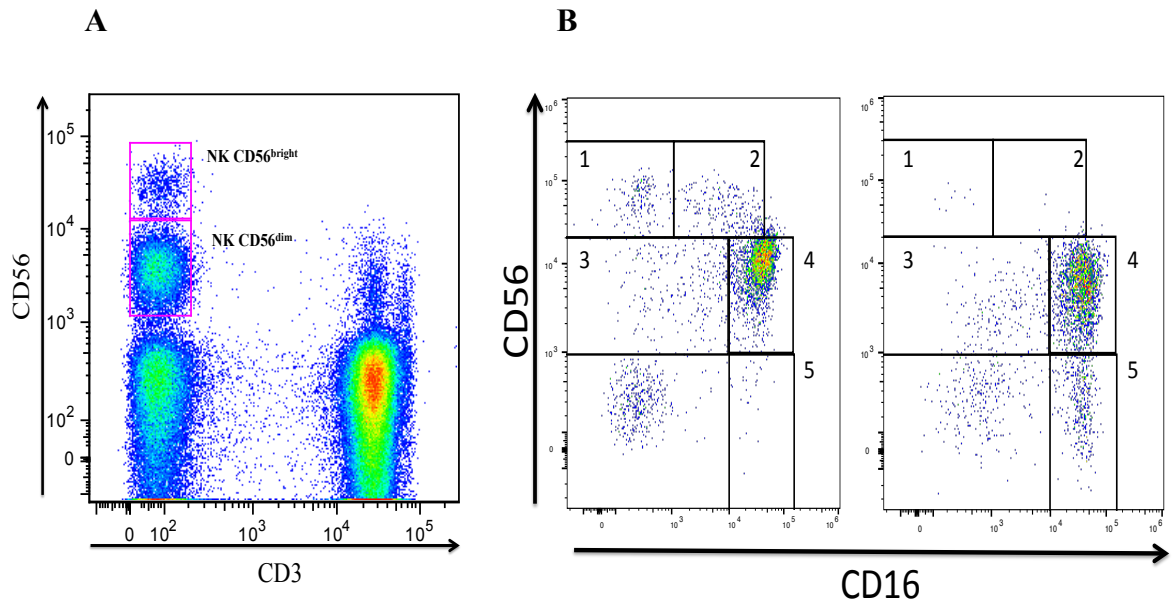


Figure 10 : Mesure par cytométrie en flux des cellules NK (CD3^{-}CD56^{+}) du sang périphérique et de sous-populations (CD56^{+}CD16^{+}) du sang périphérique chez un donneur sain (panneau gauche) et chez un patient infecté par le VIH (panneau droit) : **(A)** Représentation des deux sous-populations « classiques » en fonction du degré d'expression du CD56 : CD56^{dim} (rectangle du bas) et CD56^{bright} (rectangle du haut). **(B)** Après l'exclusion des cellules CD3, CD19 et CD14 positives, représentation des cinq sous-populations en fonction du degré d'expression du CD56 et du CD16 : (1) CD56^{bright}CD16^{-}, (2) CD56^{Bright}CD16^{Dim}, (3) CD56^{Dim}CD16$^{-/Dim}$, (4) CD56^{Dim}CD16^{+} et (5) CD56^{-}CD16^{+}

Des études récentes de cytométrie de masse suggèrent ainsi que la catégorisation des sous-populations des cellules NK pourrait très prochainement évoluer. En effet, Horowitz et al ont montré qu'il pouvait exister, chez un même individu sain, entre 6 000 et 30 000 sous-populations de cellules NK. De plus, plus de 100 000 sous-populations de cellules NK sont

observées dans un groupe de 22 patients. Cette incroyable diversité des cellules NK est liée à leur état de maturation, de différenciation ou à leur fonction. Cependant, le rôle précis de ces sous-populations reste à définir (Horowitz et al., 2013).

1.2. Répartition dans l'organisme.

La différenciation des cellules NK débute à partir de progéniteurs dans la moelle osseuse et semble s'achever dans les ganglions, les amygdales ou encore le thymus. Dans le sang périphérique les cellules NK représentent environ entre 5 à 15% des lymphocytes. La proportion des cellules NK est la plus importante dans l'utérus puis dans le poumon et enfin dans le foie où les cellules NK peuvent représenter jusqu'à 50% des lymphocytes (Yamagiwa et al., 2009). Cette proportion va cependant varier largement lors des différentes pathologies hépatiques suggérant un rôle majeur (protecteur ou néfaste) des cellules NK. Due à leur forte présence dans ces organes immuno-tolérants (qui possèdent des mécanismes permettant de contrôler la réponse immunitaire pour éviter une réponse auto-immune), la présence de récepteurs inhibiteurs qui reconnaissent les molécules du CMH de classe I **(voir partie B-1.3.2)**, va permettre aux cellules NK de jouer un rôle majeur dans le maintien de la tolérance au soi **(Voir partie B-1.3.3)** (Sun et al., 2013).

1.3 Mode de régulation de l'activité NK

Les cellules NK ont deux rôles principaux : lyser la cellule cible et signaler aux autres cellules de l'immunité la présence de pathogènes, de cellules tumorales ou encore la présence d'un stress physico-chimique pour ainsi permettre le développement d'une réponse adaptative efficace. Pour cela, les cellules NK possèdent une multitude de marqueurs activateurs ou inhibiteurs qui vont servir à moduler son activité. De plus la cellule cible va exprimer certains des ligands correspondants à chacun de ces récepteurs afin de signaler un état de stress à la cellule NK. La balance entre les deux signaux inhibiteurs et activateurs est primordiale dans la mise en place de la réponse NK et dans le type de réponse qui est engagée.

1.3.1 Marqueurs d'activation

Plusieurs familles composent le groupe des récepteurs activateurs des cellules NK. Nous allons y retrouver principalement la superfamille des immunoglobulines et des Lectines C.

a) NCR : Natural Cytoxicity Receptors

Les NCR sont composés de NKp30, NKp46 et NKp44. Mise à part leur fonction d'activation de la cellule en commun, leurs profils structuraux et génotypiques sont très différents. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires de la famille des Immunoglobulines (Ig) de type 1 qui signalent l'activation aux cellules NK par des protéines adaptatrices possédant un motif ITAM (Intracellular Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif). NKp30 et NKp46 sont exprimés de manières constitutives chez un individu sain alors que NKp44 n'est exprimé que dans des situations d'activation de la cellule (Vitale et al., 1998). Curieusement, NKp44 possède un domaine transmembranaire ITIM (Intracellular immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif) qui en réponse au traitement par PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) peut induire une action inhibitrice sur la cellule NK (Rosental et al., 2011). Par ailleurs, les gènes des NCR peuvent être transcrits en au moins trois variants ou isoformes. Le NKp30 est ainsi représenté par : NKp30a, NKp30b et NKp30c. Ce dernier a la particularité d'exercer une fonction immunosuppressive sur la cellule NK dans un environnement tumorale (Delahaye et al., 2011) ainsi que dans l'interface foeto-maternelle (Siewiera et al., 2015). De plus, Siewiera et al ont montré que l'isoforme NKp44c induit également des signaux inhibiteurs aux cellules NK présent dans l'interface foeto-maternelle et que l'expression des différentes isoformes est dépendante de l'environnement cytokinique (Siewiera et al., 2015). Précédemment, les NCR étaient considérés comme spécifiques des cellules NK, et NKp46 était utilisé comme le principal marqueur discriminant des cellules NK. Toutefois, plusieurs études ont montré qu'ils peuvent également être exprimés sur quelques rares sous-populations lymphocytaires T et les Innate Lymphoid Cells 3 (NCR^{+}ILC3), comme dans les tissus intestinaux ou hépatiques (Hudspeth et al., 2013; Spits et al., 2013).

Les ligands de ces NCR sont encore mal définis malgré la description de certains ligands d'origine virale et d'autres cellulaires qui peuvent activer les NCR ou bloquer leur activité. Parmi les ligands viraux, l'hémagglutinine du virus *Influenza* active NKp46 ou NKp44 (Mandelboim et al., 2001), alors que la protéine E du virus de la Dengue active la cellule NK par NKp44 (Hershkovitz et al., 2009). En revanche, la protéine pp65 du CMV inhibe NKp30 (Arnon et al., 2005). Les ligands cellulaires sont considérés comme des molécules de stress qu'on observe plus particulièrement dans un environnement tumoral ou infectieux. NKp44 reconnaît une isoforme de la protéine MLL5, nommé NKp44L **(Voir partie B-2.3.3)** qui induit la cytotoxicité. NKp30 reconnaît le facteur nucléaire BAT3 pour

induire l'apoptose ou la protéine tumorale B7-H6 qui active la fonction cytotoxique. Enfin, NKp46 semble interagir avec la vimentine, exprimée par des macrophages infectés (Kruse et al., 2014; Li and Mariuzza, 2014; Pazina et al., 2017), ou le facteur du complément P qui a été récemment identifié comme un ligand activateur dans un contexte bactérien (Narni-Mancinelli et al., 2017).

b) CD16

Le CD16 n'est pas spécifique des cellules NK et se trouve également à la surface des cellules de la lignée monocyte/macrophage. Il est exprimé surtout sur les cellules NK $CD56^{dim}$ et est considéré comme un marqueur discriminant des sous-populations NK. Appartenant à la famille des Ig, il possède deux domaines extracellulaires Ig et un acide aminé chargé dans son domaine transmembranaire. Il peut s'associer à CD3ζ ou FCεRIγ afin de transmettre son signal activateur aux cellules NK (Nagler et al., 1989). Il est surtout un récepteur de faible affinité aux IgG, et particulièrement les sous-classes d'IgG1 et 3, ce qui permet d'activer un mécanisme de lyse médiée par des anticorps, l'ADCC (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity) **(Voir partie I.6.1)** (Long et al., 2013).

c) NKG2C

NKG2C est un membre de la famille des lectines de type C qui forme un hétérodimère avec le CD94 à la surface des cellules. Son ligand est HLA-E (Braud et al., 1998). Chez des individus sains, NKG2C est faiblement exprimé sur les cellules NK mais il augmente au cours de différentes infections aiguës comme lors d'infections par les hantavirus (Björkström et al., 2011), le Chikungunya (Petitdemange et al., 2011), le CMV, le VIH ou le VHC (Béziat et al., 2012; Fausther-Bovendo et al., 2008; Hendricks et al., 2014; Oliviero et al., 2009).

d) NKG2D

NKG2D ne présente qu'une très faible homologie de séquence avec les autres membres de la famille des lectines de type C. Contrairement aux autres membres des C-lectines, NKG2D n'a pas besoin de s'associer avec le CD94 pour être exprimé à la membrane. Il s'associe à la molécule DAP10 afin de transduire un signal activateur. (Houchins et al., 1991; Wu et al., 1999). Ce marqueur est exprimé à la surface de la grande majorité des cellules NK à un niveau élevé, et également à la surface de LT, sous la forme d'un homodimère lié par un pont disulfure. NKG2D reconnaît une famille de molécules de stress

présentant des homologies de structures avec les CMH-I : MIC-A, MIC-B, ULBP-1 à -6. Dans certaines situations, ces ligands peuvent exister sous formes solubles dans le sérum de patients ou être exprimés à la surface de cellules stressées par des pathologies infectieuses ou tumorales. On parle alors de reconnaissance induite par le stress, ou « stress-induced recognition » (Bauer et al., 1999; Raulet et al., 2013).

e) Les KIR-S (Killer cell Immunoglobulin-like Receptors-Short) et le KIR2DL4

Les KIR-S sont des récepteurs de surface qui appartiennent à la superfamille des Ig. Leur domaine intra-cytoplasmique étant court, il signale l'activation en s'associant avec DAP12. Bien que certaines molécules du CMH-I ont été décrites comme des ligands de faible affinité pour plusieurs KIR-S, d'autres comme le KIR2DS1, reconnaissent certains allèles HLA-C du groupe 2. L'allèle Cw*04 a été identifié comme étant le ligand de KIR2DS4. Pour la plupart des KIR-S, les ligands n'ont pas encore été formellement identifiés (Boyington et al., 2001).

Le KIR2DL4, bien qu'ayant un long domaine intra-cytoplasmique, présente des propriétés activatrices qui sont dues à l'inactivation de l'un de ses motifs ITIM. Alors qu'il est très faiblement exprimé à la surface de cellules NK non stimulées, il est exprimé plus fortement intra-cellulairement. Il semble être uniquement dévolu à induire la production d'IFN-γ mais pas de cytotoxicité. Son ligand est HLA-G qui est exprimé dans des conditions tumorales et infectieuses sous forme soluble. Il semble également jouer un rôle particulièrement important dans la reconnaissance foeto-maternelle car il est y exprimé à la surface des cellules à l'interface afin de réguler la réponse NK (Rajagopalan and Long, 2012).

f) DNAM-1 (DNAX Accessory Molecule-1)

DNAM-1 est un récepteur de la superfamille des Ig. Sa partie extracellulaire est composée de deux domaines Ig et possède trois résidus tyrosines dans sa queue intracellulaire permettant de transduire son signal activateur (Shibuya et al., 1996). CD112 (PVR) et CD155 (Nectin-2) ont été identifiés comme ses ligands et ils sont généralement exprimés sur les cellules tumorales (Bottino et al., 2003; Pende et al., 2005). L'engagement de DNAM-1 augmente l'activité cytolytique et la production de cytokines par les cellules NK. Il est toujours exprimé à la surface de la cellule NK et serait impliqué dans une collaboration avec le récepteur NKp30 pour interagir avec les DC (Bottino et al., 2003; Pende et al., 2006).

g) CD160

C'est une molécule de la superfamille des Ig qui est composée d'un seul domaine Ig extracellulaire. Chez les cellules NK périphériques, il est exprimé sur les $CD56^{dim}CD16^{+}$. L'engagement du CD160 induit la cytotoxicité et la production de cytokines par les cellules NK via HLA-C (Le Bouteiller et al., 2011) ou le HVEM (HerpesVirus Entry Mediator) (Šedý et al., 2013).

1.3.2 Marqueurs d'inhibition

La reconnaissance du soi par les cellules NK est effectuée par les récepteurs inhibiteurs qui contrairement aux récepteurs activateurs, ne reconnaissent pas des molécules de stress mais dans leur grande majorité des molécules du CMH-I. Leur signal inhibiteur est transduit par l'intermédiaire d'un motif ITIM qui est présent dans leur domaine intra-cytoplasmique. Les KIR-L sont historiquement ceux qui ont été les plus décrits comme participant à l'inhibition mais également à la reconnaissance du soi et donc à la tolérance. Les autres principaux récepteurs inhibiteurs sont NKG2A, ILT-2, le CD161 et le Siglec-7.

a) KIR-L (Killer Immunoglobulin-like Receptors-Long)

Les récepteurs KIR ont été identifiés au début des années 1990. Ils sont essentiellement exprimés sur les cellules NK $CD56^{dim}$ et faiblement sur les $CD56^{bright}$. Ce sont des glycoprotéines qui se lient à certaines molécules du CMH-I (Wagtmann et al., 1995). Il existe 15 gènes KIR dans deux pseudogènes regroupés sur le chromosome 19 et répartis dans deux haplotypes. L'haplotype A est invariant, il contient essentiellement des KIRs inhibiteurs. Au contraire, le nombre de gènes contenus dans l'haplotype B est variable et il contient de nombreux KIR activateurs. Certains gènes sont communs aux deux haplotypes afin de servir de base pour la construction des autres KIR. Les KIR-L inhibiteurs sont au nombre de sept : KIR2DL1, -2DL2, -2DL3, 2DL5, -3DL1, -3DL2 et 3DL3, et représentent le pendant des KIR-S précédemment cités. Leur signal inhibiteur passe par deux motifs ITIM intracytoplasmiques activés après interaction avec leurs ligands. Chacun d'entre eux reconnaît un groupe d'allèles particuliers du CMH-I. KIR2DL1 reconnaît les allèles HLA-C du groupe 2. KIR2DL2/3 reconnaît les allèles HLA-C du groupe 1. Les allèles HLA-B du groupe Bw4 sont reconnus par le KIR3DL1. Enfin, KIR3DL2, qui s'exprime sous la forme d'un homodimère, reconnaît certains allèles du HLA-A (HLA-A3 et A11) (Kulkarni et al., 2008).

b) NKG2A

Le NKG2A appartient à la famille des lectines de type C. Il s'exprime sous forme d'hétérodimère en association avec la molécule CD94, qui permet la discrimination du soi et du non-soi. Il est exprimé sur la très grande majorité des cellules NK CD56^{bright} et sur une partie des NK CD56^{dim}. Il transmet son signal inhibiteur via son domaine intracellulaire ITIM après interaction avec HLA-E, un CMH-I non conventionnel (CMH-Ib) ; le même qui est reconnu par NKG2C, le pendant activateur de NKG2A. L'expression de NKG2A est dépendante de la disponibilité des peptides signaux des CMH classiques pour être exprimé à la surface. A l'inverse, un signal de stress peut être émis par la cellule en fixant des molécules sur le HLA-E afin d'abroger son affinité avec le NKG2A (Braud et al., 1998).

c) CD161

Le CD161 est un membre de la superfamille des Lectines-C qui est exprimé fortement à la surface des cellules NK sous forme d'homodimère lié par un pont disulfure. Il a pour rôle de bloquer l'activité cytotoxique (Lanier et al., 1994). Il est exprimé très précocement lors de la différenciation des cellules NK. LLT1 a été identifié comme l'un de ses ligands. Il est endogène et est exprimé, après activation par les TLR, sur des LB, les pDC et les mDC afin de bloquer la dégranulation et la production de cytokines (Llibre et al., 2016).

d) Siglec-7

Siglec-7 est fortement exprimé sur toutes les cellules NK et a pour ligand différentes formes d'acides sialiques. Il agit comme un récepteur inhibiteur via son domaine ITIM (Nicoll et al., 2003). À l'état latent, le domaine de reconnaissance des acides sialiques présent dans le Siglec est inaccessible. L'activation de la cellule NK déclenche un signal rendant possible l'interaction (Razi and Varki, 1999). On peut donc envisager que Siglec-7 pourrait bloquer une activation inappropriée ou agir comme un rétrocontrôle de l'activation grâce à ces signaux inhibiteurs consécutifs à l'activation de la cellule. En effet, une expression de Siglec-7 est associé à une fonction normale des cellules NK tout en restant disponible lors de l'expression de ses ligands (Shao et al., 2016).

e) KLRG1

C'est un récepteur de la famille des C-lectines possédant un ITIM intracellulaire. Il est spécifiquement exprimé sur une sous-population de $CD56^{dim}$ et a pour ligand les cadhérines E, N et R dont l'engagement bloque la cytotoxicité (Robbins et al., 2002). Ces molécules sont des protéines transmembranaires d'adhésion qui permettent des liaisons inter-cellulaires (par exemple entre des hépatocytes). KLRG1 pourrait donc être une molécule de reconnaissance de l'absence du soi car le niveau de cadhérines diminue dans le contexte tumoral (Colonna, 2006).

1.3.3 Education des cellules NK

Les cellules NK doivent être capables de distinguer les cellules du soi et du non soi afin de remplir leur rôle de sentinelle et pour ne pas engendrer de dommages auto-immuns à l'organisme. La distinction du soi et du non soi se fait grâce aux récepteurs inhibiteurs aux molécules de CMH-I, particulièrement les KIR-L ou NKG2A. Dans de la cas rare de déficience en molécules de CMH-I, l'individu présentent un répertoire normal de cellules NK non autoréactives et avec une capacité réduite à tuer des cibles $CMH\text{-}I^{-}$. L'existence des cellules NK dans un tel contexte démontre qu'elles ont été éduquées afin de ne pas détruire les cellules du soi. Les mécanismes et le site de cette éducation restent inconnus mais de nombreuses hypothèses tentent d'expliquer un tel processus (Joncker and Raulet, 2008).

La théorie du « Licensing » requiert que les voies d'activation des cellules NK soient par défaut inactives. Ainsi, si une cellule acquiert un récepteur au CMH-1 du soi, les voies d'activation deviennent compétentes. À l'inverse, la théorie du « Disarming » suggère que les cellules NK sont par défaut actives. Ainsi, si une cellule NK acquiert un récepteur au CMH-I, la tolérance est assurée. Enfin, la théorie du « rhéostat » propose que la capacité de réponse de la cellule NK dépende de la quantité de signal inhibiteur qu'elle reçoit. De plus, la capacité de réponse est réversible en fonction de la variation des signaux que reçoit la cellule NK au cours de sa vie. L'éducation de la cellule NK serait donc un processus quantitatif des signaux inhibiteurs et activateurs que la cellule reçoit (Orr and Lanier, 2010).

1.4 Autres récepteurs des cellules NK

La liste complète des récepteurs présents à la surface de la cellule NK est certainement à ce jour non exhaustive. Nous pouvons cependant citer d'autres récepteurs inhibiteurs : ILT-

2, LAIR, CD300a ; et activateurs : les récepteurs de la famille SLAM (SLAM, 2B4, Ly-9, CD84, NTB-A CRACC et CD184), NKp80, CD2, CD7, CD44 et CD59. Ces récepteurs, non détaillés ici, semblent être moins impliqués lors des infections virales et n'ont pas été particulièrement étudiés dans mes travaux.

Il est cependant important de noter que des marqueurs témoignent de l'activation des cellules NK comme le CD69 (marqueur d'activation précoce) et HLA-DR (marqueur d'activation tardif). L'état de maturation des cellules NK peut être traduit par le CD8α et le CD57. Ce dernier est un carbohydrate qui est uniquement présent sur les cellules NK $CD56^{dim}$. Son expression augmente au cours de la vie et semble ainsi être un marqueur de la maturation des cellules NK. Son expression sur les cellules NK serait également liée à des capacités cytotoxiques accrues et donc à leur implication au cours d'infections virales ou tumorales (Kared et al., 2016).

1.5 Récepteurs aux cytokines et aux chimiokines

Les cellules NK expriment également de nombreux récepteurs aux cytokines, aux chimiokines et autres facteurs. Ces molécules, solubles ou membranaires, interviennent dans la différenciation et la prolifération des cellules NK mais aussi directement dans l'activation de leurs différentes fonctions.

Lorsqu'une cellule NK périphérique détecte un signal de danger, elle va sortir du système sanguin et évoluer vers les organes lymphoïdes ou vers le site d'inflammation afin d'y être activée. Elle va devoir également établir des contacts avec les cellules cibles. Ceci est possible grâce aux sélectines (CD62-L ou CD162) qui permettent le mouvement de la cellule NK sur les parois endothéliales sanguines afin d'être recrutée via leur récepteur aux chimiokines. Enfin, les intégrines et d'autres molécules d'adhésion, permettent le contact avec les CPA (Cellules Présentatrices d'Antigènes) ou les cellules cibles (Kinashi, 2005).

Les récepteurs aux cytokines sont nécessaires à la mise en place des fonctions des cellules NK. L'IL-2 est produite par les lymphocytes T et l'IL-15 par certaines DC. Leurs deux récepteurs partagent leurs sous-unités β et γ et leur stimulation engendre la prolifération des cellules NK ainsi que l'augmentation de leur cytotoxicité. Les cellules $CD56^{Dim}$ expriment seulement les chaines β et γ d'affinité moyenne, ce qui indique que des quantités importantes sont nécessaires pour induire le signal ou bien qu'une activation préalable est

nécessaire (Nagler et al., 1990). Par contre, les cellules NK CD56^{bright} peuvent répondre à de plus faibles doses d'IL-2 en exprimant leur chaine α, formant un complexe de haute affinité (Voss et al., 1992). En revanche, l'IL-15Rα seul peut transduire un signal fort en réponse à de l'IL-15. La déficience en IL-2 ou en IL-2Rα impacte peu le fonctionnement des cellules NK. Au contraire des individus déficients en IL-15 ou IL-15Rα et en chaines β et γ présentent un profond déficit en cellules NK, ce qui montre le rôle clef de l'IL-15 et de son récepteur dans le développement de ces cellules (Gilmour et al., 2001). Les récepteurs à l'IL-7 ou à l'IL-21, partageant également la chaine γ, vont être impliqués dans le fonctionnement cytotoxique des cellules NK. En revanche le récepteur à l'IL-4 qui partage également la chaine γ du récepteur à l'IL-2, inhibe l'action de l'IL-2 via le blocage de l'expression de IL-2Rα (Nagler et al., 1988). D'autres récepteurs comme le récepteur à l'IL-12 et à l'IL-18 sont importants dans la fonctionnalité des cellules NK, car ils activent ensemble la production de différentes cytokines et particulièrement de fortes quantités de l'IFN-γ. Séparément, les récepteurs à l'IL-12 et l'IL-18 vont plutôt stimuler la cytotoxicité. L'IL-12 et l'IL-18 sont produites principalement par les macrophages activés afin d'induire la réponse NK (Fehniger et al., 1999) **(Figure 11)**. Enfin on peut mentionner le récepteur aux IFNs de type I, stimulé par l'IFN-α produit par les pDC et les cellules infectées. Ce signal va jouer un rôle majeur dans la phase très précoce des infections virales afin d'activer la cytotoxicité de la cellule NK (Biron et al., 1999).

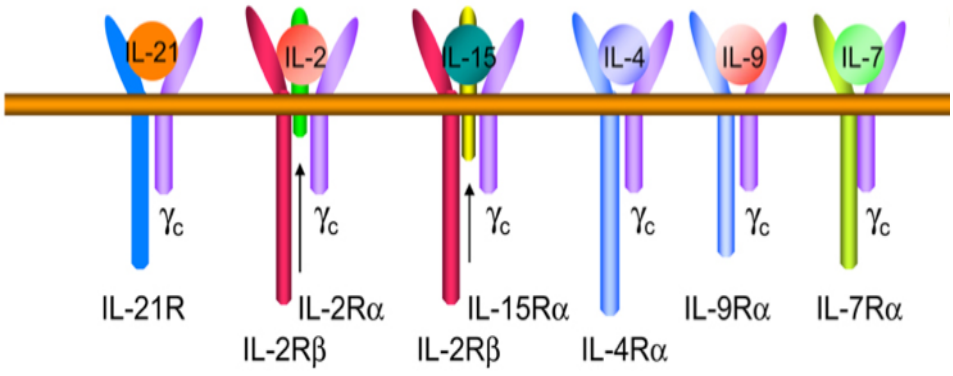


Figure 11 : Schéma des récepteurs aux cytokines : Famille des récepteurs aux cytokines partageant la même chaine γ complexée avec un récepteur α, de haute affinité, spécifique à chaque cytokine. La particularité réside au niveau de l'IL-2R et l'IL-15R qui partagent également la chaîne β, formant un hétérotrimère avec leur chaine α respective. Ils peuvent également former un complexe β/γ, d'affinité intermédiaire.

1.6. Fonctions des cellules NK

Les cellules NK possèdent des fonctions effectrices et immunomodulatrices. Chacune d'entre elles peut être la résultante des actions cytotoxiques ou de la production de cytokines en fonction qu'elles soient dirigées envers d'autres cellules de l'immunité ou directement au niveau des tissus ou cellules cibles. Plusieurs voies d'induction et d'action existent pour effectuer de la cytotoxicité et produire des cytokines.

1.6.1 Modes d'induction de la cytotoxicité

a) L'ADCC : Cytotoxicité médiée par un anticorps

Les cellules NK peuvent reconnaître une cible recouverte d'anticorps spécifiques via leur CD16a, un récepteur de faible affinité envers les IgG. L'interaction se fait par la fraction Fc des Ig et permet d'induire la lyse des cellules recouvertes d'anticorps. Ce mécanisme est appelé cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC. Il n'est pas spécifique aux cellules NK, étant donné que d'autres cellules de l'immunité innée expriment ce type de récepteurs ou des récepteurs analogues comme le CD32 ou le CD64 (Nagler et al., 1989). Il a été préalablement montré que ce mécanisme intervenait dans l'immunité anti-tumorale. Par exemple un Ac anti-CD20 comme le Rituximab s'avère efficace pour cibler les LB dans le cadre du traitement de certains cancers et de maladies auto-immunes (Edwards et al., 2004). De plus, de récents travaux ont montré qu'ils pouvaient être optimisés pour interagir plus efficacement avec le CD16 ; c'est par exemple le cas du GA101, un anti-CD20 dont l'affinité avec le CD16 a été améliorée (Tobinai et al., 2017).

b) La lyse directe par la reconnaissance du non-soi

Les cellules NK ne pouvant pas réarranger leur récepteur en fonction de l'antigène réagissent à la modulation de l'expression des molécules du CMH-I. En effet la lyse peut se produire lors de la sous-expression des molécules de CMH-I par les cellules cibles. Cela a pour effet de lever l'inhibition prédominante exercée par la liaison HLA-I/KIR-L qui pèse sur la cellule NK. Néanmoins, cette théorie initiale du « Missing-Self Recognition » a depuis évolué et semble également lier aux interactions entre les nombreux récepteurs activateurs et inhibiteurs avec leurs ligands respectifs **(Voir partie B-1.3.3)**. En fonction de la force du signal, la balance NK penchera plutôt vers un état statique ou actif (Lanier, 2005).

c) Expression de ligands de stress

Comme discuté précédemment, les cellules NK expriment une multitude de récepteurs activateurs qui surveillent l'apparition de molécules de « stress ». Ces dernières sont induites suite à une infection (virus, bactérie, champignon, parasites, ...), un stress physico-chimique (UV, radiation, stress oxydatif...) ou l'apparition de cellules cancéreuses. La détection de ces molécules ou ligands de stress par les cellules NK entraîne le déclenchement de la cytotoxicité et la lyse de la cellule « stressée ». Les récepteurs activateurs tels que les NCR, NKG2D ou DNAM-1 détectent ces signaux.

1.6.2 Mécanismes effecteurs de la cytotoxicité

Une fois activée, la cellule NK peut entraîner la lyse d'une cible en fonction de plusieurs voies directes ou indirectes.

a) L'exocytose de granules cytotoxiques

Similairement aux cellules LT $CD8^+$, les cellules NK contiennent des enzymes protéolytiques qui sont relarguées suite à leur activation. Parmi ces enzymes, la perforine va « trouer » la membrane des cellules cibles pour permettre aux granzymes (granzymes A, B, H, K ou M) ou à la granulysine d'accéder au cytoplasme afin d'induire l'apoptose (Anthony et al., 2010; Cullen and Martin, 2008). L'expression de CD107a/Lamp1 sert de marqueur pour la mise en action du relargage des granules. Ce marqueur est présent à la surface des granules et est ainsi exposé à la surface cellulaire lors de l'exocytose des granules.

b) L'engagement de récepteurs de mort cellulaire

Les cellules NK expriment des ligands qui sont capables de se lier à des récepteurs dits de « la mort cellulaire », exprimée par les cellules « stressées ». L'engagement de ces récepteurs induit l'apoptose par activation des voies dépendantes des caspases (Thorburn, 2004). Les cellules NK utilisent principalement le système FAS/FAS-Ligand mais également TRAIL (TNF-related apoptosis induicing ligand)/TRAIL-Récepteur, qui est induit en réponse à l'IL-15 (Chávez-Galán et al., 2009). Enfin, le TNF-α induit l'apoptose dans sa forme soluble en se liant aux récepteurs TNF-RI ou membranaire par le biais du récepteur TNF-RII (Declercq et al., 1998).

1.6.3 Production de chimiokines et cytokines

a) Chimiokines

La libération de ces molécules par les cellules NK sert de signal d'alarme afin d'attirer d'autres populations cellulaires au site d'inflammation. Suite à un signal par des cytokines, les chimiokines vont être rapidement produites. Elles sont divisées en quatre sous-familles : CC, CXC, C, CX3C. Les NK produisent notamment CCL4/MIP-1Beta, CCL5/RANTES ou encore CXCL8/IL-8 (Maghazachi, 2010).

b) Cytokines

En réponse à différents stimuli, les cellules NK ont la capacité de produire de grandes quantités de cytokines diverses. Les combinaisons de stimuli, utilisées pour activer les cellules NK, orientent la production de cytokines précises. Leur pouvoir de régulation de signaux intracellulaires impacte l'immunité adaptative et innée.

L'IFN-γ est considéré comme la cytokine clef produite par les cellules NK. Sa production est optimale par des NK $CD56^{bright}$ mais possible également par les $CD56^{dim}$ suite à une stimulation par de l'IL-12 associée à l'IL-18. L'IFN-γ oriente une réponse de type LT helper, pour activer les cellules présentatrices d'antigènes et augmenter l'expression des molécules de CMH-I (Wallach et al., 1982). De plus, l'IFN-γ active les macrophages afin d'éliminer les pathogènes intracellulaires et a des effets antiprolifératifs sur les cellules infectées ou malignes (Maher et al., 2007). L'IFN-γ peut également être produit après un contact cellule-cellule, qui fait intervenir des récepteurs activateurs tel que le CD16 résultant alors de l'implication des NK $CD56^{dim}$ (Fauriat et al., 2010).

Outre l'IFN-γ, les cellules NK peuvent également synthétiser du TNF-α, une cytokine pro-inflammatoire, après stimulation par de l'IL1. Du TGF-β (rôle dans l'immunomodulation de la réponse inflammatoire) ou du GM-CSF (nécessaire pour la maturation des cellules dendritiques et des macrophages) peuvent également être produits en réponse à un stimulus par de l'IL15 et de l'IL-18 tandis que l'IL-10 (cytokine immunomodulatoire) peut être induite par une stimulation IL-12 et IL-15. En revanche, l'IL-4 et l'IL-13 ont un impact négatif sur la production des autres cytokines (Cooper et al., 2001b).

2. Cellules NK et infections virales chroniques

Les cellules NK et leurs fonctions sont primordiales dans la défense contre les infections virales. Grâce au large répertoire de récepteurs, de cytokines et de chimiokines, mais surtout leurs interactions avec les autres cellules de l'immunité les cellules NK sont des acteurs majeurs dans le devenir d'une infection virale. Par exemple le contrôle des virus de la famille des *Herpesviridae* ou du virus *Influenza* est en première intention réalisé par les cellules NK (Vivier et al., 2008). Du fait de l'importance du rôle des cellules NK dans le contrôle des infections virales, différents mécanismes d'échappement sont mis en place par les virus afin de pouvoir persister et atteindre leur stade chronique. Leur étude est donc centrale pour comprendre les fonctions NK impliquées dans le contrôle ou la clairance virale.

2.1. Mémorisation par les cellules NK

Les caractéristiques de la mémoire immunitaire sont la spécificité antigénique et une réponse amplifiée lors des rencontres suivantes de l'antigène. Les cellules NK reconnaissent des antigènes grâce à un répertoire de récepteur invariant suggérant que leur réponse est équivalente quelque soit l'infection. Néanmoins plusieurs travaux sur la souris ont démontré depuis la possibilité que des cellules NK peuvent adopter un comportement de cellule mémoire. En effet, O'Leary et al ont montré que chez des souris déficientes en LT et LB, les cellules NK résidentes du foie développaient une réponse mémoire face à une haptène un mois après la sensibilisation (O'Leary et al., 2006). De plus, la génération de cellules NK avec des propriétés mémoires a été également observée à la suite d'une infection virale par le MCMV (CMV murin). En effet, Sun et al ont montré qu'une population Ly49H$^+$ (récepteurs KIR chez la souris) proliférait après l'infection par le MCMV et qu'elle persistait dans la rate, les ganglions lymphatiques et le foie au moins deux mois après l'infection (Sun et al., 2009).

Chez l'Homme, il a également été décrit des cellules NK « memory-like » exprimant des niveaux élevés de FcγR (dont CD16) amputés de leur chaine γ intracellulaire : les cellules NK FcγRΔg. Cette population, partiellement identifiée par l'expression élevée de NKG2C, est présente à une fréquence importante chez les individus CMV$^+$. De plus, les cellules NK FcγRΔg manifestent des fonctions antivirales contre le CMV, HSV et le virus *Influenza* en présence d'anticorps spécifiques à ces virus. Enfin, cette population augmente chez des individus infectés par le VIH-1 et a également été associé à la protection de la pathologie hépatique causée par l'infection du VHC (Paust et al., 2017).

2.2. Phénomène d'exhaustion des cellules NK

L'état d'exhaustion des cellules immunes décrit le statut de disfonctionnement des cellules dans un contexte tumoral ou d'infection chronique. Il est généralement caractérisé par un mauvais contrôle de l'infection dû à une diminution de la fonction et une altération du phénotype. De multiples mécanismes pourraient contribuer à l'épuisement des cellules NK, telles que la signalisation dérégulée de leurs récepteurs, ainsi que des effets suppressifs par des cellules régulatrices ou des facteurs solubles dans le microenvironnement.

L'exhaustion peut être traduite par une diminution des récepteurs activateurs et une augmentation des récepteurs inhibiteurs. Par exemple, dans le cas de l'infection à l'hépatite B, il a été observé une diminution des récepteurs activateurs 2B4 et NKG2D ainsi qu'une diminution de l'expression de leur adaptateur intracellulaire SAP et DAP10. Cela a pour conséquence une dérégulation de la fonction cytotoxique et de la production d'IFN-γ. Ce mécanisme peut être associé à une surexpression du TGF-β1 ce qui permet à l'infection de persister (Sun et al., 2012). De même d'autres récepteurs activateurs tels que les NCR ont vu leurs expressions diminuées lors de l'infection chronique par le VHC, en association avec un échec de traitement par de l'IFN-α/ribavirine (Bozzano et al., 2011). Les récepteurs inhibiteurs associés à l'exhaustion, tels que PD-1 et TIM-3 sont augmentés et associés à une diminution des capacités prolifératives des cellules NK en réponse à des stimulations par des cytokines, à une diminution de la production de leurs propres cytokines et de leurs fonctions cytotoxiques dans un contexte tumoral (Pesce et al., 2017) et d'infection virale chronique (Ju et al., 2010). On peut également citer dans le contexte des hépato-carcinomes, l'augmentation de NKG2A est associée à une augmentation de son ligand HLA-E qui est induite par l'expression de l'IL-10. Ce profil a été associé à l'exhaustion des cellules NK (production intracellulaire d'IFN-γ faible après stimulation par l'IL-12) ainsi qu'à un mauvais pronostic vital (Sun et al., 2017). Mais une surexpression de HLA-E par des lignées tumorales pourrait s'apparenter à un mécanisme de protection contre l'action des cellules NK (Lo Monaco et al., 2011). L'expression des ligands des récepteurs activateurs peut paradoxalement contribuer à l'exhaustion des cellules NK. En effet, une surexpression de MIC-A/B diminue l'expression de NKG2D à force d'y être exposée (Sanchez-Correa et al., 2011). Enfin, des modifications post-traductionnelles des ligands comme MIC-A/B réduisent l'affinité au NKG2D (Tsuboi et al., 2011). L'exhaustion peut être bloquée en inhibant les récepteurs inhibiteurs. De même l'activation peut être restaurée par des agonistes ou des traitements cytokiniques (Bi and Tian,

2017). Ce mécanisme observé pendant les infections chroniques, peut donc potentiellement être reversé afin de « réveiller » les cellules NK pour cibler efficacement les cellules en état de stress.

2.3. Les cellules NK dans l'infection VHC

Dans le cadre de l'infection VHC, les cellules NK sont impliquées dans chacune des phases de l'infection mais avec des profils très variables au cours de l'infection. On observe que les cellules NK sont plus activées, différenciées et fonctionnelles. Il est important de noter que les cellules NK représentent jusqu'à 50% des lymphocytes intra-hépatiques et peuvent augmenter jusqu'à 90% lors de l'infection VHC (Golden-Mason and Rosen, 2013).

2.3.1 Rôle dans la protection ou la clairance du virus

Chez les individus qui éliminent spontanément l'infection dans les premiers mois, il a été montré que les cellules NK périphériques ont un effet antiviral direct ainsi que des effets immuno-modulateurs. En effet, ils produisent de l'IFN-γ pour bloquer la réplication virale. Un polymorphisme spécifique dans le gène IL28B de l'IFN-λ3 est l'un des paramètres les plus associés avec une protection contre le VHC. Un autre marqueur est la présence de l'association récepteur/ligand entre le KIR2DL3/HLA-C1 : elle est le signe d'une protection contre l'évolution vers la phase chronique, elle prédomine chez les personnes séronégatives à risque et elle est associée avec un traitement efficace. Cette population de cellules NK KIR2DL3^{+} semble être plus activée. Toutefois, d'autres études ont montré une absence de corrélation avec la clairance du VHC. Comme pour le VIH-1, certains allèles « protecteurs » sont nécessaires mais pas suffisants (Jost and Altfeld, 2013). L'expansion de sous-populations de cellules NK particulières dans le sang périphérique sous-exprimant certains récepteurs (NCR, NKG2D, CD161) dans la phase aiguë est corrélée avec la clairance virale (Alter et al., 2011). Alors qu'une autre étude implique plutôt une augmentation de la population NKG2D^{+} qui est associée à une augmentation de la production d'IFN-γ et de la cytotoxicité (Amadei et al., 2010). En ce qui concerne la protection, on observe une augmentation de l'expression de NKp30 et des fonctions cytotoxiques chez des patients à risques (Golden-Mason et al., 2010). Une autre étude montre que les cellules NK polyfonctionnelles expriment fortement NKp44 et NKp46 (Werner et al., 2013). Le rôle précis des cellules NK dans la clairance ou la protection au VHC reste donc à être mieux défini mais l'étude de patients véritablement en phase aiguë rend difficile l'exploration des profils des cellules NK.

2.3.2 Rôle dans la phase chronique (Figure 12)

Pendant la phase chronique, les cellules NK sont mieux décrites : leurs fréquences diminuent et elles présentent une altération de leur phénotype et de leur fonction (Golden-Mason and Rosen, 2013). Il a été suggéré que le VHC influence le phénotype des cellules NK plus fortement dans le sang que dans le foie (Cosgrove et al., 2014) et de nombreuses études se sont plutôt intéressées aux profils des cellules NK de la périphérie (Mondelli et al., 2010). On peut en citer deux qui partagent des similitudes à l'infection chronique par le VIH-1 : l'apparition de la sous-population dysfonctionnelle $CD56^{-}CD16^{+}$ (Gonzalez et al., 2009) et la diminution de l'expression de Siglec-7 qui est associée à une diminution des fonctions des cellules NK (Varchetta et al., 2016). En ce qui concerne l'expression des fonctions cytotoxiques et de production d'IFN-γ, leurs diminutions sont associées avec l'augmentation de l'inflammation et de la fibrose (Fugier et al., 2014). D'autres données sur les cellules NK intra-hépatiques montrent une augmentation de l'expression de NKG2A, NKG2D, ou encore de NKp30. En revanche, les données de la littérature sont contradictoires en ce qui concerne l'expression du récepteur activateur NKp46 qui est soit associée à une augmentation soit associée à une diminution des fonctions des cellules NK intra-hépatiques. Ces contradictions observées pourraient être dû à la différence des méthodes d'isolement des cellules NK intra-hépatiques utilisées et au stade d'inflammation et/ou de fibrose. Il est intéressant de noter que des observations similaires ont été faites chez des patients infectés par d'autres hépatites virales ; ce qui suggère que l'altération des cellules NK est une conséquence de la physiopathologie hépatique et non de l'infection (Krämer et al., 2012; Mondelli et al., 2010; Pembroke et al., 2014). Ainsi, une étude *in vitro* montre que la capacité des cellules NK à produire de l'INF-γ serait dépendante de la réponse IFN-α des pDC au cours de l'infection (Zhang et al., 2013). De manière plus précise, la protéine NS5A module les réponses cytokiniques des monocytes induisant ainsi la diminution de l'expression du récepteur activateur NKG2D et par conséquent les fonctions des cellules NK (Sène et al., 2010).

D'autres études *in vitro* montrent en revanche une action directe du virus sur la réponse des cellules NK, ce qui permet la persistance du virus. Les cellules infectées par le biais de la protéine virale NS3 vont induire une diminution de l'expression du récepteur NKp46 et l'altération de la fonction des cellules NK (Yang et al., 2017). Le récepteur CD81, qui est le récepteur majeur de l'entrée virale, est également exprimé par les cellules NK et a été identifié comme un récepteur inhibiteur lors d'une étude *in vitro*. En effet, la protéine E2

du VHC interagit avec le CD81 ce qui provoque l'inhibition des fonctions des cellules NK (Crotta et al., 2002). Des études plus récentes, et également *in vitro,* ont montré que l'inhibition de la cellule NK serait principalement induite par l'expression des ligands du récepteur activateur NKp30 à la surface des cellules infectées induisant ainsi une diminution de l'expression du récepteur NKp30 ainsi que des fonctions des cellules NK (Holder et al., 2013).

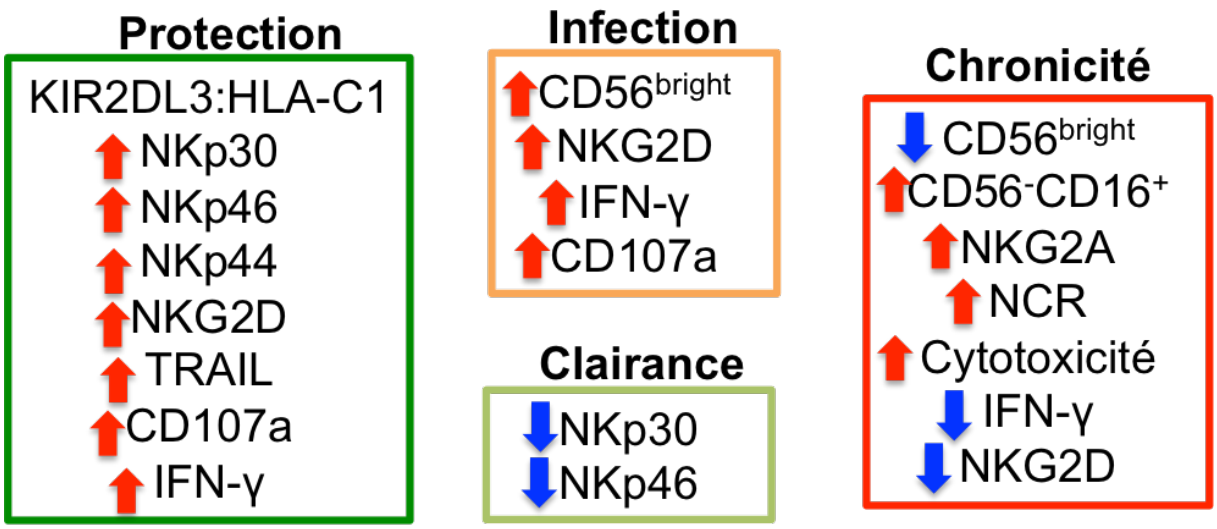


Figure 12 : Récapitulatif de la modulation des récepteurs NK à différents stades de l'infection par le VHC (d'après Golden-Mason et al., 2010)

2.4. Cas de l'infection VIH

2.4.1 Rôle dans la protection

Comme discuté dans la **partie A-1.5.2**, des patients séronégatifs constamment exposés à l'infection possèdent une réponse immunitaire forte contre le VIH-1. Dans ce phénomène les cellules NK participent activement au blocage du virus. Il a été montré chez des utilisateurs de drogues par intraveineuse (UDI) que, malgré un pourcentage normal de cellules NK, elles sont beaucoup plus cytotoxiques. De plus, les cellules NK chez les UDI ont tendance à induire plus de cytokines (IFN-γ et TNF-α) et à sécréter plus de β-chimiokines (agonistes des co-récepteurs du VIH-1) que les autres groupes contrôles. Il est intéressant de noter que la fonction cytotoxique des cellules NK est faible chez les UDI infectés par le VIH-1 (Scott-Algara et al., 2003). Une autre étude chez les partenaires des individus infectés par le VIH-1 montre une forte production d'IFN-γ par les cellules NK, après stimulation, en comparaison des groupes contrôles (Montoya et al., 2006). Une étude approfondie de la

réponse des cellules NK chez les UDI révèle une expression plus importante du CD107a qui est associée à l'augmentation du marqueur d'activation CD69 (Ravet et al., 2007). Ce profil activé des cellules NK a été associé avec une maturation plus importante des pDC, favorisant le contrôle du VIH-1 (Tomescu et al., 2010). Ces données montrent ainsi le rôle primordial de la réponse innée, et particulièrement des cellules NK, dans la protection contre le VIH-1.

2.4.2 Rôle dans le contrôle viral

Comme discuté dans la **partie A-3.1.2**, des individus séropositifs sont capables de contrôler l'infection pendant de très longues périodes tout en gardant un niveau de LT $CD4^+$ haut et/ou une charge virale basse. Ce contrôle est associé en particulier à l'expression d'HLA-I « protecteurs ». Il a ainsi été montré par plusieurs études qu'une progression lente de l'infection est associée à l'expression plus importante de KIR3DS1/L1 en présence des allèles protecteurs HLA-Bw4. De plus cette combinaison permet de sélectionner des cellules NK avec une activité plus importante (Jost and Altfeld, 2013). Une étude chez les LTNP et chez les HIC a montré que leurs cellules NK ont une fonction cytotoxique plus importante que des progresseurs ainsi qu'une expression d'IFN-γ plus importante après stimulation (Vieillard et al., 2010). Il a été également observé que des cellules NK-$CD8^+$ polyfonctionnelles sont associées à une progression plus lente de la pathologie (Ahmad et al., 2014). Ces fonctions des cellules NK plus importante semble permettre la mise en place des réponses ADCC. En effet on observe chez les EC une plus grande proportion d'anticorps anti-VIH-1 pouvant se fixer au CD16a (Kulkarni et al., 2017; Madhavi et al., 2017). Chez les individus VIH-2, les données sur l'implication des cellules NK sont encore plus limitées. Il a été surtout observé que les cellules NK semblent être plus fonctionnelles chez des patients infectés par le VIH-2 que chez des patients infectés par le VIH-1 (Bächle et al., 2016; Nuvor et al., 2006). Dans le contrôle de l'infection VIH, les cellules NK semblent avoir un impact important sur l'immuno-surveillance.

2.4.3 Rôle dans la phase chronique

L'infection par le VIH-1 est associée à une fonction altérée des cellules NK dès la phase aiguë de l'infection qui se maintient durant la progression de la maladie. En effet, plusieurs stratégies d'échappement sont mises en place par le VIH-1 de manière directe ou indirecte, ayant un impact délétère sur les sous-populations NK. Alors qu'au cours de la phase aiguë il y a une expansion des cellules NK $CD56^{Dim}$, on observe au cours de la phase

chronique une corrélation négative entre la fréquence des cellules NK fonctionnelles et la virémie. En effet, on observe l'expansion d'une population de cellules NK dysfonctionnelles $CD56^{-}CD16^{+}$ au détriment de la population de cellules NK $CD56^{Dim}$. Cette population particulière n'est pas observée chez les LTNP ou bien elle est progressivement éliminée lors du traitement cARV. Les cellules NK, et particulièrement, la population $CD56^{-}CD16^{+}$ expriment plus faiblement les récepteurs activateurs NKp30 et NKp46, affectant leur propriété de surveillance contre le virus, leur activité cytotoxique, l'expression de cytokines antivirales et leur interaction avec d'autres cellules de l'immunité (Brunetta et al., 2010). Un autre marqueur du passage à la phase chronique est la perte progressive de l'expression du Siglec-7 observée au cours de la primo-infection, qui est associée au cours de la phase chronique à l'expansion de la population $CD56^{-}CD16^{+}$. Ce récepteur est maintenu chez les patients LTNP alors qu'il est associé à une diminution des fonctions des cellules NK chez des progresseurs (Brunetta et al., 2009). De plus, des formes solubles de Siglec-7 sont retrouvés dans le sérum et sont associées positivement à la charge virale (Mikulak et al., 2017). Le VIH-1 va également agir sur l'expression des ligands des récepteurs des cellules NK. Après infection, les LT $CD4^{+}$ expriment les ligands ULBP1-3 du NKG2D pour signaler l'infection (Ward et al., 2007). Mais la protéine Nef semble pouvoir moduler l'expression de ULBP-1 et -2 (Cerboni et al., 2007) et diminuer l'expression de HLA-A et -B (Cohen et al., 1999). L'expression de HLA-C peut être diminuée à la surface des LT $CD4^{+}$ infectés par le biais de la protéine virale Vpu. Il est intéressant de noter que le VIH-2 peut également induire la diminution de l'expression de HLA-A et -B par Nef mais également HLA-C malgré l'absence de la protéine Vpu. Sachant que ces protéines virales sont très variables ce phénomène n'est pas constamment observé (Apps et al., 2016). De même ces protéines virales sont impliquées dans l'endocytose des ligands de DNAM-1, comme PVR ; induisant alors une diminution de la capacité des cellules NK à lyser ces cellules. La protéine Nef du VIH-2 ne peut pas induire ce mécanisme (Matusali et al., 2012). L'infection par le VIH-1 n'induit pas l'expression des ligands de NKp30 ou de NKp46 (Ward et al., 2007) **(Figure 13)**.

L'expression du ligand du NKp44 a été longuement étudiée. En effet, un mécanisme d'échappement du VIH-1 a été décrit (Vieillard et al., 2005, 2016) et met en jeu le ligand de NKp44 appelé NKp44L. Il a été identifié comme étant une nouvelle isoforme de MLL5 (Mixed-Lineage Leukemia 5), une protéine normalement impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et dans l'hématopoïèse. Contrairement à MLL5 qui est exprimé dans toutes les cellules saines, NKp44L n'est observé que dans certaines situations de stress cellulaires

telles que les cancers et certaines infections virales. NKp44L est en fait produit de façon intra-cytoplasmique suite à une activation cellulaire puis transloqué à la surface de la cellule, mais uniquement dans des conditions de stress (Baychelier et al., 2013). Dans le cadre de l'infection par le VIH-1, il a été observé que les LT $CD4^+$ de patients infectés sous cARV expriment à leur surface le NKp44L qui provoque leur lyse par des cellules NK-$NKp44^+$. La fréquence des LT $CD4^+NKp44L^+$ corrèle avec la charge virale et inversement avec le taux de LT $CD4^+$, et est associée à la présence de cellules NK-$NKp44^+$. La translocation du NKp44L est induite par un motif spécifique et hautement conservé de la gp41 du VIH-1, appelé motif 3S (Vieillard et al., 2005). En effet, des anticorps anti-3S sont retrouvés dans le sérum de patients infectés et sont capables de bloquer l'expression de NKp44L (Vieillard et al., 2006). Le motif 3S est localisé entre HR1 et HR2 **(Figure 3)** et est exposé à la surface de la structure trimérique de pré-fusion de l'enveloppe du VIH-1, ce qui concorde avec de récentes résolutions de la structure de l'enveloppe trimérique du VIH-1 (Lee et al., 2016; Pancera et al., 2014). L'induction du NKp44L va avoir lieu lorsque le motif 3S va interagir avec une région bien précise du gC1qR (résidus 174 à 180) présent sur les LT $CD4^+$ (Fausther-Bovendo et al., 2010; Pednekar et al., 2016). Cette interaction du motif 3S provoque alors la translocation du NKp44L à la surface des LT $CD4^+$ qui deviennent sensibles à la lyse par des cellules NK exprimant NKp44. Précisément il a été mis en évidence que le signal de transduction du NKp44L induit par l'interaction 3S/gC1qR implique la voie PhosphatIdylinositol-Trisphosphate (PIP3)/NADPH oxydase (H_2O_2). Brièvement, elle consiste en l'induction de PIP3 par l'interaction 3S/gC1qR qui entraîne la production intracellulaire d'H_2O_2, provoquant une cascade moléculaire menant à la translocation de NKp44L (Fausther-Bovendo et al., 2010). IL est à noter que la protéine Nef du VIH-1 est capable d'inhiber la translocation du NKp44L à la surface des LT $CD4^+$, afin de préserver les cellules infectées et le réservoir viral (Fausther-Bovendo et al., 2009). Ces données vont également dans le sens des travaux de Ward et al., qui ont observé seulement l'expression de NKp44L à la surface de cellule non infectée (Ward et al., 2007). Ces cellules deviennent alors sensibles à la lyse par les cellules NK, aggravant la phase de déplétion massive des cellules non-infectées observé au cours de la phase chronique de l'infection VIH-1 et résultant du stade SIDA. En résumé, un mécanisme d'échappement viral va indirectement détourner le rôle primaire des cellules NK pour devenir délétère vis-à-vis du système immunitaire pour installer au mieux la phase chronique de l'infection.

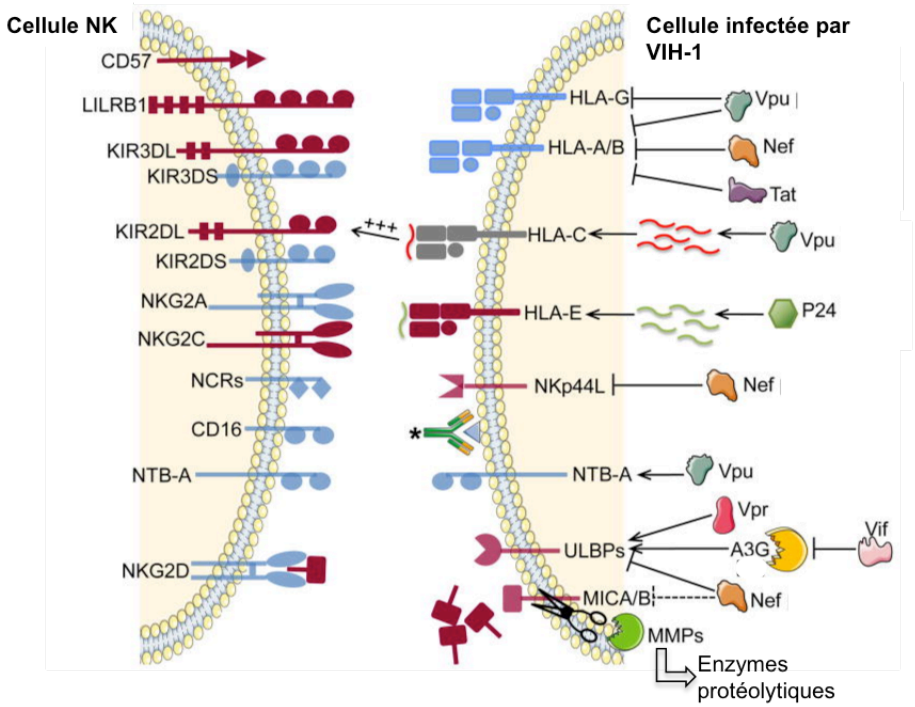


Figure 13 : Principaux mécanismes de modulation des ligands des cellules NK par l'infection VIH-1 : Le panneau de gauche représente les principaux récepteurs des cellules NK modulés pendant l'infection. Le panneau de droite représente les protéines induites ou provenant du VIH-1 modulant l'expression des ligands des récepteurs NK : augmentation (en rouge), diminution (bleu), blocage de l'expression (rouge pâle) et expression normale (gris). * Anticorps spécifique au VIH-1 (Jost and Altfeld, 2012)

Objectifs

Le VIH et le VHC sont responsables d'infections chroniques à l'origine de pandémies dont les relations avec le système immunitaire ne sont pas encore à ce jour complétement comprises. Les études actuellement menées pourraient permettre d'améliorer nos connaissances et mettre en place de nouvelles approches thérapeutiques. Les principaux objectifs de mon travail de thèse étaient :

1- De réaliser une étude extensive des cellules NK au cours de l'infection chronique par le VIH-2. Cette analyse a permis de mettre en évidence des différences phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK chez les patients infectés par le VIH-2 par rapport à des patients LTNP et HIC VIH-1^{+}.

2- De déterminer le rôle des cellules NK intra-hépatiques dans l'évolution chronique du VHC. Dans un premier temps, cette étude a pour but de déterminer le rôle des cellules NK intra-hépatiques exprimant NKp44 dans cette infection. Ensuite, j'ai cherché à déterminer le rôle potentiel de NKp44L au cours de l'infection par le VHC. Ces travaux étaient basés sur des données de la littérature qui montrent que le gC1qR interagit avec la protéine Core du VHC. Ceci suggère qu'un mécanisme similaire à celui que l'équipe avait observé au cours de l'infection par le VIH-1 puisse se produire pendant l'infection par le VHC. L'objectif est de rechercher si la protéine Core du VHC peut induire l'expression du NKp44L et de déterminer le(s) mécanisme(s) impliqué(s).

3- De disséquer la réponse anticorps neutralisante induite par un peptide modifié de la gp41. Ce projet dérive de travaux réalisés précédemment dans le laboratoire qui a mis en évidence une région importante et très conservée du VIH-1 nommée 3S. L'interaction du peptide 3S avec un récepteur ubiquitaire gC1qR à la surface des LT $CD4^{+}$ induit l'expression de NKp44L qui active la fonction cytotoxique des cellules NK. Le développement du vaccin thérapeutique VAC-3S à partir de ce peptide et les essais cliniques chez des patients infectés par le VIH-1 sous cARV immunisés par ce vaccin ont mis en évidence que VAC-3S était non toxique et immunogène aux plus fortes doses, permettant d'induire une augmentation des LT $CD4^{+}$ et du rapport des LT $CD4^{+}/CD8^{+}$. En parallèle, des travaux sur la structure du motif 3S ont mis en évidence qu'une simple substitution (W614A-3S) induit la production d'anticorps neutralisants chez la souris. Mon travail a consisté à rechercher la présence de ces anticorps chez les patients LTNP et à étudier les corrélats de protections associés. De plus, j'ai recherché dans différents modèles animaux la meilleure formulation vaccinale utilisable chez l'Homme.

Résultats

Projet 1 : Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK chez des patients contrôleurs du VIH-2

Introduction

Sur une cohorte de 23 patients contrôleurs du VIH-2, une étude phénotypique et fonctionnelle des cellules NK périphériques a été menée. D'après Thiébaut et al sur une cohorte VIH-2 de 342 patients, 6,1% étaient considérés comme des LTNP et 9,1% comme des HIC (Thiébaut et al., 2011), en utilisant les mêmes critères que ceux utilisés pour les patients VIH-1 (respectivement 0,43% et 0,22%). Cette proportion élevée de « contrôleurs » du VIH-2 a été associée à des fonctions cellulaires des LT et/ou à une réponse anticorps neutralisante plus efficaces. En revanche, dans ce contexte infectieux, l'implication de la réponse innée a été peu étudiée (Nyamweya et al., 2013). Ainsi, nous nous sommes intéressés à l'étude des profils phénotypiques et fonctionnels des cellules NK en les comparant à celui des patients VIH-1 LTNP et HIC, afin d'évaluer leur implication dans la physiopathologie du VIH-2.

Article 1

(En soumission à Plos Pathogen)

Unconventional role of natural killer cells is imprinted during chronic HIV-2 infection by an interplay between NKp30 and its ligands.

Olivier Lucar[1], Mariama Sadjo Diallo[1], Charles Bayard[1], Assia Samri[1], Patrice Debré[1], Françoise Brun-Vézinet[2], Sophie Matheron[3], Rémi Cheynier[4,5,6], Vincent Vieillard[1§], for the ANRS CO5 IMMUNOVIR-2 Study group

1 Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM U1135, CNRS ERL8255, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), Paris, France. **2** Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Laboratoire de Violologie, Hôpital Bichat, Paris, France. **3** Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Bichat, Paris, France. **4** Institut Cochin, INSERM, U1016, Paris, France. **5** CNRS, UMR8104, Paris, France. **6** Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

Funding: This work was supported in part by the ANRS (Agence nationale de recherches sur le sida et les hépatites virales), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and the Université Pierre et Marie Curie, Paris, France. OL received a doctoral fellowship from Sidaction.

Competing interests: The authors have no conflicting financial interests

§E-mail: vincent.vieillard@upmc.fr

ABSTRACT

HIV-1 and HIV-2 differ notably in their epidemiology, with HIV-1 spread globally and HIV-2 mainly confined to West Africa. Natural killer (NK) cells are critical antiviral effectors of the immune system. This study shows that HIV-2 induces major but distinct modifications in NK cell phenotypes and functions distinct from those in long-term non-progressor and controller HIV-1$^+$ patients. Profound down-modulation of the activating NKp30 receptor (p<0.0001) on NK cells occurs and is correlated negatively with HLA-DR (r=-0.4970; p=0.0002) and positively with both NKG2A (r=0.5324; p<0.0001) and Siglec-7 (r=0.4621; p=0.0004). It is also associated with polyfunctional impairment in the presence of various stimuli. To determine the mechanism leading to NK cell dysfunction in HIV-2, we analyzed cell ligands for major NK cell receptors and observed a robust and specific increase in the frequency of HIV-2-infected target cells expressing NKp30 ligands. This increase was not observed in HIV-1. Together these data suggest that down-modulation of NKp30 induced by chronic ligand exposure subverts NK cell-mediated responses to establish persistent HIV-2 infection.

Author Summary

Although infections by human immunodeficiency virus types 1 (HIV-1) and 2 (HIV-2) spread similarly, their epidemiology differs; HIV-2 remains mostly limited to West Africa, with very limited occurrence elsewhere. The likeliest explanation for this very different global epidemiology is that HIV-2 has a lower rate of transmission, related to its lower viral loads throughout most of its natural history. Natural killer (NK) cells play vital roles in the innate immune system, mediating cytotoxicity and immunoregulation via a vast network of receptors, which are triggered upon interaction with their corresponding ligands to detect cell targets and spare normal cells. We describe here the first extensive phenotypic and functional analysis of NK cells in chronic HIV-2 infection. Our detailed analysis of the activating NKp30 receptor showed that it is profoundly down-modulated, in inverse correlation with a cell-activation marker and its capacity to produce an inappropriate amount of interferon-γ. High expression of specific cell ligands for NKp30 on HIV-2-infected target cells appears to implement a novel viral escape mechanism. Overall, these data suggest that chronic exposure of specific NK cell ligands by HIV-2 induces a high rate of dysfunctional target cells that play a key role in avoiding recognition by NK cells.

Introduction

In recent decades, intensive research has focused on HIV-1 infection. Much less attention has been paid to the related HIV-2, which is endemic in West Africa, and in countries with strong socioeconomic ties to this region [1]. Compared to HIV-1 infection, the clinical course of HIV-2 infection is generally characterized by a longer asymptomatic stage and, even without combinatorial antiretroviral therapy (cART), by lower plasma HIV viral loads and a lower mortality rate. HIV-2–infected patients can however progress to AIDS over time [2]. Spontaneous control of infection is nonetheless more common among HIV-2-infected individuals, with HIV controllers (HIC) accounting for 9.1% of HIV-2-infected individuals [3], compared to 0.2% in HIV-1-infected individuals [4].

Natural killer (NK) cells comprise a unique niche because they serve as a bridge between innate and adaptive immune processes. Upon detection of generic signals of stress, transformation, or infection, NK cells acquire immediate effector functions. In infectious settings, NK cells are the critical effectors of antiviral innate immune responses, as shown by the high susceptibility to viral diseases of individuals with inherited NK deficiencies [5]. NK cells, while engaged in immune surveillance processes, distinguish their cellular targets from healthy cells via various activating receptors, including natural cytotoxicity receptors (NKp30, NKp44 and NKp46) and NKG2D and DNAM1, by recognizing ligands specifically induced to maintain self-tolerance on "stressed" cells and inhibitory receptors, such as NKG2A and KIR-L receptors [6]. When the activating signals begin to outweigh inhibitory ones, NK cells produce an array of cytokines (e.g. IFN-γ and TNF-α), while they continue to perform their cytotoxic functions [7]–[9]. In HIV-1 infection, various genetic, epidemiological, and functional studies have shown that NK cells may be directly involved in preventing HIV-1 replication [10]–[14]. In individuals with HIV-2, the data until now have been limited to a few quantifications of NK cells and/or functional studies demonstrating the cytotoxicity of these cells, more so than for HIV-1-infected subjects [15], [16].

The sparseness of these data prompted us to perform an extensive phenotypic and functional

characterization of NK cells from untreated HIV-2-infected patients of the ANRS CO5 HIV-2 cohort and compare them with those from long-term non-progressor (LTNP) and controller (HIC) HIV-1^+ patients. We report that NK cells were impaired in HIV-2^+ patients, with the activating NKp30 receptor profoundly down-modulated and inversely correlated with the HLA-DR cell-activation marker. Phenotypic alteration of NK cells was also associated with reduced NK cell polyfunctionality, even after stimulation by HIV-2-infected target cells. We also assessed the importance of specific cell ligands of NK cell receptors, especially those for NKp30, in triggering NK cell-dependent killing of HIV-2-infected, compared with uninfected and HIV-1-infected, cells. Taken together, these data suggest that an intricate interplay between NKp30 and its ligands leads to phenotypic and functional impairment of NK cells from HIV-2-infected patients.

5

Materials and Methods

Human ethics statement

This study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki and with French statutory and regulatory law. Patients received information about research performed on biological samples and provided written informed consent to participate. All participants gave their written informed consent. This study was approved by the institutional ethics committee (i.e., Comité de Protection des Personnes of Ile de France XI).

Study subjects

The ANRS HIV-2 CO5 cohort included 23 HIV-2 patients who participated in the ANRS IMMUNOVIR-2/RESERVOIR study, previously described [17]. The HIV-2 patients were all asymptomatic and treatment-naive, had been infected for at least 5 years, and had a CD4 T cell count >400 cells/µl and a viral load <400 copies/mL at enrolment (Supplemental Table S1) [3]. They were compared to 15 healthy African control subjects from the same regions [18]) and to 21 non-treated LTNP and 10 HIC HIV-1 patients from the ANRS ALT cohort [12]. Blood samples from 20 uninfected white healthy controls (CAU-Ctl) were obtained from the French Blood Bank (Etablissement Français du Sang) and analyzed as controls for HIV-1 patients (Table 1).

Flow cytometric analysis

$CD3^{-}CD56^{+}$ NK cells were analyzed from frozen PBMC by flow cytometry with an appropriate cocktail of monoclonal antibodies (mAbs): anti-CD56-PC7 (#N901), CD-45-Krome Orange, anti-CD159a/NKG2A-PE (#Z199), anti-NKp46-PE, anti-CD57-Pacific Blue, KIRDL2/DL3-PE, Siglec-7-PE, and NKG2D-APC mAbs from Coulter; anti-CD3-efluro780 (#UCHT1) mAb from eBioscience; CD161-FITC (#DX12), KIRDL1-FITC, and DNAM-1-FITC mAbs from BD Pharmingen; anti-

NKG2C-APC mAb from R&D systems; anti-HLA-DR-AlexaFluor 700 (#Immu-357) and anti-KIR3DL1 AlexaFluor700 mAbs from BioLegend; and anti-NKp30-APC mAb from Miltenyi Biotech. At least 20,000 $CD45^+$ cells were acquired on a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter) and then analyzed with Flow Jo version 9 (TreeStar).

Polyfunctional assay

NK cells were incubated with standard HLA class I negative K562 target cells (ATCC CCL243), at an effector:target (E:T) cell ratio of 1:1, in the presence of anti-CD107a mAb (#H4A3; Becton Dickinson), to measure degranulation. Cells were thereafter incubated for 5 hours in the presence of Golgi Stop and Golgi Plug solutions (BD Biosciences) and then stained with cell-surface markers (anti-CD3, anti-CD56, anti-CD45, and anti-NKp30 mAbs). Cells were fixed, permeabilized with a cytofix/cytoperm kit (Becton Dickinson), and then intracellularly stained with anti-IFN-γ (#B27; Becton Dickinson) and anti-TNF-α (#Mab11; eBiosciences) mAbs, as previously described [12]. Data were analyzed with Flow Jo version 9 (TreeStar), with the "Boolean gate" algorithm. Pestle software was used to remove the background, and pie charts, generated with Spice software (NIAI freeware) [12] present the frequency of NK cells positive for 0, 1, 2, or 3 responses. Arcs depict the frequency of cells positive for CD107a, IFN-γ, or TNF-α.

HLA genotyping

DNA samples were extracted from patients' whole blood with the QIAamp DNA blood mini kit (Qiagen). HLA class-I alleles were hybridized with the LABType SSO kit (One Lambda). HLA sequences were read with a LABScan 200 (Luminex Technology) and computer-assisted HLA Fusion software.

Staining and analysis of uninfected and HIV-infected target cells for ligands of NK-cell receptors

CEM cells were infected with 10^3 50% tissue culture infective dose ($TCID_{50}$) of the HIV-1_{JR-CSF} or HIV-2_{ROD} strains [19]. Seven to nine days after infection, cells were prepared for flow cytometry analysis. Uninfected and HIV-infected CEM cells were washed 3 times and then stained with 10 µg/ml of soluble fusion proteins (NKp30, NKp44, and NKp46-Ig from R&D Systems) or monoclonal antibodies (ULBP-1, -3, or -2,5,6 from R&D Systems) for 2 hours at 4°C. Cells were then incubated with rat anti-mouse IgG Ab (1/50) or Fcγ-fragment-specific conjugated affinity-purified $F(ab')_2$ fragments of goat anti-human IgG (1/50; Jackson ImmunoResearch), as previously described [20]. To analyze CMH-I expression, anti-HLA-ABC mAb (BD) was incubated for 30 minutes at 4°C. Cells were fixed, permeabilized with a cytofix/cytoperm kit (Becton Dickinson), and then intracellularly stained with KC-57 mAb (Coulter) to measure viral protein levels from HIV-1 and HIV-2. Data were analyzed with Flow Jo version 9 (TreeStar).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with Prism software (GraphPad, CA, USA). The non-parametric Mann-Whitney *U*, Kruskal-Wallis, and Wilcoxon tests were used as appropriate for comparison of continuous variables between groups. Correlations between variables were calculated with the non-parametric Spearman rank-order test. Principal component analysis was used to assess the differences between groups graphically for the following variables: HLA-DR, NKG2A, CD57, NKG2C, NKG2D, and NKp30. The PCA was performed with XLSTAT (Addinsoft). The component loadings were calculated as correlations between measured expression values and principal component scores. *P* values >0.05 were not considered significant.

Results

Cell activation and NKp30 expression on NK cells are associated with chronic infection by HIV-2$^+$

An extensive phenotypic study was performed to study NK cells in people infected with HIV-2$^+$; all had a CD4 count ≥400 cells/µl and almost all an undetectable viral load (Table 1). Both the proportion and absolute counts of circulating CD3$^-$CD56$^+$ NK cells were similar in the HIV-2 patients and healthy African controls; their absolute counts were slightly higher than those in uninfected and HIV-1-infected (LTNP and HIC) Caucasian (Figure 1A). The CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cell subsets were equivalent in the different groups (Figure 1B). The proportion of CD56$^-$ NK cells remained similar in healthy donors and HIV-2$^+$ patients (data not shown), but was much higher in viremic HIV-1-infected patients [21].

Table 1. Summary of clinical characteristics of the individual studies

	AFR-Ctl	HIV-2	CAU-Ctl	LTNP-HIV-1	HIC-HIV-1
Number	15	23	20	21	10
Male/Female	7/9	10/13	9/11	11/10	5/5
Age (year)	39±13	49±10	43±12	39±9	44±15
CD4 count (cells/µL)	1104±137	958±324	902±66	758±335	699±169
Time since diagnosis (years)	-	14.1±5.6	-	10.1±1.8	10.6±1.3
Viral load (copies/mL)	-	14±6	-	51006±87573	74±40
Viral DNA (copies/10^6 PBMC)	-	156±164	-	1131±1626	42±29

Results are presented as mean±SD.
Plasma viremia was analyzed by an ultrasensitive qPCR assay with a lower limit detection of 1 copy per milliliter of plasma.

An extensive analysis of NK cell-surface receptors enabled us to better characterize NK cells from HIV-2$^+$ patients. A hierarchical clustering analysis of CD3$^-$CD56^{dim} NK cells revealed that HIV-2-infected patients were easily distinguishable from healthy African donors (Supplementary Figure S1). The healthy African and white controls expressed similar levels of NK cell markers, except for CD161 (Figures 1C and Supplementary Figures S2 and S3), as previously described [18]. NK cells from patients with HIV-2 were indistinguishable from all 3 other groups, in their cell-surface expression of

several inhibitory receptors, including NKG2A, KIR2DL1, and KIR2DL2/DL3 receptors (Supplementary Figures S2 and S3). In contrast, the late differentiation CD57 marker and KIR3DL1 were significantly higher in HIV-2-infected patients than in any other group, regardless of HLA genotype (Supplementary Figures S2 and S3 and Table S2). The level of KIR3DL1 was also correlated with that of NKG2C (r=0.0055, p=0.0056), an activating receptor mostly upregulated in viremic HIV-1^+ patients [12], [22]. Notably, a very high frequency of NK cells from HIV-2 patients specifically expressed the late cell-activating HLA-DR marker (median: 35.0% [8.4-89.7]), compared with those from white and African healthy donors (less than 11.0%) and from HIV-1 infected patients (median 18.1% [6.2-39.6] for LTNP and 8.8% [1.5-21.0] for HIC) (p<0.0001). Similar effects were observed in the median fluorescence intensity (MFI) (Supplementary Figure S2). In contrast, expression of NKp30, NKp46, NKG2D, and DNAM1, all major activating NK receptors, was lower in HIV-2^+ patients, with significantly lower values for MFI and NKp30 frequency (median: 37.1% [8.1-73.5]) than in HIV-1^+ patients or healthy donors (medians between 85.8 and 90.1%) (p<0.0001) (Figures 1C and 1D, and Supplementary Figure S2). In HIV-2^+ patients, the percentage of NK cells expressing NKp30 was correlated negatively with the level of HLA-DR (r=-0.4970; p=0.0002) and positively with those of NKG2A (r=0.5324; p<0.0001) and Siglec-7 (r=0.4621; p=0.0004) (Figure 1E). Siglec-7 is an acid-binding sialic receptor, the presence of which indicates a highly functional NK cell subset [23]; its level was significantly lower in HIV-2^+ patients (in frequency and MFI), as previously observed in chronic HIV-1^+ patients [24]. In HIV-2^+ patients, Siglec 7 was also correlated negatively with HLA-DR (r=-0.6504; p=0.0008) and positively with NKG2A (r=0.4937; p=0.0167) (Supplementary Figure S2). Nonetheless, none of the tested NK cell markers was correlated with the $CD4^+$ T-cell count, $CD4^+$ T-cell nadir, plasma viral load, or blood HIV-2 viral DNA level (Table S1). Collectively, these data suggest that infection by HIV-2 is characterized by chronic NK cell activation, associated with robustly lower expression of NK cell activating markers.

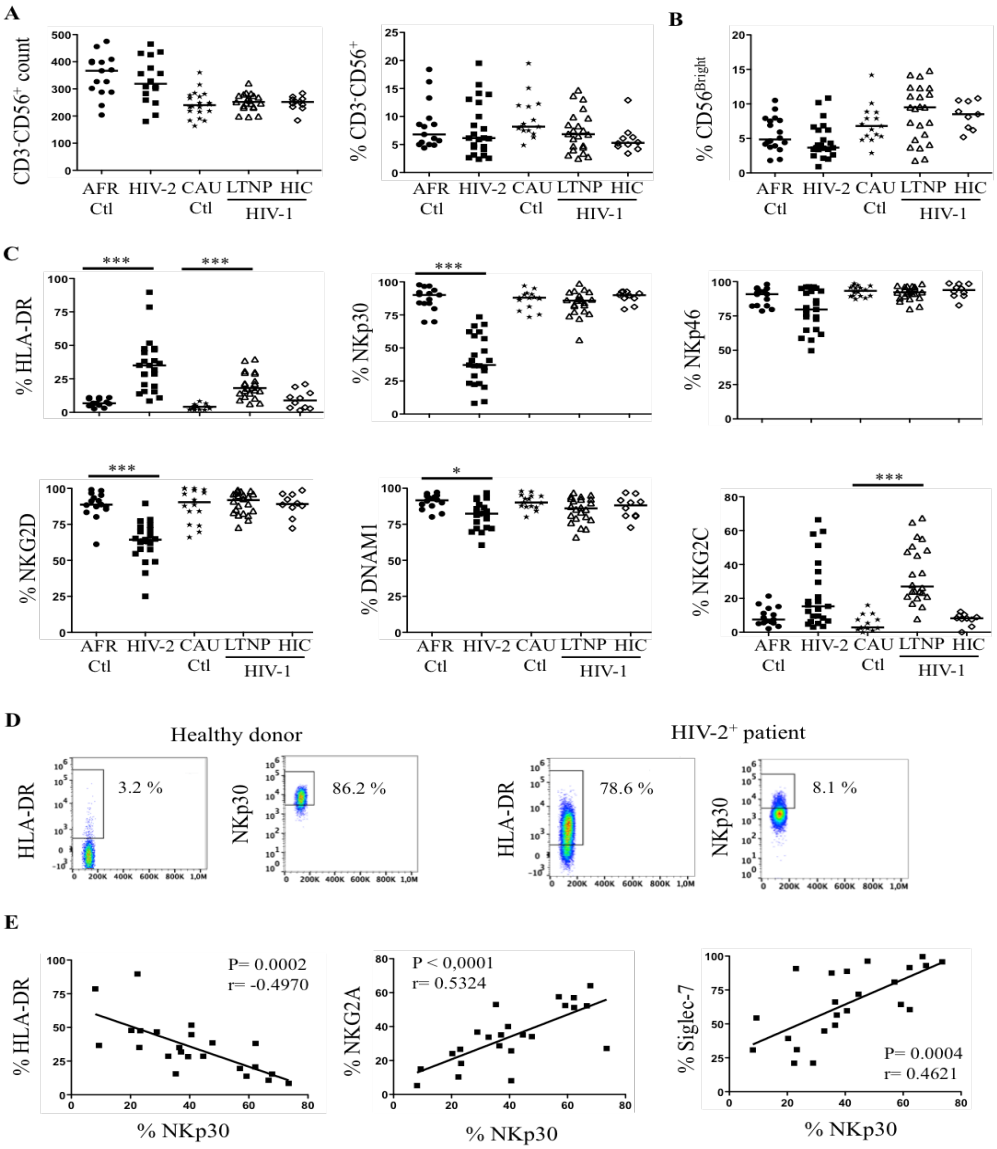


Figure 1. Quantitative and phenotypic characteristics of NK cells in HIV-2$^+$ patients.
(A) Absolute count and percentage of CD3$^-$CD56$^+$ NK cells. (B) Percentage of CD56^{bright} NK cells among CD3$^-$CD56$^+$ NK cells. (C) Percentage of CD3$^-$CD56$^+$ NK cells expressing HLA-DR and major activating markers (NKp30, NKp46, NKG2D, DNAM1, and NKG2C). Data are shown for African healthy donors (AFR, closed circles), HIV-2$^+$ patients (closed squares), LTNP HIV-1$^+$ patients (open triangles), HIC HIV-1$^+$ patients (open diamonds), and healthy white controls (CAU, stars). Horizontal bars represent the median. Intergroup comparisons were assessed with the Kruskal-Wallis test and Dunn's post-test. *p< 0.05; **p<0.01, ***p<0.001. (D) Flow cytometry expression of HLA-DR and NKp30 on CD3$^-$CD56$^+$ NK cells from a representative HIV-2$^+$ patient and a representative healthy donor. **E.** Correlation of NKp30 expression with HLA-DR, NKG2A, and Siglec-7 expression on CD3$^-$CD56$^+$ NK cells from HIV-2$^+$ patients.

These data were strengthened by a principal component analysis (PCA) that used the most significant NK cell markers to discriminate HIV-2^+ patients from both HIV-1^+ (LTNP and HIC) and healthy individuals. PCA is a mathematical algorithm that reduces dimensionality of multiparametric data by identifying components underlying the dataset. Figure 2A shows that HIV-2-infected patients segregated distinctly from the other groups; HLA-DR expression was linked to the HIV-2^+ patients, NKG2C and CD57 markers were mostly associated with LTNP HIV-1^+ patients, whereas HIC HIV-1^+ patients and healthy controls were close together but not directly associated with any specific NK cell marker (Figure 2B). Overall, this combinatorial analysis unambiguously confirmed that HIV-2 induces a different NK cell signature than that found in LTNP and HIC HIV-1 patients

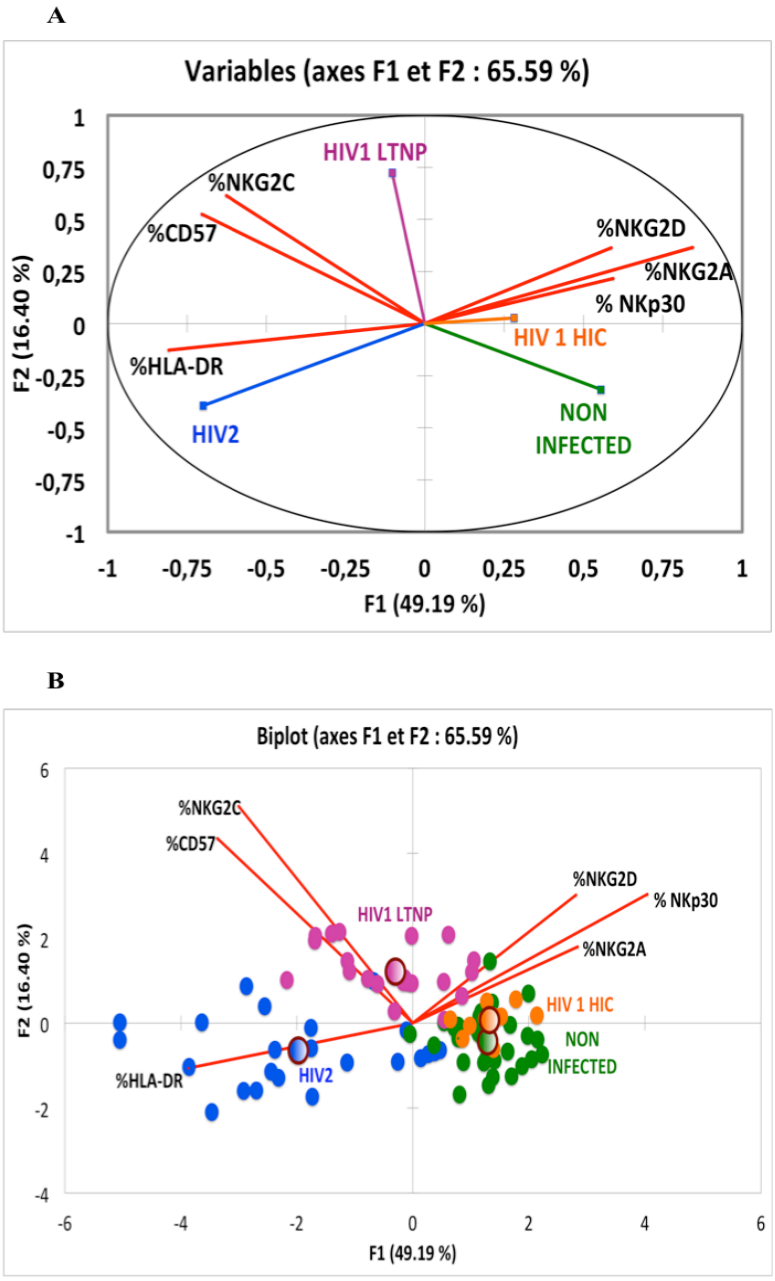


Figure 2. Principal component analysis of NK-cell markers from HIV-2$^+$ patients. This mathematical algorithm was used for graphic presentation of (A) the statistical proximity between different NK cell markers tested, and (B) the statistical distribution of the individuals according to the differential expression of NK cell markers. Analyses are performed for HIV-2$^+$ patients (blue), HIV-1$^+$ LTNP (violet), HIV-1$^+$ HIC (orange), and healthy donors (green).

13

Down-modulation of NKp30 on NK cells is associated to an up-regulation of cellular ligands on HIV-2-infected target cells

The role of specific ligands of major NK receptors was assessed by infecting target cells *in vitro* by HIV-2_{ROD} or HIV-1_{JR-CSF} strains at a frequency (mean ± SD) of 25.2±8.1% and 27.5±7.9%, respectively, depending on the experiment. For this purpose, cells were stained with specific antibodies or soluble human Ig fusion proteins for each ligand, and viruses were detected by the intracellular KC57 HIV-1 p24 Ag that cross-reacts with the HIV-2 virus. As positive controls, we used tumor cell lines that expressed the ligands tested [20], [25]. A specific and significant down-modulation of MHC class-I molecules was observed in HIV-2-infected cells (mean±SD: 50.3±7.5%, compared with uninfected cells, mean±SD: 94.3±3.8%; $p<0.0001$; Figure 3A), as previously reported for HIV-1 [26], [27]. To take into account the profound modulation we observed in the expression of several activating NK receptors in association with HIV-2 infection (Figure 1C), we tested the expression of their ligands on target cells. The major human NKG2D ligands are class I MHC-like molecules, such as ULBP family proteins, as well as MIC-A and -B. Figure 3B shows that both infected and uninfected bystander cells expressed ULBP-1 to -6 in both HIV-1 and HIV-2 infected cultures, whereas none of MIC-A, MIC-B, or ligands for NKp46 were present in the HIV-2-infected culture (Figure 3B and data not shown) (Figure 3B), After HIV-2 infection, specific induction of the cell ligand for NKp44 (NKp44L) did not take place in target cells (Figure 3B), although this ligand is specifically overexpressed on uninfected bystander cells in the HIV-1 culture, as we and others have reported [28], [29]. Inversely, ligands for NKp30 (NKp30L) were not induced in the HIV-1 culture, but their frequency in the HIV-2 culture rose to reach significant values for uninfected bystander cells (compared with their frequency in uninfected control cells, $p=0.0144$) (Figure 3B). Note, however, that the soluble forms of NKp30L (B7-H6 and BAT-3) were not detectable in the serum of patients infected with either form of HIV or of healthy donors (data not shown).

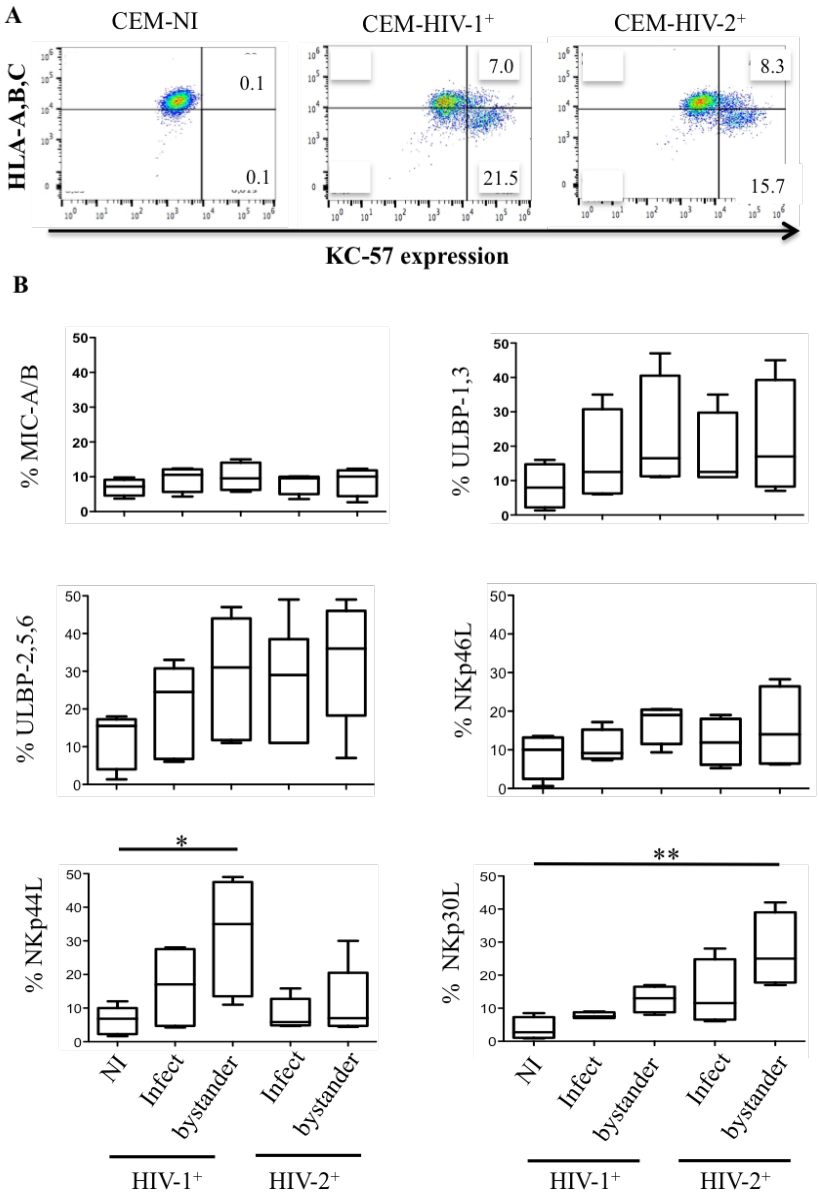


Figure 3. Expression of ligands for NK cell receptors on target cells infected by HIV-2. (A) Representative flow cytometry expression of MHC class I molecules (HLA-A, B and C) on uninfected (NI) or CEM infected by HIV-1_{JR-CSF} (CEM-HIV-1^+) or HIV-2_{Rod} (CEM-HIV-2^+) according to HIV infection (KC-57 expression). (B) Expression of ligands for NKG2D (MIC-A/B, ULBP1/3, and ULBP 2/5/6), and NCR (NKp30L, NKp44L, and NKp46) on uninfected (NI) or CEM infected by HIV-1_{JR-CSF} (HIV-1^+) or HIV-2_{Rod} (HIV-2^+). Data are shown for infected (infect; KC-57^+) and uninfected bystander (bystander; KC-57^-) CEM cells. Intergroup comparisons were assessed with the Kruskal-Wallis test and Dunn's post-test. *p< 0.05; **p<0.01.

15

Functional correlations with NKp30 in HIV-2 infected patients

To determine the functional significance of these findings, we examined the overall functional capacity of NK cells in patients with HIV-2. The cytolytic activity of NK cells is mediated by the release of cytotoxic granules containing perforin, granzyme B, and granulysin. These cytolytic markers were expressed similarly in HIV-2^+ patients and healthy controls (Supplementary Figure S4). Next, we assessed the polyfunctionality of the HIV-2^+ patients' NK cell subsets, defined by their levels of NKp30 expression (NKp30^+ and NKp30^-), their capacity to degranulate (release cytotoxic granules), measured by CD107a expression, and/or their intracellular cytokine (IFN-γ and TNF-α) production. In untreated conditions, the strongest functional capacity in HIV-2^+ patients was the production of IFN-γ by NKp30^- NK cells (Figure 4A); among these cells, a median of 54.4% produced IFN-γ, compared to 35.4% for their NKp30^+ counterparts, and less than 5% for healthy donors. In contrast, after stimulation with IL-12/IL-18, the functional level (independently of NKp30 expression) was similar in NK cells from HIV-2^+ and healthy controls (Figure S5). Other tests were performed with MHC-class I-negative K562 target cells to test their degranulation capacity, which was poorer for the NKp30^- NK cells from HIV-2 patients (measured by CD107a cell-surface expression) than for their NKp30^+ counterparts or for healthy donors (Supplementary Figure S5). NK cells from HIV-2 patients showed similar polyfunctionality profiles in the presence of uninfected and either HIV-1 or -2-infected CEM cells, regardless of the NK cell subset (Figure 4A). It is important to note, however, the significant inverse correlation between the frequency of NKp30 ligands and the expression of IFN-γ in NK cells from HIV-2^+ patients, observed only in the presence of target cells infected by either HIV-$1_{JR\text{-}CSF}$- (r=-5645; p=0.0077) or HIV-2_{Rod}- (r=-0.5684; p=0.0072) (Figure 4B). It was not observed in other stress conditions or with NK cells from healthy donors (data not shown).

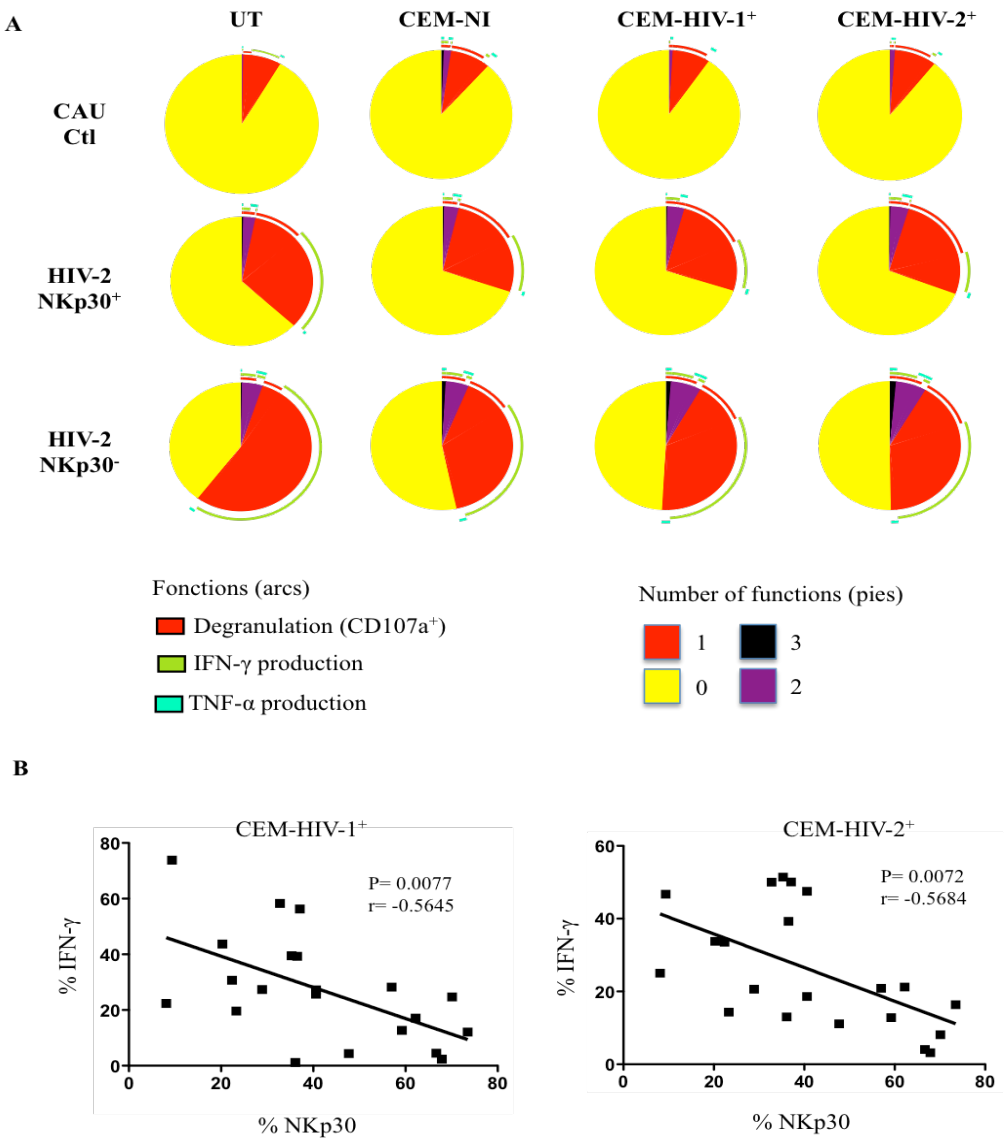


Figure 4. Functional correlations with NKp30 in NK cells from HIV-2$^+$ patients. (A) Polyfunctional assay. Cell-surface expression of CD107a and intracellular expression of TNF-α and IFN-γ were assessed on PBMC from healthy donors and HIV-2$^+$ patients subdivided into NKp30$^+$ and NKp30$^-$ subsets. The tests were performed in untreated conditions (UT) and in the presence of CEM that were uninfected (CEM-NI), or infected by HIV-1$_{JR-CSF}$ (CEM-HIV-1$^+$) or by HIV-2$_{Rod}$ (CEM-HIV-2$^+$). Effector and target were used at a 1/1 ratio. The values were analyzed with a Boolean gate algorithm (FlowJo; Tree Star). Data are presented as pie charts created with Pestle and Spice software. Colored arcs represent the frequencies of cells producing CD107a, TNF-α, and IFN-γ. Pie fractions represent cells performing 0, 1, 2, or 3 functions simultaneously. (B) Correlation between IFN-γ expression and frequency of NKp30 on CD3$^-$CD56$^+$ NK cells from HIV-2$^+$ patients in the presence of CEM cells infected by HIV-1$_{JR-CSF}$ or HIV-2$_{Rod}$.

17

Discussion

Since the discovery of NK cells, extensive research has examined their phenotypic and functional capacity against HIV-1 infection, but their role in HIV-2 remains largely elusive. After testing a large set of cell-surface markers, our in-depth analysis revealed that HIV-2 is associated with a specific profile, and the hierarchical clustering analysis showed that HIV-2^+ patients and healthy donors can be separated in two distinct groups of subjects. On the other hand, the difference between NK cells from HIV-2^+ patients and from HIV-1^+ LTNP and HIC patients suggests that these cells play distinct roles in these two infections. Specifically, we observed that a substantial proportion of NK cells from HIV-2^+ patients harbored an uncommon signature: HLA-DR^+ cells with high levels of inhibitory receptors and low levels of activating receptors. A high level of HLA-DR expression has previously been reported in HIV-1^+ patients [12] and is considered a hallmark of this infection. Increased CD38 activation has also been reported in HIV-2 infection [16]. This suggests that HIV-2 might also sustain constitutive NK cell activation, even in the absence of a detectable viral load. Nonetheless, in HIV-2-infected cells, HLA-DR is inversely correlated with the activating NKp30 marker, which is found at low levels only in viremic HIV-1^+ patients [30], [31]. Confirmation of the importance of NKp30 expression in this setting comes from chimpanzees, which control infection transmitted by exposure to human-adapted HIV-1 variants and maintain functionally competent NK cells with high levels of NKp30 expression during the course of infection [32], Down-modulation of NKp30 is not specific to HIV, but also plays a role in several other diseases, including HCV [33], [34], HPV-induced cervical cancer [35], acute myeloid leukemia [36], neuroblastoma [37], Sjögren's syndrome [38] and anti-synthetase autoimmune syndrome [39].

Down-modulation of NKp30 on NK cells is currently associated with the production of soluble forms of NKp30 ligands (NKp30L) [25], [40], [41]. We observed above that while NKp30L is not found in soluble forms in serum samples from HIV-2 infected patients, it is expressed in large quantities as membrane-bound ligands at the surface of target cells infected by HIV-2, a form found on

few, if any, HIV-1-infected cells, as Ward et al [28] have shown. These findings support that the hypothesis that the decreased expression of NKp30 on NK cells from HIV-2 patients results from chronic exposure to its ligands on target cells, as previously reported in other settings [36], [42]. Very little is known, however, about the possible mechanisms involved in the down-modulation of activating NK receptors, although it appears to depend on physical contact between NK effector cells and target cells expressing various specific ligands [43]. Examples of chronic ligand exposure-induced down-regulation of NK cell activating receptors, other than NKp30, include DNAX accessory molecule-1 (DNAM1), CD16, and NKG2D [44].

Thus, several lines of evidence indicate that NKG2D ligands induce receptor endocytosis and suggest that the rate of receptor internalization and degradation depends on the nature of the ligand [44]. In addition, functional impairment is apparently associated with down-modulation of membrane-bound ligand-mediated NKG2D; for example, reduced reception expression prevents NK cells in transgenic mice that overexpress MICA from rejecting MICA-positive tumors [45]. Similar experimental studies should be performed to analyze the NKp30 down-modulation process in patients with HIV-2. Intriguingly Holder et al [46] have shown an association between increased binding of an NKp30-Ig fusion protein to the surface of HCV-infected cells and down-modulation of NKp30 expression on NK cells. Accordingly, this phenomenon may serve as a mechanism for evasion from NK cell immune-surveillance in different situations, including HIV-2. In samples from HIV-2-infected patients, the cell ligand of NKp44 (NKp44L) is not induced in uninfected bystander cells, compared with those from HIV-1-infected patients [28]. This finding is consistent with the absence of the 3S motif in the HIV-2 envelope protein [47], [29]. Together, these data suggest that direct or indirect disruption of NCR/NCR-ligand expression is a significant event that must be considered in evaluating the balance between NK cell activation and inhibition.

The functional impact of the NKp30 down-modulation is highlighted by the poor degranulation capacity of NK cells from HIV-2-infected patients in the presence of K562 target cells, as been shown

by their low level of Siglec-7, a marker that defines normally or highly functional NK cells [23]. This result conflicts with a previous report [15], that NK cells from HIV-2 patients are cytotoxic. This discrepancy may reflect different procedures for measuring cytolytic activity. In this study we measured degranulation by cell-surface expression of CD107a, at an effector/target (E/T) ratio of 1/1, compared to the chromium release assay performed at a much higher E/T ratio, up to 50/1, by Nuvor et al., [15].

Another remarkable point is that NK cells from HIV-2$^+$ patients produce very high amounts of IFN-γ, regardless of the environmental pressure, whereas in specific CD8$^+$ T cells it is often equivalent to the levels in healthy controls [2], [48]. It is however important to note that CD8$^+$ T cells from HIV-2$^+$ patients possess an unusually strong capacity to suppress the infection in autologous CD4$^+$ T cells [17]. In NK cells, the unusually high production of IFN-γ could reflect dysfunctions of their ontogenic development or it might be a consequence of heightened levels of NK cell activation, demonstrated by HLA-DR expression, in accordance with the "discontinuity theory" [49]. It would thus affect the dialogue with other innate and adaptive immune cells. It is important to remember that NKp30 is directly involved in both dendritic cell (DC) killing and DC maturation to promote increments of IFN-γ release by NK cells [50], [51],

In conclusion, the decreased expression of the activating NKp30 NK cell receptors, induced by chronic ligand exposure, could represent a new mechanism of viral escape that participates in immune subversion mediated by HIV-2.

Supplemental Materials

Supporting Information

Supplementary Table 1 : Characteristics of HIV-2-infected patients

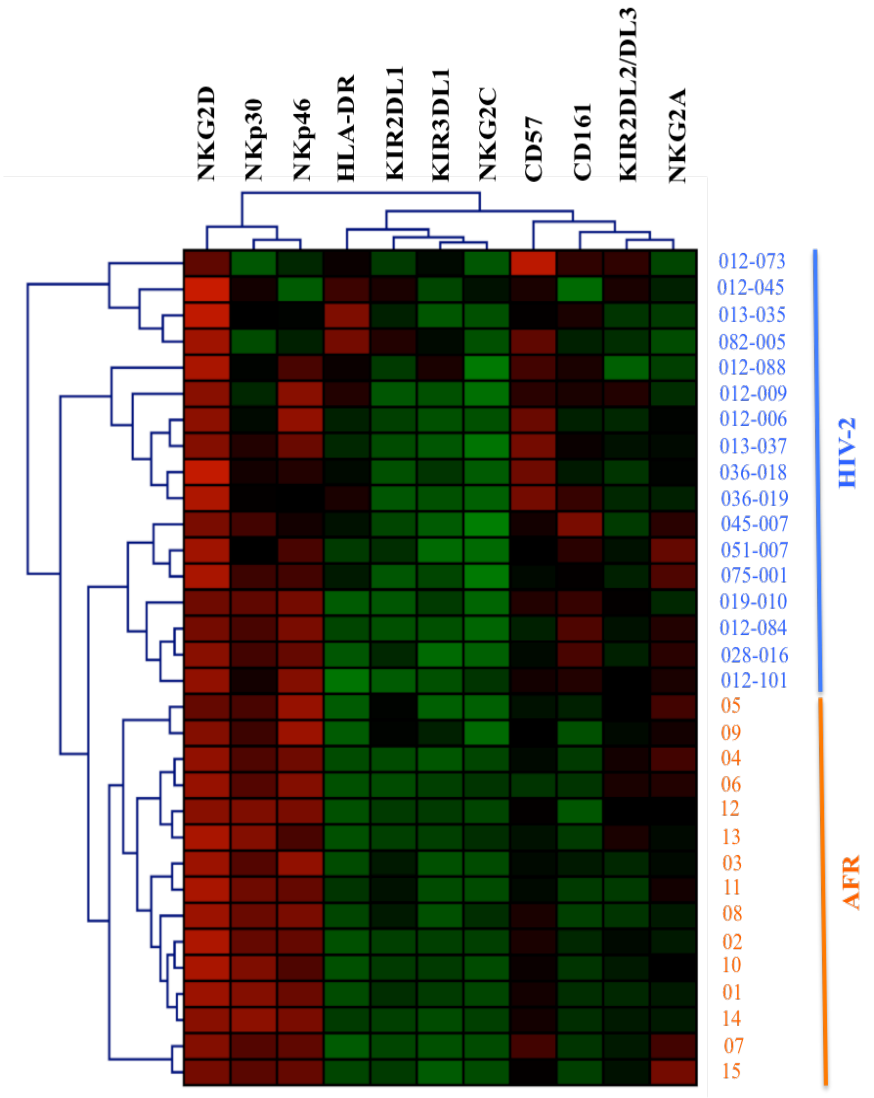
ID	Gender	Age (years)	CD4 count (cell/ul)	Nadir CD4 count (cell/ul)	Time since Diagnosis (years)	Viral load (copies/mL)	Viral DNA (copies/ 10^6 PBMC)	Country of birth
012-006	M	44	707	444	20.5	1.3	187	Ivory coast
012-009	F	54	1 118	539	27.3	2.4	10	Guinea Conakry
012-045	F	43	858	706	22.7	<1	10	France
012-073	M	52	891	602	11.3	<1	131	Ivory coast
012-084	F	50	1 776	971	8.8	<1	53	Ghana
012-088	M	70	502	390	7.4	58.0	127	Senegal
012-101	F	34	1 212	711	12.5	5.6	88	The Gambia
013-035	F	48	859	601	9.2	75.0	40	Guinea Conakry
013-037	M	59	1 300	712	8.8	<1	nd	Colombia
016-004	M	46	nd	359	7.5	nd	nd	Ivory coast
019-010	F	40	1 170	597	15.4	nd	484	Ivory coast
028-012	F	49	812	513	10.2	<1	nd	Guinea Conakry
028-016	F	49	895	528	11.3	<1	28	Ivory coast
034-005	M	55	927	588	9.0	<1	nd	Ivory coast
036-015	F	49	836	528	10.4	<1	nd	Ghana
036-018	F	39	1 036	800	12.7	<1	53	Ivory coast
036-019	M	53	1 228	1165	17.6	<1	170	Guinea Bissau
036-020	F	21	nd	465	nd	nd	nd	Ivory coast
041-002	F	59	1123	520	16.0	nd	nd	Ivory coast
045-007	F	50	nd	485	16.2	nd	517	Ivory coast
051-007	M	48	399	434	14.4	<1	nd	France
075-001	M	52	413	314	18.2	5.7	342	France
082-005	M	57	1 090	562	23.0	nd	107	Ivory coast

M : male ; F : Female

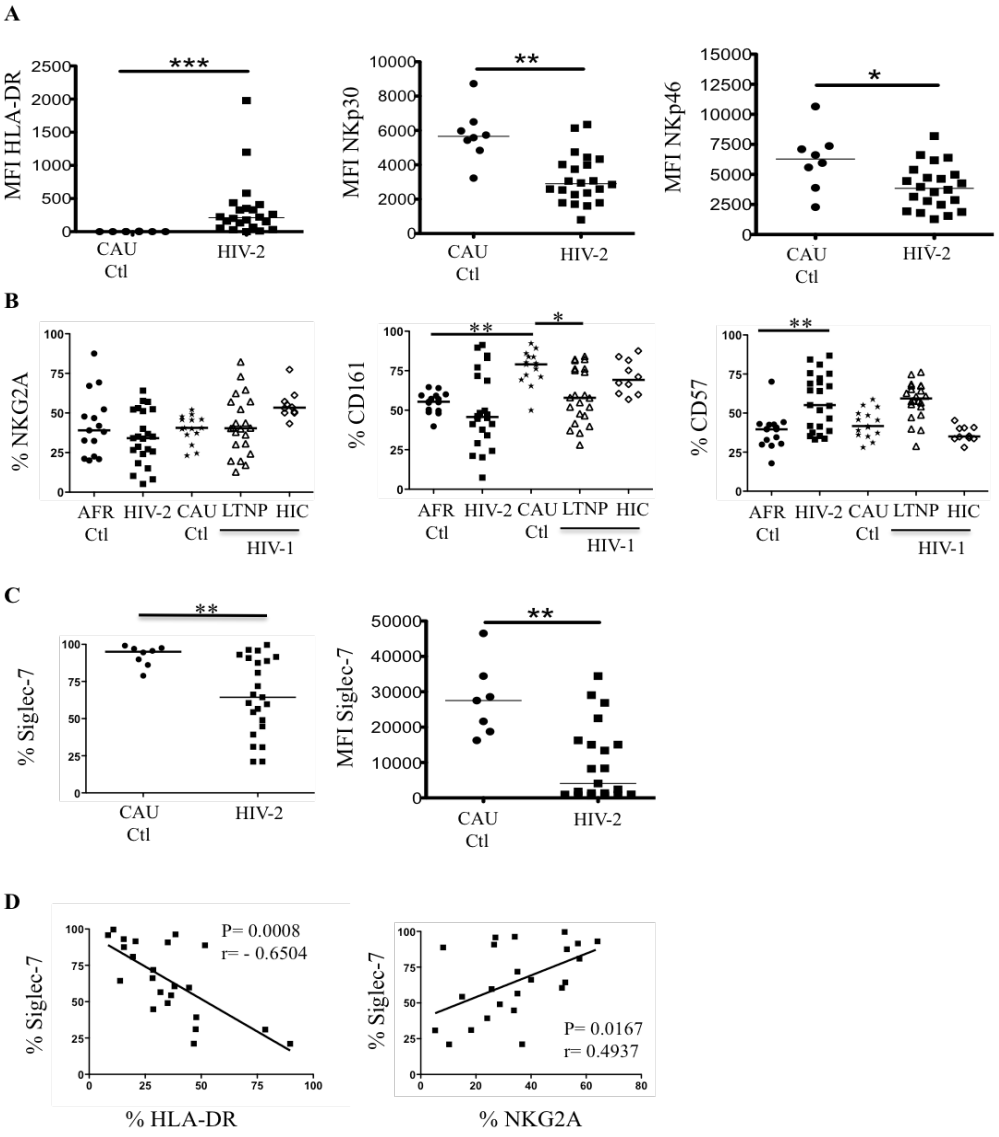
Supplementary Table 1: HLA class I typing of HIV-2-infected patients

ID	HLA-A	Bw4	HLA-B	Bw4/Bw6	HLA-C	C1/C2
012-006	03:01:01/23:01:01		35:01:01/53:01:01	Bw6/Bw4	04:01:01/04:01:01	C2/C2
012-009	03:01:01/74:01		14:02:01/15:52	Bw6/Bw6	07:01:01/08:02:01	C1/C1
012-045	01:23/33:79		15:16:01/35:03:01	Bw4/Bw6	04:01:01/14:02/01	C2/C1
012-073	02:05:01/03:01:01		49:01:01/57:03:01	Bw4/Bw4	07:01:01/18:01	C1/C2
012-084	68:01:01/68:02:01		07:02:01/52:01:02	Bw6/Bw4	nd	
012-088	02:05:01/02:05:01		27:03/53:01:01	Bw4/Bw6	02:02:01/04:01:01	C2/C2
012-101	03:01:01/26:01:01		58:01:01/58:01:01	Bw4/Bw4	03:02:01/07:01:01	C1/C1
013-035	34:02:01/68:02:01		15:03:01/53:01:01	Bw6/Bw4	02:10/04:01:01	C2/C2
013-037	01:01:01/29:02:01		44:03:01/57:01:01	Bw4/Bw4	06:02:01/16:01:01	C2/C1
013-049	02:01:01/23:01:01	Bw4	15:03:01/52:01:02	Bw6/Bw4	02:03/16:01:01	C2/C1
019-010	33:03:01/68:02:01		53:01:01/53:01:01	Bw4/Bw4	04:01:01/04:01:01	C2/C2
023-008	34:02:01/34:02:01		07:05:01/53:01:01	Bw6/Bw4	04:01:01/07:02:01	C2/C1
028-016	02:01:01/68:01:01		15:16:01/51:01:01	Bw4/Bw4	14:02:01/16:01:01	C1/C1
036-018	03:01:01/03:01:01		35:01:01/53:01:01	Bw6/Bw4	04:01:01/04:01:01	C2/C2
036-019	23:01:01/23:01:01		07:02:01/14:02:01	Bw6/Bw6	07:02:01/08:02:01	C1/C1
045-007	33:03:01/33:03:01		53:01:01/53:01:01	Bw4/Bw4	04:01:01/04:01:01	C2/C2
051-007	02:01:01/29:02:01		39:01:01/44:03:01	Bw6/Bw4	07:02:01/16:01:01	C1/C1
075-001	24:01:01/25:01:01	Bw4/Bw4	35:01:01/44:02:01	Bw6/Bw4	nd	
082-005	23:01:01/34:02:01		53:01:01/53:01:01	Bw4/Bw4	04:01:01/04:01:01	C2/C2

Nd : not done

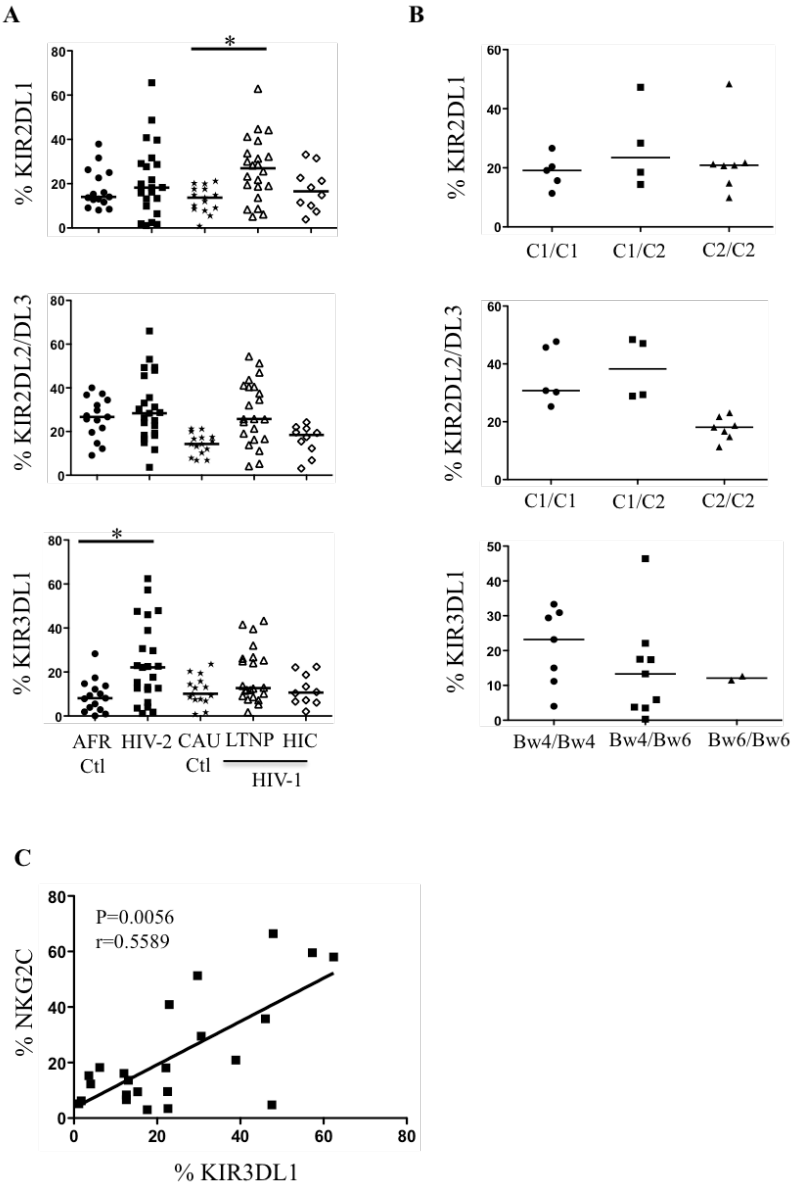


Supplementary Figure S1. Hierarchical clustering of the 11 combinations of NK cell markers from HIV-2$^+$ patients. Characteristics of each HIV-2$^+$ patient are reported in Supplementary Table 1. This analysis was performed with 17 HIV-2-infected patients and 15 healthy controls from the same origin (AFR). Each horizontal line is dedicated to a definite NK marker, with the color of each square reflecting the percentage of expression of the corresponding marker in each NK sample. The values measured for samples were color displayed and rank ordered: green color indicates inferior to median, and red color indicates superior to median. Analysis was performed using the Genesis program (available at www.genome.tugraz.at), as described [19].



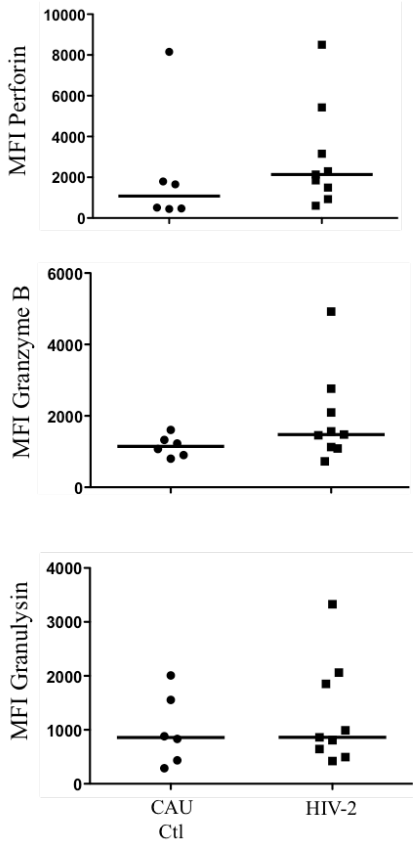
Supplementary Figure S2. Complementary analysis of phenotypic NK cell markers from HIV-2$^+$ patients. (A) Median fluorescence intensity (MFI) of HLA-DR, NKp30 and NKp46) on CD3$^-$CD56$^+$ NK cells. (B) Percentage of differentiation markers (NKG2A, CD161 and CD57) among the CD3$^-$CD56$^+$ NK cells. Data are shown for African healthy donors (AFR, closed circles), HIV-2$^+$ patients (closed squares), LTNP HIV-1$^+$ patients (open triangles), HIC HIV-1$^+$ patients (open diamonds), and Caucasian healthy controls (CAU, stars). Horizontal bars represent the median. Intergroup comparisons were assessed with Kruskal-Wallis test and Dunn post-test. *p< 0.05; **p<0.01. (C) Percentage and MFI of Siglec-7 expression among the CD3$^-$CD56$^+$ NK cells. Data are shown for HIV-2$^+$ patients (closed squares) and healthy controls (closed circles). Unpaired comparison was assessed with Mann-Whitney test; **p=0.0072. (D) Correlation between Siglec 7 and HLA-DR or NKG2A expression on CD3$^-$CD56$^+$ NK cells from HIV-2$^+$ patients.

24

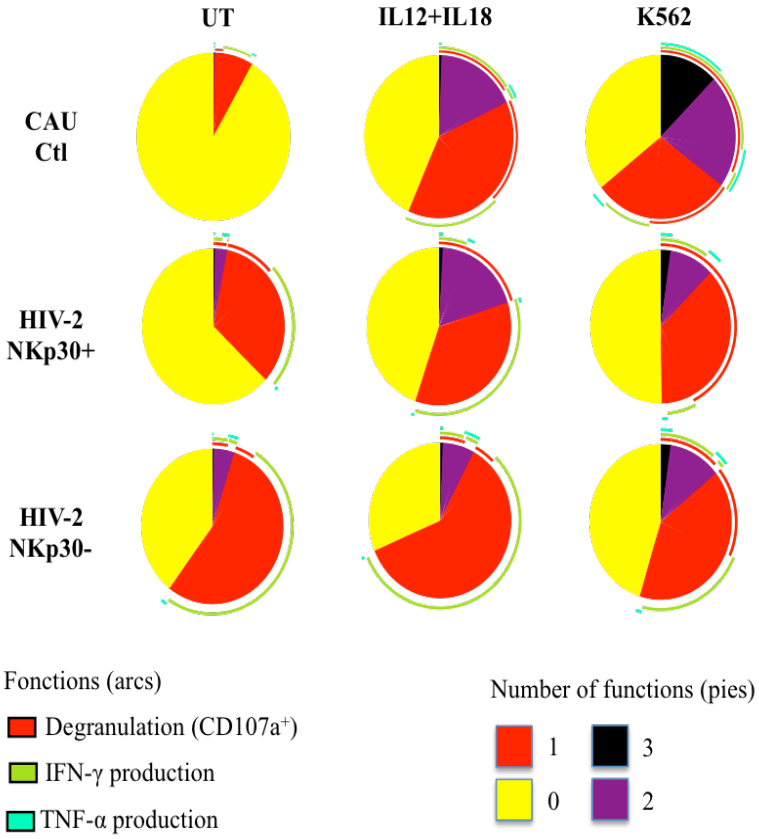


Supplementary Figure S3. Analysis of inhibitory KIR markers in NK cells from HIV-2$^+$ patients.
(A) Percentage of CD3$^-$CD56$^+$ NK cells expressing KIR2DL1, KIR2DL2/DL3 and KIR3DL1. Data are shown for African healthy donors (AFR, closed circles), HIV-2$^+$ patients (closed squares), LTNP HIV-1$^+$ patients (open triangles), HIC HIV-1$^+$ patients (open diamonds) and Caucasian healthy controls (CAU, stars). Horizontal bars represent the median. Intergroup comparisons were assessed with Kruskal-Wallis test and Dunn post-test. *p< 0.05. (B) Analysis of the recognition of inhibitory KIR (KIR2DL1, KIRD2DL2/DL3 and KIR3DL1) and HLA class I group (Supplementary Table 2). (C) Correlation between KIR3DL1 and NKG2C expression on CD3$^-$CD56$^+$ NK cells from HIV-2$^+$ patients.

25



Supplementary Figure S4. Analysis of cytolytic markers in NK cells from HIV-2$^+$ patients. Median fluorescence intensity (MFI) of intracellular expression of perforin, granzyme B and granulysin among the CD3$^-$CD56$^+$ NK cells. Data are shown for HIV-2$^+$ patients (closed squares) and healthy controls (closed circles). Horizontal bars represent the median.



Supplementary Figure S5. Complementary polyfunctional analysis of NK cells from HIV-2$^+$ patients. Cell-surface expression of CD107a and intracellular expression of TNF-α and IFN-γ were assessed on PBMC from healthy donors and HIV-2$^+$ patients subdivided in NKp30$^+$ and NKp30$^-$ sub-groups. The tests are performed in untreated conditions (UT), after stimulation with IL-12+IL18, or in the presence of MHC class-I negative K562 target cells. Effector and target are used at a 1/1 ratio. The values were analyzed with a Boolean gate algorithm (FlowJo; Tree Star). Data are presented as pie charts created with Pestle and Spice software. Colored arcs represent the frequencies of cells producing CD107a, TNF-α and IFN-γ. Pie fractions represent cells performing 0, 1, 2, or 3 functions simultaneously.

Acknowledgments

We wish to thank all participants to the ANRS CO5 IMMUNOVIR-2 Study Group: Victor Appay, Brigitte Autran, Amel Besseghir, Françoise Brun-Vezinet, Nathalie Chaghil, Charlotte Charpentier, Sandrine Couffin-Cardiergues, Rémi Cheynier, Diane Descamps, Anne Hosmalin, Gianfranco Pancino, Nicolas Manel, Lucie Marchand, Sophie Matheron, Marine Naudin, Livia Pedroza-Martins, Marie-Anne Rey-Cuille, Asier Sàez-Cirion, Assia Samri, Rodolphe Thiebaut, and Vincent Vieillard. We also thank Ioannis Theodorou, Sabine Canivet and Marie-Line Moussalli for HLA typing.

References

[1] C. van Tienen, M. S. van der Loeff, S. M. A. Zaman, T. Vincent, R. Sarge-Njie, I. Peterson, A. Leligdowicz, A. Jaye, S. Rowland-Jones, P. Aaby, and H. Whittle, "Two distinct epidemics: the rise of HIV-1 and decline of HIV-2 infection between 1990 and 2007 in rural Guinea-Bissau," *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, vol. 53, no. 5, pp. 640–647, Apr. 2010.
[2] S. Nyamweya, A. Hegedus, A. Jaye, S. Rowland-Jones, K. L. Flanagan, and D. C. Macallan, "Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis," *Rev. Med. Virol.*, vol. 23, no. 4, pp. 221–240, Jul. 2013.
[3] R. Thiébaut, S. Matheron, A. Taieb, F. Brun-Vezinet, G. Chêne, B. Autran, and immunology group of the ANRS CO5 HIV-2 cohort, "Long-term nonprogressors and elite controllers in the ANRS CO5 HIV-2 cohort," *AIDS*, vol. 25, no. 6, pp. 865–867, Mar. 2011.
[4] S. Grabar, H. Selinger-Leneman, S. Abgrall, G. Pialoux, L. Weiss, and D. Costagliola, "Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV," *AIDS*, vol. 23, no. 9, pp. 1163–1169, Jun. 2009.
[5] J. S. Orange, "Natural killer cell deficiency," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 132, no. 3, pp. 515–525; quiz 526, Sep. 2013.
[6] S. Gasser and D. H. Raulet, "Activation and self-tolerance of natural killer cells," *Immunol. Rev.*, vol. 214, pp. 130–142, Dec. 2006.
[7] J. C. Sun and L. L. Lanier, "NK cell development, homeostasis and function: parallels with $CD8^+$ T cells," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, no. 10, pp. 645–657, Aug. 2011.
[8] E. Vivier, D. H. Raulet, A. Moretta, M. A. Caligiuri, L. Zitvogel, L. L. Lanier, W. M. Yokoyama, and S. Ugolini, "Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells," *Science*, vol. 331, no. 6013, pp. 44–49, Jan. 2011.
[9] E. Vivier, S. Ugolini, and J. A. Nunès, "ADAPted secretion of cytokines in NK cells," *Nat. Immunol.*, vol. 14, no. 11, pp. 1108–1110, Nov. 2013.
[10] A. S. Fauci, D. Mavilio, and S. Kottilil, "NK cells in HIV infection: paradigm for protection or targets for ambush," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 5, no. 11, pp. 835–843, Nov. 2005.
[11] G. Alter and M. Altfeld, "NK cells in HIV-1 infection: evidence for their role in the control of HIV-1 infection," *J. Intern. Med.*, vol. 265, no. 1, pp. 29–42, Jan. 2009.
[12] V. Vieillard, H. Fausther-Bovendo, A. Samri, P. Debré, and French Asymptomatiques à Long Terme (ALT) ANRS-CO15 Study Group, "Specific phenotypic and functional features of natural killer cells from HIV-infected long-term nonprogressors and HIV controllers," *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, vol. 53, no. 5, pp. 564–573, Apr. 2010.
[13] S. Jost and M. Altfeld, "Evasion from NK cell-mediated immune responses by HIV-1," *Microbes Infect.*, vol. 14, no. 11, pp. 904–915, Sep. 2012.
[14] J. Mikulak, C. Di Vito, E. Zaghi, and D. Mavilio, "Host Immune Responses in HIV-1 Infection: The Emerging Pathogenic Role of Siglecs and Their Clinical Correlates," *Front Immunol*, vol. 8, p. 314, 2017.
[15] S. V. Nuvor, M. van der Sande, S. Rowland-Jones, H. Whittle, and A. Jaye, "Natural killer cell function is well preserved in asymptomatic human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infection but similar to that of HIV-1 infection when CD4 T-cell counts fall," *J. Virol.*, vol. 80, no. 5, pp. 2529–2538, Mar. 2006.
[16] S. M. Bächle, D. F. G. Malone, M. Buggert, A. C. Karlsson, P.-E. Isberg, A. J. Biague, H. Norrgren, P. Medstrand, M. Moll, J. K. Sandberg, M. Jansson, and SWEGUB CORE group, "Elevated levels of invariant natural killer T-cell and natural killer cell activation correlate with disease progression in HIV-1 and HIV-2 infections," *AIDS*, vol. 30, no. 11, pp. 1713–1722, Jul. 2016.
[17] M. Angin, G. Wong, L. Papagno, P. Versmisse, A. David, C. Bayard, B. Charmeteau-De Muylder, A. Besseghir, R. Thiébaut, F. Boufassa, G. Pancino, D. Sauce, O. Lambotte, F. Brun-Vézinet, S. Matheron, S. L. Rowland-Jones, R. Cheynier, A. Sáez-Cirión, V. Appay, and ANRS CO5

IMMUNOVIR-2 Study Group, "Preservation of Lymphopoietic Potential and Virus Suppressive Capacity by CD8+ T Cells in HIV-2-Infected Controllers," *J. Immunol.*, vol. 197, no. 7, pp. 2787–2795, Oct. 2016.
[18] C. Petitdemange, P. Becquart, N. Wauquier, V. Béziat, P. Debré, E. M. Leroy, and V. Vieillard, "Unconventional repertoire profile is imprinted during acute chikungunya infection for natural killer cells polarization toward cytotoxicity," *PLoS Pathog.*, vol. 7, no. 9, p. e1002268, Sep. 2011.
[19] C. Petitdemange, A. Achour, S. Dispinseri, I. Malet, A. Sennepin, R. Ho Tsong Fang, J. Crouzet, A.-G. Marcelin, V. Calvez, G. Scarlatti, P. Debré, and V. Vieillard, "A single amino-acid change in a highly conserved motif of gp41 elicits HIV-1 neutralization and protects against CD4 depletion," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 57, no. 5, pp. 745–755, Sep. 2013.
[20] F. Baychelier, A. Sennepin, M. Ermonval, K. Dorgham, P. Debré, and V. Vieillard, "Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44," *Blood*, vol. 122, no. 17, pp. 2935–2942, Oct. 2013.
[21] D. Mavilio, G. Lombardo, J. Benjamin, D. Kim, D. Follman, E. Marcenaro, M. A. O'Shea, A. Kinter, C. Kovacs, A. Moretta, and A. S. Fauci, "Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 102, no. 8, pp. 2886–2891, Feb. 2005.
[22] M. Gumá, C. Cabrera, I. Erkizia, M. Bofill, B. Clotet, L. Ruiz, and M. López-Botet, "Human cytomegalovirus infection is associated with increased proportions of NK cells that express the CD94/NKG2C receptor in aviremic HIV-1-positive patients," *J. Infect. Dis.*, vol. 194, no. 1, pp. 38–41, Jul. 2006.
[23] J.-Y. Shao, W.-W. Yin, Q.-F. Zhang, Q. Liu, M.-L. Peng, H.-D. Hu, P. Hu, H. Ren, and D.-Z. Zhang, "Siglec-7 Defines a Highly Functional Natural Killer Cell Subset and Inhibits Cell-Mediated Activities," *Scand. J. Immunol.*, vol. 84, no. 3, pp. 182–190, Sep. 2016.
[24] E. Brunetta, M. Fogli, S. Varchetta, L. Bozzo, K. L. Hudspeth, E. Marcenaro, A. Moretta, and D. Mavilio, "The decreased expression of Siglec-7 represents an early marker of dysfunctional natural killer-cell subsets associated with high levels of HIV-1 viremia," *Blood*, vol. 114, no. 18, pp. 3822–3830, Oct. 2009.
[25] A. Byrd, S. C. Hoffmann, M. Jarahian, F. Momburg, and C. Watzl, "Expression analysis of the ligands for the Natural Killer cell receptors NKp30 and NKp44," *PLoS ONE*, vol. 2, no. 12, p. e1339, Dec. 2007.
[26] G. B. Cohen, R. T. Gandhi, D. M. Davis, O. Mandelboim, B. K. Chen, J. L. Strominger, and D. Baltimore, "The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells," *Immunity*, vol. 10, no. 6, pp. 661–671, Jun. 1999.
[27] R. Apps, G. Q. Del Prete, P. Chatterjee, A. Lara, Z. L. Brumme, M. A. Brockman, S. Neil, S. Pickering, D. K. Schneider, A. Piechocka-Trocha, B. D. Walker, R. Thomas, G. M. Shaw, B. H. Hahn, B. F. Keele, J. D. Lifson, and M. Carrington, "HIV-1 Vpu Mediates HLA-C Downregulation," *Cell Host Microbe*, vol. 19, no. 5, pp. 686–695, May 2016.
[28] J. Ward, M. Bonaparte, J. Sacks, J. Guterman, M. Fogli, D. Mavilio, and E. Barker, "HIV modulates the expression of ligands important in triggering natural killer cell cytotoxic responses on infected primary T-cell blasts," *Blood*, vol. 110, no. 4, pp. 1207–1214, Aug. 2007.
[29] H. Fausther-Bovendo, N. Sol-Foulon, D. Candotti, H. Agut, O. Schwartz, P. Debré, and V. Vieillard, "HIV escape from natural killer cytotoxicity: nef inhibits NKp44L expression on CD4+ T cells," *AIDS*, vol. 23, no. 9, pp. 1077–1087, Jun. 2009.
[30] D. Mavilio, J. Benjamin, M. Daucher, G. Lombardo, S. Kottilil, M. A. Planta, E. Marcenaro, C. Bottino, L. Moretta, A. Moretta, and A. S. Fauci, "Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 100, no. 25, pp. 15011–15016, Dec. 2003.
[31] N. Prada, G. Antoni, F. Commo, S. Rusakiewicz, M. Semeraro, F. Boufassa, O. Lambotte, L. Meyer, M.-L. Gougeon, and L. Zitvogel, "Analysis of NKp30/NCR3 isoforms in untreated HIV-1-

infected patients from the ANRS SEROCO cohort," *Oncoimmunology*, vol. 2, no. 3, p. e23472, Mar. 2013.
[32] E. Rutjens, S. Mazza, R. Biassoni, G. Koopman, E. Ugolotti, M. Fogli, R. Dubbes, P. Costa, M. C. Mingari, E. J. D. Greenwood, L. Moretta, A. De Maria, A. DeMaria, and J. L. Heeney, "CD8+ NK cells are predominant in chimpanzees, characterized by high NCR expression and cytokine production, and preserved in chronic HIV-1 infection," *Eur. J. Immunol.*, vol. 40, no. 5, pp. 1440–1450, May 2010.
[33] F. Bozzano, A. Picciotto, P. Costa, F. Marras, V. Fazio, I. Hirsch, D. Olive, L. Moretta, and A. De Maria, "Activating NK cell receptor expression/function (NKp30, NKp46, DNAM-1) during chronic viraemic HCV infection is associated with the outcome of combined treatment," *Eur. J. Immunol.*, vol. 41, no. 10, pp. 2905–2914, Oct. 2011.
[34] G. Alter, S. Jost, S. Rihn, L. L. Reyor, B. E. Nolan, M. Ghebremichael, R. Bosch, M. Altfeld, and G. M. Lauer, "Reduced frequencies of NKp30+NKp46+, CD161+, and NKG2D+ NK cells in acute HCV infection may predict viral clearance," *J. Hepatol.*, vol. 55, no. 2, pp. 278–288, Aug. 2011.
[35] T. Garcia-Iglesias, A. Del Toro-Arreola, B. Albarran-Somoza, S. Del Toro-Arreola, P. E. Sanchez-Hernandez, M. G. Ramirez-Dueñas, L. M. A. Balderas-Peña, A. Bravo-Cuellar, P. C. Ortiz-Lazareno, and A. Daneri-Navarro, "Low NKp30, NKp46 and NKG2D expression and reduced cytotoxic activity on NK cells in cervical cancer and precursor lesions," *BMC Cancer*, vol. 9, p. 186, Jun. 2009.
[36] C. Fauriat, E. O. Long, H.-G. Ljunggren, and Y. T. Bryceson, "Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition," *Blood*, vol. 115, no. 11, pp. 2167–2176, Mar. 2010.
[37] M. Semeraro, S. Rusakiewicz, V. Minard-Colin, N. F. Delahaye, D. Enot, F. Vély, A. Marabelle, B. Papoular, C. Piperoglou, M. Ponzoni, P. Perri, A. Tchirkov, J. Matta, V. Lapierre, T. Shekarian, S. Valsesia-Wittmann, F. Commo, N. Prada, V. Poirier-Colame, B. Bressac, S. Cotteret, L. Brugieres, F. Farace, N. Chaput, G. Kroemer, D. Valteau-Couanet, and L. Zitvogel, "Clinical impact of the NKp30/B7-H6 axis in high-risk neuroblastoma patients," *Sci Transl Med*, vol. 7, no. 283, p. 283ra55, Apr. 2015.
[38] S. Rusakiewicz, G. Nocturne, T. Lazure, M. Semeraro, C. Flament, S. Caillat-Zucman, D. Sène, N. Delahaye, E. Vivier, K. Chaba, V. Poirier-Colame, G. Nordmark, M.-L. Eloranta, P. Eriksson, E. Theander, H. Forsblad-d'Elia, R. Omdal, M. Wahren-Herlenius, R. Jonsson, L. Rönnblom, J. Nititham, K. E. Taylor, C. J. Lessard, K. L. M. Sivils, J.-E. Gottenberg, L. A. Criswell, C. Miceli-Richard, L. Zitvogel, and X. Mariette, "NCR3/NKp30 contributes to pathogenesis in primary Sjogren's syndrome," *Sci Transl Med*, vol. 5, no. 195, p. 195ra96, Jul. 2013.
[39] B. Hervier, M. Perez, Y. Allenbach, H. Devilliers, F. Cohen, Y. Uzunhan, H. Ouakrim, K. Dorgham, J.-F. Méritet, E. Longchampt, W. Stenzel, I. Cremer, O. Benveniste, and V. Vieillard, "Involvement of NK Cells and NKp30 Pathway in Antisynthetase Syndrome," *J. Immunol.*, vol. 197, no. 5, pp. 1621–1630, Sep. 2016.
[40] E. Pogge von Strandmann, V. R. Simhadri, B. von Tresckow, S. Sasse, K. S. Reiners, H. P. Hansen, A. Rothe, B. Böll, V. L. Simhadri, P. Borchmann, P. J. McKinnon, M. Hallek, and A. Engert, "Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells," *Immunity*, vol. 27, no. 6, pp. 965–974, Dec. 2007.
[41] C. S. Brandt, M. Baratin, E. C. Yi, J. Kennedy, Z. Gao, B. Fox, B. Haldeman, C. D. Ostrander, T. Kaifu, C. Chabannon, A. Moretta, R. West, W. Xu, E. Vivier, and S. D. Levin, "The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans," *J. Exp. Med.*, vol. 206, no. 7, pp. 1495–1503, Jul. 2009.
[42] B. Sanchez-Correa, I. Gayoso, J. M. Bergua, J. G. Casado, S. Morgado, R. Solana, and R. Tarazona, "Decreased expression of DNAM-1 on NK cells from acute myeloid leukemia patients," *Immunol. Cell Biol.*, vol. 90, no. 1, pp. 109–115, Jan. 2012.
[43] M. Carlsten, H. Norell, Y. T. Bryceson, I. Poschke, K. Schedvins, H.-G. Ljunggren, R. Kiessling, and K.-J. Malmberg, "Primary human tumor cells expressing CD155 impair tumor targeting

by down-regulating DNAM-1 on NK cells," *J. Immunol.*, vol. 183, no. 8, pp. 4921–4930, Oct. 2009.
[44] R. Molfetta, L. Quatrini, A. Santoni, and R. Paolini, "Regulation of NKG2D-Dependent NK Cell Functions: The Yin and the Yang of Receptor Endocytosis," *Int J Mol Sci*, vol. 18, no. 8, Aug. 2017.
[45] K. Wiemann, H.-W. Mittrücker, U. Feger, S. A. Welte, W. M. Yokoyama, T. Spies, H.-G. Rammensee, and A. Steinle, "Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo," *J. Immunol.*, vol. 175, no. 2, pp. 720–729, Jul. 2005.
[46] K. A. Holder, S. N. Stapleton, M. E. Gallant, R. S. Russell, and M. D. Grant, "Hepatitis C Virus-Infected Cells Downregulate NKp30 and Inhibit Ex Vivo NK Cell Functions," *The Journal of Immunology*, vol. 191, no. 6, pp. 3308–3318, Sep. 2013.
[47] V. Vieillard, D. Costagliola, A. Simon, P. Debré, and French Asymptomatiques à Long Terme (ALT) Study Group, "Specific adaptive humoral response against a gp41 motif inhibits CD4 T-cell sensitivity to NK lysis during HIV-1 infection," *AIDS*, vol. 20, no. 14, pp. 1795–1804, Sep. 2006.
[48] S. R. Roff, E. N. Noon-Song, and J. K. Yamamoto, "The Significance of Interferon-γ in HIV-1 Pathogenesis, Therapy, and Prophylaxis," *Front Immunol*, vol. 4, p. 498, Jan. 2014.
[49] T. Pradeu and E. Vivier, "The discontinuity theory of immunity," *Sci Immunol*, vol. 1, no. 1, Jul. 2016.
[50] O. Chijioke and C. Münz, "Dendritic cell derived cytokines in human natural killer cell differentiation and activation," *Front Immunol*, vol. 4, p. 365, 2013.
[51] G. Ferlazzo, M. L. Tsang, L. Moretta, G. Melioli, R. M. Steinman, and C. Münz, "Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells," *J. Exp. Med.*, vol. 195, no. 3, pp. 343–351, Feb. 2002.

Analyse et Perspectives

Dans cette importante étude du phénotype et de la fonction des cellules NK lors de l'infection chronique par le VIH-2, nous observons une altération du profil des cellules NK mis en évidence par la surexpression du marqueur d'activation cellulaire HLA-DR et la forte diminution de l'expression du récepteur activateur NKp30. Une analyse en composante principale nous a permis de mettre en évidence que l'analyse des récepteurs NK permet de différencier les patients VIH-2 des patients LTNP et HIC VIH-1. L'étude de l'expression des ligands des récepteurs NK sur des cellules infectées montre que le VIH-2, contrairement au VIH-1, induit une forte induction de NKp30L. Différentes hypothèses peuvent expliquer le lien entre la diminution d'un récepteur en présence d'un niveau élevé de son ligand : par exemple l'engagement continu du récepteur pourrait entraîner son endocytose. Enfin, l'étude fonctionnelle met en évidence que les cellules NK-NKp30^{-} sont peu cytotoxiques mais qu'elles sont par contre capables, en l'absence de toute stimulation, de produire un niveau intracellulaire très significatif d'IFN-γ par rapport aux cellules NK de donneurs sains. L'augmentation intracellulaire d'IFN-γ pourrait être révélateur de l'activation anormale des cellules NK alors que la faible dégranulation pourrait être due à la diminution des récepteurs activateurs. On peut comparer ces résultats à ceux obtenus avec les cellules NK-NKp44^{+} dans l'infection chronique VIH-1 (Vieillard et al., 2005) ou encore dans l'infection chronique VHC durant laquelle une diminution de l'expression de NKp30 est également observée **(voir projet 2a)**. Dans notre étude, les cellules NK n'expriment pas le NKp44 et les cellules infectées par le VIH-2 n'expriment pas son ligand NKp44L, ce qui est probablement due à l'absence du motif 3S dans le VIH-2. L'ensemble de ces données suggère que la modulation des ligands des NCR pourrait jouer un rôle critique dans la mise en place de la fonctionnalité des cellules NK. Une étude longitudinale de patients VIH-2 en phase aiguë et/ou chronique apporterait plus de clarté au profil particulier des cellules NK que nous avons observé.

Projet 2a : Étude du profil des cellules NK intra-hépatiques chez des patients infectés chroniquement par le VHC

Introduction

En collaboration avec le service du Pr. Patrick Marcellin à l'Hôpital Beaujon (Clichy, France), nous avons étudié 31 échantillons de sang frais et de foie après biopsie provenant des mêmes patients infectés chroniquement par le VHC. Ces patients ont été sélectionnés en fonction de leur charge virale haute et de la présence de fibrose hépatocytaire. Ces échantillons ont été comparés à ceux provenant de dix patients atteints d'une hépatite non virale et non alcoolique (NASH). Plusieurs études ont déjà décrit le profil des cellules NK dans le sang périphérique de patients infectés par le VHC **(Voir Introduction B-2.2.2)** mais peu d'entre elles ont décrit les cellules NK intra-hépatiques dans le contexte du VHC. Les données de la littérature indiquent surtout une qu'activation des cellules NK peut être mise en relation avec la réplication virale. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés au profil phénotypique et fonctionnel des cellules NK intra-hépatiques en les comparant aux cellules NK de leur sang périphérique.

Article 2

Medicine®

OBSERVATIONAL STUDY

OPEN

Accumulation of Intrahepatic TNF-α-Producing NKp44$^+$ NK Cells Correlates With Liver Fibrosis and Viral Load in Chronic HCV Infection

Isabelle Nel, Pharm D, Olivier Lucar, MS, Caroline Petitdemange, PhD, Vivien Béziat, PhD, Martine Lapalus, PhD, Pierre Bédossa, MD, PhD, Patrice Debré, MD, PhD, Tarik Asselah, MD, PhD, Patrick Marcellin, MD, PhD, and Vincent Vieillard, PhD

Abstract: In the setting of chronic hepatitis C virus (HCV) infection, changes in natural killer (NK) cells have been shown to reflect activation in response to virus stimulation. The contribution of individual natural cytotoxicity receptors to HCV infection remains to be clarified. NKp44 is the sole specific natural cytotoxicity receptor expressed only on activated NK cells.

In this study, peripheral blood and liver NK-cell subsets were purified from 31 patients with chronic C hepatitis or nonalcoholic steatohepatitis, and then characterized by flow cytometry. Their polyfunctional activity was determined by expression of the CD107a degranulation marker, together with intracellular cytokine production.

Unlike the patients with nonalcoholic steatohepatitis, patients with chronic HCV infection had a higher frequency of NKp44$^+$ NK cells in the liver than in their peripheral blood ($P < 0.0001$). Intrahepatic NKp44$^+$ NK cells from HCV$^+$ individuals produced higher levels of tumor necrosis factor-α than did NKp44$^-$ NK cells ($P = 0.0011$). Importantly, the frequency of intrahepatic NKp44$^+$ NK cells was correlated with both HCV-RNA levels ($P = 0.0234$) and stage of fibrosis ($P = 0.0003$).

Our findings suggest that the accumulation of intrahepatic tumor necrosis factor-α-producing NKp44$^+$ resident NK cells play a role in the liver damage associated with chronic HCV infection.

(*Medicine* 95(19):e3678)

Abbreviations: HCV = hepatitis C virus, IFN-γ = interferon-gamma, KIR = killer-cell immunoglobulin-like receptor, NASH = nonalcoholic steatohepatitis, NCR = natural cytotoxicity receptor, NK = natural killer, TNF-α = tumor necrosis factor-alpha.

Editor: Edwin Leeansyah.
Received: December 28, 2015; revised: April 6, 2016; accepted: April 20, 2016.
From the Sorbonne Universités (IN, OL, CP, VB, PD, VV), UPMC Univ Paris 06, INSERM U1135, CNRS ERL8255, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), Paris; Univ Paris Diderot (ML), INSERM UMR 1149, CRI Paris Montmartre, Clichy; AP-HP (PB), Service d'Anatomie Pathologique; and AP-HP (TA, PM), Service d'Hépatologie, Hôpital Beaujon, Clichy, France.
Correspondence: Vincent Vieillard, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), Hôpital Pitié-Salpêtrière, 83 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France (e-mail: vincent.vieillard@upmc.fr).
IN, OL, and CP contributed equally to this work.
Funding: This study was supported by the Agence Nationale pour la Recherche sur le Sida et les Hépatites Virales (ANRS #1176).
The authors have no conflict of interest to disclose.
Supplemental digital content is available for this article.
Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.
This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License 4.0, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
ISSN: 0025-7974
DOI: 10.1097/MD.0000000000003678

INTRODUCTION

Approximately 170 million people worldwide are infected with hepatitis C virus (HCV), many of them diagnosed only after decades of chronic infection. Only a minority of patients can clear the virus spontaneously during acute infection. HCV remains a leading cause of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma, despite great progress in the development of direct-acting antivirals (DAAs) able to cure more than 90% of HCV genotype 1-infected patients after 12 weeks of treatment.[1] The mechanisms associated with both the failure of viral clearance and the development of chronic infection are not yet well understood. It has, however, been observed that most patients are unable to clear the virus and thus develop viral persistence.[1] Natural killer (NK) cells are involved in every stage of HCV infection. As a major component of the intrahepatic lymphocyte pool, they are likely to be important sentinels that survey the liver for signs of damage or cellular stress. Accordingly, HCV must subvert NK cell-mediated responses to establish persistent infection.[2–6] NK cells participate in viral clearance by killing infected cells directly, through the release of cytotoxic molecules, such as perforin and granzymes, and by producing cytokines such as interferon (IFN)-γ and tumor necrosis factor (TNF)-α. Under normal immune surveillance, NK cells express inhibitory receptors, including killer Ig-like receptors (KIR), Ig-like transcript 2, and the CD94:NKG2A heterodimer, which recognize Major histocompatibility complex class I molecules as their cognate ligands. Cytotoxicity, however, occurs when stimulatory signals outweigh HLA-I inhibition. Several of these activating receptors have been characterized, including NKG2C, NKG2D, and the natural cytotoxicity receptors (NCRs): NKp30, NKp44, and NKp46.[7–9] Compared with the constitutively expressed NKp30 and NKp46 receptors, NKp44 is especially interesting because it is induced only after cell activation.[10] NKp44 triggers NK-cell cytotoxicity upon recognition of a new mixed lineage leukemia 5 (MLL5) isoform, expressed only on stressed cells.[11,12] Several ''pathogenic'' ligands for NKp44 that stimulate NK-cell response have been described, including influenza virus hemagglutinin and viral Hemagglutinin-neuraminidase.[9] NKp44 also interacts with the E glycoprotein of the dengue and West Nile viruses.[13]

Several lines of evidence indicate that NK cells play a role in acute HCV infection. Khakoo et al[14] reported that individuals homozygous for the genes encoding KIR2DL3, an inhibitory NK cell receptor, and its ligand are more likely than others to resolve infection by HCV, consistent with a subsequent finding that KIR2DL3$^+$NKG2A$^-$ NK cells seem to mediate early control of HCV infection, before seroconversion.[15] Furthermore, several studies over the past decade have reported that chronic HCV infection is characterized by functionally and phenotypically impaired NK-cell responses that may contribute

Lucar Olivier – Thèse d'immunologie - 07-12-2017

to the progression of liver disease[1,3,5,16,17] and are partially restored during antiviral therapy.[18] The scarcity of data about intrahepatic NK cells and their discrepancy concerning NKp44 in patients with chronic HCV infection[19,20] prompted us to compare peripheral blood and liver NK cells from these patients to evaluate the role of intrahepatic NKp44$^+$ NK cells in the immunopathogenesis of this disease.

METHODS

Patient Populations

This study included 31 patients scheduled for liver biopsy at Beaujon Hospital (Clichy, France) from December 2009 through February 2014: 21 with chronic HCV infection and 10 with nonalcoholic steatohepatitis (NASH) (Table 1). The study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki and was approved by the Comité de Protection des Personnes (CCP), Ile de France IV (# 2009/19NI). All patients provided written informed consent. Infected patients were included if they had chronic HCV infection, defined by seropositivity for HCV-RNA, respectively, for at least 12 months. Coinfected patients, patients on antiviral treatment, and patients with liver transplants were excluded. Staging and grading of pathology were determined as part of the hospital's routine diagnostic work-up. An experienced pathologist, blinded to the clinical and laboratory data, analyzed the liver biopsy specimens according to the Metavir scoring system: necroinflammatory activity (A) was graded as A0 (absent), A1 (mild), A2 (moderate), or A3 (severe). Fibrosis stage (F) was scored as F0 (absent), F1 (portal fibrosis), F2 (portal fibrosis with >1 septum), F3 (septal fibrosis), or F4 (cirrhosis).[21]

TABLE 1. Characteristics of Subjects Enrolled in This Study

Characteristics	HCV-NASH
Number	21 10
Mean age in yrs (range)	54 (41–70) 49 (26–67)
Male:female (n)	14:7 6:4
Median viral load (range)	1.1×10^6 (3.6×10^4–7.1×10^6)
Necroinflammation activity (n, %)	
A0 to A1	16 (76.2) 7 (70.0)
A2 to A3	5 (23.8) 3 (30.0)
Fibrosis stage (n, %)	
F0 to F2	12 (57.1) 8 (80.0)
F3 to F4	9 (42.9) 2 (20.0)
HCV genotype (n, %)	
1	8 (38.1)
2	0
3	5 (23.8)
4	8 (38.1)
Hepatic enzymes	
Median ALT (range), IU/L	93 (24–332) 80 (17–286)
Median AST (range), IU/L	60 (32–239) 65 (20–305)
Median γGT (range), IU/L	78 (16–549) 223 (55–810)

γGT = gamma glutamyl-transferase, ALT = alanine aminotransferase, AST = aspartate aminotransferase, HCV = hepatitis C virus, IU = International unit, n = number, NASH = nonalcoholic steatohepatitis.

Sample Preparation

Peripheral blood samples were collected in heparin tubes the same day as the biopsy. Liver biopsies were prepared as previously described.[11,22] Briefly, they were mechanically dissociated through a 70-μm cell strainer (BD Pharmingen), before incubation with 10 mg/mL collagenase II-S (Sigma-Aldrich) in medium containing trypsin inhibitor (Sigma-Aldich) and DNase I (Roche Life Science) for 1.5 hours at 37°C on a rotary shaker. After additional washes, the suspension was filtered through a 40-μm cell strainer, centrifuged, and used directly for phenotypic and/or functional assays analyzed by flow cytometry.

Flow Cytometric Analysis

Natural killer cells were analyzed after staining with an appropriate monoclonal antibody (mAb) cocktail, as previously described[22,23]: anti-CD45 (#J33), anti-CD3 (#UCHT1), anti-CD56 (#N901), anti-CD16 (#3G8), anti-CD159a/NKG2A (#Z199), CD335/NKp46 (#BAB281), anti-CD336/NKp44 (#Z231), anti-CD69 (#FN50), anti-Cx3CR1 (#2A9–1), and anti-CD127 (#R34.34) mAbs from Coulter; anti-CD62L (#DREG-56; BD Pharmingen), anti-CD337/NKp30 (#AF29–4D12), and anti-NKG2C (#134591) mAbs from R&D systems, and also a cocktail of anti-panKIR-L including anti-KIR2DL1 (#143211) and anti-KIR3DL1 (#177407); and anti-KIR2DL2/KIR2DL3 (#DX27; Miltenyi Biotech) mAbs. Populations of interest within the CD45$^+$ lymphocytic population were gated on CD3$^-$CD56$^+$ NK cells. At least 20,000 CD45$^+$ cells or 1000 CD3$^-$CD56$^+$ NK cells were acquired on a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter) and then analyzed with Flow Jo version 9 (TreeStar) (Supplementary Figure 1, http://links.lww.com/MD/A971), as described.[22]

Intracellular Cytokine Production and Polyfunctionality Assay

Functional capacity of NKp44$^+$ NK cells compartment has been tested in 10 samples from peripheral blood and liver biopsies. Cells were incubated overnight with 10 ng/mL interleukin (IL)-12 and 100 ng/mL IL-18 at 37°C and 5% CO_2. They were thereafter incubated for 5 hours in the presence of Golgi Stop and Golgi Plug solutions (BD Biosciences), and then stained with cell surface markers (anti-CD3, anti-CD56, and anti-NKp44 mAbs). Next they were fixed, permeabilized with a cytofix/cytoperm kit (Becton Dickinson), and then stained intracellularly with anti-IFN-γ (#B27; Becton Dickinson) and anti-TNF-α (#Mab11; eBiosciences) mAbs, as described.[23]

For the polyfunctionality assays, nonstimulated NK cells were incubated in the presence of the standard K562 target cells (ATCC CCL243) and hepatocellular carcinoma Hep G2 cells, kindly provided by Professor D. Mazier (CIMI-Paris, Paris, France), at an effector:target (E:T) cell ratio of 1:1 in the presence of an anti-CD107a mAb (#H4A3; Becton Dickinson), used as a degranulation cell-surface marker, as described.[22,23] Data were analyzed with Flow Jo version 9 (TreeStar), and the rates of NK cells positive for 0, 1, 2, or 3 functions were defined with this software's ''Boolean gate'' algorithm. Pie charts, generated with Spice software (NIAI freeware),[24] present the frequency of NK cells positive for 0, 1, 2, or 3 responses (to CD107a, IFN-γ, and/or TNF-α). Arcs depict the frequency of cells positive for each of CD107a, IFN-γ, and TNF-α.

Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

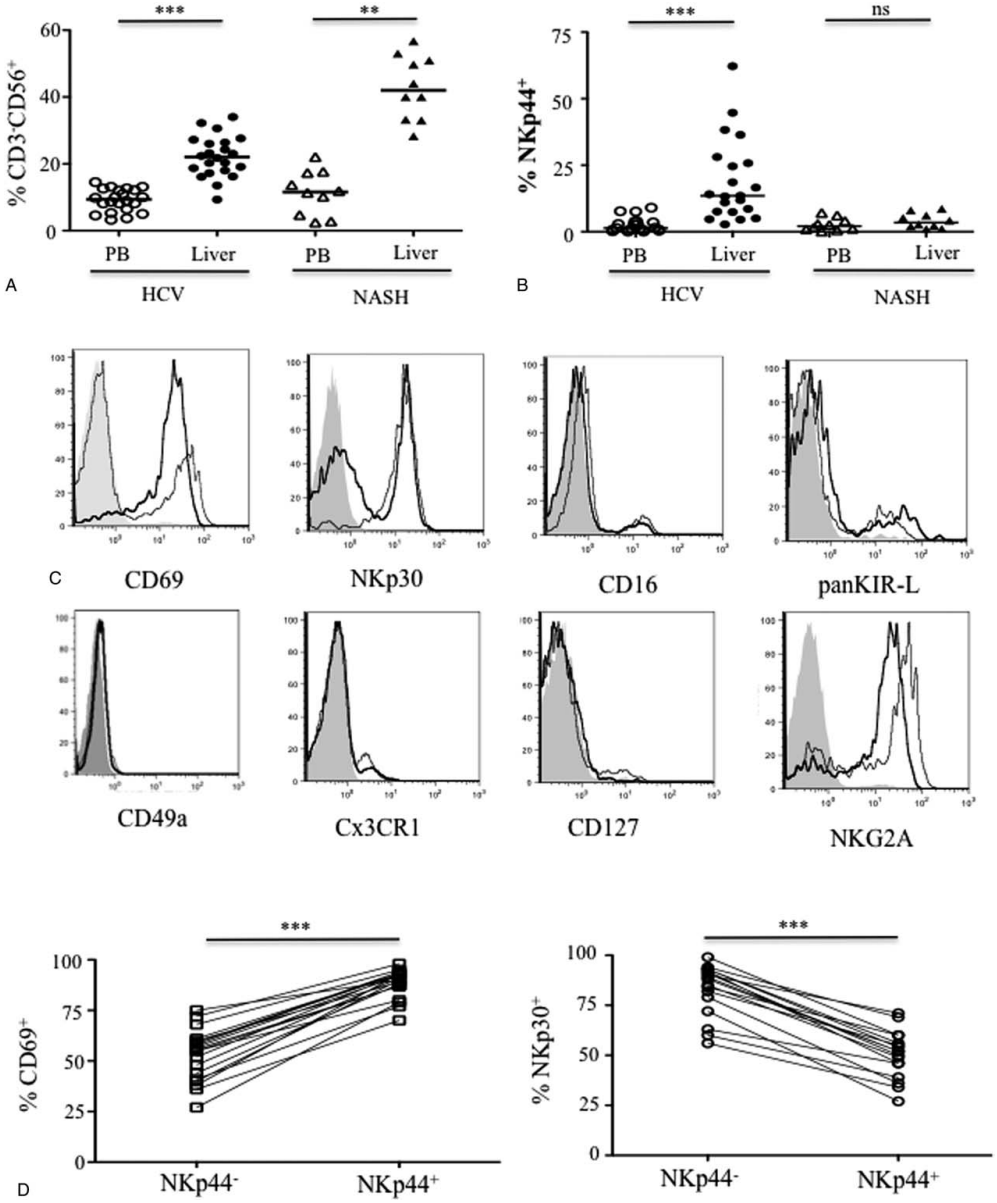


FIGURE 1. Accumulation of intrahepatic NKp44$^+$ NK cells in chronically HCV-infected patients. Flow cytometry analysis of NK cells from patients with HCV (n = 21) or NASH (n = 10) (Table 1). A, Frequency of peripheral blood (PB) and intrahepatic (liver) CD3$^-$CD56$^+$ NK cells. B, Expression of NKp44 gated on CD3$^-$CD56$^+$ cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and liver biopsies. Statistical analysis used the Wilcoxon rank test to compare paired blood and intrahepatic samples. (**) $P < 0.01$; (***) $P < 0.001$. C, Representative phenotypic characterization of intrahepatic NKp44$^+$ NK cells (bold black line), compared with NKp44$^-$ cells (light black line) and isotype controls (gray panel). D, Frequency of CD69$^+$ (left panel) and NKp30$^+$ (right panel) within intrahepatic NKp44$^-$ and NKp44$^+$ NK-cell subsets from the 21 HCV-infected patients. HCV = hepatitis C virus, NASH = nonalcoholic steatohepatitis, NK = natural killer, ns = nonsignificant.

Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Lucar Olivier – Thèse d'immunologie - 07-12-2017

Quantification of Cytokines

Cytokine analysis was performed in the plasma of the 21 HCV^+ patients, with Quantikine IFN-γ and TNF-α immunoassays (R&D Systems), according to the manufacturer's protocols. Frozen plasma samples (preserved at −80 °C) were used for testing after clarification by centrifugation (30 min at 1000*g*) at 4°C. Experiments were performed in duplicates. The sensitivity was 8.0 pg/mL for IFN-γ and 1.6 pg/mL for TNF-α.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed with Prism-5 software (GraphPad Software). The nonparametric ''Wilcoxon rank test'' was used to compare 2 related samples. Statistical significance was defined by a *P* value less than 0.05 with a 2-tailed test. Nonparametric correlations were assessed by determining Spearman rank correlation coefficient.

RESULTS

Accumulation of Intrahepatic $NKp44^+$ NK Cells in Chronic HCV-infected Patients

Previous reports published on the properties of intrahepatic NK cells in chronic HCV-infected patients are conflicting, likely related to limited cell numbers from biopsies or different gating strategies by flow cytometry.[3,16–18,25,26] In this study, we observed that the overall frequency of NK cells was significantly higher in the liver than in the peripheral blood in both HCV-infected patients and patients with NASH (Figure 1A). However, in contrast to the patients with NASH, HCV^+ patients showed a significant accumulation of $NKp44^+$ $CD3^-CD56^+$ cells in the liver, compared with their blood samples ($P < 0.0001$, median 13.5%; Figure 1B).

This observation prompted us to characterize the intrahepatic $NKp44^+$ cells from HCV^+ patients in more detail. They did not express either CD127 (IL7Rα) or CD49a, which indicates that they are distinct from both the $NKp44^+$ invariant lymphocyte cells (ILC1) in tonsils[27] and the liver-resident $CD49a^+$ NK-cell subset (Figure 1C), consistent with the findings of Marquardt et al.[28] Furthermore, compared with peripheral NK cells, they did not express high frequencies of CD16, panKIR-L, CD62L, or Cx3CR1, which is associated with the migration of circulating $CD56^{dim}$ NK cells to sites of inflammation (Figure 1C and Supplementary Figure 2 , http://links.lww.com/MD/A971). Although a high frequency of $NKp44^+$ cells expressed NKG2A, its mean fluorescence intensity (MFI) was slightly lower than in the $NKp44^-$ cells (Figure 1C and Supplementary Figure 2, http://links.lww.com/MD/A971). $NKp44^+$ NK cells had a significantly higher frequency of activation receptor CD69 than did the $NKp44^-$ cells ($P < 0.0001$; Figure 1D), and a lower frequency of NKp30 ($P = 0.0003$; Figure 1D). Instead, the intrahepatic $NKp44^+$ cells displayed the profile of activated $CD3^-CD56^{bright}CD16^-NKp30^{low}$ NK cells.

Intrahepatic $NKp44^+$ NK Cells are Correlated With HCV Viral Load and Fibrosis Activity

Next, we attempted to identify any statistical correlations between the accumulation of intrahepatic $NKp44^+$ cells and biochemical (serum alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and gamma glutamyl-transferase), virologic (HCV genotype, HCV-RNA), and/or clinical (necroinflammatory activity and fibrosis stage) parameters. No association was found with HCV genotype, hepatic enzyme levels, or necroinflammatory activity (data not shown). However, the frequency of intrahepatic $NKp44^+$ cells was significantly correlated with the liver fibrosis stage ($P < 0.0001$, $r = 0.89$; Figure 2A) and, to a lesser extent, with viral load ($P = 0.042$, $r = 0.60$; Figure 2B).

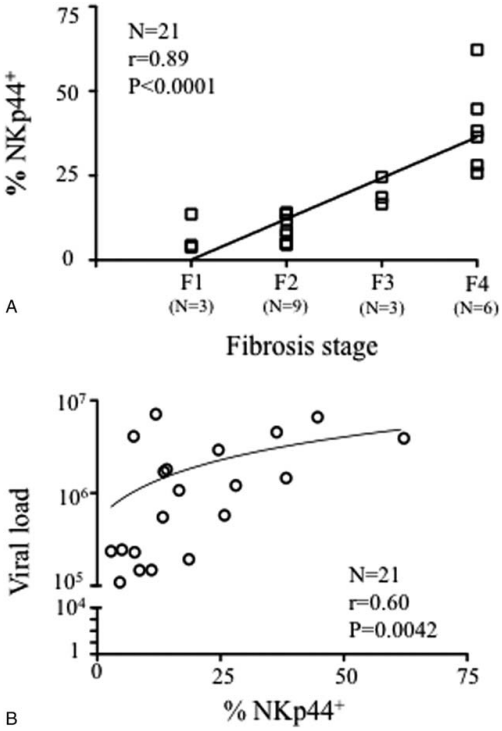


FIGURE 2. Correlation between intrahepatic $NKp44^+$ NK cells, virological and clinical parameters in chronically HCV-infected patients (n = 21). Linear regression between the frequency of intrahepatic $NKp44^+$ NK cells and the fibrosis stage (F1–F4) (A) or with viral load (B). The Spearman test showed significant statistical correlations. HCV = hepatitis C virus, NK = natural killer.

Intrahepatic $NKp44^+$ NK cells Produce High Levels of TNF-α in Association With HCV Viral Load and Fibrosis Activity

We next assessed the overall functional ability of $NKp44^+$ NK cells within the intrahepatic compartment in 10 of the 13 liver biopsies, with an NKp44 frequency greater than the median (13.5%) (13.6%–62.2%) (Figure 1B); the 3 last biopsies were too small size to undergo functional analyses. One of the main functions of NK cells is the production and release of IFN-γ and TNF-α. After treatment with IL-12 and IL-18, the frequency of NK cells able to produce IFN-γ was lower in the intrahepatic $NKp44^+$ cells than in the other subsets in the 10 tested liver biopsies (Figure 3A and B). Consistently with a previous study,[29] the plasma level of IFN-γ, in the plasma of the 21 HCV^+ patients, was inversely correlated with the stage of

Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Lucar Olivier – Thèse d'immunologie - 07-12-2017

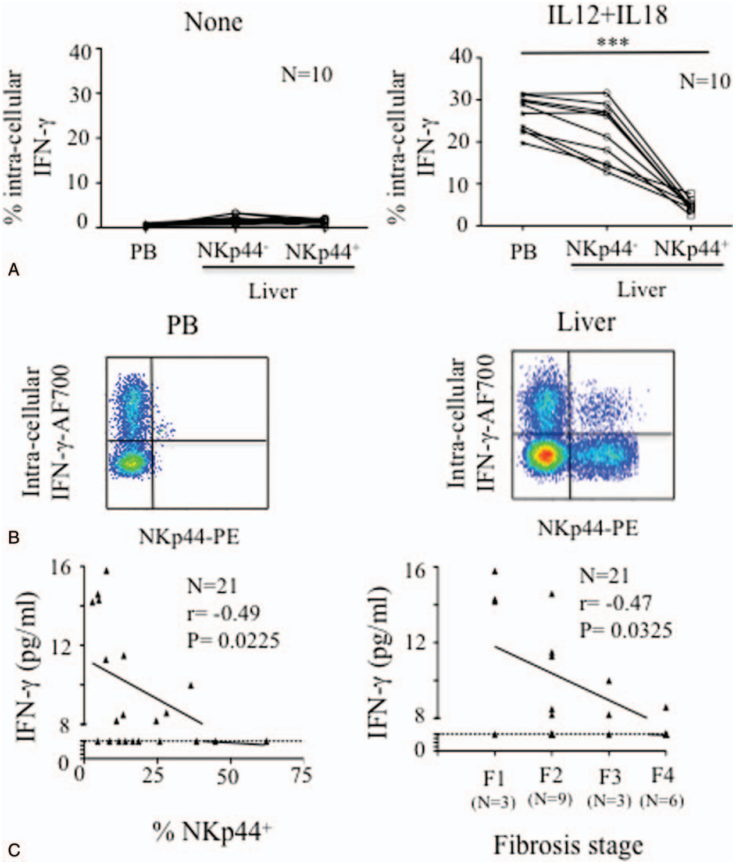


FIGURE 3. Lower level of IFN-γ in intrahepatic NKp44$^+$ NK cells from HCV-infected patients than in its NKp44$^-$ counterparts or in peripheral blood cells. A, Intracellular production of IFN-γ in peripheral blood (PB) and intrahepatic (liver) NKp44$^-$ or NKp44$^+$ CD3$^-$CD56$^+$ NK cells before (none) or after overnight stimulation with IL-12 plus IL-18. Samples from 10 of the 13 patients with a frequency of NKp44$^+$ cells superior to the median (>13.5%) were tested. Statistical correlation used 1-way analysis of variance with Tukey multiple comparison tests. B, Representative HCV$^+$ sample for intracellular production of IFN-γ in regard of NKp44 expression, gated on CD3$^-$CD56$^+$ NK cells from peripheral blood (PB) and liver biopsy (liver), after overnight stimulation with IL-12 plus IL-18. C, Correlation of the plasma level of IFN-γ with the frequency of intrahepatic NKp44$^+$ NK cells and the fibrosis stage in the 21 HCV-infected patients. The Spearman test showed significant statistical correlations. Dotted lines indicate the sensitivity of IFN-γ detection. HCV = hepatitis C virus, IFN-γ = interferon-gamma, NK = natural killer.

fibrosis ($P = 0.0325$, $r = -0.47$), and also with the frequency of intrahepatic NKp44$^+$ NK cells ($P = 0.0225$, $r = -0.50$; Figure 3C). Neither intracytoplasmic nor plasma levels of IFN-γ were correlated with viral load (data not shown).

In contrast to IFN-γ, the intracellular level of TNF-α was significantly higher in intrahepatic NKp44$^+$ NK cells than in either their NKp44$^-$ counterparts or the peripheral blood NK cells, both before and after treatment with IL-12 plus IL-18, in the 10 tested liver biopsies (Figure 4A and B). The frequency of NK cells producing TNF-α correlated with the frequency of intrahepatic NKp44$^+$ NK cells ($P = 0.0011$, $r = 0.89$; Figure 4C). More importantly, NKp44$^+$ NK cells producing TNF-α were significantly associated with the stage of fibrosis ($P = 0.0003$, $r = 0.92$; Figure 4C) and viral load ($P = 0.0234$, $r = 0.72$; Figure 4D). These data are consistent with the correlation of the TNF-α plasma level with the frequency of intrahepatic NK cells, in the plasma of the 21 HCV$^+$ patients ($P = 0.0388$, $r = 0.46$; Supplementary Figure 3, http://links.lww.com/MD/A971) and still more specifically with the NKp44$^+$ cell subset ($P < 0.0001$, $r = 0.85$; Figure 4E). The TNF-α plasma level was also correlated with fibrosis stage ($P < 0.0001$, $r = 0.71$; Figure 4E) and viral load ($P = 0.0105$, $r = 0.55$; Figure 4D). Of note, the plasma levels of TNF-α and IFN-γ were not correlated with any other laboratory or clinical parameters (data not shown).

Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Lucar Olivier – Thèse d'immunologie - 07-12-2017

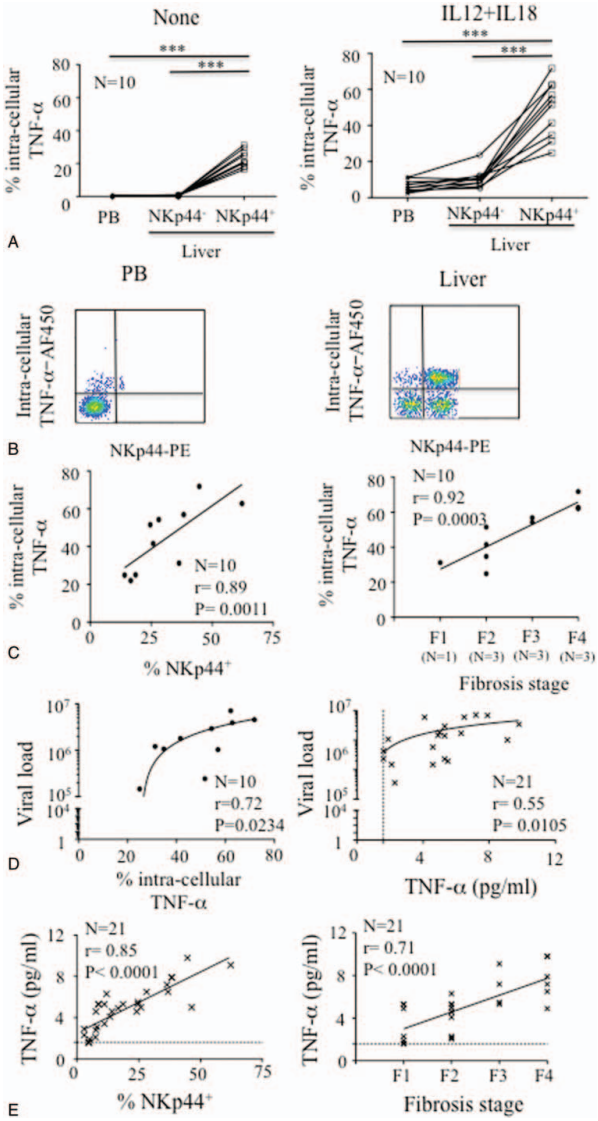


FIGURE 4. Overproduction of TNF-α by intrahepatic NKp44$^+$ NK cells in chronically HCV-infected patients. A, Intracellular production of TNF-α in peripheral blood (PB) and intrahepatic (liver) NKp44$^-$ or NKp44$^+$ CD3$^-$CD56$^+$ NK cells before (none) or after overnight stimulation with IL-12 plus IL-18. Samples from 10 of the 13 patients with a frequency of NKp44$^+$ cells superior to the median (>13.5%) were tested. Statistical correlation used the 1-way analysis of variance with Tukey multiple comparison tests. B, Representative HCV$^+$ sample for intracellular production of TNF-α in regard of NKp44 expression, gated on CD3$^-$CD56$^+$ NK cells from peripheral blood (PB) and liver biopsy (liver), after overnight stimulation with IL-12 plus IL-18. C, Correlation between the intracellular production of TNF-α in intrahepatic NK cells and the frequency of intrahepatic NKp44$^+$ NK cells or fibrosis stages. Samples from 10 of the 13 patients with a frequency of NKp44$^+$ cells superior to the median (>13.5%) were tested. The Spearman test showed significant statistical correlations. D, Correlation between the intracellular production (n = 10; left panel) or plasma level (n = 21; right panel) of TNF-α and viral load in 10 patients with a frequency of NKp44$^+$ cells superior to the median (>13.5%). Significant statistical correlations were obtained using the Spearman test. E, Correlation between the plasma level of TNF-α, the frequency of intrahepatic NKp44$^+$ NK cells, and fibrosis stage in the 21 HCV-infected patients. The Spearman test showed significant statistical correlations. Dotted lines indicate the sensitivity of TNF-α detection. HCV = hepatitis C virus, IL = interleukin, NASH = nonalcoholic steatohepatitis, NK = natural killer, TNF-α = tumor necrosis factor-alpha.

Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Lucar Olivier – Thèse d'immunologie - 07-12-2017

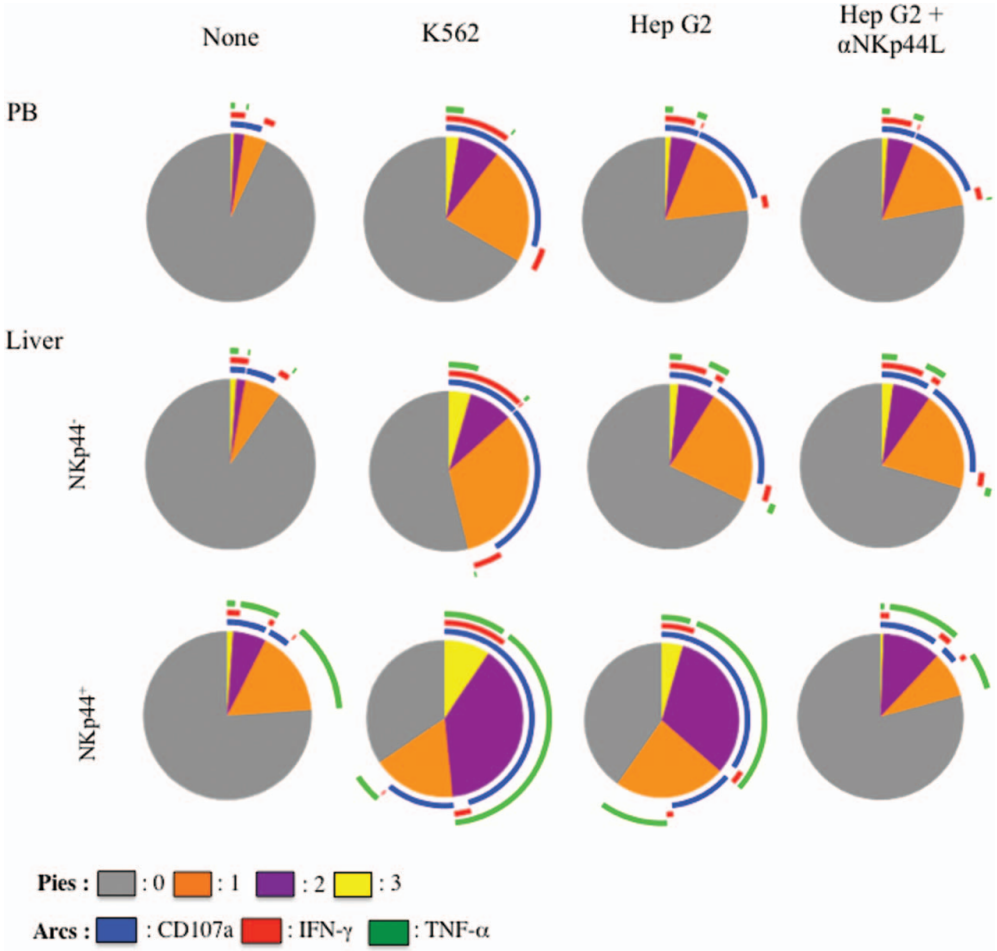


FIGURE 5. Polyfunctional activity of intrahepatic NKp44$^+$ NK cells in chronically HCV-infected patients. Assays were performed with peripheral blood CD3$^-$CD56$^+$ NK cells (PB) and NK cells from liver biopsy samples (NKp44$^-$ and NKp44$^+$ NK-cell subsets) from the same HCV-infected patients. Pie chart representation of the polyfunctional activity representing the cell-surface expression of CD107a, and intracellular expression of IFN-γ and TNF-α assessed in the absence (none) or presence of K562, Hep G2. Data are the means of the 10 available samples with a frequency of NKp44$^+$ cells superior to the median (>13.5%). Hep G2 were treated with 10 μg/mL of anti-NKp44L (aNKp44L) (right panel) or with IgM isotype control (not shown), as described.[11] The Boolean gate function of FlowJo software was used to determine whether cells expressed 0 (gray), 1 (orange), 2 (purple), or 3 (yellow) functions simultaneously (pie charts). Colored arcs represent the frequency of NK cells expressing CD107a (blue), IFN-γ (red), and TNF-α (green). HCV = hepatitis C virus, NASH = nonalcoholic steatohepatitis, NK = natural killer, PB = peripheral blood, TNF-α = tumor necrosis factor-alpha.

We next attempted to determine the capacity of intrahepatic NKp44$^+$ NK cells to simultaneously degranulate and produce cytokines (IFN-γ and/or TNF-α). This polyfunctional assay was performed against standard K562 target cells and Hep G2 hepatocellular cells—2 cell lines expressing NKp44L (Supplementary Figure 3, http://links.lww.com/MD/A971), the cellular ligand of NKp44. Stimulation with both targets produced similar functional profiles in peripheral blood and intrahepatic NKp44$^-$ NK-cell subsets, although the level of polyfunctionality was slightly lower with Hep G2 (Figure 5). Intrahepatic NKp44$^+$ NK cells were more polyfunctional, than liver and peripheral NKp44$^-$ cells, with a strong capacity to simultaneously degranulate and produce TNF-α (Figure 5); this capacity was lower in the presence of Hep G2 than K562 target cells, in accordance with their respective cell surface expression of NKp44L (Supplementary Figure 4, http://links.lww.com/MD/A971).

Further proof that NKp44 is involved in the NK cytotoxicity mediated by the intrahepatic NK cells came from the

Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Lucar Olivier – Thèse d'immunologie - 07-12-2017

pretreatment of Hep G2 cells by anti-NKp44L mAb. The presence of anti-NKp44L mAb strongly inhibited the polyfunctional activity of intrahepatic NKp44$^+$ NK cells (by up to 55% for their capacity to perform at least 1 function), whereas the polyfunctionality of their NKp44$^-$ counterparts remained similar to that observed in untreated Hep G2 cells (Figure 5, right panel). These data suggest that NKp44 expressed by intrahepatic NK cells could be involved in the destruction of NKp44L-expressing hepatocytes.

We then considered whether intrahepatic NKp44$^+$ NK cells were able to interfere with hepatic stellate cells (HSCs), which are considered the main contributors to liver fibrosis.[30] NKp44L expression was tested on the LX-2 human HSC cell line, which retains key features of primary HSCs.[2,31] The failure of the LX-2 cells, unlike the Hep G2 hepatocellular cells, to express NKp44L (Supplementary Figure 4, http://links.lww.com/MD/A971), suggests that NKp44$^+$ NK cells do not target HSCs.

DISCUSSION

This study provides insights into the role of intrahepatic NK cells in chronic HCV infection. While it has consistently been reported that peripheral blood NK cells are altered in chronically HCV-infected patients, compared with healthy controls,[1,3–5] peripheral blood and intrahepatic NK cells behave differently. One of the most intriguing finding of this study is the specific and significant accumulation of intrahepatic NKp44$^+$ NK cells, which is correlated with both viral load and liver fibrosis in HCV-infected patients. This accumulation of NKp44$^+$ NK cells has not been observed in vivo in either chronic HBV$^+$ or NASH patients; it has been described, rarely, in certain situations, including in a subsets of RORγt$^+$ innate lymphoid cells (ILCs)[24,32,33] and NK cells in the decidua,[34] and in peripheral blood NK cells after infection by the chikungunya virus[35] and by HIV-1.[36] The data we present here are consistent with the hypothesis that NKp44$^+$ NK cells might have deleterious effects in tissue of patients with chronic HCV infection, as they have previously been suggested to do in the intestinal mucosa of patients with Crohn disease.[37] This contrasts with the protective roles played by the other NCRs in HCV, such as the inverse correlation between NKp46^{bright} NK cells and the severity of liver inflammation,[36,38] and the protection against HCV infection mediated by NKp30.[39] The antagonistic roles of NCRs might be explained by the constitutive expression of NKp30 and NKp46 on NK cells, compared with the strict association of the cell-surface induction of NKp44 with cell activation.[9,10] This point also highlights the key role of cell activation in the development of the liver fibrosis, as described.[40]

Our in-depth functional analysis of intrahepatic NK cells from HCV-infected patients revealed that expression of IFN-γ was inversely associated with the frequency of NKp44$^+$ NK cells, whereas NKp46^{high} NK cells secrete larger amounts of IFN-γ than NKp46^{dim} NK cells.[37] These data are consistent with the antifibrotic function of IFN-γ-producing NK cells mediated by the inhibition of HSCs in a TNF-related apoptosis-inducing ligand and NKG2D-dependent manner.[41] We demonstrated, however, that TNF-α production was mainly confined to the intrahepatic NKp44$^+$ NK cells, as previously reported for RORγt$^+$ ILC, which use the selective expression of TNF-α by NKp44 to sense the environment.[26] It has also been shown that hepatic dendritic cells acquire the marked ability to stimulate NK cells TNF-α-dependently in liver fibrosis.[42] In view of these results, it was striking that the serum level of TNF-α correlated significantly with the fibrosis stage, as seen in previous studies of chronic HCV.[29,43] As TNF-α is a major proinflammatory cytokine involved in several chronic diseases, the in vivo role of NKp44$^+$ NK-derived TNF-α certainly requires further investigation in other associated pathologies.

We can thus hypothesize that high expression of TNF-α by intrahepatic NKp44$^+$ NK cells might result from direct contact with HCV-infected hepatocytes, as previously shown in vitro.[44] Nonetheless, the expression of NKp44 ligands on hepatocytes must be explored to illuminate more clearly the physiological relevance of NKp44 engagement in the intrahepatic NK cells of HCV-infected patients. It is important to note that NKp44L is expressed on Hep G2 hepatocyte cells, but not on LX2 HSCs. We propose that recognition of NKp44 by its ligand on intrahepatic NK cells from HCV patients might play a role in the TNF-α-dependent destruction of hepatocytes, while protecting HSCs. This TNF-α-dependent mechanism could lead to faster progression of liver fibrosis and cirrhosis, which are the main causes of morbidity and mortality in patients with HCV infection.[45]

Together with the previously described specific localization of NK cells to necrotic areas in liver biopsy specimens of HCV-infected patients,[25] our data suggest that intrahepatic TNF-α-producing NKp44$^+$ NK cells play a deleterious role in immune-mediated liver injury during chronic infection. Hence, these data deepen our understanding of liver immunology in fibro-inflammatory disease and suggest that an approach targeting NKp44 could present an attractive therapeutic strategy in HCV infection and potentially in other chronic inflammatory diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the hepatology specialist nurses at Beaujon Hospital (Clichy, France) for their help with this study. We also gratefully acknowledge patients enrolled in this study for their participation.

REFERENCES

1. Asselah T, Marcellin P. Optimal IFN-free therapy in treatment-naïve patients with HCV genotype 1 infection. *Liver Int.* 2015;35:56–64.
2. Rehermann B. Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells. *Nat Med.* 2013;19:859–868.
3. Golden-Mason L, Rosen HR. Natural killer cells: multifaceted players with key roles in hepatitis C immunity. *Immunol Rev.* 2013;255:68–81.
4. Park SH, Rehermann B. Immune responses to HCV and other hepatitis viruses. *Immunity.* 2014;40:13–24.
5. Heim MH, Thimme R. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. *J Hepatol.* 2014;61:S14–25.
6. Tian Z, Chen Y, Gao B. Natural killer cells in liver disease. *Hepatology.* 2013;57;:1654–1662.
7. Sun JC, Lanier LL. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8T cells. *Nat Rev Immunol.* 2011;11:645–657.
8. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science.* 2011;331:44–49.
9. Koch J, Steinle A, Watzl C, et al. Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends Immunol.* 2013;34:182–191.
10. Vitale M, Bottino C, Sivori S, et al. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med.* 1998;187:2065–2072.

Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Lucar Olivier – Thèse d'immunologie - 07-12-2017

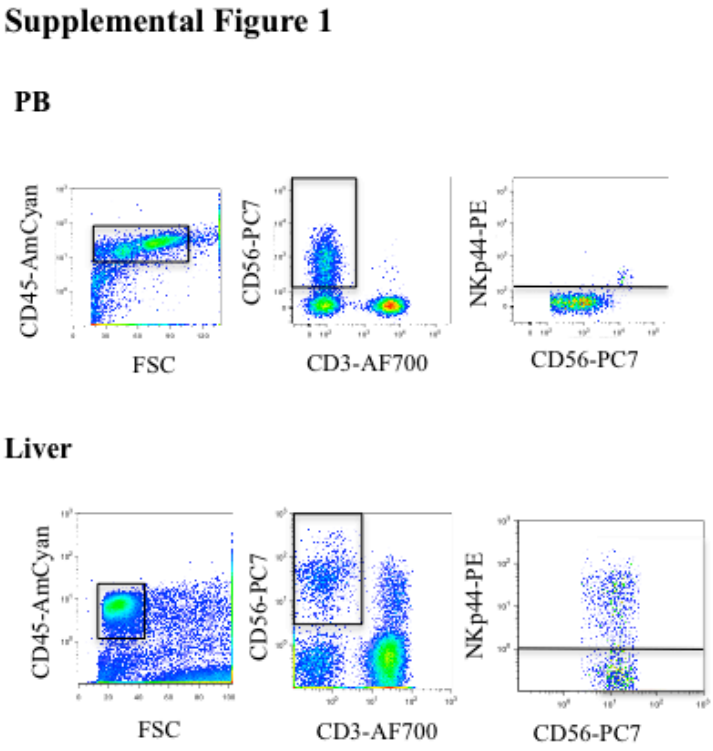
11. Baychelier F, Sennepin A, Ermonval M, et al. Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *Blood.* 2013;122:2935–2942.
12. Vieillard V, Baychelier F, Debré P. NKp44L: a new tool for fighting cancer. *OncoImmunol.* 2014;3:e27988.
13. Hershkovitz O, Rosental B, Rosenberg LA, et al. NKp44 receptor mediates interaction of the envelope glycoproteins from the West Nile and dengue viruses with NK cells. *J Immunol.* 2009;183:2610–2621.
14. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science.* 2004;305:872–874.
15. Thoens C, Berger C, Trippler M, et al. KIR2DL3$^+$NKG2A$^-$natural killer cells are associated with protection from productive hepatitis C virus infection in people who inject drugs. *J Hepatol.* 2014;61:475–481.
16. Alter G, Jost S, Rihn S, et al. Reduced frequencies of NKp30+NKp46+, CD161+, and NKG2D+ NK cells in acute HCV infection may predict viral clearance. *J Hepatol.* 2011;55: 278–288.
17. Cosgrove C, Berger CT, Kroy DC, et al. Chronic HCV infection affects the NK cell phenotype in the blood more than in the liver. *PLoS One.* 2014;9:e105950.
18. Spaan M, van Oord GW, Janssen HL, et al. Longitudinal analysis of peripheral and intrahepatic NK cells in chronic HCV patients during antiviral therapy. *Antiviral Res.* 2015;123:86–92.
19. Ahlenstiel G, Edlich B, Hogdal LJ, et al. Early changes in natural killer cell function indicate virologic response to interferon therapy for hepatitis C. *Gastroenterology.* 2011;141:1231–1239.
20. Varchetta S, Mele D, Mantovani S, et al. Impaired intrahepatic natural killer cell cytotoxic function in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2012;56:841–849.
21. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology.* 1996;24:289–293.
22. Béziat V, Dalgard O, Asselah T, et al. CMV drives clonal expansion of NKG2C+ NK cells expressing self-specific KIRs in chronic hepatitis patients. *Eur J Immunol.* 2012;42:447–457.
23. Béziat V, Hervier B, Achour A, et al. Human NKG2A overrides NKG2C effector functions to prevent autoreactivity of NK cells. *Blood.* 2011;117:4394–4396.
24. Roederer M, Nozzi JL, Nason MC. SPICE: exploration and analysis of post-cytometric complex multivariate datasets. *Cytometry A.* 2011;79:167–174.
25. Bonorino P, Ramzan M, Camous X, et al. Fine characterization of intrahepatic NK cells expressing natural killer receptors in chronic hepatitis B and C. *J Hepatol.* 2009;51:458–467.
26. Pembroke T, Christian A, Jones E, et al. The paradox of NKp46+ natural killer cells: drivers of severe hepatitis C virus-induced pathology but in-vivo resistance to interferon α treatment. *Gut.* 2014;63:515–524.
27. Fuchs A, Vermi W, Lee JS, et al. Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL-12- and IL-15-responsive IFN-γ-producing cells. *Immunity.* 2013;38:769–781.
28. Marquardt N, Béziat V, Nyström S, et al. Cutting edge: identification and characterization of human intrahepatic CD49a+ NK cells. *J Immunol.* 2015;194:2467–2471.
29. Akcam FZ, Tigli A, Kaya O, et al. Cytokine levels and histopathology in chronic hepatitis B and chronic hepatitis C. *J Interferon Cytokine Res.* 2012;32:570–574.
30. Mederacke I, Hsu CC, Troeger JS, et al. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat Comm.* 2013;4:2823.
31. Xu L, Hui AY, Albanis E. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut.* 2005;54:142–151.
32. Glatzer T, Killig M, Meisig J, et al. RORγt$^+$ innate lymphoid cells acquire a proinflammatory program upon engagement of the activating receptor NKp44. *Immunity.* 2013;38:1223–1235.
33. McKenzie AN, Spits H, Eberl G. Innate lymphoid cells in inflammation and immunity. *Immunity.* 2014;41:366–374.
34. Manaster I, Mandelboim O. The unique properties of uterine NK cells. *Am J Reprod Immunol.* 2010;63:434–444.
35. Petitdemange C, Becquart P, Wauquier N, et al. Unconventional repertoire profile is imprinted during acute chikungunya infection for natural killer cells polarization toward cytotoxicity. *PLoS Pathog.* 2011;7:e1002268.
36. Vieillard V, Strominger JL, Debré P. NK cytotoxicity against CD4$^+$ T cells during HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:10981–10986.
37. Takayama T, Kamada N, Chinen H, et al. Imbalance of NKp44 (+)NKp46 (-) and NKp44 (-)NKp46 (+) natural killer cells in the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2010;139:882–892.
38. Krämer B, Körner C, Kebschull M, et al. Natural killer p46High expression defines a natural killer cell subset that is potentially involved in control of hepatitis C virus replication and modulation of liver fibrosis. *Hepatology.* 2012;56: 1201–1213.
39. Golden-Mason L, Cox AL, Randall JA, et al. Increased natural killer cell cytotoxicity and NKp30 expression protects against hepatitis C virus infection in high-risk individuals and inhibits replication in vitro. *Hepatology.* 2010;52:1581–1589.
40. Xu R, Zhang Z, Wang FS. Liver fibrosis: mechanisms of immune-mediated liver injury. *Cell Mol Immunol.* 2012;9:296–301.
41. Radaeva S, Sun R, Jaruga B, et al. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology.* 2006; 130:435–452.
42. Connolly MK, Bedrosian AS, Mallen-St Clair J, et al. In liver fibrosis, dendritic cells govern hepatic inflammation in mice via TNF-alpha. *J Clin Invest.* 2009;119:3213–3225.
43. Zylberberg H, Rimaniol AC, Pol S, et al. Soluble tumor necrosis factor receptors in chronic hepatitis C: a correlation with histological fibrosis and activity. *J Hepatol.* 1999;30:185–191.
44. Yoon JC, Lim JB, Park JH, et al. Cell-to-cell contact with hepatitis C virus-infected cells reduces functional capacity of natural killer cells. *J Virol.* 2011;85:12557–12569.
45. Asselah T, Marcellin P, Bedossa P. Improving performance of liver biopsy in fibrosis assessment. *J Hepatol.* 2014;61:193–195.

Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Nel et al.

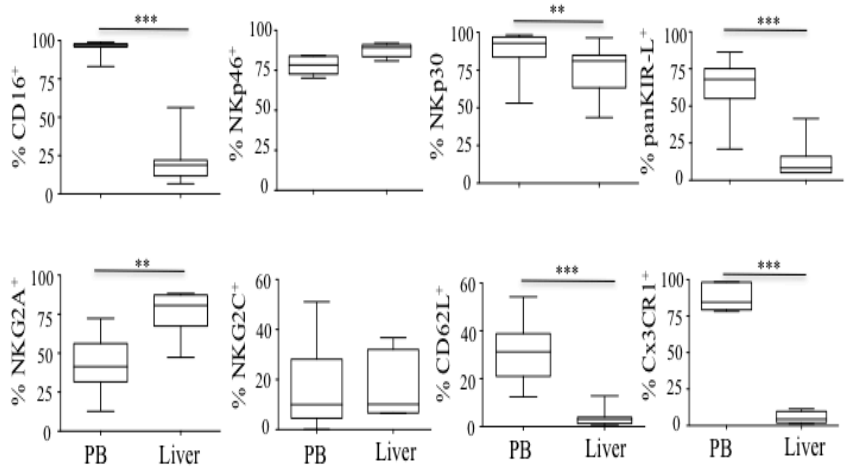
Supplemental Materials

Supplementary FIGURE 1. Gating strategy for NKp44$^+$ NK cells. CD3$^-$CD56$^+$ NK cells from peripheral blood (PB) and liver biopsies of a representative HCV$^+$ sample were gated within the CD45$^+$ lymphocytic population. NK cells positive for NKp44 were detected with a specific anti-NKp44-PE monoclonal antibody.



Supplementary FIGURE 2. Expression of NK cell markers on intrahepatic NK cells. Frequency of CD16, NKp46, NKp30, panKIR-L (KIR2DL1, KIR2DL2/DL3, and KIR3DL1), NKG2A, NKG2C, CD62L, and Cx3CR1 in peripheral blood (PB) and intrahepatic (Liver) $CD3^{-}CD56^{+}$ NK cell from the 21 HCV-infected patients. Statistical analysis used the Wilcoxon rank test; **: p<.01; ***: p<.001.

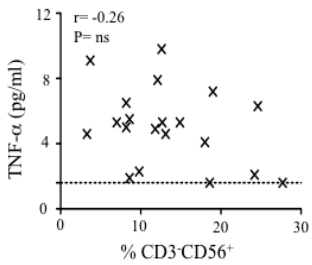
Supplemental Figure 2

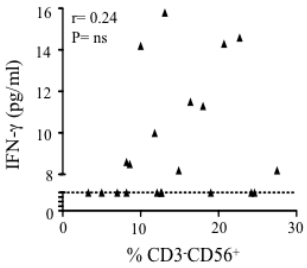


Supplementary FIGURE 3. Linear regression between the frequency of peripheral or intrahepatic NK cells and the cytokine levels in the plasma of the 21 HCV$^+$ samples. The Spearman test showed significant statistical correlations.

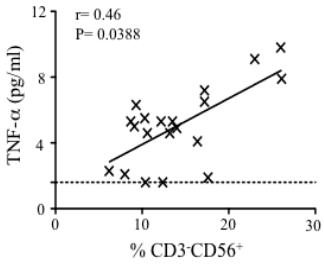
Supplemental Figure 3

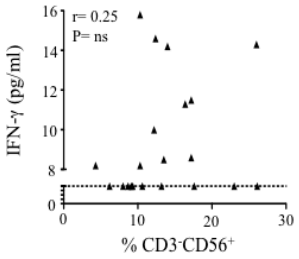
PB





Liver





Analyse et perspectives

Ce travail a permis de mettre en évidence une forte accumulation chez les patients infectés par le VHC de cellules NK intra-hépatiques activées exprimant le récepteur activateur NKp44, par rapport au cellules NK du sang périphérique chez ces mêmes patients. L'absence d'expression des marqueurs CD49a et CD127, spécifique de certaines populations d'ILC, nous ont permis de valider le phénotype des cellules NK de la population étudiée. L'expression de NKp44, qui est spécifiquement induite sur des cellules NK sous-exprimant le récepteur NKp30, est associée positivement à l'évolution de la fibrose ainsi qu'à l'augmentation de la charge virale. Après une stimulation par de l'IL-12 et l'IL-18, l'étude fonctionnelle a montré que la population NK-NKp44$^+$ expriment des taux faibles d'IFN-γ mais des taux très élevés de TNF-α par rapport aux cellules NK-NKp44$^-$ et aux cellules NK du sang périphérique. Il est intéressant de noter que le taux d'IFN-γ dans le plasma est inversement corrélé à la fréquence de la population NK-NKp44$^+$ contrairement au taux de TNF-α mesuré dans le plasma. De plus, les niveaux de TNF-α intracellulaire et plasmatique sont corrélés avec la charge virale et l'aggravation de la fibrose. L'évaluation de la fonctionnalité des cellules NK-NKp44$^+$ montre qu'elles sont capables d'être polyfonctionnelles contre des cibles K562 standards et la lignée hépatique HepG2, contrairement aux cellules NK-NKp44$^-$ et aux cellules NK du sang périphérique. Il est enfin important de noter que la polyfonctionnalité est fortement inhibée par un prétraitement avec un anticorps anti-NKp44L. Ceci montre que l'activation fonctionnelle des cellules NK-NKp44$^+$ est dépendante de l'interaction NKp44/NKp44L. Ainsi, cette population NK-NKp44$^+$ productrice de TNF-α semble participer à la dégradation du foie qui est observée pendant la phase chronique du VHC. Il serait intéressant d'observer l'évolution de cette population de la phase aiguë à la phase chronique et de rechercher d'autres associations avec des récepteurs des cellules NK (tel que Siglec-7 dont la diminution de son expression est corrélée avec le stade de fibrose et de l'inflammation chez des patients chroniquement infectés (Brunetta et al., 2009)). Il est cependant important de noter que l'utilisation de biopsies de foie chez les patients VHC$^+$ est de plus en plus restreinte, du fait de l'utilisation de tests non-invasifs pour le suivi de la fibrose. Dans l'absolu, il serait vraiment intéressant de savoir si l'utilisation des traitements actuels par AAD a un impact sur l'expression du NKp44 sur les cellules NK intra-hépatiques. Parallèlement, des modèles de primates non-humains pourraient ainsi permettre de mieux appréhender l'implication de ce phénotype dans l'évolution de cette maladie. Une étude a récemment montré que la réponse innée est impliquée dans la dégradation du foie lors

de la phase aiguë (Manickam et al., 2016). Enfin, il est important de se rappeler que l'expression du récepteur NKp44 n'est pas restreinte à l'infection chronique par le VHC, mais avait été précédemment observée dans le laboratoire au cours de l'infection chronique par le VIH-1, et plus particulièrement dans les ganglions lymphoïdes (Vieillard et al., 2012). La similitude entre ces deux modèles est en partie responsable du projet de recherche que j'ai ensuite développé.

Projet 2b : Implication d'un mécanisme mettant en jeu la liaison entre une région conservée de la protéine Core et le gC1qR permettant d'induire le NKp44L à la surface de cellules hépatiques

Introduction

Le **projet 2a** a mis en évidence l'expansion d'une population NK-NKp44$^+$ intra-hépatiques chez des patients infectés chroniquement par le VHC. Les données précédemment obtenues par le laboratoire ont montré que la région 3S de la gp41 du VIH-1 interagissait avec le gC1qR induisant l'expression du NKp44L à la surface des LT CD4$^+$ les rendant sensible à la lyse par des cellules NK-NKp44$^+$. Nous avons donc voulu déterminer si un mécanisme similaire pouvait être à l'origine de la destruction des cellules hépatocytaires dans le cadre de l'infection chronique par le VHC. Il a été montré que le gC1qR est aussi exprimé à la surface des hépatocytes où une augmentation de son expression est observée lors de l'infection chronique par le VHC (Dembitzer et al., 2012). Le gC1qR interagit normalement avec plusieurs molécules physiologiques comme des protéines impliquées dans la coagulation (Ghebrehiwet et al., 1994). De plus, il a été montré qu'il pouvait également interagir avec de nombreuses protéines microbiennes dont notamment la protéine Core du VHC dont l'interaction module la réponse immunitaire **(Voir introduction partie A.3.2.2)**. Le but de mes travaux a été de déterminer le motif spécifique à la protéine Core qui interagit avec le gC1qR et d'évaluer si cela peut induire l'expression de NKp44L à la surface des hépatocytes, provoquant par la suite leur destruction par des cellules NK intra-hépatiques exprimant le NKp44. Nous avons choisi de réaliser cette étude sur deux lignées cellulaires d'origines hépatocytaires HepG2 et HepaRG, qui présentent des caractéristiques morphologiques et métaboliques très proche des hépatocytes matures et ont déjà été utilisées avec succès dans une étude sur le VHC (Ndongo-Thiam et al., 2011). L'identification de la région précise de la protéine Core du VHC peut ainsi apporter de nouvelles informations sur les mécanismes associés à la destruction du foie pendant la phase chronique du VHC. Une fois le motif identifié, des expériences de mutagénèse dirigée ont été menées afin de déterminer le rôle du motif identifié sur l'activité du VHC dans un modèle d'infection standard *in vitro* HuH 7.5.

Matériels & Méthodes

Obtention, activation et culture des lignées hepatocytaires HepG2 et HepaRG

La lignée cellulaire HepG2 provient d'un carcinome hépatocellulaire humain bien différencié. Les cellules sont mises en culture dans du milieu complet DMEM à raison d'environ $6x10^4$ cellules/mL. La lignée cellulaire HepaRG est fournie sous forme cryopreservée et déjà dans un état de différenciation terminale (LifeTechnologies). Les cellules sont placées dans leur milieu de culture : Milieu Williams E, 1% GlutaMAX I et du milieu HepaRG Thaw, Plate & General Purpose Working (LifeTechnologies). Les cellules sont déposées sur une plaque de 96 puits à la concentration de 1.10^6 cellules/mL. Pour induire un état d'activation métabolique des HepaRG, un milieu de culture « d'induction » est utilisé.

Peptides de la protéine Core du VHC

Une banque des 26 peptides chevauchants de 18-mers qui dérivent de la protéine Core du VHC de génotype 1a (souche H77) provenant de l'ANRS a été utilisée pour déterminer la région interagissant avec le gC1qR. La séquence sauvage d'un motif de la protéine Core (P7/P8) ainsi que trois peptides mutés ponctuellement par une alanine (Covalab, purification >90%) ont également été testés.

Stimulation cellulaire par la protéine Core du VHC ou des peptides.

Les HepG2 ou les HepaRG sont incubées avec la protéine recombinante Core du VHC de génotype 1a (AbD Serotec, pureté de 95%) ou des peptides de la protéine Core à la concentration de 10µg/mL pendant 4h (37°C, 5% CO_2). Un peptide scramble (Scr) est utilisé comme contrôle négatif.

Marquage membranaire pour analyse au FACS

Les HepaRG ou les HepG2 sont incubées, avec 4µg d'Ac primaire anti-NKp44L (IgM de souris ; #7.1) ou 1µg d'anti-gC1qR #74.5.2. Après lavage dans du PBS/BSA 0,5%, l'Ac secondaire, respectivement un Ac de rat anti-IgM de souris PE (Bioscience) ou à un Ac de chèvre anti-IgG1 de souris FITC (Beckman Coulter), est ajouté au 50ème pendant 30min à 4°C.

Test de relargage de ^{51}Chrome (^{51}Cr)

Afin de montrer la capacité des cellules NK à tuer des cellules HepG2 exprimant le NKp44L, ces dernières sont chargées en ^{51}Cr pendant 2h à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées avec leur milieu respectif puis déposés dans une plaque à 96 puits. Des tests de stimulation similaire par la protéine Core ou ses peptides sont réalisés en présence d'anti-NKp44L ou de son isotype contrôle (IgM, BD). Les cellules sont alors incubées avec des cellules NK actives à différents ratios cellules effectrices/cellules cibles (E/T ratio). Le pourcentage de lyse spécifique des cellules cibles est calculé selon : $(cpm_{test}-cpm_{neg})/(cpm_{pos}-cpm_{neg})$ x100.

Design des virus mutants

Quatre mutants viraux portant les mutations décrites précédemment ont été produits à partir d'un plasmide natif pUC-LMTV-P7-GLuc2A (contient le génome complet du VHC, un gène de résistance à l'ampicilline et un gène rapporteur luciférase) par une amplification avec des amorces induisant une mutation ponctuelle à l'aide du QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis enzyme (Agilent Technologies). Une vérification post-PCR a été réalisée par migration sur gel d'agarose 0,7%. Des bactéries compétentes Xgold ont été transfectées avec les plasmides mutants, puis étalées sur milieu gélosé LB-agar contenant de l'ampicilline et placées à 37°C la nuit. Les bactéries obtenues ont été amplifiées en présence d'ampicilline à 37°C sous agitation pendant 16 heures. Les plasmides ont été purifiés avec le PureLink HiPure Plasmid DNA Purification Kits (Invitrogen), quantifiés et vérifiés par migration sur gel d'agarose à 0,7% et par séquençage Sanger (GATC).

Transcription *in vitro*

Les plasmides mutants ou WT ont été digérés avec XbaI pendant 2h à 37°C. L'ADN linéaire obtenu est purifié par une série de centrifugation : (i) avec 100 µl de phenol/chlorophorme (2 fois) séparé par PhaseLock Gel, (ii) 10 µl d'acétate de sodium + 200 µl d'éthanol 100% (mis a précipité toute la nuit à -20°C), puis (iii) 200 µl d'éthanol 70% froid. Après que le culot soit sec, l'ADN est re-suspendu dans de l'eau et quantifié pour réaliser la transcription *in vitro*. Elle est réalisée avec MEGAscript Kit (Applied Biosystems) avec un mix comprenant l'ADN, des NTPs, le tampon et la polymérase T7, dans un thermocycleur à 37°C pendant 4h. À la fin de la réaction, l'ADN est digéré par une Turbo DNase pendant 15 min à 37°C et l'ARN est purifié avec RNeasy Mini Kit (Qiagen) et finalement élué dans de l'eau.

Transfection et production de VHC

Des cellules Huh7.5.1 permissives à l'infection par le VHC sont ensemencées en triplicat sur une plaque de 24 puits et mises en culture à 37°C. Après 24h, le milieu des cellules est éliminé et remplacé par 200 µl d'OptiMEM + 5% SVF. On utilise le TransIT-mRNA Transfection Kit (Mirus Bio LLC) pour faire un mix contenant 0,5 µg d'ARN. 50 µl de ces mix sont ajoutés goutte à goutte dans les puits et mis à incuber 37°C pendant 4h. L'OptiMEM + 5% SVF est remplacé par du milieu complet DMEM après 4h de transfection (soit le début de production). Du surnageant est prélevé à différents temps post-transfection : 2h, 24h, 48h et 72h pour mesurer l'activité luciférase. La lecture au luminomètre (Berthold technologies) se fait après ajout de la luciférine présente dans le BioLux Gaussia Luciferase Assay Kit (Biolabs).

Résultats

Induction de NKp44L par la protéine Core et son peptide P7/P8

La translocation du NKp44L à la surface s'effectue de façon optimale après une stimulation par la protéine Core à la concentration de 10 µg/mL. Un prétraitement avec Ac anti-gC1qR confirme que l'expression de NKp44L est dépendante du gC1qR **(Figure 1).**

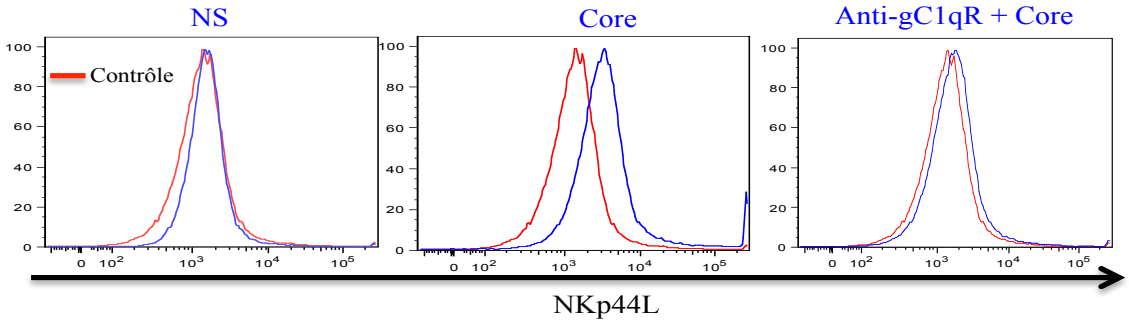


Figure 1 : Induction de l'expression du NKp44L par la protéine Core : Analyse par cytométrie en flux du niveau d'expression du NKp44L à la surface de HepG2 non stimulés (NS) et stimulés par la protéine Core du VHC seule ou après traitement par un Ac anti-gC1qR (en bleu). Le contrôle isotypique est représenté en rouge.

Afin d'identifier la région spécifique de la protéine Core impliquée dans la translocation de NKp44L, 26 peptides chevauchants de 18 mers (nommés P1 à P26) ont été générés à partir de la séquence entière de la protéine Core du VHC de génotype 1a. Seuls les peptides P7 et P8 ont la capacité d'induire la translocation du NKp44L **(Figure 2)**. Comme observé précédemment, un prétraitement avec un anti-gC1qR inhibe également l'augmentation d'expression membranaire de NKp44L (données non montrées). Ces données suggèrent que la région d'interaction avec le gC1qR est comprise dans la séquence commune aux peptides P7 et P8, nommé peptide P7/P8.

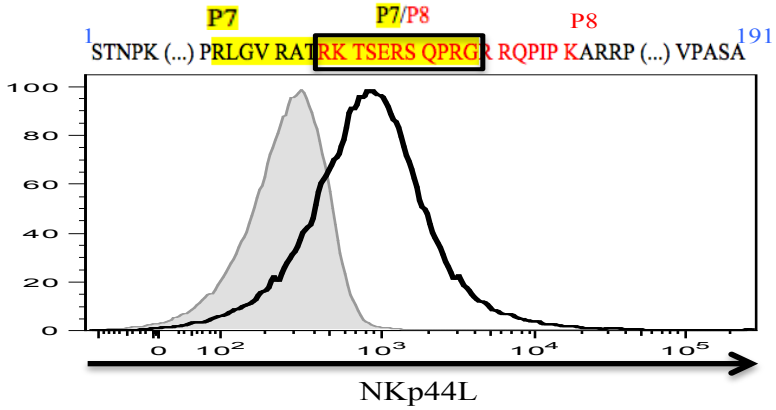


Figure 2 : Induction de l'expression du NKp44L par le peptide P7/P8 de la protéine Core : Analyse par cytométrie en flux du niveau d'expression de NKp44L à la surface de HepG2 après stimulation par le peptide P7/P8 (trait noir epais) de la protéine Core correspondant à la séquence commune entre P7 (surlignée en jaune) et P8 (rouge). Le contrôle isotypique correspond à la courbe pleine.

Il est intéressant de noter qu'une analyse dans les différentes banques de données disponibles révèle que le motif « SERS » est très fortement conservé entre les différents génotypes du VHC. On peut donc en déduire que le motif « SERS » pourrait être le « cœur » du motif de la protéine Core impliqué dans la translocation de NKp44L à la surface cellulaire.

Un test de relargage au ^{51}Cr montre une sensibilité accrue des HepG2 à la lyse NK particulièrement après une stimulation par la protéine Core et le peptide P7/P8 **(Figure 3A)**.

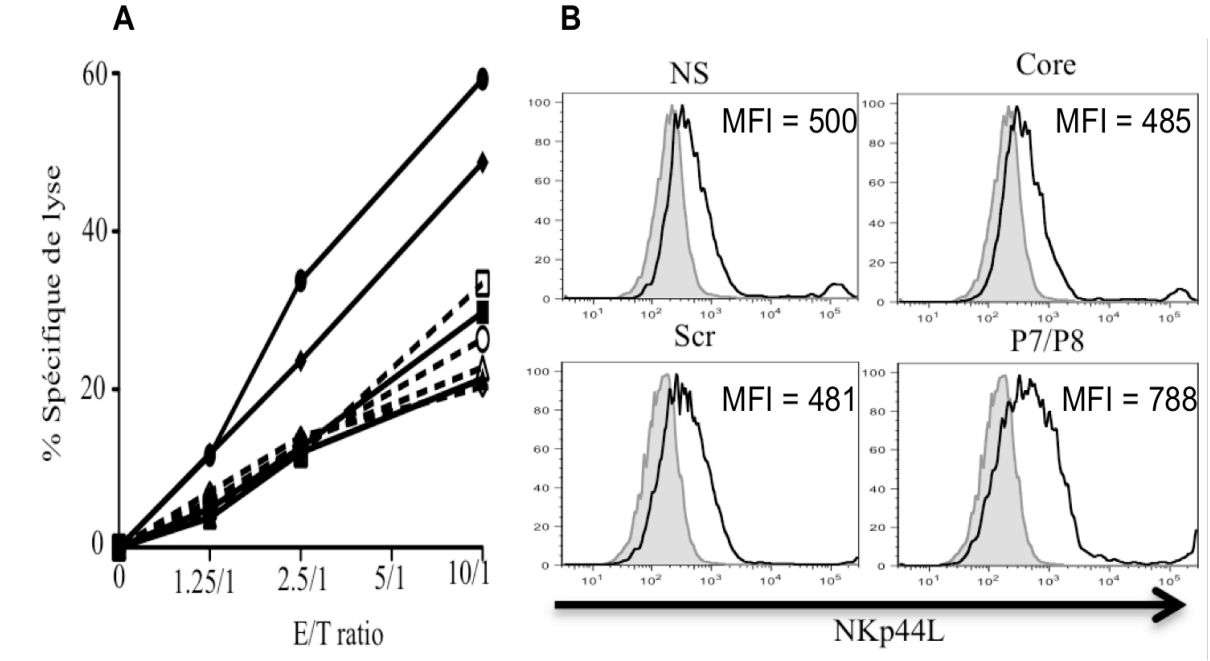


Figure 3 : Action des cellules NK vis-à-vis de cellules HepG2 et induction de NKp44L sur les cellules HepRG :
(A) Des cellules HepG2, pré-incubés avec du ^{51}Cr, sont mis en contact avec une proportion croissante de cellules NK actives (E/T ratio) après stimulation ou non (carré) par Core (cercle), P7/P8 (losange) ou Scr (triangle), après traitement par 10µg/mL d'anticorps anti-NKp44L (ligne en pointillée) ou de l'isotype contrôle (ligne pleine).
(B) Analyse par cytométrie en flux de l'expression de NKp44L à la surface de cellules HepaRG après stimulation ou non (NS) par la protéine Core ou les peptides Scr ou P7/P8 (trait noir). Le contrôle isotypique est représenté par la courbe pleine. MFI : Médiane de l'intensité de fluorescence après stimulation

Afin de confirmer ces résultats, nous avons utilisé la lignée HepaRG qui est physiologiquement plus proche des hépatocytes primaires matures. La **figure 3B** montre que les cellules HepaRG non stimulées semblent avoir un niveau basal de NKp44L contrairement aux cellules HepG2 **(Figure 1)**. De plus, la stimulation par la protéine Core entière n'a aucun effet sur la translocation du NKp44L alors que la stimulation par le peptide P7/P8 semble augmenter (MFI = 788) l'expression du NKp44L à la surface des HepaRG comparé au contrôle négatif avec le peptide Scr (MFI = 481).

Identification des acides aminés impliqués dans la translocation du NKp44L

Des mutants ont ensuite été générés à partir de la séquence sauvage P7/P8 qui possèdent chacun une substitution d'AA au niveau de la région « SERS » comme montré dans le **Tableau 1**. Le peptide M2 n'a pas pu être synthétisé.

Peptides	**Séquences**	**Mutations**
VHC WT	NH2-ATRKTSERSQPRGRK-COOH	0
VHC Scr	NH2-ATSSTKEPRGRRQRK-COOH	Redistribution aléatoire des AA
VHC M1	NH2-ATRKTAERSQPRGRK-COOH	S_1 →A
VHC M2	NH2-ATRKTSARSQPRGRK-COOH	E →A => **Non testé**
VHC M3	NH2-ATRKTSEASQPRGRK-COOH	R →A
VHC M4	NH2-ATRKTSERAQPRGRK-COOH	S_2 →A

Tableau 1 : Séquence des peptides mutants synthétisés à partir de la séquence P7/P8 :
Séquence du peptide sauvage de P7/P8 (WT) et de ses 3 peptides mutés : M1 pour la substitution de la 1ere Sérine (S1) en Alanine (A), M2 pour la substitution du Glutamate (E) en A, M3 pour la substitution de l'Arginine (R) en A, M4 pour la substitution de la 2ème Serine (S2) en A. Le peptide Scramble (Scr) sert de contrôle négatif.

Ces peptides ont été utilisés dans les conditions précédemment décrites. La **figure 4** montre que seul le mutant M4 est capable d'induire le NKp44L de façon équivalente au peptide sauvage. La stimulation par les deux autres mutants reste similaire au niveau obtenu avec le peptide contrôle. Ceci suggère que les substitutions de S1 et R empêchent l'interaction du peptide avec le gC1qR qui est nécessaire à l'induction de la translocation de NKp44L. Ces deux AA pourraient donc jouer un rôle particulier dans l'interaction avec le gC1qR.

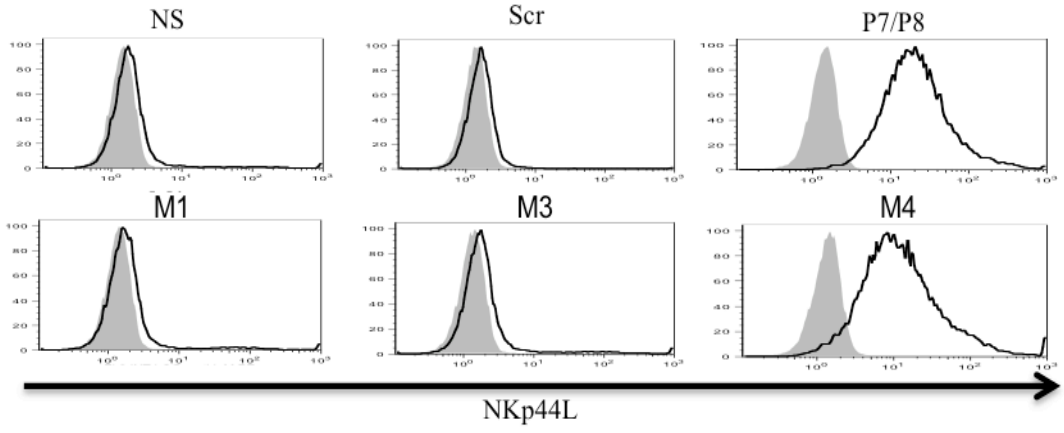


Figure 4 : Analyse de l'induction de la translocation du NKp44L à la surface par le peptide P7/P8 et ses mutants : Analyse par cytométrie en flux du niveau d'expression du NKp44L membranaire après stimulation ou non (NS) par les peptides Scr, P7/P8, M1, M3 ou M4 (trait noir épais). Le contrôle isotypique est représenté par la courbe pleine.

Production de virus portant une mutation ponctuelle dans le motif SERS

Pour évaluer le rôle du motif SERS de la protéine Core du VHC dans la fonction du virus, un alanine scanning a été effectué à différentes positions du motif à partir du plasmide contenant le génome complet du VHC. Après vérification par PCR de chaque mutation, les plasmides ont été amplifiés puis validés par séquençage. Afin d'optimiser les chances de produire du virus, les ARN ont été transfectés dans des cellules Huh7.5.1 qui sont un modèle optimal pour la production virale. La production des particules virales a été testée à différents temps dans le surnageant de culture par la mesure du taux de luciférase, produit lors de la traduction virale. La **figure 5** montre qu'après 24h d'infection, une activité luciférase est détectée dans le surnageant de culture des cellules infectées par le virus sauvage (WT) et tous les virus mutants exceptés pour le virus M2 dont le niveau est similaire à celui des cellules non-infectées (NI). 48h après infection, l'activité luciférase reste indétectable dans le cas de l'infection par le virus M2 qui ne produit pas de virions, mais augmente d'un facteur d'environ quatre pour les infections par les virus WT, M3 et M4 alors que le niveau de luciférase chute dans la culture infectée par le virus M1. Les données obtenues après 72h confirment un arrêt de production du virus M1 et une évolution exponentielle de la production du virus WT, M3 et M4. Ainsi, les mutations S1 et E du motif SERS semblent être des acides aminés importants pour la production de virions. A l'inverse, le R et la S2 ne semblent pas influencer la production virale. Il est cependant important de noter que ces données intéressantes devront être validées dans une nouvelle expérience indépendante.

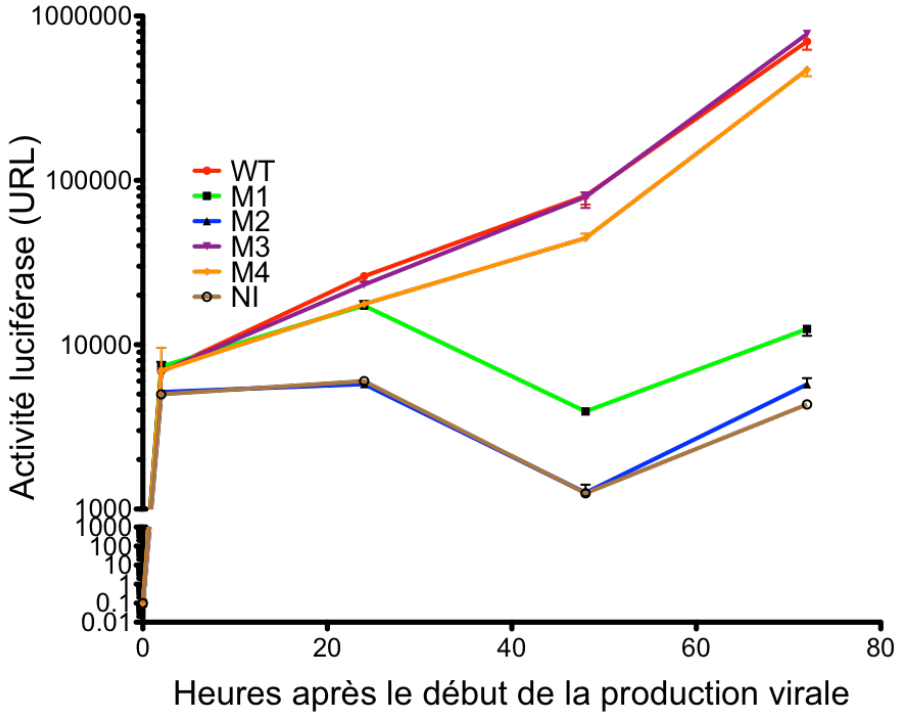


Figure 5 : Mesure de l'activité luciférase produit après infection par des cellules Huh 7.5.1 en fonction du temps : Courbe cinétique de l'activité luciférase en RLU (unité relative de lumière) dans le surnageant de cellules NI : non-infecté ou infecté par un virus WT : sauvage, M1 : mutant 1, M2 : mutant2, M3 : mutant 3, M4 : mutant 4 à 2h, 24h, 48h et 72h. N=3.

Discussion & Perspectives

Cette étude montre pour la première fois qu'un motif spécifique et conservé de la protéine Core du VHC est capable d'induire l'expression du ligand cellulaire d'un récepteur activateur NK. Ces données sont en accord avec notre hypothèse initiale et suggèrent fortement que les cellules NK sont impliquées dans la destruction hépatocytaire au cours de l'infection chronique par le VHC. Ce mécanisme est similaire à celui observé pendant l'infection chronique du VIH-1. Les similitudes entre les résultats observés peuvent en partie s'expliquer par la ressemblance des motifs 3S du VIH-1 et P7/P8 du VHC mis en jeu. En effet, la comparaison d'une partie de la séquence P7/P8 (RKT**SERS**QPRG) avec celle du motif 3S (SW**SNKS**) met en évidence une forte homologie de structure pour quatre acides aminés contigus qui présentent des analogies biochimiques **(Voir Figure ci-dessous)**. Cela pourrait suggérer que les sites de fixation des deux motifs avec le gC1qR soient identiques mais Pednekar et al ont montré que les deux protéines (gp41 et Core) interagissaient avec des régions différentes du gC1qR (Pednekar et al., 2016). Il est intéressant de noter que contrairement à la protéine Core entière, le peptide P7/P8 n'a pas de propriétés immuno-modulatrices des LT.

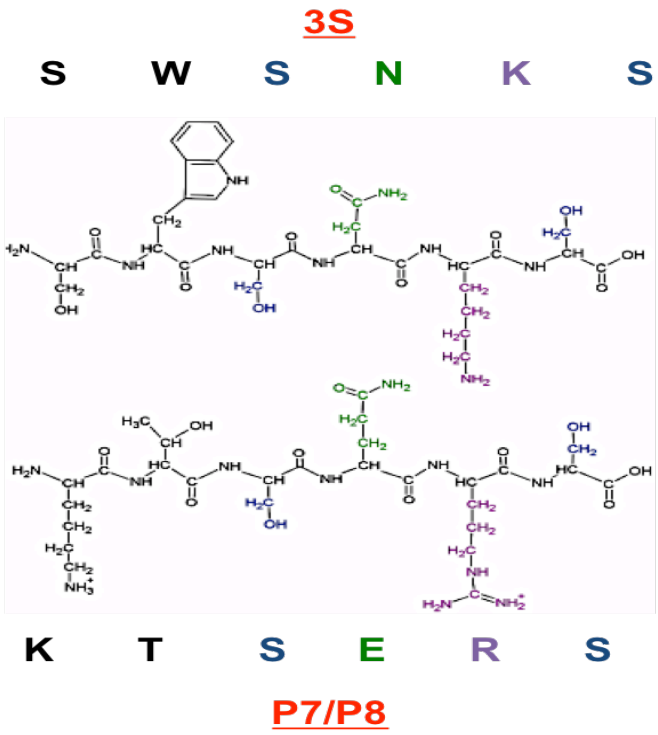


Figure : Comparatif des acides aminés du motif 3S du VIH-1 et du motif P7/P8 du VHC

Afin de valider ces données, nous avons produit différents peptides ou virus VHC mutants portant chacun des mutations ponctuelles sur le motif SERS afin de tester respectivement leurs effets sur l'induction de NKp44L ou sur la production de virions sur la lignée hépatocytaire HuH 7.5.1. Seul le peptide mutant M4 garde la capacité d'induire du NKp44L à la surface de HepG2 ; les peptides mutés en M1 et M3 montrent que ces résidus sont nécessaires à l'induction de l'expression de NKp44L. Les résultats obtenus sur les virus mutants montrent qu'une production virale est quantifiable avec les virus WT, M3 et M4 de façon exponentielle jusqu'à 72h, ce qui suggère que les mutations sur les résidus R et S2 ne semblent pas nécessaires à la production de la protéine Core fonctionnelle. Celle-ci est pourtant nécessaire pour la formation des particules virales et à leur libération. A l'inverse, les mutants M1 et M2 ne semblent pas produire de particules virales. Afin de valider ces résultats de nouvelles expériences devront être réalisées à partir de nouvelles préparations plasmidiques. Par ailleurs, il serait intéressant de tester le surnageant produit dans ces cellules afin de tester leur infectivité.

En résumé, les résidus SERS semblent critiques dans la fonction de la protéine Core : S1 et E seraient indispensables pour induire le NKp44L ainsi que nécessaire dans la formation des virions. R serait nécessaire à l'induction du NKp44L mais pas à la structuration de la protéine Core alors que S2 ne serait indispensable dans aucune des deux fonctions étudiées. À plus long terme, ce motif pourrait ainsi être considéré comme une nouvelle cible thérapeutique pour des drogues antivirales. Il est cependant important de tester d'autres types de mutations pour confirmer le rôle de cette région dans l'induction de l'expression de NKp44L et/ou la formation des virions. Une analyse par modélisation nous permettrait également d'observer *in silico* la structure du motif SERS et de ses mutants au sein de la protéine Core. Malheureusement, le cristal et les caractéristiques biochimiques de la protéine Core ne sont pas résolus à ce jour. En revanche, des analyses d'interactions des différents peptides avec le gC1qR sont en cours et permettraient de prédire la structure de la région SERS.

Projet 3a : Étude de la fonction d'AcNs anti-3S dans le contrôle de l'infection VIH-1 dans une cohorte de patients LTNP

Introduction

L'identification d'un motif très conservé de la gp41 du VIH-1 nommé 3S, qui induit chez les patients VIH-1^+ la déplétion des LT $CD4^+$, a permis de développer un vaccin peptidique thérapeutique VAC-3S. Ce vaccin a été successivement testé chez le macaque puis chez l'Homme dans le cadre de deux essais cliniques (Vieillard et al., 2016; voir annexe 1). Les données de l'essai clinique de phase IIa, qui a été testé chez 90 patients VIH-1^+ sous cARV, confirment la sécurité de ce vaccin observée au cours de la phase I, mais également son immunogénécité. Les post-analyses mettent également en évidence que chez les patients qui ont un niveau d'anticorps supérieur à 100 UA/mL, on observe une augmentation significative du taux de LT $CD4^+$ et du ratio CD4/CD8 (manuscrit en préparation). Des études approfondies de ce motif (Petitdemange et al., 2013) ont montré qu'un peptide mutant de la région 3S nommé W614A-3S est capable après immunisation d'induire chez la souris des AcNs contre la région 3S. Depuis des résultats similaires ont été obtenus chez le lapin et le macaque **(Voir projet 3b)**. La présence d'AcNs W614A-3S avait été également observé chez un nombre restreint de patients VIH-1^+ progresseurs (moins de 5% des individus testés) ayant un nombre élevé de LT CD4+ et une charge virale indétectable. Ces données suggéraient que des anticorps capables de reconnaître le motif sauvage mais également sa forme mutée, pouvaient être induit par vaccination mais également être naturellement présents chez certains patients.

Sur une cohorte de patients contrôleurs du VIH-1 qui conserve un taux élevé de LT $CD4^+$ sans traitement cARV, nous avons cherché à évaluer l'implication des AcNs W614A-3S dans le maintien de ce statut particulier. À partir du plasma de ces patients, nous avons cherché à quantifier les Ac anti-3S et -W614A-3S au cours d'un suivi longitudinal de minimum cinq ans après l'entrée dans la cohorte. Puis nous avons recherché des corrélations entre le titre de ces anticorps et les différents marqueurs biologiques et cliniques.

Article 3

EBioMedicine 22 (2017) 122–132

Contents lists available at ScienceDirect

EBioMedicine

journal homepage: www.ebiomedicine.com

Research Paper

Neutralizing Antibodies Against a Specific Human Immunodeficiency Virus gp41 Epitope are Associated With Long-term Non-progressor Status

Olivier Lucar [a], Bin Su [b,c], Valérie Potard [d], Assia Samri [a], Brigitte Autran [a], Christiane Moog [b], Patrice Debré [a], Vincent Vieillard [a,*]

[a] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM U1135, CNRS ERL8255, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), Paris, France
[b] U1109 INSERM, FMTS, Université de Strasbourg, Strasbourg, France
[c] Center for Infectious Diseases, Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China
[d] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR-S 1136, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 13 January 2017
Received in revised form 7 July 2017
Accepted 7 July 2017
Available online 11 July 2017

Keywords:
HIV-1
Long-term non-progressors
Neutralizing antibody

ABSTRACT

Antibodies (Abs) play a central role in human immunodeficiency virus (HIV) protection due to their multiple functional inhibitory activities. W614A-3S Abs recognize a specific form of a highly conserved motif of the gp41 envelope protein and can elicit viral neutralization to protect $CD4^+$ T cells. Here, we describe in detail the neutralizing profile of W614A-3S Abs in untreated long-term non-progressor (LTNP) HIV-infected patients. W614A-3S Abs were detected in 23.5% (16/68) of untreated LTNP patients compared with <5% (5/104) of HIV-1 progressor patients. The W614A-3S Abs had efficient neutralizing activity that inhibited transmitted founder primary viruses and exhibited Fc-mediated inhibitory functions at low concentrations in primary monocyte-derived macrophages. The neutralizing capacity of W614A-3S Abs was inversely correlated with viral load ($r = -0.9013$; $p < 0.0001$), viral DNA ($r = -0.7696$; $p = 0.0005$) and was associated the preservation of high $CD4^+$ T-cell counts and T-cell responses. This study demonstrates that W614A-3S neutralizing Abs may confer a crucial advantage to LTNP patients. These results provide insights for both pathophysiological research and the development of vaccine strategies.

© 2017 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Neutralizing antibodies (NAbs) are a good correlate of protection in infectious diseases such as yellow fever, smallpox, and measles (Amanna et al., 2008). The potential protective role of Nabs during the course of human immunodeficiency virus (HIV) infection remains a highly debated issue. Many HIV-infected individuals naturally develop NAbs that target several sites on the gp41 and gp120 HIV-1 envelope proteins after several years of infection, but only 10–25% develop potent and broadly reactive Nabs (Mikell et al., 2011; Hraber et al., 2014; West et al., 2014). These findings suggest that the human immune system can achieve NAb responses, but whether these Abs are naturally protective during HIV infection remains unclear.

Studies of NAbs in general have provided an enormous impetus to HIV vaccine research and to immunology as a whole (Sadanand et al., 2016). Monoclonal Abs (mAbs) with the remarkable ability to neutralize most circulating strains of HIV-1 were recently isolated from HIV-infected individuals. Examples include 3BNC117 and PGT121 mAbs, which both transiently block infection and suppress viremia in simian/HIV (SHIV)-infected macaques, demonstrating that the passive administration of potent NAbs protects macaques for a short period of time (Barouch et al., 2013). In HIV-1-infected humans, a single infusion of 3BNC117 mAb, which specifically targets the CD4-binding site on gp120, decreased viremia for up to 28 days (Caskey et al., 2015).

Although these data indicate the potential effectiveness of passive immunotherapy by NAbs, the successful development of preventive HIV-1 vaccines requires a thorough understanding of how Nabs are induced during HIV-1 infection. The unusual maturation features of NAbs make them extremely difficult to induce and indicate that one of the most important challenges for vaccines development is to characterize well-defined targets that specifically stimulate neutralizing activity (Sadanand et al., 2016). The gp41 subunit is far more conserved than gp120, and the fusion machinery is common to all strains. We previously described a highly specific motif localized in a gp41 HIV-1 region, called 3S (Vieillard et al., 2005; Vieillard et al., 2016), localized between the N-terminal heptad repeat (HR) 1 and the HR2, that appears to be exposed to the surface in the trimeric pre-fusion structure of the HIV-1 envelope (Fig. S1), in line with recent resolve structures of the HIV-1 envelope trimer (Pancera et al., 2014; Lee et al., 2016). In an *in vivo*

* Corresponding author.
E-mail address: vincent.vieillard@upmc.fr (V. Vieillard).

http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.07.007
2352-3964/© 2017 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

macaque model, immunization with a candidate vaccine based on the 3S motif induced non-neutralizing Abs, which limited $CD4^+$ T-cell depletion, immune activation, and inflammation, thus achieving immune protection and restoring immune homeostasis (Vieillard et al., 2008, 2012).

An alanine-scanning assay within the 3S motif of the viral gp41 protein showed that a tryptophan residue at position 614 (W614) is crucial for the virus entry (Petitdemange et al., 2013). The main reason could be that this region plays a key role in the formation of the six-helix bundled gp41 ectodomain core structure that imposes several kinetic and steric constraints responsible for the high degree of motif preservation, as previously reported (Gallo et al., 2003). Altogether, these data could explain the absence of detectable "3S" escape variants, and the remarkable conservation of the 3S motif within the gp41 (Vieillard et al., 2005; Potard et al., 2013). Next, we generated in mice a class of Abs against the 3S motif, called W614A-3S Ab that elicits neutralizing activity, against a panel of tier 1 and tier 2 viruses from clades A, B, C and E (Petitdemange et al., 2013). More recently, these data were confirmed in rabbit and macaque models (unpublished data are from Vieillard et al.). Our data are in accordance with Bradley et al. (2016) showing that amino-acid changes in gp41 membrane proximal region (MPER) induce viral neutralization sensitivity. Interestingly, we also determined that approximately 5% of HIV-1-infected progressor patients naturally produce neutralizing W614A-3S Abs (Petitdemange et al., 2013).

In this study, we analyzed the neutralizing activity of W614A-3S Abs isolated from long-term non-progressor (LTNP) patients from the French ALT ("Asymptomatic Long-Term") cohort ("Agence Nationale de Recherche sur le Sida" ANRS CO15). These HIV-1-infected individuals account for <0.4% of the total HIV population (Grabar et al., 1999). They maintain high $CD4^+$ T-cell counts and remain therapy naïve. Here, we report an unusually high frequency of LTNP patients with W614A-3S Nabs. These Abs displayed neutralizing activities over a five-year follow-up period, which are correlated with low viral load, low viral reservoir, and high $CD4^+$ T-cell responses. These data support the hypothesis that these specific Nabs play an important role *in vivo* in maintaining LTNP status.

2. Materials and Methods

2.1. Study Subjects

This study enrolled 68 LTNP HIV-1^+ patients from the French ALT cohort (ANRS CO15). Their characteristics are summarized in Table 1. As previously reported, ALT cohort members met the following inclusion criteria: HIV seropositivity for at least 8 years and CD4 cell counts > 600/mm^3 for the past 5 years, whatever the viral load, but without symptoms or antiretroviral therapy (Grabar et al., 1999). LTNP patients were subdivided into three groups according to their capacity to produce neutralizing W614A-3S Abs, non-neutralizing WT-$3S^+$ Ab only, or neither subtype (Neg). The CO15 ALT cohort is funded and sponsored by ANRS and was approved by the ethics review committee of Ile de France – VI. All patients provided written informed consent, and all methods were performed in accordance with relevant guidelines and regulations indicated by the Declaration of Helsinki.

2.2. CD4 Count and Viral Production

The course of the immune and virological status of LTNP patients from the ALT cohort has been described elsewhere (Candotti et al., 1999; Magierowska et al., 1999; Martinez et al., 2005). All tests were conducted in a single laboratory. CD4 cell counts were performed on fresh blood by flow cytometry (Coulter) and were determined in accordance with a standard internal control (mean ± SD reference value, 858 ± 260 cells/mm^3). HIV-1 RNA viral load was quantified in fresh plasma samples using an ultrasensitive HIV-1 Amplicor-Monitor assay (Roche-Diagnostic Systems; limit of detection, 20 copies/ml). The level of HIV-1 viral DNA was determined in frozen peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using a modified Amplicor Monitor assay (Roche Laboratories) with an internal HIV-1 proviral DNA standard. Results were expressed as copies of HIV-1 viral DNA/10^6 PBMCs with a limit of detection of 1 copy/10^6 PBMCs.

Sequencing analysis of the patient viral sequences at the 614 position of the 3S motif is shown in Table S1. This analysis came from the

Table 1
Characteristics of study ALT patients.

Characteristics	Neg	WT-3S	W614-3S	P*
Number	24	28	16	
Median age in years	36.0	36.6	38.0	0.55
Male:Female (n)	20:4	24:4	8:8	**0.02**
Median viral load (quartiles)	9.3×10^3 (2.1×10^3–1.0×10^5)	2.3×10^5 (4.5×10^3–1.0×10^5)	1.3×10^2 (3.3×10^1–4.1×10^2)	<**0.0001**
Median viral DNA (quartiles)	403 (120–1449)	430 (114–1011)	24 (8–27)	<**0.0001**
Median CD4 count (quartiles)	605 (467–769)	717 (609–799)	697 (590–833)	0.09
Median % CD4 (quartiles)	33.0 (27.5–37.0)	30.0 (26.0–36.0)	39.5 (35.0–42.5)	**0.01**
In $CD4^+$ T cells (%, median, quartiles)				
$HLA\text{-}DR^+$	8.5 (4.0–9.0)	8.5 (6.0–14.0)	6.0 (3.0–11.0)	0.12
$CD38^+$	76.5 (70.0–86.0)	76.0 (58.0–80.5)	69.5 (50.0–75.0)	0.07
$CD45Ra^+$	59.0 (49.0–65.0)	53.0 (43.5–91.0)	51.0 (41.0–68.0)	0.24
$CD45Ro^+$	47.0 (35.0–58.5)	50.0 (35.5–76.0)	51.0 (39.0–66.0)	0.81
Median CD8 count (quartiles)	818 (685–964)	1121 (974–1541)	717 (531–1168)	**0.004**
Median % CD8 (quartiles)	42.5 (38.0–49.5)	48.0 (41.5–60.0)	39.0 (36.0–44.0)	**0.004**
In $CD8^+$ T cells (%, median, quartiles)				
$HLA\text{-}DR^+$	27.0 (19.0–35.0)	33.0 (28.0–45.0)	22.0 (16.0–30.0)	**0.007**
$CD38^+$	56.5 (45.0–69.0)	51.0 (38.0–66.0)	43.5 (37.0–50.0)	**0.03**
$CD45Ra^+$	65.0 (54.0–74.5)	54.0 (46.0–70.0)	64.0 (55.0–74.0)	0.24
$CD45Ro^+$	28.5 (20.2–41.2)	35.0 (24.2–45.7)	30.0 (21.0–38.0)	0.52
$CD57^+$	38.0 (34.0–52.0)	34.0 (26.5–83.0)	34.0 (20.0–43.0)	0.49

Significant values ($P < 0.05$) expressed in *bold*.
* Statistical analysis was performed using chi-square test for categorical variables and Kruskal-Wallis test for continuous variables, with Dunn post-test.

complete protein sequence of gp41 from the 56 available samples of LTNP patients from the ALT cohort (Potard et al., 2013).

2.3. Phenotyping and Specific $CD4^+$/$CD8^+$ T-cell Responses

$CD4^+$ and $CD8^+$ T cells were analyzed on a Beckman Coulter FC500 flow cytometer using the CXP Analysis (Beckman Coulter) software, with an appropriate combination of antibodies: CD4-PE-Cy7 (#SK3), CD8-PE-Cy7 (#RPA-T8), HLA-DR-PE (#G46–6), CD38-PE (#HIT-2), CD57-APC (#NK-1) from Becton Dickinson, CD45-RA-ECD (#2H4), and CD45-RO-FITC (#UCHL1) from Beckman Coulter.

$CD8^+$ T-cell responses were evaluated using a standard IFN-γ enzyme-linked immunospot assay. PBMCs in triplicate were incubated with medium alone (negative control), phytohemagglutinin (positive control), or pools of 15-mer peptides overlapping by 11 amino-acids and spanning the entire Gag, RT and Nef HIV-1 proteins (2 μg/ml), previously described (Xie et al., 2010). Results are expressed as spot-forming cells (SFC)/10^6 PBMCs. The positive threshold was 50 SFCs/10^6 PBMC after background subtraction.

For the $CD4^+$ T-cell proliferation assay, PBMCs were stimulated with media, HIV-p24 protein (0.25 μg/ml; donated by Transgene, Strasbourg, France), or recall antigens, specifically varidase (5 μg/ml; Sigma-Aldrich) or tuberculin (purified protein derivative, PPD) (1 μg/ml; Statens Serum Institut, Denmark). After a 6-day incubation, 1 γCi of [^{3}H]-thymidine was added to each well, and the plate was incubated for 18 h. The stimulation index (SI) was calculated as the ratio of (cells plus stimuli) cpm to (cells plus medium) cpm. Positive antigen-specific responses were defined as those with >3000 cpm and an SI > 3.

2.4. ELISA, Affinity Purification of Antigen-specific IgG, and Viral Neutralization

Plasma samples were titrated by ELISA with EIA/RIA 96-well flat-bottom plates coated overnight with 100 ng/well of purified 3S peptides NH2-pwnasSWSNKSssleqiw-COOH or NH2-pwnasSASNKSssleqiw-COOH to specifically quantify WT-3S and W614A-3S Abs, respectively, as described (Vieillard et al., 2006; Petitdemange et al., 2013). A scramble peptide NH2-pnsakwlwssiqsnswes-COOH served as control (Fig. S2). Purified peptides were prepared by Covalab (Villeurbanne, France). Specific Abs were purified from heat-inactivated plasma from HIV-infected patients, as described (Cheung et al., 2012; Petitdemange et al., 2013). Briefly, total IgG from the serum was purified using Protein A sepharose beads (GE Healthcare), then incubated rotating for 15 min in a column with the immunogen peptide covalently coupled to sepharose beads. By gravity flow, the unbound fraction was drained, and the column was washed extensively with 1 x PBS to eliminate nonspecific IgG. Antigen-specific polyclonal IgG pool was eluted sequentially with 0.1 M glycine/HCl buffer at pH 3.5, followed by pH 2.7, and finally pH 1.8. Each elution was immediately neutralized with 1 M Tris buffer (pH 8.5). Purified Abs were dialyzed against PBS (Slide-A-Lyzer Dialysis cassette, Pierce) and then quantified by NanoDrop using a BCA (BiCinchoninic acid Assay) assay with bovine gamma globulin as the reference standard (Thermo Fisher). The specificity of WT-3S and W614A-3S Ab was tested by Elisa after each set of purification with specific and control synthetic peptides (scramble, WT-3S and W614A-3S peptides). Negatives values were <0.15 OD_{450} and positives values ≥ 1.0 OD_{450}.

Neutralization by purified W614A-3S Abs was assessed at starting concentrations of 2 μg/ml, followed by five 2-fold dilutions with a standard TZM-bl assay against various tier 1 (NDK, NL4.3, SF162) and tier 2 (JR-CSF, YU2, QH0692) HIV-1 clade B strains, as well as two T/F molecular clones (pCH058 and pCH077), as described (Petitdemange et al., 2013; Heyndrickx et al., 2012). TZM-bl cells expressing Fc-gamma receptor 1 (FcγRI) (TZM-bl-Fc/FcγRI) were used to measure the FcγRI function of purified W614A-3S Abs, in the presence of SF162 and QH0692 HIV-1 strains (Perez et al., 2013). The panel of mAbs shown in Table S2 was used as controls. The following reagents were obtained from the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS (NIAID, Germantown, MD, USA): TZM-bl (Cat # 8129) and TZM-bl-Fc/FcγRI (Cat # 11798) cells, as well as VRC01, VRC07, 3BNC117, PGT 121,447-52D, IgG1 b12 and 10-E8 mAbs. The 2F5 and 2G12 mAbs were obtained from Polymun Scientific (Austria), and the 10-1074 mAb was a gift from Dr. H. Mouquet (Pasteur Institute, Paris, France).

For the MDM assay, magnetic separation with the CD14 MicroBeads kit (Miltenyi Biotec) was used to purify monocytes from peripheral mononuclear cells from HIV-seronegative healthy donors. After the monocyte purity was determined by flow cytometry, the monocytes were cultured in AIM-V FCS-free medium with Glutamax 1× (Thermo Fisher) and 100 U/ml GM-CSF (PeproTech). The culture medium was changed after 3 days of culture. On day 5, macrophages were washed twice before infection with BaL (subtype B, HIV-1 R5 strain), detailed elsewhere (Holl et al., 2004; Lederle et al., 2014). Various HIV-specific mAbs were used as controls in both the TZM-bl and MDM neutralizing assays, previously described (Holl et al., 2006).

2.5. Sample Preparation, Mass Spectometry Analysis of CDR-H3 Motifs

F(ab)2 fragments were prepared from affinity-purified W614A-3S Nabs and WT-3S non-neutralizing Abs using immobilized pepsin (Pierce, IL, USA). The pepsin-agarose beads were separated by applying the reaction solution to an Ultrafree centrifugal filter column (Millipore, MA, USA). F(ab)2 were applied to Econo-Pac chromatography column in gravity mode (BioRad). The elution fractions were trypsin digested at 37 °C for 60 min in a reaction solution (50% v/v TFE, 50 mM ammonium bicarbonate and 2.5 mM DTT), as described (Cheung et al., 2012; Wine et al., 2013). Trypsin digestion generates peptide fragments with enough coverage of the CDR-H3 region and of lengths appropriate for MS detection (Wine et al., 2013). Digested peptides were desalted by STAGE (Stop and go extraction) TIPS, and analyzed by LC-MS (Liquid chromatography-mass spectrometry)/MS.

LC-MS/MS was done by Alphalyse (Odense, Denmark), using the LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher) mass spectrometer. The samples were loaded for 10 min using a Famos autosampler (LC Packings) onto a hand-poured fused silica capillary column (125 mm internal diameter × 20 cm) packed with Magic C18aQ resin (5 μm, 200 Å) using an Agilent 1100 series binary pump with an in-line flow splitter. The resulting MS/MS spectra were searched against a protein sequence database consisting of the in-house human VH sequences, and identified using the SEQUEST algorithm (Proteome Discoverer, Thermo Scientific). For post-acquisition analysis, passing peptides were remapped to the NGS (next-generation sequencing) immunoglobulin database, and matches were limited to those arising from expected cleavage site for trypsin. We therefore considered all Iso/Leu sequence variants as a single group, and mapped the group to all CDR-H3s associated with any of the group members, as described (Wine et al., 2013). For other isobaric pairings, only the top-ranked PSM (peptide spectrum matches) determined by the SEQUEST-Percolator pipeline were considered. Resulting sequences of CDR-H3 were then aligned with the following panel of monoclonal NAbs, used as controls: 2F5, 10-1074, 10E8, PGT121 (Tables S2 and S3).

2.6. Statistical Analysis

Characteristics of all patients of the ALT cohort were analyzed for the following 3 groups of patients: negative, WT-$3S^+$, and W614A-$3S^+$. Categorical variables were described as numbers and percentages and continuous variables as medians and interquartile ranges. All data accruing were taken into account. Categorical variables were tested with the $\chi 2$ test and continuous variables with the Kruskal-Wallis test.

Kaplan-Meier curves and log-rank tests were used to compare the probability of maintaining non-treated status in the 3 groups of patients described above. An univariate Cox regression model was used to assess

the influence of W614A-3S Abs on the second endpoint. Time was right-censored at 5 years. Statistical significance was defined as a p-value < 0.05. SAS software (v9.3; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used for these statistical analyses.

3. Results

3.1. High Frequency of LTNP Patients with W614A-3S Neutralizing Abs

To study the role of W614A-3S Abs in the 68 LTNP patients, samples were subdivided into three groups according to their capacity to produce neutralizing W614A-3S Abs ($n = 16$; 23.5%), non-neutralizing WT-3S Abs only ($n = 28$), or neither 3S subtype ($N = 24$) at the time of enrollment in the cohort (Table 1 & Fig. S2). Notably, we observed that anti-WT-3S were IgG2 > IgG1 > IgG3, whereas anti-W614A-3S responses were IgG1 > IgG3 > IgG2, with IgG1 > 85%. The concentration of IgG4 was below detection level (data not shown). This switch of Ig subtype supports a possible maturation of the Ab response against the 3S epitope. Consistently, almost all broadly NAbs identified to date have either been isolated or expressed as IgG1 (Sadanand et al., 2016).

Kaplan-Meier survival curves indicated that all W614A-3S$^+$ patients remained non-treated at 5 years compared with 41.7% [20.5%; 61.7%] in the Neg group, and 53.1% [30.8%; 71.2%] in the WT-3S group (log rank: $p = 0.004$; Fig. 1A).

After immunoprecipitation to purify the W614A-3S Abs, dose-response curves of neutralizing activity were assessed at year 1 after cohort entry. Fig. 1B shows neutralizing activity against JR-CSF and YU-2 HIV-1 strains from all patients that produced W614A-3S Abs, whereas WT-3S Abs were not neutralizing, as previously observed (Vieillard et al., 2006; Petitdemange et al., 2013). More importantly, the potency of W614A-3S NAbs increased significantly 5 years later against the HIV-1 strains JR-CSF ($p = 0.0017$) and YU2 ($p = 0.0011$) (Fig. 1C). W614A-3S Abs exhibited high neutralizing activity against a panel of tier 1 (SF162), tier 2 virus and pseudo-viruses (JR-CSF, YU-2, QH092), two T/F infectious molecular clones (pCH058 and pCH77), but also BaL strain (Table 2). The IC_{80} levels, ranged from <0.1 to 3.0 μg/ml, depending on the HIV-1 strain (Table 2) were similar or superior to those observed with a reference panel of potent neutralizing mAbs (Table S2).

Next, we assessed the neutralizing capacity of W614A-3S Abs in the presence of TZM-bl/FcγRI cells, and observed that it was approximately

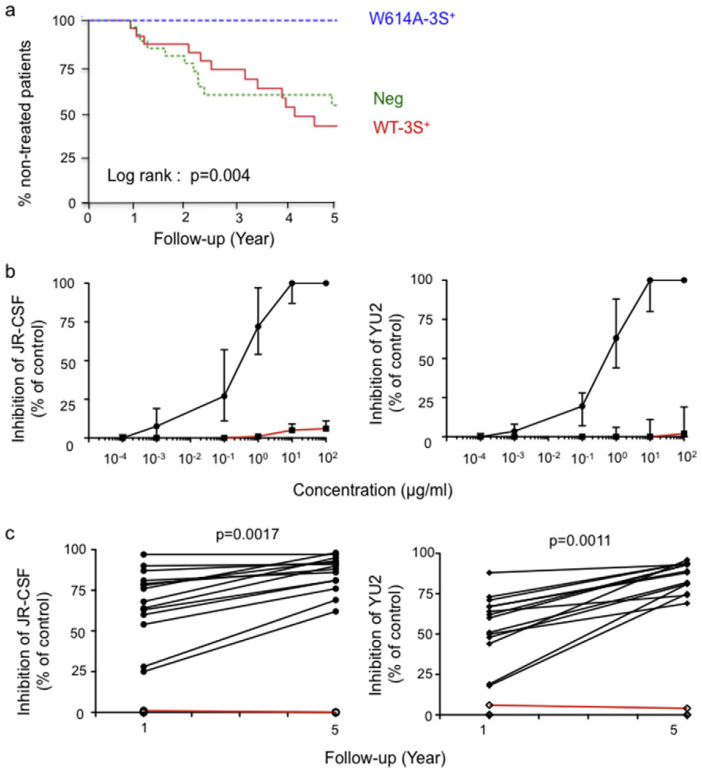


Fig. 1. High frequency and neutralizing activity of W614A-3S Ab in LTNP patients. (A) Kaplan-Meier curves of the frequency of patients in the W614A-3S$^+$ group ($n = 16$) compared with the WT-3S$^+$ ($n = 28$) and Neg control ($n = 24$) groups. Blue: W614A-3S$^+$ group; green: WT-3S$^+$ group, and red: negative control group. (B) Dose-response curves of neutralizing activity at year 1 after cohort entry. Inhibition of infection by JR-CSF and YU2 HIV-1 strains, at different concentrations with all purified W614A-3S Abs ($n = 16$; closed symbols, black curves) or WT-3S Abs (open symbols, red curves, purified from 5 WT-3S patients), as control. Neutralizing activities were performed in the TZM-bl assay with concentrations of purified Abs from 0.00001 to 100 μg/ml. Data expressed in median ± range. These data are representative of 3 independent experiments. C, Evolution of the viral neutralization efficiency of purified W614A-3S Abs from the 16 ALT patients against JR-CSF and YU-2 HIV-1 strains at years 1 and 5 after cohort entry. Data are expressed as the percentage of decreased RLU values at 1 μg/ml W614A-3S Abs, compared with the RLU detected in infected cells without Abs (control). Similar data were obtained with other HIV-1 strains (NL4.3, and NDK) (data not shown). The red curve corresponds to the results obtained in the presence of the same amount of purified non-neutralizing WT-3S Abs.

Table 2
Neutralizing activity of purified W614A-3S Abs from ALT patients.

Samples	Year	IC_{80} (μg/ml)										
		TZM-bl assay							TZM-bl/FcγRI assay		MDM assay	
		SF162	JR-CSF	YU-2	QH092	pCH058	pCH077	BaL	SF162	QH092	BaL	SF162
02.002	1	>5	3	>5	>5	>5	>5	>5	1.2	>5	0.1	>5
	2	0.3	1	5	3	3	2	3	<0.3	1	0.001	0.3
	5	0.3	0.3	1	3	3	2	3	<0.3	1.2	0.005	0.3
	8	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	5	>5	0.1	>5
	10	>5	>5	>5	>5	nd	nd	>5	5	>5	0.2	>5
04.034	1	5	3	>5	>5	>5	>5	>5	0.3	5	0.05	5
	2	0.5	1	5	4	5	3	5	<0.3	<0.3	0.005	0.5
	5	<0.3	<0.1	0.3	0.7	1	0.5	1	<0.3	0.3	0.008	<0.3
	10	0.3	<0.1	0.1	1	3	2	3	0.3	0.4	0.05	0.3
09.015	1	>5	5	>5	>5	nd	nd	>5	<0.3	0.3	0.1	5
	2	0.3	1	3	2	3	1	2	1	>5	0.08	0.3
	5	<0.3	<0.1	0.2	0.4	1.3	0.3	1	<0.3	0.7	0.05	<0.3
	10	0.3	1	5	3	4	1.2	2	<0.3	0.3	0.05	0.3
	12	>5	>5	>5	>5	nd	nd	>5	<0.3	0.6	0.03	>5
3S-WT		>10	>10	>10	>10	nd	nd	>5	>10	>10	>10	>10

A orange-color scale indicates ranges of values for maximal concentration needed to neutralise 80% of virus infection (IC_{80}). nd: not done

twice that against standard TZM-bl targets (Table 2), suggesting an Fc-mediated inhibitory activity against tier 1 (SF162) and tier 2 (QH092) HIV-1 viruses. A similar differential response was previously reported for two other anti-gp41 NAbs, 2F5 and 4E10, which recognize distinct epitopes within the membrane-proximal external region (MPER) (Perez et al., 2013). The capacity of W614A-3S Abs to inhibit the infection of monocyte-derived macrophages (MDMs) was next assessed to detect both neutralization and Fc-mediated functions (Holl et al., 2004). The different purified W614A-3S Abs produced very strong inhibitory titers against MDMs infected by the HIV-1-BaL and SF162 strains (Table 2), similar or higher to those observed with a reference panel of potent neutralizing mAbs (Table S2). Taken together, these data suggest that W614A-3S Abs mediate efficient polyfunctional neutralizing activities against different tier 1 and tier 2 HIV-1 strains in accordance with previous data obtained after W614A-3S immunization in mice (Petitdemange et al., 2013), and display Fc-mediated inhibitory functions.

In the absence of fresh memory B cells for these patients to perform a complete characterization of W614A-3S NAbs, we have analyzed their heavy chain complementary-determining region 3 (CDR-H3) motifs to provide insights in accordance with their functional capacities. As previously reported, many of the HIV-1 NAbs have long CDR-H3 sequences, especially those against the glycan-related V3 or the gp120/gp41 bridging regions, and the gp41-MPER motif. In general long CDR-H3 are found in <0.2% of antibody heavy chains (Yu and Guan, 2014). MS/MS analysis revealed between 3 and 9 fully sequences CDR-H3s for each antibody. Given the complexity and sequence homology of a polyclonal response, it is important to note that from W614A-3S and WT-3S polyclonal mixtures, we cannot exclude that only the most representative deduced amino acid CDR-H3 sequences were obtained. Table S3 shows that purified W614A-3S NAbs from 3 LTNP patients (#02.002, #04.034 and #09.015) have long CDR-H3 sequences (ranged between 22 and 29 residues), which is consistent with the length of control monoclonal NAbs (2F5, 10-1074, 10E8, and PGT-121). In contrast, the length of CDR-H3 sequences of the purified non-neutralizing WT-3S Abs from two patients (#02.011 and #04.061) was inferior to 15 residues. It seems that any dissimilarity in the amino acid sequence account in the neutralizing capacities of the tested Nabs from the 3 LTNP patients (#02.002, #04.034 and #09.015), as described (Xu and Davis, 2000).

3.2. W614A-3S Abs Display Neutralizing Activity That is Inversely Associated With Viral Load

A central question surrounding the relationship between NAb and clinical outcome remains to be determined. To assess this in the context of in LTNP patients, we looked at the impact of W614A-3S NAb on the viral load. Fig. 2A shows that the persistence of high W614A-3S NAb level in the "controller" (#04.034) is associated with strong control of the viral DNA, whereas the decreased neutralizing activity during the follow up, was observed in the two "viremic" patients (#02.002 and #09.015) with uncontrolled viral DNA. Similar profiles were obtained for RNA viral load (Fig. 2B).

In the entire cohort of LTNP patients, we next search for correlations between the presence of W614A-3S NAbs and viral features. As shown in Fig. 3A, viral DNA was significantly lower in W614A-3S$^+$ patients than in control group during the 5-year follow-up ($p < 0.001$). Concomitantly, the viral load was at least 2-log lower in patients with W614A-3S Abs than in the other groups ($p < 0.001$; Fig. 3B). At cohort enrollment, neutralizing activity of purified W614A-3S Abs was significantly and negatively correlated both with RNA viral load (YU-2: $r = -0.6986$; $p = 0.0026$), and viral DNA (YU2: $r = -0.8352$; $p < 0.0001$) (Fig. 3C). Similar data were obtained with JR-CSF, another tier-2 HIV-1 strain (Fig. 3C). In contrast, no statistical correlation was measured with purified WT-3S Abs (data not shown), but also with Abs against the T20 peptide, which contains the 2F5 neutralizing core epitope (Fig. S3) (Vieillard et al., 2006). These results show that patients with W614-3S NAbs can be distinguished from the other LTNPs at enrolment by their lower viral levels.

3.3. W614A-3S NAbs Correlate with High CD4$^+$ T-cell Responses

We then examined whether W614A-3S NAbs affect the T-cell compartment. Fig. 4A shows that the absolute CD4$^+$ T-cell count was significantly higher at enrollment in patients with WT- and/or W614A-3S Abs than in patients from the Neg group. This suggests that anti-3S (WT and W614A) Abs could play a positive effect on CD4$^+$ T cells, as previously observed in SHIV-infected macaques immunized with 3S peptide (Vieillard et al., 2008; Vieillard et al., 2012). After 5 years, the only patients whose CD4$^+$ T-cell counts increased were W614A-3S$^+$ (Fig.

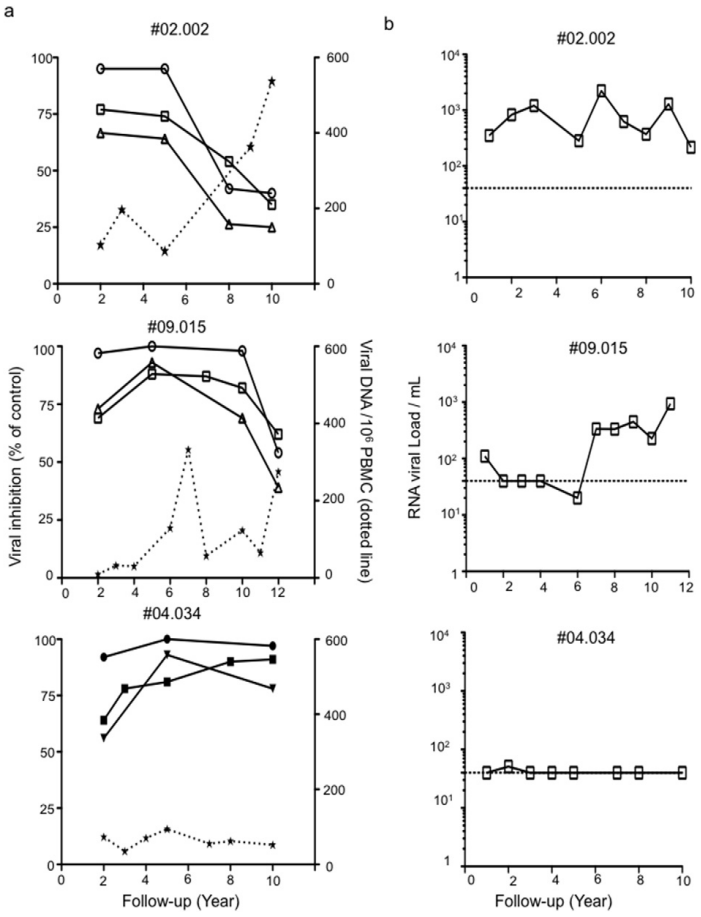


Fig. 2. Individual longitudinal neutralizing activity in LTNP patients (#02.002, #09.015 and #04.034) during the follow up. (A) Association between neutralizing activity and viral DNA (star and dotted line) in patients, who produced W614A-3S Abs. Neutralizing activities were assessed with purified Abs, using the TZM-bl assay with SF162 (tier 1, circle), YU-2 (tier 2, square) and QH092 (tier 2, triangle) clade B viruses. Data are expressed as the percentage of decreased RLU values at 1 μg/ml W614A-3S Abs, compared with the RLU detected in infected cells without Abs (control). Similar data were obtained with other HIV-1 strains (NL4.3, NDK, and JR-CSF) (data not shown). (B) Kinetics of RNA viral load evolution.

4A). The data for the percentage of $CD4^+$ T cells and CD4/CD8 T-cell ratios were similar (Fig. S4), whereas no difference were observed in patients producing anti-T20 Abs (Fig. S3). Notably, the level of W614A-3S NAbs was significantly correlated with $CD4^+$ T-cell counts at 1 ($r = 0.5764$; $p = 0.0154$), and even more at 5 years ($r = 0.7733$; $p = 0.0043$) after inclusion (Fig. 4B). Moreover, as shown in Table 1, markers of activation (HLA-DR and CD38) and differentiation (CD45Ra/Ro) on $CD4^+$ T cells were low in W614A-$3S^+$ patients, although not significantly different from the other two groups. By contrast, $CD8^+$ T cells from W614A-$3S^+$ patients expressed significantly lower levels of HLA-DR^+ ($p = 0.007$) and $CD38^+$ ($p = 0.03$) activation markers than cells from the other two groups (Table 1).

Finally, we evaluated $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cell responses in W614A-$3S^+$ patients. The frequency of Interferon (IFN)-γ-producing HIV-specific $CD8^+$ T cells was similar in all groups of patients (Fig. 5A). By contrast, the frequency of $CD4^+$ T-cell responders to HIV-p24 and different recall antigens tested, was higher in the group of W614A-$3S^+$ patients than in the other groups over time (Fig. 5B). This suggests that recall and HIV-specific $CD4^+$ T cell responses were specifically preserved in patients who produced W614A-$3S^+$ Abs.

4. Discussion

Here, we report that NAbs against the highly conserved 3S gp41 Env motif are more prevalent in LTNP HIV^+ patients than in HIV progressor patients (23.5% *vs* 4.7%) (Gallo et al., 2003), indicating that this motif is likely associated with a lack of disease progression. Furthermore, W614-3S NAbs were detected predominantly in patients with low levels of viral load and viral DNA and high $CD4^+$ T-cell counts and preserved T-cell function. The absence of effect mediated by anti-T20 Abs suggests that function associated with anti-W614A-3S NAb is certainly not a general property of NAbs, and support the hypothesis that W614A-3S NAbs provide immune benefits and may be associated with LTNP status. We can however not exclude that W614A-3S Abs develop preferentially under conditions of non-progression, such as high $CD4^+$ T cells and low viral load.

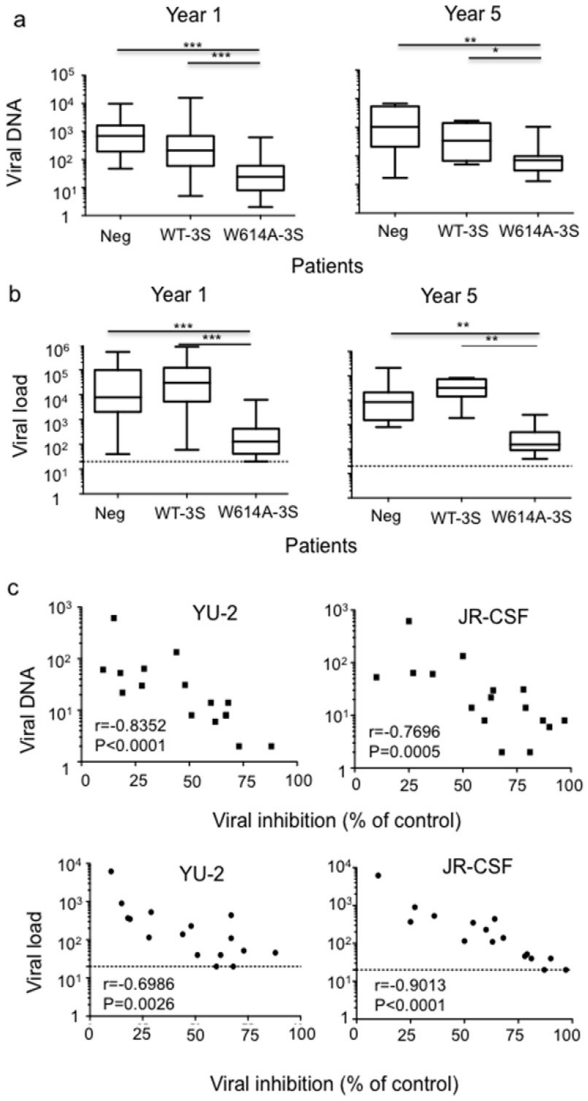


Fig. 3. Robust decrease in RNA viral load and viral DNA in LTNP patients producing W614A-3S NAbs. (A) Viral DNA in LTNP patients subdivided into three groups according to their capacity to produce W614A^{+}-3S NAbs, non-neutralizing WT-3S^{+} Ab only, or neither subtype (Neg). Data are done at years 1 and 5 after cohort entry. (B) RNA viral load in the different groups of LTNP patients at years 1 and 5 after cohort entry. (C) Correlations between RNA viral load, viral DNA and neutralizing activity of purified W614A-3S NAbs from the 16 ALT patients against JR-CSF and YU-2 HIV-1 strains at year 1 after cohort entry. Neutralizing activity was measured as the percentage of viral inhibition compared with the control. Dotted lines indicate the limit of detection of viral load.

NAbs occurring after initial infection with HIV-1 are generally not associated with any clinical or biological benefits. Doria-Rose et al. (2010) suggested that the limited breadth of neutralization observed in whole-serum samples from LTNP patients maybe attributable to low levels of antigenic stimulation due to their undetectable viral loads. Indeed, several studies have demonstrated that the development of NAbs is significantly associated with duration of infection and high viral load and that NAbs do not protect against HIV-1 disease progression, whereas Freund et al. (2017) have recently shown the coexistence of potent NAbs and antibody-sensitive viruses in a viremic controller. These findings were consistent with a model in which antigenic stimulation drives the breadth of the NAb response (Euler et al., 2010; Piantadosi et al., 2009). Such a model, however, is not supported by our data. Notably, previous studies examined neutralizing activities in whole-serum samples and not in samples specifically prepared from highly conserved motifs of Env. Interestingly, the neutralizing activity of W614A-3S-

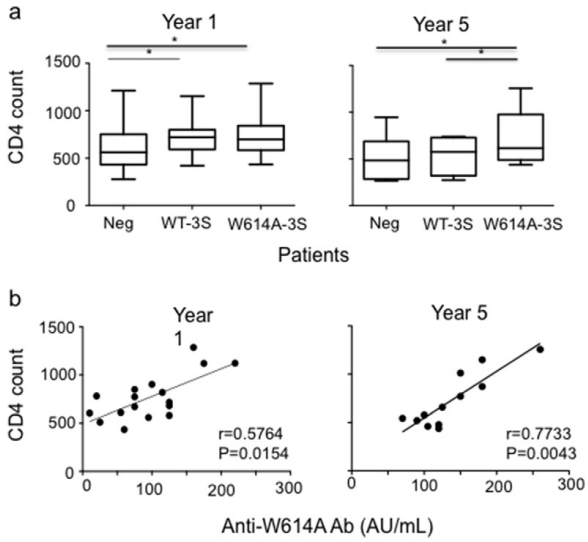


Fig. 4. W614A-3S NAbs are associated with high CD4$^+$ T-cell counts and continued ALT controller status. (A) CD4$^+$ T-cell counts in LTNP patients subdivided into three groups according to their capacity to produce W614A$^+$-3S NAbs, non-neutralizing WT-3S$^+$ Ab only, or neither subtype (Neg). Data are done at years 1 and 5 after cohort entry. (B) The positive correlation between CD4$^+$ T-cell counts and W614A-3S Abs titer at years 1 and 5 after cohort entry.

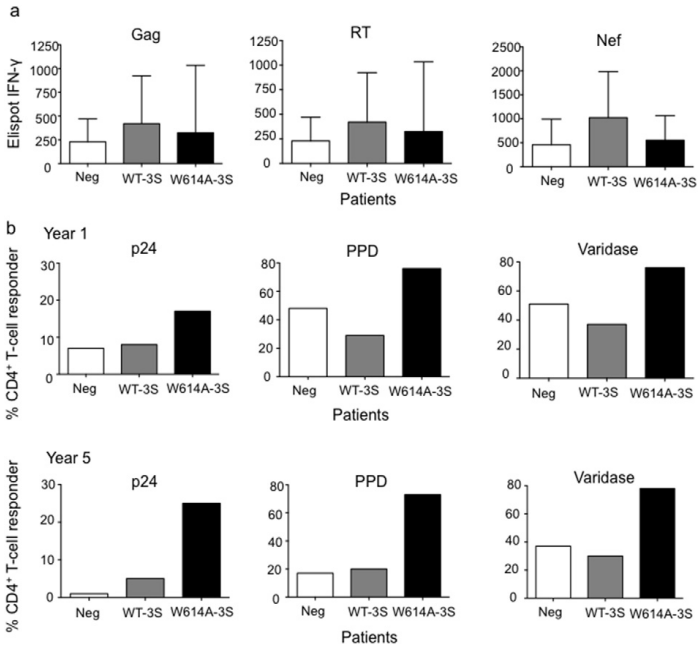


Fig. 5. CD4$^+$ and CD8$^+$ T-cell responses in patients producing neutralizing W614A-3S Abs. (A) CD8$^+$ T-cell responses to HIV 15-mer peptides covering Gag, RT, and Nef in ELISpot interferon-γ assays in counts in LTNP patients subdivided into three groups according to their capacity to produce W614A$^+$-3S NAbs, non-neutralizing WT-3S$^+$ Ab only, or neither subtype (Neg). Data are done at year 1 after cohort entry. Individual sums of positive responses to HIV peptide pools are shown. Results are expressed as spot-forming cells (SFCs)/10^6 PBMCs. The positive threshold was 50 SFCs/10^6 PBMCs. (B) CD4$^+$ T-cell responses to HIV p24 protein and recall antigens (tuberculin (PPD) and varidase) in a proliferation assay after ^{3}H–thymidine incorporation in the different patient groups at years 1 and 5 after cohort entry. A positive response was defined by data > 3000 cpm and a stimulation index > 3. Results are expressed as a percentage of CD4$^+$ T-cell responders.

specific Abs observed in the TZM-bl standard assay was greatly potentiated by targets expressing FcγRI, as previously observed for MPER-specific mAbs (Perez et al., 2009). The mechanism remains unclear, but our pre-positioning of the 3S motif at the cell surface, where it has been observed on the pre-fusion HIV envelope 3D structure (Fig. S1), may have facilitated its binding to FcγRI, thereby conferring a kinetic advantage for virus inhibition by W614A-3S Abs. Generally, this could be observed in Abs with epitopes exposed for at least a short time on an intermediate pre-fusion conformation of gp41 (Wyatt and Sodroski, 1998; Labrijn et al., 2003). FcγRI engagement may also stabilize a favorable orientation of Abs at the sterically constrained virus-cell interface to provide an additional kinetic advantage for a specific intermediate conformation of gp41. This will have to be investigated, however, this hypothesis is strengthened by the high conservation of the W614 position within the 3S motif of the gp41 in all LTNP tested (Table S1) (Potard et al., 2013), suggesting that W614A-3S Abs could recognize a "conformational intermediate epitope", mimic by the W614A-3S peptide. Thus, the generation of W614A-3S Abs is certainly not the result of mutated W614A-3S virus production, which are non-infectious (Petitdemange et al., 2013), but could be associated with an increased Ab binding and/or neutralizing breadth.

Although rare on $CD4^+$ lymphocytes, FcγRs are highly expressed by macrophages and dendritic cells, which are involved in the sexual transmission and early establishment of long-lived viral reservoirs[25]. We observed greater neutralizing activity in macrophages (MDMs) than in TZM-bl cells, as previously reported for HIV and SIV infections with MPER mAbs (Perez et al., 2013; Lederle et al., 2014; Su and Moog, 2014; Zhuge et al., 1997; Ruppach et al., 2000). Remarkably, the polyclonal neutralizing efficiency of W614A-3S NAbs against the BaL HIV strain in MDMs was highly potent, with levels similar to or higher than those observed with neutralizing mAbs. These polyfunctional capacities may be extremely useful for a prophylactic vaccine.

To date, most studies have analyzed NAbs cross-sectionally, and only a few have conducted long-term follow-up of neutralizing responses according to HIV-1 disease outcome (Cecilia et al., 1999; Chaillon et al., 2012). Here, we observed that the neutralizing activity of purified W614A-3S Abs increased in all LTNP patients at 5 years post-enrollment. As the purified W614A-3S Abs corresponded to a mixture of mAbs, as suggested by the variation in term of CDR-H3 motifs, it is tempting to speculate that affinity maturation leading to the selection for the most efficient NAbs occurred with time. Notably, W614A-3S Ab-mediated neutralizing activity was both inversely correlated with viral load and viral DNA, in accordance with the enhanced clearance of infected cells after passive transfer of NAbs in SHIV-infected macaques (Lu et al., 2016; Liu et al., 2016). Notably, W614A-3S Ab neutralizing activity decreased in LTNP patients with persistent viral loads, perhaps due to modifications of Ab/epitope recognition following viral escape mechanisms over time, as described (van Gils et al., 2010). Our results suggest that the durability of certain NAbs may be a major clue to the mechanisms of long-term non-progression. To date however, the mechanism to explain the presence of W614A-3S NAb remains unclear, we can however hypothesized that W614A-3S Abs recognized an "intermediate conformational epitope" within the highly conserved 3S motif of the gp41, which is mimic by the W614A-3S peptide. In accordance with the substantial conformational changes in gp41 used facilitate viral entry (Wyatt and Sodroski, 1998), we can supposed that this "intermediate conformational epitope" should be exposed for at least a short time on an intermediate pre-fusion conformation of gp41. A complete characterization of W614A-3S NAb could be very informative.

The decrease in Ab levels is undoubtedly caused by general deterioration of the immune response, which is well documented, not only in terms of decreased $CD4^+$ T-cell counts but also in proliferative responses (Imami et al., 2013; Lewis et al., 2014). Here, we sought to quantify and characterize peripheral $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cell populations that may be correlated with the neutralizing activity of W614A-3S Abs. As we previously reported, anti-3S Abs are clearly associated with higher $CD4^+$ T-cell counts and decreased cell activation (Vieillard et al., 2012; Petitdemange et al., 2013). Studies using animal models have established the importance of virus-specific $CD4^+$ T cells in the induction and maintenance of effective host immune responses (Migueles and Connors, 2015). In HIV-1 infection, several features of HIV-specific $CD4^+$ T cells, including proliferative capacity, surface phenotype, and secretion of multiple cytokines, are impaired in individuals with high plasma concentrations of HIV-1 RNA. However, cART can improve these features to resemble those observed in LTNP patients (Emu et al., 2005). Here, we demonstrated that $CD4^+$ T cells from LTNP patients producing W614A-3S NAbs improved their functional capacities such that they could specifically recognize antigens from both HIV itself and recall antigens. Simultaneously, viremia decreased significantly, as previously observed in patients with long-term AIDS-free infection (Carotenuto et al., 1998). $CD4^+$ T-cell responses to HIV antigens appear to be selectively impaired during high-level viremia and may be restored when HIV replication is controlled using therapy (McNeil et al., 2001; Lange et al., 2002). Conceivably, W614A-3S Abs participate in the protection of LTNP patients by continuous virological control, resulting in maintenance of $CD4^+$ T-cell count and function.

Evidence suggests that the frequency of broad $CD8^+$ T-cell responses is high in LTNP patients (Imami et al., 2013), as observed in the W614A-$3S^+$ and other patients in this study. However, W614A-$3S^+$ HIV-infected individuals had lower numbers of $CD8^+$ T cells, and these cells were less activated. Discordant expression of these activation markers has also been documented on HIV-specific cells of LTNP patients (Sáez-Cirión et al., 2007; Lécuroux et al., 2014). Notably, we observed that $CD8^+$ T-cell activation decreased over time in W614A-$3S^+$ patients due to their low viral load, as described (Imami et al., 2013; Wherry et al., 2003).

This study provides strong arguments that W614A-3S NAbs contribute to LTNP status, although, *in vivo* immunization or passive-transfer experiments with purified W614A-3S Ab in macaques will have to be investigated to determine their "protective" value. In addition to their putative role in a prophylactic vaccine strategy, we hypothesized that W614A-3S Ab, like other Nabs, could be also investigated as possible therapeutic agents in accordance with recent studies demonstrate that monoclonal Abs significantly reduced viremia in chronically infected macaques (Stephenson and Barouch, 2016), suggesting that such therapies might be effective in humans. Thus, a combination of conventional multi-hits antiretroviral therapy with NAbs therapy might be successful and could generate a strategy that may lead to an HIV cure. Future clinical approaches for inducing W614A-3S NAbs should be developed alone or in combination as steps toward both a functional cure by immunotherapy and prophylactic vaccines.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Author Contributions

O.L. and B.S. performed experiments, interpreted and analyzed data. V.P. performed statistical analysis. A.S., B.A., P.D. interpreted and analyzed data. C.M. designed assays, interpreted and analyzed data and edited the manuscript. V.V. designed assays, interpreted and analyzed data, wrote and edited the manuscript.

Acknowledgments

We thank all of the clinicians and patients who participated in the ANRS CO15 ALT study. Sequencing data of the 3S motif kindly provided by Prof H. Agut (Department of Virology, Pitié-Salpêtrière hospital, Paris, France) within the framework of the ALT study group. We kindly thank Dr. M. Pancera (Vaccine Research Center, NIAID) for the helpful analysis of the 3S motif in trimeric HIV Envelop structure. This work

was supported by the ANRS/HIVERA European ERA-net Program (#009/JTC 2013), and by the European Union's Horizon 2020 research and innovation program (EAVI2020, Agreement number 681137). O.L. was in part supported by InnaVirVax (Evry, France) (#IVV01/2015) and by SIDACTION (#10800/2016).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.07.007.

References

Amanna, I.J., Messaoudi, I., Slifka, M.K., 2008. Protective immunity following vaccination: how is it defined? Hum. Vaccin. 4, 316–319.

Barouch, D.H., Whitney, J.B., Moldt, B., Klein, F., Oliveira, T.Y., Liu, J., Stephenson, K.E., Chang, H.W., Shekhar, K., Gupta, S., Nkolola, J.P., Seaman, M.S., Smith, K.M., Borducchi, E.N., Cabral, C., Smith, J.Y., Blackmore, S., Sanisetty, S., Perry, J.R., Beck, M., Lewis, M.G., Rinaldi, W., Chakraborty, A.K., Poignard, P., Nussenzweig, M.C., Burton, D.R., 2013. Therapeutic efficacy of potent neutralizing HIV-1-specific monoclonal antibodies in SHIV-infected rhesus monkeys. Nature 503, 224–228.

Bradley, T., Trama, A., Tumba, N., Gray, E., Lu, X., Madani, N., Jahanbakhsh, F., Eaton, A., Xia, S.M., Parks, R., Lloyd, K.E., Sutherland, L.L., Scearce, R.M., Bowman, C.M., Barnett, S., Abdool-Karim, S.S., Boyd, S.D., Melillo, B., Smith 3rd, A.B., Sodroski, J., Kepler, T.B., Alam, S.M., Gao, F., Bonsignori, M., Liao, H.X., Moody, M.A., Montefiori, D., Santra, S., Morris, L., Haynes, B.F., 2016. Amino acid changes in the HIV-1 gp41 membrane proximal region control virus neutralization sensitivity. EBioMedicine 12, 196–207.

Candotti, D., Costagliola, D., Joberty, C., Bonduelle, O., Rouzioux, C., Autran, B., Agut, H., 1999. Status of long-term asymptomatic HIV-1 infection correlates with viral load but not with virus replication properties and cell tropism. French ALT study group. J. Med. Virol. 58, 256–263.

Carotenuto, P., Looij, D., Keldermans, L., de Wolf, F., Goudsmit, J., 1998. Neutralizing antibodies are positively associated with CD4+ T-cell counts and T-cell function in long-term AIDS-free infection. AIDS 12, 1591–1600.

Caskey, M., Klein, F., Lorenzi, J.C., Seaman, M.S., West Jr., A.P., Buckley, N., Kremer, G., Nogueira, L., Braunschweig, M., Scheid, J.F., Horwitz, J.A., Shimeliovich, I., Ben-Avraham, S., Witmer-Pack, M., Platten, M., Lehmann, C., Burke, L.A., Hawthorne, T., Gorelick, R.J., Walker, B.D., Keler, T., Gulick, R.M., Fätkenheuer, G., Schlesinger, S.J., Nussenzweig, M.C., 2015. Viraemia suppressed in HIV-1-infected humans by broadly neutralizing antibody 3BNC117. Nature 522, 487–491.

Cecilia, D., Kleeberger, C., Muñoz, A., Giorgi, J.V., Zolla-Pazner, S., 1999. A longitudinal study of neutralizing antibodies and disease progression in HIV-1-infected subjects. J. Infect. Dis. 179, 1365–1374.

Chaillon, A., Braibant, M., Hué, S., Bencharif, S., Enard, D., Moreau, A., Samri, A., Agut, H., Barin, F., 2012. Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) continues to evolve in presence of broadly neutralizing antibodies more than ten years after infection. PLoS One 7, e44163.

Cheung, W.C., Beausoleil, S.A., Zhang, X., Sato, S., Schieferl, S.M., Wieler, J.S., Beaudet, J.G., Ramenani, R.K., Popova, L., Comb, M.J., Rush, J., Polakiewicz, R.D., 2012. A proteomics approach for the identification and cloning of monoclonal antibodies from serum. Nat. Biotechnol. 30, 447–452.

Doria-Rose, N.A., Klein, R.M., Daniels, M.G., O'Dell, S., Nason, M., Lapedes, A., Bhattacharya, T., Migueles, S.A., Wyatt, R.T., Korber, B.T., Mascola, J.R., Connors, M., 2010. Breadth of human immunodeficiency virus-specific neutralizing activity in sera: clustering analysis and association with clinical variables. J. Virol. 84, 1631–1636.

Emu, B., Sinclair, E., Favre, D., Moretto, W.J., Hsue, P., Hoh, R., Martin, J.N., Nixon, D.F., McCune, J.M., Deeks, S.G., 2005. Phenotypic, functional, and kinetic parameters associated with apparent T-cell control of human immunodeficiency virus replication in individuals with and without antiretroviral treatment. J. Virol. 79, 14169–14178.

Euler, Z., van Gils, M.J., Bunnik, E.M., Phung, P., Schweighardt, B., Wrin, T., Schuitemaker, H., 2010. Cross-reactive neutralizing humoral immunity does not protect from HIV type 1 disease progression. J Infect Dis 201, 1045–1053.

Freund, N.T., Wang, H., Scharf, L., Nogueira, L., Horwitz, J.A., Bar-On, Y., Golijanin, J., Sievers, S.A., Sok, D., Cai, H., Cesar Lorenzi, J.C., Halper-Stromberg, A., Toth, I., Piechocka-Trocha, A., Gristick, H.B., van Gils, M.J., Sanders, R.W., Wang, L.X., Seaman, M.S., Burton, D.R., Gazumyan, A., Walker, B.D., West Jr., A.P., Bjorkman, P.J., Nussenzweig, M.C., 2017. Coexistence of potent HIV-1 broadly neutralizing antibodies and antibody-sensitive viruses in a viremic controller. Sci. Transl. Med. 9, eaal2144.

Gallo, S.A., Finnegan, C.M., Viard, M., Raviv, Y., Dimitrov, A., Rawat, S.S., Puri, A., Durell, S., Blumenthal, R., 2003. The HIV Env-mediated fusion reaction. Biochim. Biophys. Acta 1614, 36–50.

van Gils, M.J., Bunnik, E.M., Burger, J.A., Jacob, Y., Schweighardt, B., Wrin, T., Schuitemaker, H., 2010. Rapid escape from preserved cross-reactive neutralizing humoral immunity without loss of viral fitness in HIV-1-infected progressors and long-term nonprogressors. J. Virol. 84, 3576–3585.

Grabar, S., Selinger-Leneman, H., Abgrall, S., Pialoux, G., Weiss, L., Costagliola, D., 1999. Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French hospital database on HIV. AIDS 23, 1163–1169.

Heyndrickx, L., Heath, A., Sheik-Khalil, E., Alcami, J., Bongertz, V., Jansson, M., Malnati, M., Montefiori, D., Moog, C., Morris, L., Osmanov, S., Polonis, V., Ramaswamy, M., Sattentau, Q., Tolazzi, M., Schuitemaker, H., Willems, B., Wrin, T., Fenyö, E.M., Scarlatti, G., 2012. International network for comparison of HIV neutralization assays: the NeutNet report II. PLoS One 7, e36438.

Holl, V., Hemmerter, S., Burrer, R., Schmidt, S., Bohbot, A., Aubertin, A.M., Moog, C., 2004. Involvement of Fc gamma RI (CD64) in the mechanism of HIV-1 inhibition by polyclonal IgG purified from infected patients in cultured monocyte-derived macrophages. J. Immunol. 173, 6274–6283.

Holl, V., Peressin, M., Decoville, T., Schmidt, S., Zolla-Pazner, S., Aubertin, A.M., Moog, C., 2006. Nonneutralizing antibodies are able to inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages and immature dendritic cells. J. Virol. 80, 6177–6181.

Hraber, P., Seaman, M.S., Bailer, R.T., Mascola, J.R., Montefiori, D.C., Korber, B.T., 2014. Prevalence of broadly neutralizing antibody responses during chronic HIV-1 infection. AIDS 28, 163–169.

Imami, N., Westrop, S.J., Grageda, N., Herasimtschuk, A.A., 2013. Long-term non-progression and broad HIV-1-specific proliferative T-cell responses. Front. Immunol. 24, 58.

Labrijn, A.F., Poignard, P., Raja, A., Zwick, M.B., Delgado, K., Franti, M., Binley, J., Vivona, V., Grundner, C., Huang, C.C., Venturi, M., Petropoulos, C.J., Wrin, T., Dimitrov, D.S., Robinson, J., Kwong, P.D., Wyatt, R.T., Sodroski, J., Burton, D.R., 2003. Access of antibody molecules to the conserved coreceptor binding site on glycoprotein gp120 is sterically restricted on primary human immunodeficiency virus type 1. J. Virol. 77, 10557–10565.

Lange, C.G., Lederman, M.M., Madero, J.S., Medvik, K., Asaad, R., Pacheko, C., Carranza, C., Valdez, H., 2002. Impact of suppression of viral replication by highly active antiretroviral therapy on immune function and phenotype in chronic HIV-1 infection. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 30, 33–40.

Lécuroux, C., Sáez-Cirión, A., Girault, I., Versmisse, P., Boufassa, F., Avettand-Fenoël, V., Rouzioux, C., Meyer, L., Pancino, G., Lambotte, O., Sinet, M., Venet, A., 2014. Both HLA-B*57 and plasma HIV RNA levels contribute to the HIV-specific CD8+ T cell response in HIV controllers. J. Virol. 88, 176–187.

Lederle, A., Su, B., Holl, V., Penichon, J., Schmidt, S., Decoville, T., Laumond, G., Moog, C., 2014. Neutralizing antibodies inhibit HIV-1 infection of plasmacytoid dendritic cells by an FcγRIIa independent mechanism and do not diminish cytokines production. Sci Rep 4, 5845.

Lee, J.H., Ozorowski, G., Ward, A.B., 2016. Cryo-EM structure of a native, fully glycosylated, cleaved HIV-1 envelope trimer. Science 351, 1043–1048.

Lewis, G.K., DeVico, A.L., Gallo, R.C., 2014. Antibody persistence and T-cell balance: two key factors confronting HIV vaccine development. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111, 15614–15621.

Liu, J., Ghneim, K., Sok, D., Bosche, W.J., Li, Y., Chipriano, E., Berkemeier, B., Oswald, K., Borducchi, E., Cabral, C., Peter, L., Brinkman, A., Shetty, M., Jimenez, J., Mondesir, J., Lee, B., Giglio, P., Chandrashekar, A., Abbink, P., Colantonio, A., Gittens, C., Baker, C., Wagner, W., Lewis, M.G., Li, W., Sekaly, R.P., Lifson, J.D., Burton, D.R., Barouch, D.H., 2016. Antibody-mediated protection against SHIV challenge includes systemic clearance of distal virus. Science 353, 1045–1049.

Lu, C.L., Murakowski, D.K., Bournazos, S., Schoofs, T., Sarkar, D., Halper-Stromberg, A., Horwitz, J.A., Nogueira, L., Golijanin, J., Gazumyan, A., Ravetch, J.V., Caskey, M., Chakraborty, A.K., Nussenzweig, M.C., 2016. Enhanced clearance of HIV-1-infected cells by broadly neutralizing antibodies against HIV-1 in vivo. Science 352, 1001–1004.

Magierowska, M., Theodorou, I., Debré, P., Sanson, F., Autran, B., Rivière, Y., Charron, D., Costagliola, D., 1999. Combined genotypes of CCR5, CCR2, SDF1, and HLA genes can predict the long-term nonprogressor status in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. Blood 93, 936–941.

Martinez, V., Costagliola, D., Bonduelle, O., N'go, N., Schnuriger, A., Théodorou, I., Clauvel, J.P., Sicard, D., Agut, H., Debré, P., Rouzioux, C., Autran, B., Asymptomatiques à Long Terme Study Group, 2005. Combination of HIV-1-specific CD4 Th1 cell responses and IgG2 antibodies is the best predictor for persistence of long-term nonprogression. J Infect Dis 191, 2053–2063.

McNeil, A.C., Shupert, W.L., Iyasere, C.A., Hallahan, C.W., Mican, J.A., Davey Jr., R.T., Connors, M., 2001. High-level HIV-1 viremia suppresses viral antigen-specific CD4(+) T cell proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 13878–13883.

Migueles, S.A., Connors, M., 2015. Success and failure of the cellular immune response against HIV-1. Nat. Immunol. 16, 563–570.

Mikell, I., Sather, D.N., Kalams, S.A., Altfeld, M., Alter, G., Stamatatos, L., 2011. Characteristics of the earliest cross-neutralizing antibody response to HIV-1. PLoS Pathog. 7, e1001251.

Pancera, M., Zhou, T., Druz, A., Georgiev, I.S., Soto, C., Gorman, J., Huang, J., Acharya, P., Chuang, G.Y., Ofek, G., Stewart-Jones, G.B., Stuckey, J., Bailer, R.T., Joyce, M.G., Louder, M.K., Tumba, N., Yang, Y., Zhang, B., Cohen, M.S., Haynes, B.F., Mascola, J.R., Morris, L., Munro, J.B., Blanchard, S.C., Mothes, W., Connors, M., Kwong, P.D., 2014. Structure and immune recognition of trimeric pre-fusion HIV-1 Env. Nature 514, 455–461.

Perez, L.G., Costa, M.R., Todd, C.A., Haynes, B.F., Montefiori, D.C., 2009. Utilization of immunoglobulin G Fc receptors by human immunodeficiency virus type 1: a specific role for antibodies against the membrane-proximal external region of gp41. J. Virol. 83, 7397–7410.

Perez, L.G., Zolla-Pazner, S., Montefiori, D.C., 2013. Antibody-DEPENDENT, FcγRI-mediated neutralization of HIV-1 in TZM-bl cells occurs independently of phagocytosis. J. Virol. 87, 5287–5290.

Petitdemange, C., Achour, A., Dispinseri, S., Malet, I., Sennepin, A., Ho Tsong Fang, R., Crouzet, J., Marcelin, A.G., Calvez, V., Scarlatti, G., Debré, P., Vieillard, V., 2013. A single amino-acid change in a highly conserved motif of gp41 elicits HIV-1 neutralization and protects against CD4 depletion. Clin. Infect. Dis. 57, 745–755.

Piantadosi, A., Panteleeff, D., Blish, C.A., Baeten, J.M., Jaoko, W., McClelland, R.S., Overbaugh, J., 2009. Breadth of neutralizing antibody response to human immunodeficiency virus type 1 is affected by factors early in infection but does not influence disease progression. J. Virol. 83, 10269–10274.

Potard, V., Ait-Arkoub, Z., Agut, H., ALT ANRS CO15 Study Group, 2013. Polymorphism in gp41glycoprotein might influence the progression to disease in HIV-1 infection. AIDS 27, 1189–1191.

Ruppach, H., Nara, P., Raudonat, I., Elanjikal, Z., Rübsamen-Waigmann, H., Dietrich, U., 2000. Human immunodeficiency virus (HIV)-positive sera obtained shortly after seroconversion neutralize autologous HIV type 1 isolates on primary macrophages but not on lymphocytes. J. Virol. 74, 5403–5411.
Sadanand, S., Suscovich, T.J., Alter, G., 2016. Broadly neutralizing antibodies against HIV: new insights to inform vaccine design. Annu. Rev. Med. 67, 185–200.
Sáez-Cirión, A., Lacabaratz, C., Lambotte, O., Versmisse, P., Urrutia, A., Boufassa, F., Barré-Sinoussi, F., Delfraissy, J.F., Sinet, M., Pancino, G., Venet, A., Agence Nationale de Recherches sur le Sida EP36 HIV Controllers Study Group, 2007. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 6776–6781.
Stephenson, K.E., Barouch, D.H., 2016. Broadly neutralizing antibodies for HIV eradication. Curr. HIV/AIDS Rep. 13, 31–37.
Su, B., Moog, C., 2014. Which antibody functions are important for an HIV vaccine? Front. Immunol. 5, 289.
Vieillard, V., Strominger, J.L., Debré, P., 2005. NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 10981–10986.
Vieillard, V., Costagliola, D., Simon, A., Debré, P., French Asymptomatiques à Long Terme (ALT) Study Group, 2006. Specific adaptive humoral response against a gp41 motif inhibits CD4 T-cell sensitivity to NK lysis during HIV-1 infection. AIDS 20, 1795–1804.
Vieillard, V., Le Grand, R., Dausset, J., Debré, P., 2008. A vaccine strategy against AIDS: an HIV gp41 peptide immunization prevents NKp44L expression and CD4+ T cell depletion in SHIV-infected macaques. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 2100–2104.
Vieillard, V., Dereuddre-Bosquet, N., Mangeot-Méderlé, I., Le Grand, R., Debré, P., 2012. An HIVgp41 vaccine protects CD4 central memory T cells in SHIV-infected macaques. Vaccine 30, 6883–6891.
Vieillard, V., Gharakhanian, S., Lucar, O., Katlama, C., Launay, O., Autran, B., Ho Tsong Fang, R., Crouzet, J., Murphy, R.L., Debré, P., 2016. Perspectives for immunotherapy: which applications might achieve an HIV functional cure? Oncotarget 7, 38946–38958.
West Jr., A.P., Scharf, L., Scheid, J.F., Klein, F., Bjorkman, P.J., Nussenzweig, M.C., 2014. Structural insights on the role of antibodies in HIV-1 vaccine and therapy. Cell 156, 633–648.
Wherry, E.J., Teichgräber, V., Becker, T.C., Masopust, D., Kaech, S.M., Antia, R., von Andrian, U.H., Ahmed, R., 2003. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. Nat. Immunol. 4, 225–234.
Wine, Y., Boutz, D.R., Lavinder, J.J., Miklos, A.E., Hughes, R.A., Hoi, K.H., Jung, S.T., Horton, A.P., Murrin, E.M., Ellington, A.D., Marcotte, E.M., Georgiou, G., 2013. Molecular deconvolution of the monoclonal antibodies that comprise the polyclonal serum response. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 2993–2998.
Wyatt, R., Sodroski, J., 1998. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. Science 280, 1884–1888.
Xie, J., Lu, W., Samri, A., Schnuriger, A., da Silva, B.C., Blanc, C., Larsen, M., Theodorou, I., Rouzioux, C., Autran, B., ALT-ANRS-CO15 study group, 2010. Distinct differentiation profiles of HIV-Gag and Nef-specific central memory CD8+ T cells associated with HLA-B57/5801 and virus control. AIDS 24, 2323–2329.
Xu, J.L., Davis, M.M., 2000. Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. Immunity 13, 37–45.
Yu, L., Guan, Y., 2014. Immunologic basis for long HCDR3s in broadly neutralizing antibodies against HIV-1. Front. Immunol. 5, 250.
Zhuge, W., Jia, F., Adany, I., Narayan, O., Stephens, E.B., 1997. Plasmas from lymphocyte- and macrophage-tropic SIVmac-infected macaques have antibodies with a broader spectrum of virus neutralization activity in macrophage versus lymphocyte cultures. Virology 227, 24–33.

Lucar et al.

Supplemental Materials

Table S1. Sequencing of the 3S motif in Neg-, WT^{+}- and W614A^{+}-3S groups of LTNP samples

Sample #		gp41-3S motif sequencing				
		Year 1	Year 2	Year 3	Year 4	Year 5
Neg-3S group						
02.014		SWSNRS				
04.016		SWSNKS	SWSNKS			
04.023		SWSNKS	SWSNKS			
04.036	nd					
04.037						SWSNKS
04.048			SWSNKS			
04.050			SWSNKS			
04.052	nd					
04.055		SWSNKS				
04.062		SWSNKS				
04.068	nd					
04.071			SWSNKS			
04.075	nd					
05.012			SWSNRS			
06.006			SWSNKS			
06.011		SWSNKS				
07.002		SWSNKS				
09.013		SWSNKS				
09.016		SWSNKS				
11.005			SWSNKS			
11.012		SWSNKS				
11.016		SWSNKS				
11.021		SWSNKS				
11.023			SWSNKS			
WT^{+}-3S group						
02.011		SWSNKS	SWSNKS			
02.015		SWSNKS				
03.004			SWSNRS			
04.005		SWSNKS				
04.008					SWSNKS	
04.014		SWSNRS				
04.028		SWSNKS				
04.044				SWNNRS		
04.053		SWSNKS				
04.061			SWSNKS			
04.063		SWSNKS				
05.002	nd					
05.005		SWSNKS				
05.008		SWSNKS				
06.002	nd					
08.001	nd					
08.003	nd					
08.009			SWSNKS			
08.013		SWSNKS				
08.015	nd					
08.021		SWSNKS				
09.006						SWSNKT
10.001			SWSNKS			
11.003		SWSNKS				
11.007		SWSNKS				
11.008		SWSNKS	SWSNKS			
12.001			SWSNKN			
W614A^{+}-3S group						
02.002		SWSNKS	SWSNKS			
02.009			SWSNKS			
04.002					SWSNKS	
04.030		SWSNKS				SWSNKS
04.034					SWSNKS	
04.035		SWSNKS				
04.046					SWSNKS	
04.064			SWSNKS			SWSNKS
04.065				SWSNKS		
04.072	nd					
08.011			SWSNKS			
09.015	nd					
11.018			SWSNKS			
11.020		SWSNKS				
11.024	nd					
13.010				SWSNKS		

LTNP patients are subdivided into three groups according to their capacity to produce neutralizing W614A-3S Ab (W614A^{+}-3S), non-neutralizing WT-3S Abs (WT^{+}-3S), or neither subtype (Neg-3S). nd: not done; The position 614 is noted in red

2

Table S2. Neutralizing activity of potent human monoclonal antibodies

Samples	IC_{80} (µg/ml)				
	TZM-bl assay				MDM assay
	SF162	QH092	pCH058	pCH077	BaL
VRC01	1	5	nd	nd	0.005
VRC07	0.25	3	nd	nd	0.01
3BNC117	0.6	2	0.3	0.5	0.005
PG121	0.02	2	<0.3	20	0.004
447-52D	4	>20	nd	nd	0.04
2F5	4	5	nd	nd	0.005
2G12	4	5	nd	nd	0.2
IgG1b12	0.4	5	nd	nd	1
10-1074	nd	nd	0.3	20	nd
10-E8	nd	nd	3	5	nd

A orange-color scale indicates ranges of values for maximal concentration needed to neutralize 80% of virus infection (IC_{80}). nd: not done

3

Table S3. Deduced amino acid CDR-H3 sequences of purified W614A-3S Ab from LTNP patients

Candidats	CDR-H3 sequences	Size[§]
Monoclonal NAbs*		
10-1074	CATARRGQ--RIYGVVSFGE---FFYYYSMDVW	28
PGT121	CARTLHGR--RIYGIVAFNE---WFTYFYMDVW	28
2F5	CAHRRGPT--TLFGVPIAR-----GPVNAMDVW	26
10E8	CARTGKYYDF-WSGYPP--------GEEYFQDW	24
WT-3S Abs		
02.011a	C-R-G--YNDDF-T----------YI-DVW	14
02.011b	--RSG-Y--DDF----------VDMVW	12
02.011c	C-RS--Y--NDF----------ID-VW	11
02.011d	C-RT--YY-N-V----------I--VW	10
02.011e	--R-TGDYDNDF----------V-MDW	13
02.011f	C-R-GGD-TDDF----------ID--W	12
04.061-a	-TRSY--IVD-F----------FDVW	12
04.061-b	--RSI--YGD----------IV-DVW	11
04.061-c	CTR----SDD-Y----------IVD-VW	12
W614A-3S NAb		
02.002-a	-AHTTQSRY--SFGSNEGDLMTTLESQY--QDW	27
02.002-b	CAHTTQRY---SFGFIIGD-MTTLESQI--QDW	27
02.002-c	CAHTTQRY---SFGFNEGDLMTTLESGYPIQDW	29
04.034-a	CAHTTQRSSY------NEDIIMTLESGY--QDW	25
04.034-b	-AHTTQRY---SFGMTT------LE--S--DDW	19
04.034-c	--HTTQRS---SFGIIVDL-MTTLESGY--QDW	24
04.034-d	CAHT-QRY---SF----GD-MTTLESPY--QDW	22
09.015-a	CA-TTQRY---SF----GD-MTTLESGY--QDW	22
09.015-b	-AHTRTSF--GNE-----DLMMTL-IGY--QDW	22
09.015-c	CAHTQRSF--GYYGI-IVDLMT-LESPY--Q-W	25
09.015-d	-AHTQRS----YYG--IIDLMTTLESPY--DDW	22
09.015-e	C-HT-MLTT----------QQGIIESGYPEQDW	21
09.015-f	CAHTTQRG---YYGF--GDIIMT-LEGYPIQDW	26
09.015-g	--HTQRGY---F-GFIIDGDMTTLESGYPIQDW	27
09.015-h	CAHTTQRGYL-LYG-----FMTTLES-Y--DVW	24
09.015-i	-AATTQSSFFLLYGFIIGD-MT-LESGY--QDW	28

* Data from the broadly neutralizing antibodies electronic resource (bNaber; http://www.bnaber.org).
§ Size is expressed in number of amino-acid residues; Capital letters represent amino-acids and dashes represent gaps in the alignment. Alignment was assessed with Clustal Omega.

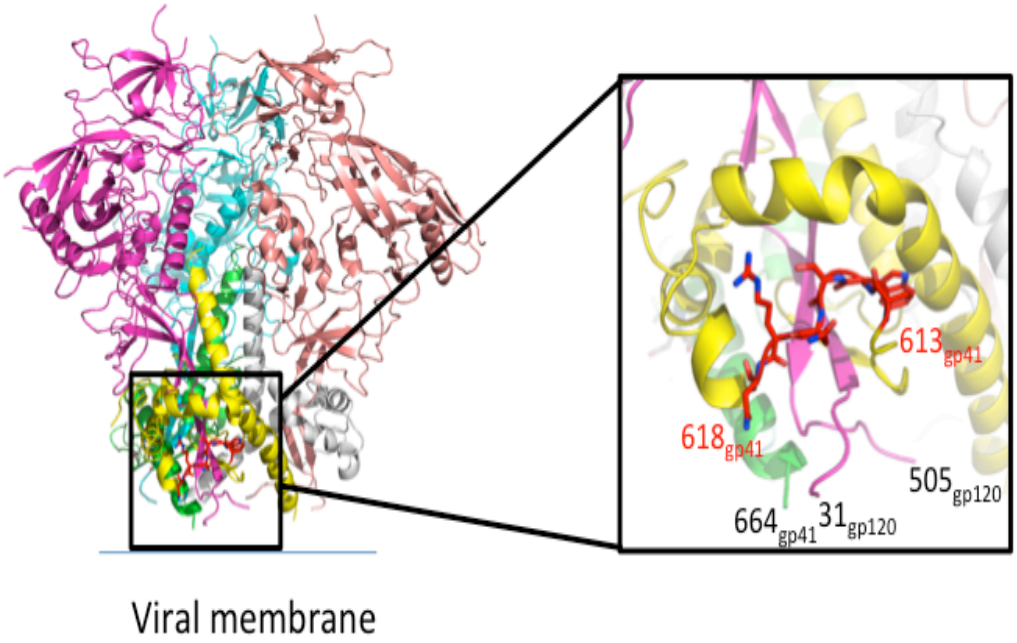


Figure S1. Residues 613-618 of the 3S motif form a membrane-proximal epitope on the pre-fusion closed structure of the HIV-Envelop spike. The 3S motif of gp41 (613-618) shown in red (right panel). Adapted from the crystal structure of the trimeric pre-fusion HIV-1 Env (Pancera et al., 2014).

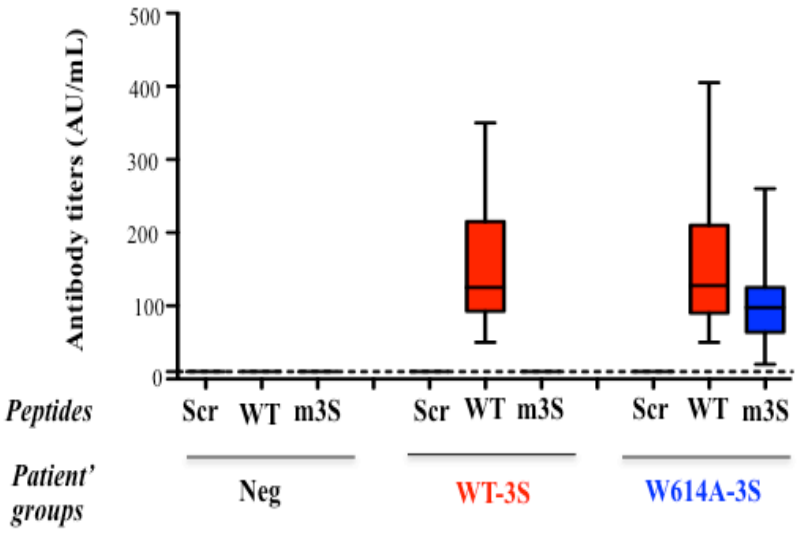


Figure S2. Subdivision of the 68 LTNP patients into three groups according to their capacity to produce neutralizing W614A-3S Abs, non-neutralizing WT-3S Abs only, or neither subtype (Neg). Plasma samples were titrated by ELISA with purified WT peptide (NH2-pwnasSWSNKSssleqiw-COOH) to quantify WT-3S Abs, with the m3S peptide to quantify W614A-3S Abs (NH2-pwnasSASNKSssleqiw-COOH), or a scramble peptide (Scr; NH2-pnsakwlwssiqsnswes-COOH) as control.

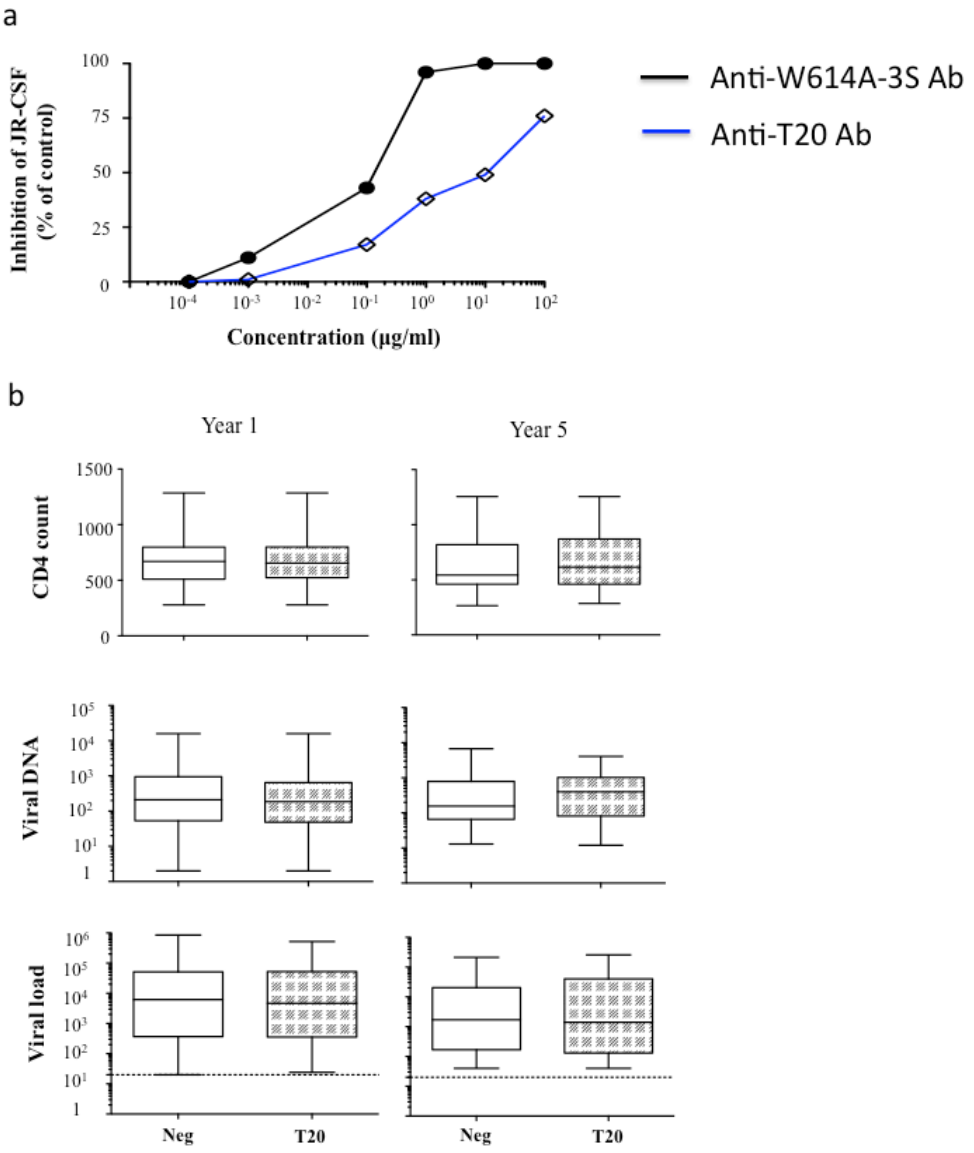


Figure S3. Neutralizing activity in the Absence of immunological and virological modulations in LTNP patients producing anti-T20 Abs (Vieillard et al., 2006). (A) Dose-response curves of neutralizing activity . Inhibition of infection by JR-CSF HIV-1 strain, at different concentrations with purified W614A-3S Abs (closed symbols, black curves) or T20 Abs (open symbols, blue curves) from LTNP patients. (B) CD4 count, viral DNA and RNA viral load in LTNP patients producing (T20, dashed whiskers) or not (Neg, open whiskers) anti-T20 Abs. Data are done at years 1 and 5 after cohort entry.

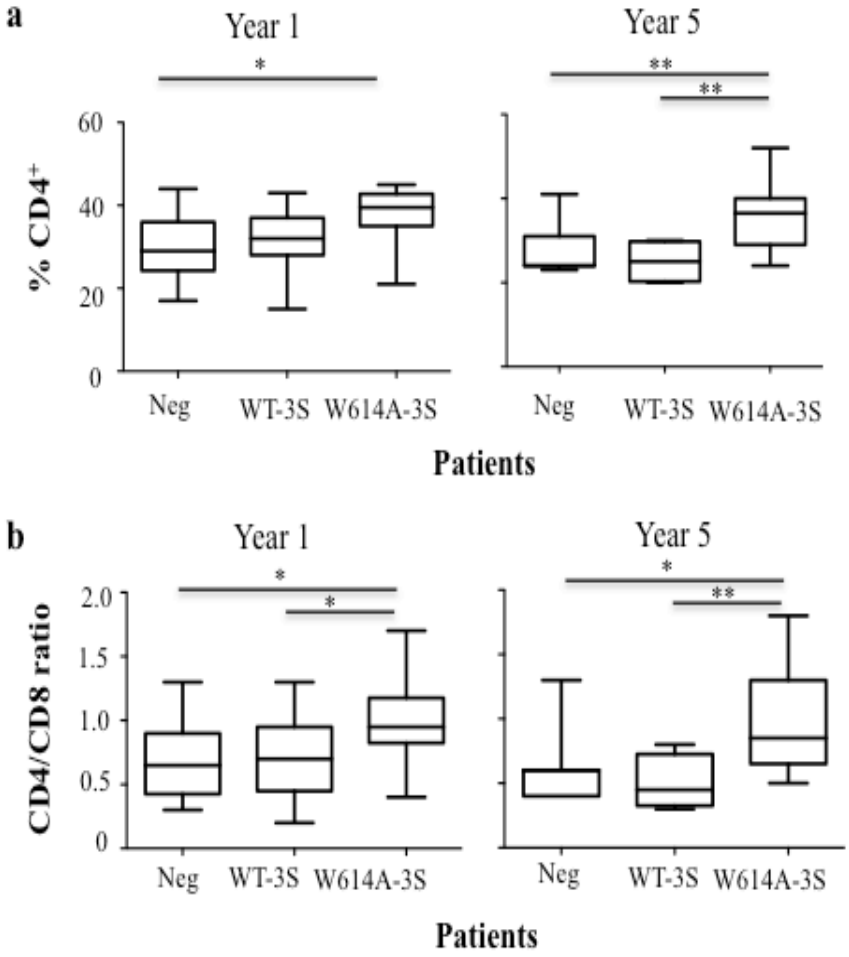


Figure S4. Frequency of $CD4^+$ T cells (A), and CD4/CD8 ratio (B) at years 1 and 5 after cohort entry, in three groups of patients according to their capacity to produce neutralizing W614A-3S Ab, non-neutralizing WT-3S Abs, or neither subtype (Neg).

Analyse et perspectives

Les résultats obtenus au cours de ce travail montrent que des AcNs W614A-3S sont présents dans 23,5% des sérums de patients de la cohorte LTNP. Il faut noter que la présence de ces AcNs est associée à la maintenance du statut LTNP sur une période de cinq ans contrairement à des patients qui ne produisent que des Ac anti-3S ou qui ne produisent aucun de ces deux types d'anticorps. Les AcNs W614A-3S exercent une forte activité neutralisante contre plusieurs souches de VIH-1 (avec une IC_{80} comprise entre <0,1 ug/mL et 3ug/mL selon les souches testées) qui augmente au cours du temps. Ces AcNs ont une activité neutralisante plus importante en présence de TZM-bl qui expriment des FcγRI suggérant que ces anticorps pourraient être polyfonctionnels. La présence d'AcNs W614A-3S est significativement associée à un contrôle de la charge virale et de l'ADN virale. Enfin, nous avons montré que les patients produisant ces AcNs maintiennent des niveaux élevés de LT $CD4^+$ qui ont conservé leur capacité à répondre à des antigènes de rappel mais également à des antigènes du VIH-1.

Précédemment, il avait été suggéré que des AcNs sont rarement observés chez des patients qui contrôlent l'infection (Doria-Rose et al., 2010), car leur génération est dépendante de la stimulation antigénique. Freund et al., ont cependant montré chez un EC, suivi pendant plusieurs années, l'émergence de puissants AcNs au cours du temps (Freund et al., 2017). Il est important de noter que les patients LTNP sélectionnés en fonction du niveau élevé de LT $CD4^+$ ne sont pas des patients EC car leur niveau de virémie peut varier au cours du temps. Les données que nous avons obtenues chez les patients LTNP suggèrent que les AcNs anti-W614-3S pourraient jouer un rôle important dans le contrôle de l'infection. Il est cependant important de noter que les patients LTNP représentent un groupe très restreint et très particulier de patients pour lesquels différents marqueurs génétiques, phénotypiques et fonctionnels avaient été mis en évidence. Nos données ne sont donc pas suffisantes pour démontrer que *in vivo* les AcNs anti-W614-3S jouent un rôle protecteur. Plusieurs stratégies peuvent être envisagées afin de déterminer le potentiel de ces anticorps. L'une de ces stratégies consisterait en des expériences d'immunisation passive dans un modèle animal infecté par le SVIH afin de confirmer leur activité protectrice contre l'infection. Cette stratégie nécessiterait l'obtention d'Ac monoclonaux (Acm), qui pourrait également permettre de réaliser une étude de leur structure. L'obtention de ces Acm peut par exemple s'effectuer

par un tri de LB mémoires avec un tétramère spécifique (comme montré par Scheid et al., 2009). Des essais préliminaires que nous avons réalisé à partir d'un nombre restreint de PBMC n'a pas permis d'isoler suffisamment de LB mémoire pour réaliser ce clonage.

Il est cependant important de noter que l'obtention d'AcNs anti-W614A-3S par simple immunisation dans différents modèles d'animaux laisse envisager qu'une stratégie vaccinale pourrait être envisagée. Mais si l'immunisation passive a de nombreuses applications, elle reste bien moins avantageuse et efficace que la vaccination par un simple peptide.

Projet 3b : Approche vaccinale par un vaccin peptidique induisant une réponse neutralisante dans différents modèles animaux

Introduction

Afin de confirmer les résultats obtenus chez la souris (Petitdemange et al., 2013), des immunisations avec le peptide W614A-3S ont été menés chez le lapin et le macaque. L'objectif était de déterminer la meilleure formule vaccinale pour induire une réponse neutralisante efficace. Le vaccin utilisé est composé du peptide W614A-3S couplé à une protéine porteuse (CRM pour Cross-Reacting Material). La CRM utilisée avec succès dans d'autres vaccins est un variant génétiquement modifié non toxique de la toxine diphtérique. Il a l'avantage de posséder plusieurs chaînes lysyl permettant une conjugaison avec plusieurs peptides (Pichichero, 2013). Le composé vaccinal qui a été développé est très similaire à celui qui a été utilisé dans les expériences avec le peptide 3S chez le macaque puis les études cliniques chez l'Homme **(Annexe 1)**. La première partie de notre étude a consisté à tester différentes formulations basées sur 5 adjuvants différents afin de rechercher celle qui permet d'obtenir une forte immunogénécité (titre d'anticorps spécifique contre le peptide W614A-3S) associée à une forte activité neutralisante :

- **IFA** (Incomplete Freund Adjuvant) : L'IFA est l'adjuvant qui avait été utilisé dans les expériences précédentes pour obtenir une réponse neutralisante. Il est cependant important de noter que son utilisation chez l'Homme est complétement prohibé. Dans nos différentes expériences, il a donc été utilisé comme contrôle positif. C'est une émulsion d'eau dans un mélange d'huile minérale qui permet une maintenance efficace de l'antigène (Apostólico et al., 2016; Aucouturier et al., 2002)
- **Montanide ISA 51 :** proche de l'IFA, il est utilisé dans des essais cliniques chez l'Homme. C'est un adjuvant composé d'émulsion d'eau dans de l'huile minérale qui est utilisé à un ratio de 50/50. Il est connu pour être bien toléré et va surtout induire une inflammation et le recrutement de CPA. Il permet d'induire un titre important d'anticorps ainsi que des réponse CTL spécifiques (Aucouturier et al., 2002).
- **Montanide ISA 720 :** c'est un adjuvant composé d'une émulsion d'eau dans de l'huile non minérale d'origine végétale qui est utilisé à un ratio 70/30. Sa réponse est

comparable au Montanide ISA 51 mais il est intéressant de noter qu'en combinaison avec du CpG, il induit une réponse cellulaire plus importante (Aucouturier et al., 2002).

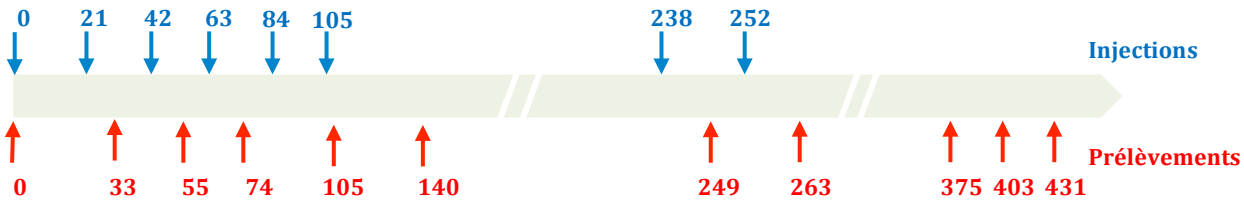
- **QS21 (*Quillaja saponaria* 21)** : Il provient de l'écorce d'un arbre du Chili (*Quillaja saponaria*) dont son composé moléculaire est nommé saponine. Il induit une forte réponse anticorps avec une production d'IgG1 et IgG2a et une réponse LT $CD8^+$. Son utilisation chez l'Homme est encore limitée dû à des effets secondaires importants. Une combinaison avec d'autres adjuvants semble réduire les effets indésirables (Wenbin Tuo, 2015)
- **Addavax** : C'est un adjuvant similaire au MF59 composé d'une émulsion d'huile, nommé squalène, dans de l'eau. Il est rapidement métabolisé, comparé à d'autres huiles. Son utilisation va induire une réponse immunitaire complète par le recrutement et l'activation de CPA et la stimulation de cytokines et chimiokines (O'Hagan et al., 2012).

Dans un second temps nous avons étudié différentes modifications de la séquence peptidique du motif 3S pour améliorer la qualité de la réponse AcNs. Une étude *in silico* par modélisation informatique a été utilisé pour étudier le lien entre la structure 3D du peptide 3S et de son mutant W614A-3S au sein de la gp41 en se basant sur les données 3D de l'enveloppe virale obtenues par le laboratoire de Peter Kwong (Pancera et al., 2014) par modélisation informatique. Notre hypothèse est que le peptide mutant W614A-3S reconnaît un état conformationnel particulier du motif 3S, se dévoilant lors du changement de conformation de la gp41 au cours de l'entrée virale. Cette hypothèse est basée sur les études de séquence de la gp41 des patients LTNP chez qui la séquence mutée en alanine du motif 3S n'a jamais été mise en évidence **(Projet 3a)**. Par cette approche, de nouveaux peptides mutants ont été obtenus *in silico* puis testés chez la souris afin de déterminer la capacité des anticorps générés à neutraliser le VIH-1.

Matériels & Méthodes

Schéma de vaccination

Les différentes combinaisons ont chacune été testées sur deux lapins par injection intramusculaire selon le schéma de vaccination suivant :



Par la suite 3 des combinaisons ont été testées sur des groupes de trois singes par injection intramusculaire selon le schéma de vaccination suivant :

Tests Elisa de quantification d'Ac anti-W614A-3S

Sur des plaques Maxisorp (Nunc) de 96 puits, le peptide W614A-3S a été coaté la nuit à 4°C à une concentration de 100 ng/puit. Les anticorps ont été purifiés à partir du sérum afin d'isoler les IgG totaux, comme décrit précédemment **(Projet 3a)**. Après avoir saturé la plaque avec du PBS/lait 3%, des dilutions au dixième des IgG purifiés ont été effectuées pour chaque sérum et en triplicat. Un anticorps anti-IgG de lapin ou de singe couplé à la biotine (Jackson ImmunoResearch) a été ajouté au 1000ème. La réaction enzymatique s'effectue avec de l'ExtrAvidin (Sigma) diluée au 2000ème puis avec du TMB (Sigma). La réaction est stoppée avec de l'acide sulfurique 3N. La lecture de la plaque est faite par un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 450 nm.

Test de neutralisation virale par dosage d'activité luciférase

Les cellules TZM-bl sont des cellules HeLa $CD4^+CCR5^+CXCR4^+$ qui possèdent un gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle d'un promoteur inductible par la protéine

virale Tat, permettant alors de mesurer l'infection du VIH-1. Sur une plaque de 96 puits, 100 000 cellules/mL ont été mises en cultures. Des dilutions au dixième des IgG purifiés ont été ajoutées en triplicat. Puis 500 000 pg/mL de différentes souches de VIH-1 (NL4.3, JR-CSF ou YU-2) ont été ajoutés dans chaque puit. 48h après l'infection, le surnageant a été prélevé pour effectuer la mesure de l'activité luciférase selon le protocole du kit Britelite glow (PerkinElmer). La quantité de luciférase produite est mesurée par luminomètre (Promega).

Modélisation des mutants de 3S

PEP-FOLD 2011 est le logiciel utilisé pour modéliser la structure tertiaire des peptides 3S et son mutant. Le logiciel utilise des séquences primaires de 9 aa minimum. La séquence 3S WT de 9 aa utilisée est : TSWSNKSLN et la séquence W614A-3S est : TSASNKSLN. Chaque acide aminé a été substitué avec chacun des 20 acides aminés possibles afin de prédire leur structure 3D par le logiciel. Les conformations les plus adaptés ont été synthétisées par Covalab et utilisées pour immuniser les souris comme décrit précédemment (Petitdemange et al., 2013).

Résultats

Immunisation de lapin avec cinq formulations vaccinales différentes contenant le peptide W614A-3S (En collaboration avec l'équipe de B. Combadière, CIMI-Paris)

Deux lapins par groupe ont été vaccinés par chacune des combinaisons vaccinales W614A-3S. Plusieurs prélèvements ont été effectués. Les IgG polyclonaux ont été purifiés par colonne et quantifié par ELISA à différents temps.

Titre d'IgG anti-W614A-3S (AU/ml)

JOUR	105	140	249	263
AddaVax	4 101	3 642	2 598	9 273
	2 043	1 152	3 154	4 228
IFA	241 562	227 439	58 152	55 565
	115 329	163 763	41 975	42 147
ISA 51	50 086	98 389	11 411	40 103
	23 225	25 736	5 423	15 563
ISA 720	42 562	49 365	9 488	27 434
	74 001	64 710	15 479	44 028
QS-21	1 697	4 350	6 777	3 929
	3 724	4 435	3 540	3 553

Tableau 1 : Titre d'IgG anti-W614A-3S (AU/ml) : Le titre d'IgG anti-W614A-3S induit par chacun des vaccins dans le lapin a été quantifié par ELISA à plusieurs temps après la première injection

Ces données montrent que tous les vaccins induisent une production d'IgG contre le peptide W614A-3S. Le titre d'IgG anti-W614A-3S est cependant très variable entre les différents adjuvants. En effet l'IFA induit un titre très élevé après les six premières injections (J105 et J140) tandis que le QS-21 induit un titre très faible comparable à l'AddaVax. Les deux Montanides induisent tous les deux des titres intermédiaires. Après deux nouvelles injections à J238 et J252, on observe une diminution du titre sauf pour le QS-21 et l'AddaVax qui restent stables **(Tableau 1)**.

Le **tableau 2** donne les résultats des tests d'activités neutralisantes contre trois souches de VIH-1. Ainsi, l'AddaVax et le Montanide ISA 51 n'induisent pas de réponse neutralisante. En revanche, une vaccination avec le QS-21 permet d'induire des AcNs contre les trois souches entre J105 et J140. Il est également important de noter que le potentiel neutralisant augmente au cours du temps, jusqu'à atteindre une IC_{50} (concentration suffisante pour neutraliser 50% de l'infection) d'environ 1µg/mL à J403. Les deux autres adjuvants : IFA et Montanide ISA 720 induisent des AcNs contre les trois souches entre J249 et J263. On peut

alors supposer que les trois adjuvants sont capables d'induire une réponse neutralisante mais que le QS-21 semble être plus efficace **(Tableau 2)**.

IC_{50} (ug/mL)

Adjuvant	D105			D140			D249			D263			D403		
	NL4.3	JR-CSF	YU-2	NL4.3	JR-CSF	YU-2	NL4.3	JR-CSF	YU-2	NL4.3	JR-CSF	YU-2	NL4.3	JR-CSF	YU-2
AddaVax	>20	nd	nd	>20	nd	nd	>20	nd	nd	>20	nd	nd	nd	nd	nd
AddaVax	>20	nd	nd	>20	nd	nd	>20	nd	nd	>20	nd	nd	nd	nd	nd
IFA	11,3	17,9	>20	7,5	15,6	>20	2,5	11,6	19,6	**<1**	**4,9**	**9,9**	nd	**2,9**	nd
IFA	9,9	16,0	>20	9,9	17,3	>20	3,9	14,3	>20	**1,0**	**7,6**	**15,6**	nd	**4,3**	nd
ISA51	>20	nd	nd	>20	nd	nd	>20	nd	nd	>20	nd	nd	nd	nd	nd
ISA51	>20	nd	nd	>20	nd	nd	>20	nd	nd	>20	nd	nd	nd	nd	nd
ISA720	19,4	>20	>20	14,7	>20	>20	7,7	15,9	>20	**2,5**	**10,8**	**17,9**	nd	**12,1**	nd
ISA720	17,6	>20	>20	15,0	>20	>20	5,4	14,8	>20	**4,4**	**15,6**	>20	nd	**10,8**	nd
QS-21	5,2	12,6	>20	3,3	11,6	17,3	**1,3**	**8,7**	**13,6**	**<1**	**5,3**	**9,3**	nd	**1,3**	nd
QS-21	7,7	15,3	>20	4,9	12,0	19,5	**<1**	**3,3**	**6,2**	**<1**	**2,7**	**5,6**	nd	**1,2**	nd

Tableau 2 : Test TZM-bl de neutralisation de souches VIH-1 (NL4.3, JR-CSF et YU-2) par des IgG polyclonaux anti-W614A-3S (IC_{50} ug/ml) prélevés à différents temps

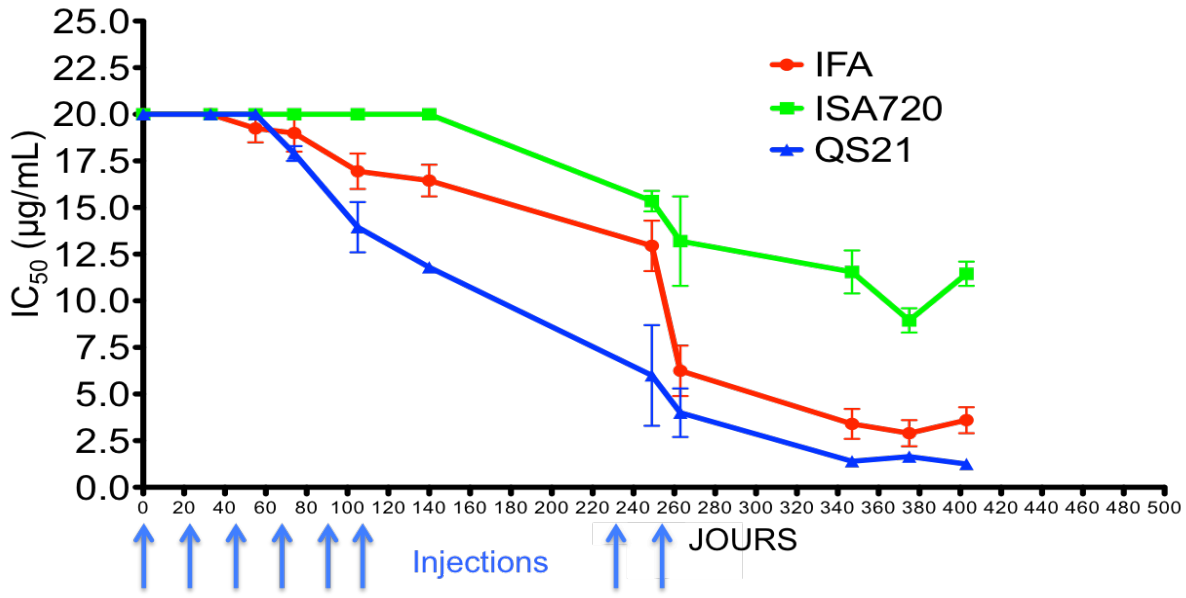


Figure 1 : Evolution de l'IC50 neutralisante au cours du temps en fonction de l'adjuvant dans un système TZM-bl en présence de la souche virale JR-CSF du VIH-1

La **figure 1** montre l'évolution de l'IC_{50} des AcNs induit par chacun des trois adjuvants au cours du temps. Il est intéressant de noter que le pouvoir neutralisant des IgG induit par le QS-21 augmente constamment au cours du temps après les six premières injections. En effet l'IC_{50} passe de 13,5ug/mL à J105 à 6ug/mL à J249, meilleure que celle obtenue avec le contrôle positif IFA. En revanche, en présence de Montanide ISA 720 une réponse neutralisante efficace n'est obtenue qu'après les deux dernières injections. En résumé, pour obtenir une réponse neutralisante efficace, l'IFA pourrait être remplacé par le QS-21 ; il est cependant important de noter que le titre en anticorps généré avec le QS21 est inférieur par rapport à l'IFA, ce qui empêche son utilisation potentielle.

Immunisation de singe cynomolgus avec trois formulations vaccinales différentes contenant le peptide W614A-3S

Afin de valider les résultats obtenus dans le modèle de lapin, une étude chez le macaque a été réalisée. Dans cette étude, trois singes par groupes ont été immunisés en présence d'IFA, Montanide ISA 720 et ISA 51.

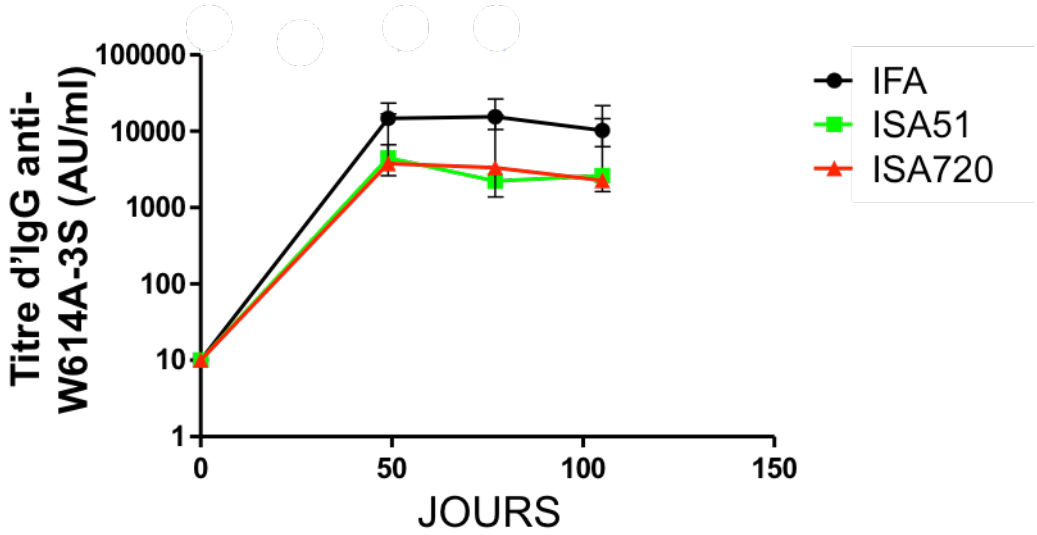


Figure 2 : Titre d'IgG anti-W614A-3S (AU/ml) : Le titre d'IgG anti-W614A-3S induit par chacun des vaccins a été quantifié par ELISA à plusieurs temps.

On observe que les trois préparations vaccinales induisent des IgG anti-W614A-3S mais qu'en présence d'IFA, le titre est plus important comme observé chez le lapin. Ce titre est maintenu à un plateau malgré la 4ème injection **(Figure 2)**. En ce qui concerne la neutralisation, un début de réponse neutralisante apparaît avec l'IFA entre J49 et J77, correspondant à la 3ème injection. Le pouvoir neutralisant semble augmenter au cours du

temps (J105 et J215). Il est à noter que seul un singe a pu être booster avec une 5ème injection, car les deux autres animaux ont développé des abcès froids (effet secondaire du vaccin). En ce qui concerne le Montanide ISA 51, aucune activité neutralisante n'a été observée, confirmant les résultats obtenus dans le modèle lapin ; les injections ont donc été arrêtées après le prélèvement à J105. Enfin, en présence d'ISA 720 aucun effet significatif n'a été observé chez le singe **(Figure 3)**.

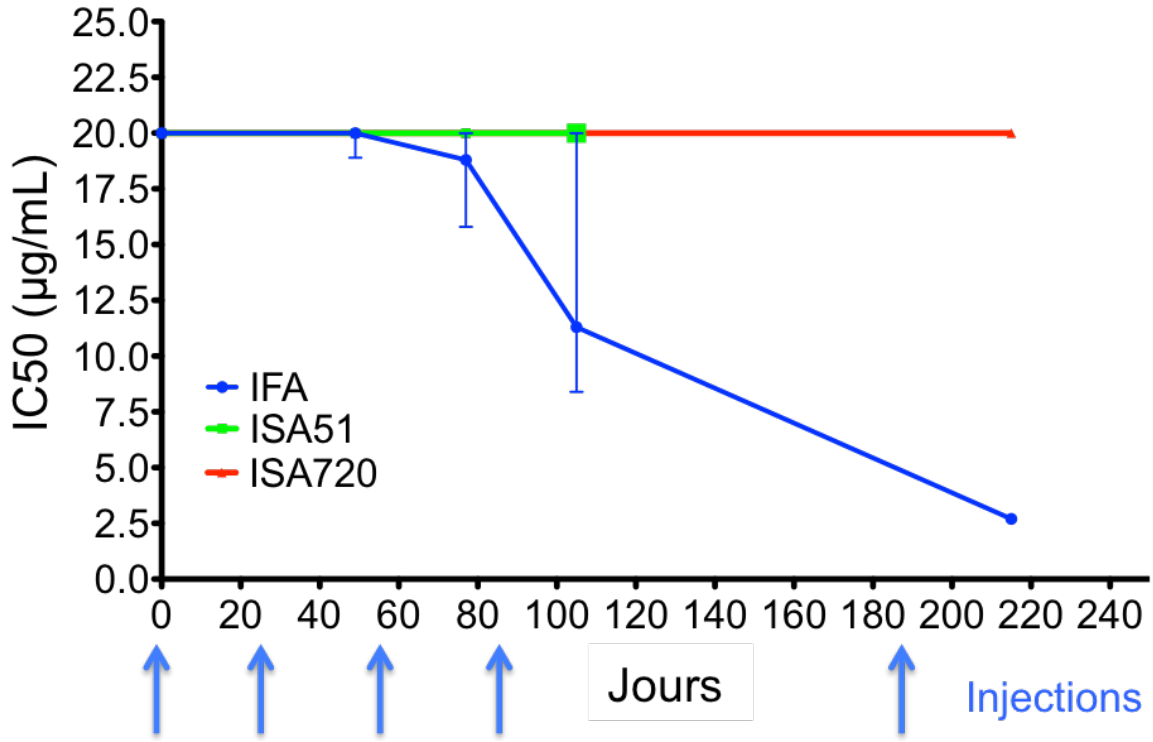


Figure 3 : Evolution de l'IC_{50} neutralisante au cours du temps en fonction des préparations vaccinales injectées au macaque dans un système TZM-bl en présence de la souche virale JR-CSF du VIH-1

Ces différentes évaluations confirment les résultats obtenus précédemment chez la souris et montrent clairement qu'il est possible dans différents modèles animaux d'induire des AcNs reconnaissant le peptide W614A-3S. Ces nouvelles données montrent également que l'immunogénécité et la réponse neutralisante est dépendante de l'adjuvant utilisé. L'IFA reste le meilleur adjuvant pour obtenir un titre élevé en anticorps et une réponse neutralisante. Parmi les autres adjuvants testés qui sont potentiellement utilisable chez l'homme, seul le QS-21 permet d'obtenir une réponse neutralisante importante, mais le titre faible en anticorps qu'il génère bloque son utilisation.

Modélisation informatique de peptides inducteurs d'AcNs (En collaboration avec N. Pietrancosta, Paris Descartes)

À ce stade différentes possibilités peuvent être explorées. La première consiste à changer les doses utilisées et/ou le schéma d'immunisation, ou encore à tester des combinaisons d'adjuvants. Une autre approche pour améliorer la génération d'AcNs est de modifier la séquence peptidique. En effet, l'ensemble de nos données suggère que la modification du résidu tryptophane en alanine du motif 3S change l'exposition du motif, le rendant beaucoup plus accessible, ce qui pourrait expliquer la génération d'AcNs. Les structures *in silico* des motifs 3S et de W614A-3S étudiées avec le logiciel Pep-Fold montrent aussi que le motif 3S sauvage à une structure en hélice (Figure 4A) alors que le peptide muté en tryptophane (W614A-3S) à une structure plus étendue avec des acides aminés (AA) plus exposés (Figure 4B). Ce dernier se rapproche de la structure cristallographique du motif 3S présent naturellement dans la structure du trimère de l'enveloppe virale décrite par M. Pancera et al (2014). En prenant en compte ces données, nous avons cherché à améliorer l'efficacité du motif peptidique en jouant sur l'accessibilité de ces résidus

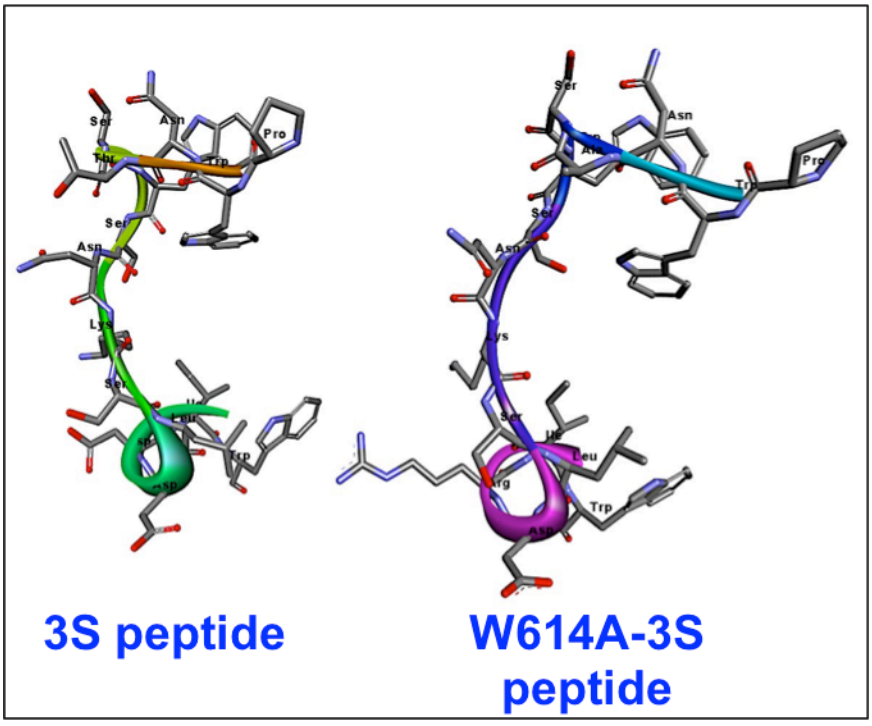


Figure 4 : Modélisation du (A) peptide 3S sauvage et (B) du peptide W614A-3S

Par modélisation, trois nouveaux peptides ont été obtenus puis synthétisés. Ils présentent des doubles mutations afin de mieux mimer la structure tridimensionnelle du peptide **(Figure 5)**

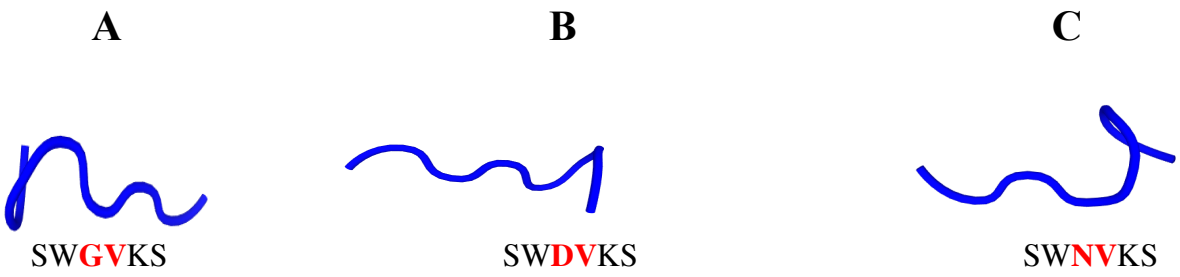


Figure 5 : Modélisation du (A) peptide mutant 1 (SWGVKS), (B) du peptide mutant 2 (SWDVKS) et (C) du peptide mutant 3 (SWNVKS)

Ces trois mutants ont été mutés sur les AA en positions 3 et 4 pour produire les structures les plus étendues avec la présence d'AA plus exposés.

- A la position 3 : G, D et N (AA polaires) remplacent S (AA hydrophile). Les AA hydrophiles ont tendance à se disposer à la périphérie en contact avec les molécules d'eau.
- A la position 4 : V (un AA hydrophobe) remplace N (AA hydrophile) dans tous les mutants. V contribue à la structure tertiaire et quaternaire des protéines.

La valine (V) permet de contraindre les peptides mutants à adopter une conformation plus allongée. L'effet des AA hydrophiles contribuerait aussi à la structure plus étendue.

Immunisation de souris avec des formulations vaccinales contenant chacun des peptides mutants obtenus par modélisation

Ces peptides synthétisés ont été couplés à une molécule porteuse, le KLH, afin d'immuniser des souris en présence d'IFA, selon un protocole standard de vaccination (immunisation tous les 14 jours pendant 5 semaines) décrit précédemment (Petitdemange et al., 2013). Chaque groupe de souris (composé de 3 souris) a été immunisé avec le peptide W614A-3S (contrôle positif), le mutant 1, 2 ou 3. La production d'anticorps a été quantifiée à différents temps par un test ELISA, comme utilisé précédemment. La **figure 6** montre qu'après immunisation par un peptide W614A-3S l'induction d'un titre élevé en anticorps (dilution au 1000ème). En présence des peptides mutants 1 et 2 des IgG sont induits, mais les titres sont plus faibles qu'avec le contrôle positif. Enfin le peptide mutant 3 induit seulement des IgG anti-W614A-3S dans une souris **(Figure 6)**.

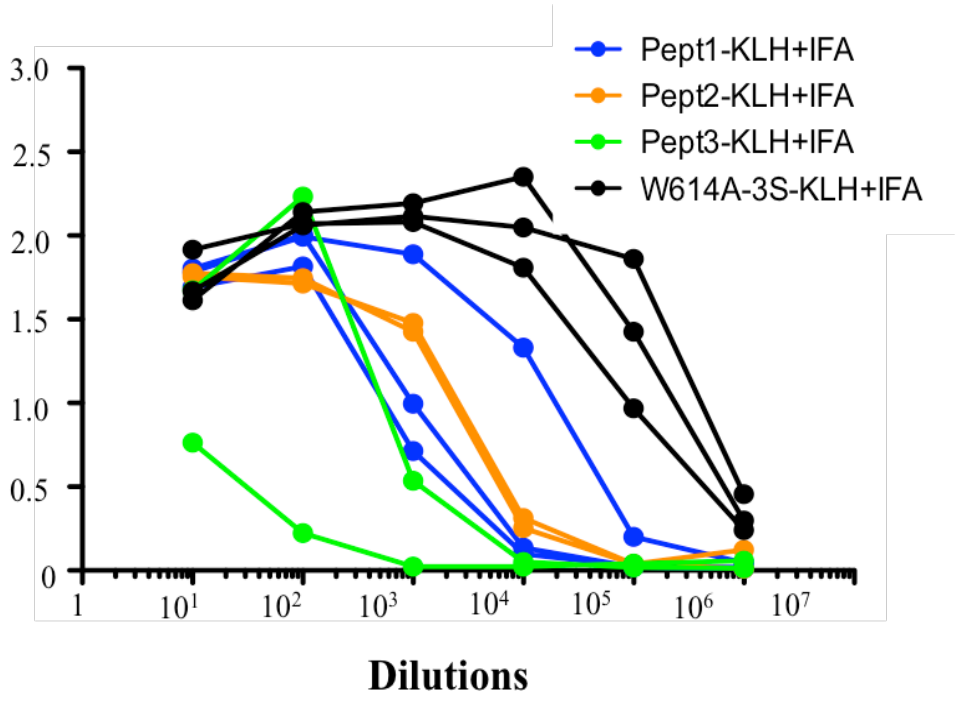


Figure 6 : Mesure du titre d'IgG anti W614A-3S après vaccination à J68 : Dilutions successives au 10ème afin de déterminer le titre d'anticorps anti-W614A-3S après différentes préparations vaccinales

Le pouvoir neutralisant de ces anticorps a été évalué **(Figure 7)** en utilisant le système standard TZM-bl en présence de la souche virale JR-CSF. On observe que le mutant 1 ne produit pas d'AcNs, alors que le mutant 3 produit des Ac facilitants. Enfin, le mutant 2 produit des AcNs qui présentent un niveau de neutralisation comparable à des anti-W614A-3S.

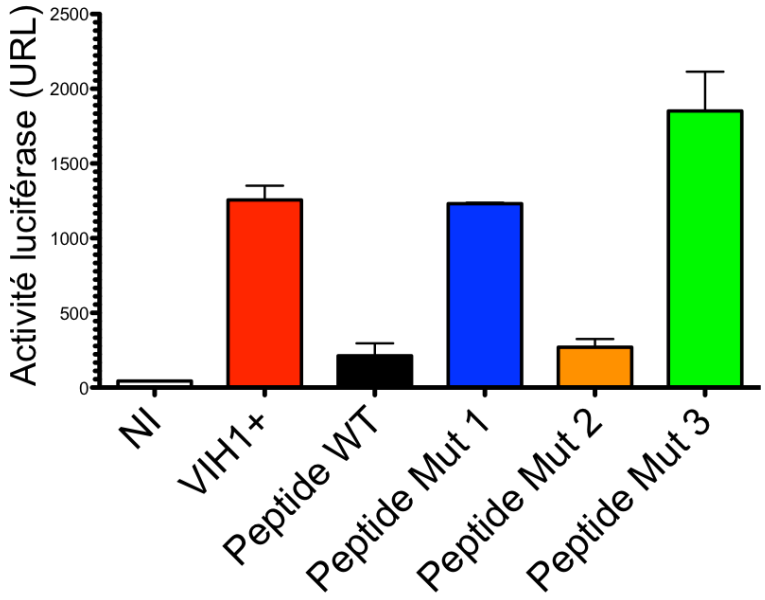


Figure 7 : Mesure de l'activité luciférase des cellules TZM-bl en présence d'IgG anti-W614A-3S et de VIH-1 JR-CSF à J68 : Les cellules TZM-bl sont pré-incubées avec une dilution au 100ème d'IgG polyclonaux anti-W614A-3S provenant des souris immunisées par chacun des peptides puis le virus est ajouté à la même concentration pour chaque condition.

Ces expériences à partir de peptides modélisés *in silico* semblent ne pas valider notre hypothèse selon laquelle une meilleure exposition des AA pourrait améliorer le pouvoir neutralisant des Ac. En effet pour trois peptides différents, on observe trois réactions différentes. Il est intéressant de noter que la différence entre le peptide 2 et 3 est localisé sur un seul AA : respectivement l'acide aspartique (D) qui a groupe hydroxyle (-OH) et l'asparagine (N) qui a un groupe amine (-NH2). Cette particularité doit être approfondie, car cette position au sein du motif 3S pourrait être critique pour la génération d'AcNs. De plus, nous pouvons également suggérer que les résultats obtenus pourraient dépendre de l'adjuvant qui pourrait modifier la conformation et la présentation du peptide.

Afin de confirmer ces données, nous avons modélisé puis synthétisé de nouveaux peptides mutés qui possèdent la mutation de départ W614A associée à la nouvelle mutation précédemment décrites S615D (peptide mutant 4). Deux autres peptides W614A et S615E (peptide mutant 5) ou S615K (peptide mutant 6) ont été synthétisés car ces les AA E et K ont des propriétés physico-chimiques proche de D. Comme précédemment, trois souris par groupe ont été immunisées avec chacun des peptides couplés au KLH en présence d'IFA. Les mesures par ELISA du titre d'anticorps sont similaires pour le contrôle positif et pour le peptide 4 (2 souris sur 3). En revanche le titre d'IgG pour le peptide 5 est plus faible (2 souris sur 3) et celui pour le peptide 6 est pratiquement indétectable **(Figure 8)**.

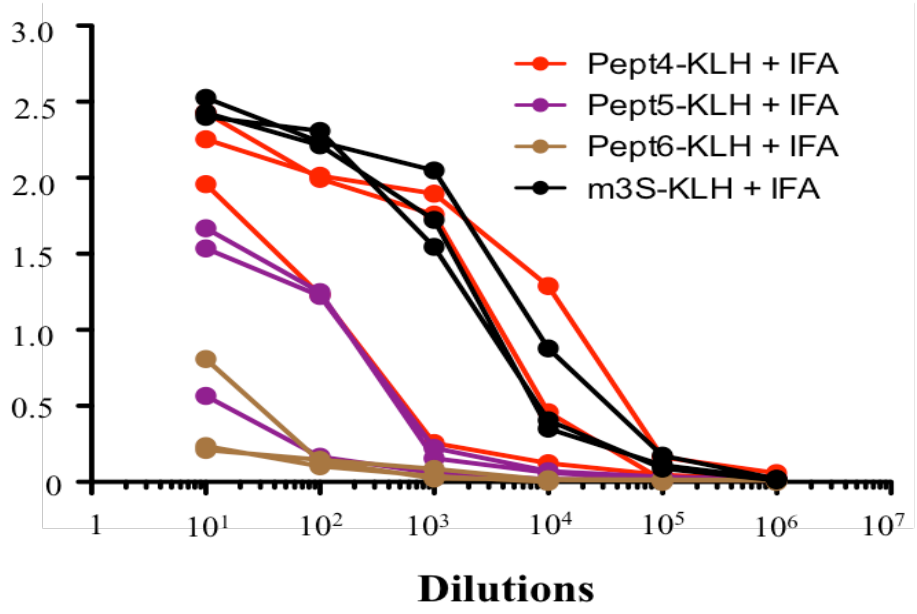
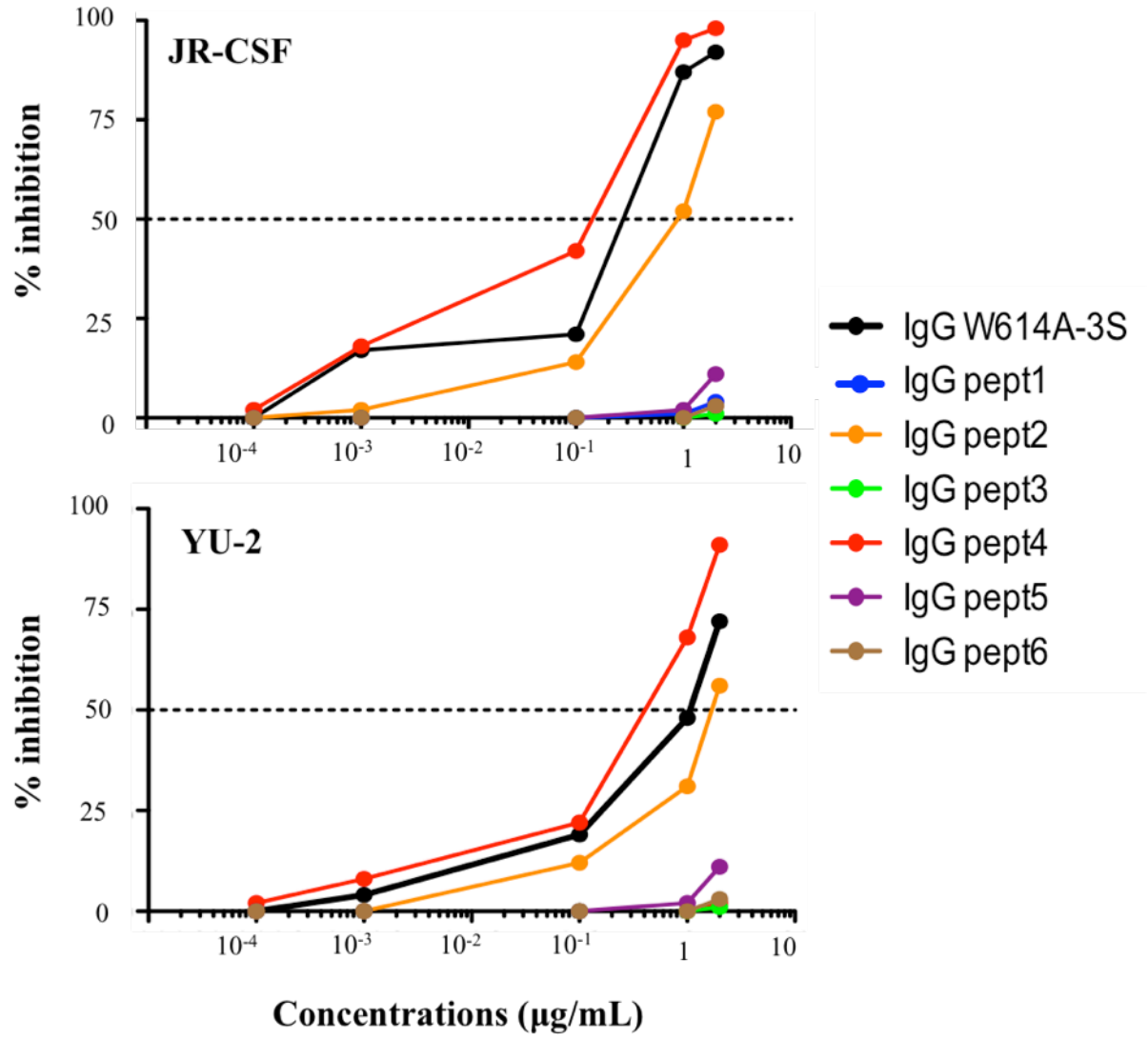


Figure 8 : Mesure du titre d'IgG anti W614A-3S après vaccination à J68 : Dilution successives au 10ème afin de déterminer le titre d'anticorps anti-W614A-3S obtenus après immunisation par différentes préparations vaccinales.

Au niveau de la réponse neutralisante, vis-à-vis de deux souches virales VIH-1 JR-CSF et YU-2, on observe ainsi que le peptide W614A-3S contrôle et le mutant 2 induisent des AcNs. Il est intéressant de noter que le double mutant 4 (W614A et S615D) semble induire des anticorps qui présentent un potentiel neutralisant accru. Par contre, les autres peptides mutants n'induisent pas de neutralisation **(Figure 9)**.



<u>Figure 9</u> : Évolution du pourcentage d'inhibition de la souche VIH-1 JR-CSF et YU-2 dans un système TZM-bl par des IgG anti-W614A-3S induit par les différents peptides mutants à J68.

Discussion & Perspectives

À travers ces expériences chez le lapin puis le macaque cynomologus, nous avons pu confirmer qu'il est possible d'induire des AcNs par vaccination peptidique, dans différents modèles animaux. Ces données ont également permis de confirmer les résultats obtenus par d'autres équipes, dans d'autres pathologies, sur la réponse neutralisante qui est dépendante de l'adjuvant utilisé (Awate et al., 2013). Dans notre système, seul l'IFA qui n'est pas utilisable chez l'Homme permet d'obtenir un titre élevé en Ac et une réponse neutralisante efficace. Au sujet des autres adjuvants testés, seul le QS21 se révèle capable d'induire une forte réponse neutralisante, mais le titre en anticorps est insuffisant pour espérer obtenir une immunogénécité suffisante. Afin d'améliorer l'efficacité du QS21, différentes stratégies peuvent être envisagées : il est possible d'augmenter les doses utilisées ou de changer le schéma d'immunisation. Des expériences en doses croissantes ou décroissantes ont déjà permis de mettre en évidence des modulations de la réponse anticorps, par rapport à des expériences en doses constantes utilisées dans notre protocole. De plus, il serait intéressant d'essayer de combiner le QS21 à un autre adjuvant ; la plupart des nouveaux vaccins qui sont actuellement développés sont composés de plusieurs types d'adjuvants (Wenbin Tuo, 2015).

En ce qui concerne la prédiction *in silic*o de nouveaux mutants du motif 3S, basée sur des différences conformationnelles, nous avons pu mettre en évidence qu'il est possible de prédire de nouveaux peptides capables de générer des AcNs. En effet, la double mutation W614A-S615D sur le peptide 3S a permis d'induire chez la souris, en présence d'IFA, des AcNs anti-VIH-1 qui semblent plus efficaces que ceux obtenus avec le peptide de départ W614A-3S. Ces données sont intéressantes et nous incitent à essayer de mieux définir le motif peptidique inclus dans la formulation vaccinale. Il est important de noter que ces travaux de neutralisation virale par le peptide 3S sont à l'origine issus d'une étude par alanine scanning du motif 3S. Ceci suggère que des études systématiques de mutations du peptide 3S doivent être réalisées, *in silico* puis *in vitro*, afin de rechercher la (ou les) modification(s) qui doit (doivent) être réalisée(s) pour obtenir la plus forte efficacité.

Discussions générales et perspectives

Cette discussion générale a plusieurs objectifs : 1) Discuter le rôle des cellules NK au cours des infections chroniques par le VIH et VHC et 2) analyser les résultats obtenus au cours de ma thèse avec une visée translationnelle afin de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques contre ces pathologies.

I. Impact des infections chroniques sur la fonctionnalité des cellules NK : mise en évidence de nouvelles stratégies d'échappements

L'étude de trois virus distincts associés à des pathologies chroniques, le VIH-1, le VIH-2 et le VHC, révèle des profils NK particuliers associés à la mise en place de mécanismes pour détourner ou échapper à l'immuno-surveillance médié par les cellules NK.

1. Conséquence de la diminution de l'expression du récepteur NKp30 sur les cellules NK de patients infectés par le VIH-2

L'infection par le VIH-2 peut être considérée comme un modèle important dans l'étude de la pathologie induite par le VIH-1. En effet, le contrôle du VIH-2 par l'hôte sans traitement cARV a été associé à une réponse adaptative efficace, médiée en particulier par les LT $CD8^+$ producteurs d'IFN-γ (cytokine antivirale majeure) (Angin et al., 2016). Le rôle de la réponse innée, qui est primordiale dans le devenir de l'infection VIH-1, a été peu étudié pendant l'infection VIH-2. Dans une cohorte de patients VIH-2, une étude extensive du phénotype et des fonctions NK nous a permis de décrire pour la première fois un profil altéré et différent des cellules NK provenant de donneurs sains ou de patients VIH-1^+ long terme non-progresseurs ou contrôleurs **(Projet 1)**. Nous avons observé qu'une grande majorité des cellules NK des patients infectés par le VIH-2 exprime un niveau très élevé de HLA-DR et une diminution des récepteurs activateurs tel que le NKp30, lequel est fortement sous-exprimé. L'expression du récepteur NKp30 chez ces patients est inversement corrélée à celle du marqueur d'activation cellulaire tardif HLA-DR. Une diminution de ce type de NCR a déjà été décrite dans l'infection par le VHC où elle est associée à la clairance virale (Alter et al., 2011). Dans d'autres études, la modulation de l'expression de NKp30 est associée à la

présence des ligands de NKp30 sous formes solubles dans le sérum des patients (Byrd et al., 2007; Pogge von Strandmann et al., 2007).

Dans l'infection par le VIH-2, nous n'avons pas détecté ces formes solubles dans le sérum de patients mais nous avons observé que *in vitro* l'infection par le VIH-2 peut induire à la surface de cellules CEM (lignée T) by-stander (cellules non-infectées) les ligands de NKp30 comparé à des cellules CEM non infectées. Ce phénomène n'est pas observé lors de l'infection par le VIH-1 à la surface des cellules CEM by-stander **(Projet 1)**. Ces observations sont à mettre en parallèle de celles obtenues pour l'expression de NKp44L lors de l'infection par le VIH-1. En effet, seuls les LT $CD4^+$ by-stander expriment le NKp44L tandis que l'expression du NKp44L est bloquée par la protéine Nef dans les cellules infectées par le VIH-1 pour échapper à la réponse des cellules NK (Fausther-Bovendo et al., 2009). Ce qui suggère que l'infection par le VIH-2 pourrait induire un mécanisme similaire dans la modulation de l'expression des ligands de NKp30. A la différence que l'augmentation de l'expression des ligands de NKp30 aurait pour but d'altérer directement les cellules NK. Il est intéressant de noter que dans le modèle de l'infection par le VHC, des expériences *in vitro* sur des cellules infectées montrent également une augmentation des ligands de NKp30 membranaires associée à une modulation négative de l'expression de NKp30 qui pourrait être liée à l'exposition constante à ses ligands (Holder et al., 2013). Un tel mécanisme a été décrit pour NKG2D qui, en contact constant avec certains ligands, provoque l'endocytose du récepteur activateur (Molfetta et al., 2017). Il est également possible que les ligands induits par le VIH-2 soient d'origine virale avec un effet inhibiteur du NKp30, comme cela fut observé pour la protéine pp65 du CMV (Arnon et al., 2005). Une identification de la (ou des) protéine(s) virale(s) du VIH-2 impliquée(s) dans ce mécanisme permettrait alors d'identifier précisément le mécanisme d'échappement aux cellules NK. De plus, cela apporterait des informations complémentaires dans la compréhension des mécanismes d'action des NCR.

La diminution du récepteur NKp30 a également des conséquences sur la fonction des cellules NK qui présentent une mauvaise capacité à dégranuler face à des cibles K562 standard, alors que le contenu intracellulaire de leurs granules semble être préservé. La meilleure capacité à dégranuler des cellules NK-$NKp30^+$, suggère que le niveau d'expression de NKp30 est un élément important pour induire la dégranulation **(Projet 1)**. Étant donné que le CD16 est bien exprimé à la surface de ces cellules (données non montrées), des expériences complémentaires d'ADCC devraient être menées pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

En revanche, la population NK-NKp30$^-$ produit des taux importants d'IFN-γ, quel que soient les stimuli **(Projet 1)**. Cela pourrait être due à la sur-activation de la cellule NK signalée par la surexpression de HLA-DR. Au cours de l'infection chronique par le VIH-2, nous n'avons pas observé la présence d'une population CD56$^-$CD16$^+$, laquelle a été décrite au cours de l'infection par le VIH-1 comme une sous-population anergique (Mavilio et al., 2005). Il est cependant important de noter que cette sous-population a été associée à la charge virale pratiquement indétectable chez les patients VIH-2$^+$. Par ailleurs, notre **projet 1** a mis en évidence la diminution de l'expression de Siglec-7 au cours de l'infection VIH-2. Celle-ci a été préalablement décrite dans l'infection par le VIH-1 comme un marqueur précoce de cellules NK dysfonctionnelles (Brunetta et al., 2009). Au cours de l'infection par le VHC, la diminution significative de l'expression de Siglec-7 a également été observée et a été associée à l'augmentation de l'inflammation hépatique (Varchetta et al., 2016). Ceci suggère que la diminution de l'expression de Siglec-7 pourrait ainsi être un paramètre commun aux infections chroniques.

En résumé, au cours de l'infection par le VIH-2, la modulation des fonctions NK pourrait être due à la diminution significative de l'expression de son récepteur activateur NKp30. Ce nouveau mécanisme d'échappement permettrait au VIH-2 de persister dans l'hôte. Des études longitudinales apporteraient des informations complémentaires pour expliquer ce mécanisme.

2. Implication des cellules NK-NKp44$^+$ dans l'infection chronique par le VHC et la dégradation du foie (Projet 2a)

Dans les infections chroniques par le VIH-1 et le VHC, il a été montré qu'en phase chronique une proportion de cellules NK présente un même profil particulier. Comme les cellules NK évoluent dans un environnement d'activation constant, on observe une augmentation du récepteur activateur NKp44. La fréquence de cette population augmente principalement dans les ganglions lymphoïdes de patients infectés par le VIH-1 (Vieillard et al., 2012) et dans le foie de patients infectés par le VHC **(Projet 2a)**, tissus principaux de la réplication virale. Lors de l'infection par le VIH-1, il a été montré que la population NK-NKp44$^+$ augmente en fonction de la charge virale et est associée à la déplétion de LT CD4$^+$ non infectés. Ce phénomène repose sur l'induction membranaire de son ligand cellulaire

NKp44L induit par l'interaction entre une région conservée de la gp41 nommée 3S et le gC1qR. Ce mécanisme de déplétion de LT $CD4^+$ by-stander participe à l'établissement de la phase SIDA. Ce phénomène n'est pas observé pendant l'infection par le VIH-2 ou d'autres infections par des lentivirus, dans lesquels le motif 3S est absent (Vieillard et al., 2005). Parallèlement, nous avons montré dans le **projet 2a** que la protéine Core du VHC est également capable *in vitro* d'interagir avec le gC1qR pour induire le NKp44L à la surface de lignées hépatiques. De plus, nos travaux sur des patients infectés chroniquement par le VHC mettent en évidence une expression de NKp44 plus élevée sur les cellules NK intra-hépatiques que sur celles de la périphérie. La fréquence des cellules NK-$NKp44^+$ intra-hépatiques est associée à l'augmentation de la charge virale et à l'avancement de la fibrose menant à une dégradation importante du foie. L'accumulation de cette population n'est pas observée chez des patients infectés chroniquement par le VHB (données personnelles) et chez les patients atteints de NASH. L'augmentation d'expression de NKp44 a été également rapportée dans d'autres rares cas tels que les ILC du groupe 3 (NCR^+ILC ou NK-22) qui présentent une activité cytotoxique dans divers tissus (Spits et al., 2013), comme à l'interface foeto-maternelle où l'expression d'un variant de NKp44 induit un profil inhibiteur (Siewiera et al., 2015) ou à la périphérie, lors d'infection aiguë comme lors de l'infection par le virus du chikungunya (Petitdemange et al., 2011). Il est important de rappeler que l'induction membranaire de NKp44 est strictement liée à un environnement activateur. En effet *in vitro,* NKp44 n'est pas exprimé en surface lorsque la cellule est dans un état quiescent mais peut être induit après une période prolongée de culture en présence d'IL-2, indiquant que NKp44 est également un marqueur tardif d'activation des cellules NK (Vitale et al., 1998). Cette activation agit également sur la production du ligand NKp44L qui s'accumule au niveau intracellulaire. Ainsi lors de l'infection chronique par le VIH-1 et le VHC, l'activation continue qui en résulte va modifier le profil des cellules NK pour devenir délétère (très actif et cytotoxiques) pour l'hôte. Lors de l'infection par le VIH-1, les cellules NK qui expriment le NKp44 acquièrent des capacités cytotoxiques exacerbées face à des LT $CD4^+$ exprimant le NKp44L et vont produire des niveaux beaucoup plus élevés de cytokines pro-inflammatoires (IL-2, IFN-γ et TNF-α) que des cellules NK-$NKp44^-$ (Sennepin et al., 2013). Dans le cas de l'infection par le VHC, nous avons montré dans le **projet 2a** que la population $NKp44^+$ est fortement cytotoxique face à une lignée hépatique exprimant du NKp44L membranaire et exprime des taux importants de TNF-α mais pas d'IFN-γ. Ces données corrèlent avec la fonction anti-fibrotique des NK producteurs d'IFN-γ précédemment décrite (Radaeva et al., 2006). Nous retrouvons également ce profil au niveau plasmatique, ce qui suggère que les

cellules NK pourraient, lors de ce type d'infection, être les principaux producteurs d'INF-γ, en corollaire de la réponse LT décrite comme dysfonctionnelle (Park and Rehermann, 2014). Alternativement, nous pourrions envisager que le virus inhibe par un mécanisme direct ou indirect la production d'INF-γ, comme cela a été clairement observé dans un grand nombre de situations pathologiques (Devasthanam, 2014).

Nos observations suggèrent que les virus étudiés utilisent des mécanismes similaires pour détourner la fonction des cellules NK afin de favoriser l'apparition d'un environnement délétère pour l'hôte mais bénéfique pour les virus. Pour rappel, le VIH-1 persiste en préservant les LT $CD4^+$ infectés, par l'inhibition de la translocation de NKp44L par sa protéine Nef (Fausther-Bovendo et al., 2009). Le VIH-1 préserve ainsi ces réservoirs et dérégule le système immunitaire en favorisant la déplétion de LT $CD4^+$ by-stander. Le VHC infecte les hépatocytes et possède également des mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire. En effet, par le biais de ces différentes protéines non structurales le VHC peut bloquer l'induction de certains signaux de danger et ligands de stress **(voir introduction B-2.2.2)**. On peut alors supposer qu'il peut également bloquer la translocation de NKp44L à la surface d'hépatocytes infectés pour les préserver, bien que ce mécanisme n'ait pas été démontré à ce jour. Il est important de rappeler que le VHC est un virus non lytique, la destruction hépatocytaire étant principalement médiée par une dérégulation de la réponse immunitaire. Ceci favorise indirectement l'infection car des particules virales sont libérées dans la circulation pour permettre l'infection d'autres régions du foie. Le VHC peut également transiter entre les hépatocytes sans passer par le milieu extérieur et il peut donc se concentrer dans des zones restreintes du foie. Au cours de l'infection VHC il a été clairement démontré que la réponse LT $CD8^+$ présente un profil d'exhaustion (Park and Rehermann, 2014) alors que la réponse NK reste forte et importante pendant la phase chronique (Golden-Mason and Rosen, 2013). **Quel serait alors le bénéfice pour le VHC d'induire la lyse d'hépatocytes non infectés ?**

Une **première hypothèse** serait que l'induction par la protéine Core de NKp44L sur des cellules non infectées pourrait permettre de détourner la réponse cytotoxique NK des zones hépatocytaires où le virus se réplique. Ceci impliquerait que la protéine Core non entourée d'enveloppe virale circule dans le sang, ce qui n'a jamais pu être formellement observé, contrairement à la particule virale entière (Piver et al., 2017). La présence de la protéine Core dans le milieu extérieur pourrait s'expliquer par la lyse des hépatocytes

infectées. De nombreuses études *in vitro* ont montré son rôle important dans la persistance du virus en modulant la réponse immunitaire **(Voir partie A-3.2.2)**. En revanche, la protéine Core ne semble pas avoir d'effet direct sur les cellules NK. Une **deuxième hypothèse** serait un effet collatéral de l'infection qui provoquerait alors la sur-activation des cellules NK favorisant ainsi la destruction du foie. Il est intéressant de noter que le gC1qR peut être exprimé à la surface d'hépatocytes activées, mais est surtout observé dans le cytoplasme au niveau des mitochondries ou du réticulum endoplasmique (Dembitzer et al., 2012). Ainsi, la protéine Core peut induire l'expression de NKp44L à la surface des cellules mais également de manière intracellulaire, le gC1qR étant proche du réticulum endoplasmique qui est le site d'assemblage des nouveaux virions. Ces hypothèses devront être validées par des expériences d'immunohistochimie ou de microscopie électronique afin d'étudier une co-localisation de la protéine Core dans les cellules infectées et des cellules NK-NKp44^{+} dans le foie. Des études de pseudo infection par le VHC (nommé GBV) sur des modèles de primates non humain, où l'activation de la réponse innée est associé avec la dégradation du foie (Manickam et al., 2016), pourraient permettre une véritable exploration du rôle délétère des cellules NK par des expériences de déplétion par exemple. Une récente étude sur le singe vert d'Afrique infecté par le VIS associe la migration des cellules NK cytotoxiques dans les ganglions au contrôle de l'infection (Huot et al., 2017). Il serait alors intéressant d'observer si en cas d'échappement viral, celui-ci impliquerait l'augmentation de l'expression de NKp44/NKp44L dans ce modèle.

3. Implication du mécanisme NKp44/NKp44L dans l'infection chronique par le VHC : comparaison à l'infection chronique par le VIH-1 (Projet 2b)

L'un des résultats les plus surprenant de ces études sur le VIH et le VHC a été la mise en évidence que l'effet délétère des cellules NK serait en partie dû à un mécanisme spécifique. En effet, une région précise et très conservée du VIH-1 et du VHC, respectivement un motif de 6 AA (SWSNKS) nommé 3S (Vieillard et al., 2005) et un motif de 4 AA (SERS) nommé P7/P8 **(Projet 2b)**, est capable d'interagir avec le gC1qR. Ces deux motifs ont des propriétés physico-chimiques très similaires mais curieusement, leur site de liaison sur la gC1qR n'est pas le même (Pednekar et al., 2016; données personnelles de modélisation). Les données de la littérature rapportent que le gC1qR interagit avec plusieurs molécules physiologiques comme le C1q du complément ou des protéines de la coagulation, conduisant respectivement à l'induction de cytokines inflammatoires et de vasodilatateurs

(Peerschke and Ghebrehiwet, 2001). Le gC1qR peut également interagir avec des protéines de plusieurs pathogènes comme la protéine A du Staphylococus aureus (Sethi et al., 2011) ou l'internaline B de Listeria monocytogenes (Khelef et al., 2006). Le VIH-1 et le VHC sont des virus génétiquement très différents mais leur motif commun a pu apparaître à cause de leur évolution au contact de l'Homme, afin de pouvoir détourner la fonction du gC1qR à leur avantage. Il est intéressant de noter que le C1q peut induire l'expression membranaire de NKp44L en interagissant avec le gC1qR exprimé par des lignées cellulaires (Baychelier et al., 2013). Étant donné que le gC1qR membranaire et le NKp44L intracellulaire augmentent en fonction des signaux d'activations, l'interaction C1q/gC1qR pourrait correspondre à un mécanisme secondaire de régulation d'une cellule sur-activée. Des expériences de compétitions entre les ligands naturels du gC1qR et les protéines des pathogènes nous permettraient de mieux comprendre la régulation de ce mécanisme et d'envisager des stratégies pour le bloquer, en utilisant par exemple des agonistes au gC1qR ciblant spécifiquement les zones d'interactions des pathogènes.

Il est intéressant de rappeler que dans l'infection par le VIH-2 **(Projet 1)** nous n'avions pas pu mettre en évidence d'induction de NKp44L probablement à cause de l'absence du motif 3S dans son enveloppe virale. Ceci indique que le motif 3S a été acquis au cours de l'évolution et pourrait suggérer que ce motif très conservé dans les différents clades du VIH-1 pourrait jouer un rôle important en lien avec les différences physiopathologiques entre des infections par le VIH-1 et le VIH-2. De même, la dichotomie entre le VIH-1 et le VIH-2 dans l'expression des ligands de NKp44 et NKp30 devrait être également explorée pour mieux définir les mécanismes de subversion vis-à-vis de la réponse NK mis en place par chacun de ces deux virus. Ceci pourrait également permettre d'identifier de nouveaux ligands de ces NCR. Dans certaines conditions particulières les NCR pourraient ainsi agir comme des PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns), réagissant à des antigènes spécifiques. L'infection par le VIH-2, malgré la diminution de sa prévalence, devrait être considérée comme un véritable outil dans les études de physiopathologie du VIH-1.

4. Récapitulatif

Ainsi, à travers ces différentes infections chroniques, nous avons pu étudier leurs effets sur le profil et la fonction des cellules NK. Nous observons que la réponse NK est bien une cible privilégiée pour la mise en place par les virus de différents mécanismes d'échappement, ce qui confirme l'importance de ces cellules dans la réponse antivirale. Ces

virus vont ainsi pouvoir moduler différents récepteurs afin d'agir sur la fonction cytotoxique et/ou immuno-régulatrice de ces cellules. On observe ainsi deux profils distincts : des cellules NK-NKp30$^-$NKp44$^-$HLA-DR$^+$CD107a$^-$-IFN-γ$^+$-TNF-α$^-$ lors de l'infection par le VIH-2 **(Projet 1)** et des cellules NK-NKp30$^-$NKp44$^+$-CD69$^+$-CD107a$^+$-IFN-γ$^-$-TNF-α$^+$ lors de l'infection par le VHC **(Projet 2a)**. Le profil fonctionnel opposé entre les deux infections suggère un effet direct des NCR. Curieusement, le NKp44 n'est pas exprimé sur les cellules NK des patients infectés par le VIH-2 (données personnelles) malgré l'activation constante. Il est cependant nécessaire de rappeler que nos études ont uniquement portées sur le sang périphérique et non sur les organes lymphoïdes où l'expression de NKp44 avait été spécifiquement rapportée pour l'infection VIH-1. Alternativement, on peut imaginer que l'absence de NKp44 est due à l'absence d'expression de son ligand NKp44L sur les LT CD4$^+$. Des études complémentaires (transciptomique ou protéomiques) dans le cas de ces infections pourraient apporter des informations sur les mécanismes mis en jeu.

II. Mise en place de thérapies contre le VHC et le VIH-1

Les différentes études menées au laboratoire sur le motif 3S de la gp41 du VIH-1 ont permis de proposer un vaccin thérapeutique VAC-3S qui a pour objectif de protéger les LT CD4$^+$. Les récentes données de l'essai clinique de phase II sur le VAC-3S réalisé chez 90 patients VIH-1$^+$ sous cART confirment les données de l'étude de phase I sur la sécurité du vaccin ainsi que son immunogénécité. Ainsi chez les patients qui produisent un taux suffisant d'Ac anti-3S, il a été observé une augmentation significative du taux de LT CD4$^+$ et du ratio CD4/CD8 par rapport à la « baseline » (manuscrit en préparation). Il est intéressant de noter que lors de précédentes expériences d'immunisation chez le singe une inhibition de certains marqueurs de l'inflammation avait également été observée (Vieillard et al., 2016, Annexe 1). En parallèle, des études de mutation sur le motif 3S ont permis de montrer que certaines mutations ponctuelles produisaient des virus non-infectieux, incapables d'induire la translocation de NKp44L à la surface des LT CD4. Pour l'une de ces mutations, nommée W614A-3S, une simple vaccination animale permet d'induire des anticorps capables de neutraliser le virus (AcNs) (Petitdemange et al., 2013).

1. Le motif P7/P8 du VHC : nouvelle cible thérapeutique ? (Projet 2b)

En se basant sur les données obtenues sur le motif 3S, nous avons cherché lors du **projet 2b** à identifier les résidus du motif P7/P8 (S_1, E, R ou S_2) de la protéine Core qui sont

nécessaires à l'induction de NKp44L. Nous avons observé que seul le résidu S_1 est nécessaire à la fois pour l'induction de NKp44L et pour la production de nouveaux virions. En revanche, le résidu S2 ne semble pas nécessaire dans l'induction de NKp44L et sa mutation n'a pas d'effet sur la production virale. De plus la mutation du résidu R bloque la translocation du NKp44L alors que cette même mutation dans le virus n'inhibe pas sa production. On peut alors supposer que ce résidu R est nécessaire à l'interaction avec le gC1qR, mais qu'il est négligeable au bon fonctionnement de la protéine Core. Ces virus mutés vont nous permettre de confirmer que le motif $\mathbf{S_E R_S}$ est bien celui qui est impliqué dans l'induction de NKp44L sur des lignées hépatiques. Toutefois, l'identification de ces mutations défectives dans la production virale doit être relativisée. En effet la protéine Core est primordiale pour l'assemblage de nouvelles particules virales et peut donc être sensible à de nombreuses mutations. Il est cependant important de noter que le motif P7/P8, comme le motif 3S de la gp41, est très conservé à travers les différents génotypes viraux. L'ensemble de ces données suggère que l'interaction entre le motif P7/P8 et le gC1qR pourrait servir à identifier de nouvelles drogues qui pourraient potentialiser les effets des AAD. En effet, des drogues ciblant cette région permettraient d'agir précocement sur le cycle viral et pourraient participer à la restauration du système immunitaire en modulant le taux de protéine Core circulante. Des expériences complémentaires devront être entreprises pour confirmer le rôle de ce motif dans la production virale par d'autres types de mutations et pour valider les données sur des hépatocytes primaires humains, bien que la difficulté d'infecter de telles cellules reste problématique. Dans le cas du VHC et au vu de l'efficacité actuelle des AAD, une approche vaccinale est difficilement envisageable.

2. Les anticorps neutralisants W614A-3S : nouveau candidat pour une vaccination anti-VIH-1 (Projet 3a)

Le vaccin est en revanche toujours d'actualité pour le VIH-1. Malgré l'échec dans la mise en place d'un vaccin prophylactique efficace contre le VIH-1, les progrès dans la connaissance des AcNs incitent de nouveau à développer des stratégies vaccinales. Cependant, l'induction d'une réponse AcNs efficace et à large spectre n'a pas encore était obtenue par vaccination chez l'Homme. Nos travaux dans le **projet 3a** sur le rôle bénéfique des AcNs ciblant la région 3S de la gp41 chez des patients LTNP pourraient permettre d'apporter de nouvelles données dans la vaccination anti-VIH-1. Ces travaux ont ainsi montré que des AcNs W614A-3S sont présent dans 23,5% des patients de la cohorte LTNP et que leur titre ainsi

que leur pouvoir neutralisant augmentent au cours du temps. De plus, ces patients présentent une charge virale et une charge ADN virale plus basse en lien avec la capacité neutralisante des AcNs W614A-3S suggérant un effet direct de ces anticorps. En revanche, chez certains patients LTNP, on observe une augmentation de la charge virale et de l'ADN virale associée à une diminution de la réponse neutralisante. Ceci pourrait être dû à des modifications de la reconnaissance entre l'anticorps et l'epitope induit par des mécanismes d'échappement observés au cours du temps (Van Gils et al., 2010) et/ou à la détérioration de la réponse immunitaire impactant le niveau d'anticorps (Lewis et al., 2014). En résumé, cette étude a montré que des AcNs W614A-3S pourraient participer au maintien du statut LTNP. Ces anticorps ont quelques propriétés remarquables telles que la présence d'un CDR H3 de grande taille et d'être majoritairement d'isotope IgG1 (à plus de 85%), ce qui est comparable aux données de la littérature sur les AcNs (Sadanand et al., 2016; Yu and Guan, 2014). Des informations complémentaires sur la structure et l'affinité pourraient être apportées en isolant des anticorps monoclonaux. La génération et le maintien d'AcNs puissant sont souvent associés à une infection VIH- 1 non contrôlée, la majorité des AcNs ayant été isolés chez des patients en phase chronique (Doria-Rose et al., 2010). Néanmoins, une récente étude sur des contrôleurs VIH-1 suggère que la génération d'anticorps neutralisants est associée à un profil d'activation cytokinique spécifique (Dugast et al., 2017). Dans les autres infections que nous avons étudiées, une réponse neutralisante efficace a été mise en évidence au cours de l'infection VIH-2 contrôlée (Kong et al., 2012). De plus, chez les patients qui ont éliminé le VHC sans traitement, des AcNs spécifiques du VHC peuvent être induits, et restent présent après plusieurs décennies. Ces AcNs avaient peu de mutations somatiques suggérant que l'induction d'une réponse neutralisante reste possible malgré un contrôle efficace de l'infection (Bailey et al., 2017). Ainsi, nous pouvons suggérer que les patients LTNP infectés par le VIH-1 ont un niveau de virémie suffisant et/ou un profil cytokinique particulier pour induire la maturation des AcNs W614A-3S.

3. La formulation vaccinale (Projet 3b)

L'obtention d'un vaccin W614A-3S efficace permettrait d'induire une réponse spécifique contre le VIH-1. Nos premiers travaux ont mis en évidence que le schéma vaccinal ainsi que sa formulation sont deux éléments clefs. En collaboration avec l'équipe du Dr. B. Combadière (CIMI-Paris), nous nous sommes focalisés dans le **projet 3b** sur l'adjuvant à utiliser pour obtenir la meilleure réponse. Nos données préliminaires avaient en effet montré

qu'une réponse neutralisante ne pouvait être obtenues en présence d'hydroxyde d'alum (précédemment utilisé dans le vaccin VAC-3S) mais pouvait seulement l'être avec de l'IFA (un adjuvant non utilisable chez l'Homme). Dans les études suivantes, nous avons comparé cinq adjuvants qui correspondent à une émulsion d'eau dans l'huile (IFA (témoin positif), Montadine ISA 51 et Montanide ISA 720) d'un adjuvant composé d'une émulsion d'huile dans de l'eau (Addavax) et d'un adjuvant composé d'une molécule végétale (QS-21). Des données similaires ont été obtenues chez la souris et le lapin. Ainsi, l'Addavax induit un titre faible en anticorps anti-W614A-3S et pas de réponse neutralisante suggérant que ce type d'émulsion n'est pas adapté pour induire une réponse spécifique contre ce peptide. Les deux Montanides, qui différent sur l'origine de l'huile utilisée, ont induit un titre d'anticorps anti-W614A-3S. Seul l'ISA 720 permet de générer des AcNs chez le lapin mais avec une IC_{50} qui est insuffisante pour espérer obtenir *in vivo* un effet protecteur. Enfin seul le QS21, parmi les adjuvants potentiellement utilisables chez l'Homme, permet d'obtenir une réponse neutralisante spécifique et intéressante, mais le niveau d'anticorps anti-W614A-3S induit reste faible. Ces premières données suggèrent que le QS-21 devrait être utilisé en combinaisons avec d'autres adjuvants ou à des doses plus importantes. Des expériences complémentaires devront être conduites avant de considérer le W614A-3S comme un candidat vaccin possible au même titre que le vaccin VAC-3S.

Une autre approche pour essayer d'améliorer un vaccin est de jouer sur sa composition peptidique en utilisant des outils de modélisation. La modélisation permet en effet d'essayer de visualiser les particularités structurelles de l'épitope étudié par rapport à sa forme sauvage. Ainsi la modélisation du peptide W614A-3S rapporté dans le **projet 3b** montre qu'il a une conformation plus ouverte que le peptide sauvage, et mime mieux la conformation observée lorsque le peptide W614A-3S est inclus dans la gp41 lors des étapes de pré-fusion. Cette étude *in silico* a permis de proposer de nouvelles mutations dans le motif 3S, afin de se rapprocher le plus possible de la conformation native qui est présente dans la protéine. Différents mutants ont ainsi été générés dont un peptide double mutant, W614A/S615D, qui semble induire chez la souris une réponse neutralisante supérieure à celle observée avec le simple mutant W614A. Ces données préliminaires pourraient ouvrir un nouveau champ d'investigation pour le screening *in silico* de nouveaux vaccins. Il est cependant évident que chacun des candidats sélectionnés devrons ensuite être validés par des tests biologiques.

Conclusion

Mes travaux ont permis de mieux comprendre le rôle des cellules NK au cours de certaines infections virales chroniques et plus particulièrement l'impact des NCR et de leurs ligands sur les cellules cibles en lien avec le développement de mécanismes d'échappement viral. En parallèle, mes travaux sur le motif 3S de la gp41 ont permis de démontrer le rôle important joué par des anticorps neutralisants dirigés contre un motif spécifique et très conservés de la gp41. Le motif pourrait devenir une cible pertinente pour l'élaboration d'un nouveau vaccin à visée prophylactique et/ou thérapeutique.

Résumé

Les infections chroniques de l'Immunodéficience Humaine et de l'Hépatite C (VIH et VHC) sont à l'origine de pandémies. Malgré des traitements avancés, leurs relations avec le système immunitaire ne sont pas résolues et restent nécessaires pour établir de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les cellules Natural Killer (NK) sont des effecteurs majeurs antiviraux et sont importants pour l'immunité innée et adaptative. Ils contrôlent leur cytotoxicité et leur fonction immunorégulatrice via de multiples récepteurs activateurs et inhibiteurs qui sont enclenchés par interaction avec leurs ligands respectifs. Parmi tous les récepteurs, je me suis particulièrement intéressé aux Natural Cytotoxicity Receptors NKp30 et NKp44. Il est intéressant de noter que le laboratoire a précédemment identifié un épitope conservé de la gp41 du VIH-1 qui induit l'expression du ligand de NKp44 sur des LT $CD4^+$ les rendant susceptibles à la lyse par des cellules NK-$NKp44^+$. Après plusieurs études, le laboratoire a mis en place une stratégie vaccinale basée sur un peptide de l'épitope conservé de la gp41 qui induit chez la souris des Anticorps Neutralisants (AcNs W614A-3S) contre l'infection VIH-1. Alors que le VIH-2 est considéré comme un modèle unique d'une infection VIH contrôlée, les données sur les cellules NK y sont très limitées. Nous avons observé une dérégulation du récepteur NKp30 et une augmentation de ses ligands qui conduisent à des déficiences de leurs fonctions et représentent un nouveau mécanisme de persistance virale. Ensuite, nous avons observé pendant l'infection chronique par le VHC une forte proportion de cellules NK intra-hépatiques exprimant NKp44 qui corrèle avec la fibrose et la charge virale. De plus, nous avons identifié un épitope conservé de la protéine Core du VHC qui induit le ligand de NKp44 sur des lignées hépatiques. Ces données suggèrent que la déplétion des hépatocytes passe par un mécanisme similaire à celui observé pendant l'infection VIH-1. Enfin, une étude sur des patients VIH-1 contrôleurs nous a permis d'identifier la présence d'AcNs W614A-3S qui sont associées au contrôle viral et au maintien de LT $CD4^+$ fonctionnelles. Ces données ont confirmé le potentiel de ces AcNs et, dont leur production par vaccination, ont été confirmée chez le lapin et le singe. Ainsi, ces études apportent de nouvelles données dans les relations entre les cellules NK et le VIH ou le VHC ainsi que de nouvelles stratégies thérapeutiques. Ces études ont notamment confirmé le pouvoir des AcNs W614A-3S dans un vaccin contre le VIH-1.

Mots-clés : VIH, VHC, cellules NK, NKp30/44, anticorps neutralisants, échappement viral

Abstract

Human Immunodeficiency and Hepatitis C (HIV and HCV) chronic infections are at the origin of pandemics. Despite advance drug treatments, their relationship with the immune system is not resolved and is still required to establish new therapeutic strategies. Natural Killer (NK) cells are major antiviral effectors of the immune system and are important for innate and adaptive immune processes. They mediate cytotoxicity and immunoregulation via various activator and inhibitor receptors that are triggered upon interaction with their cognate ligands. Among all receptors, I particularly took an interest in Natural Cytotoxicity Receptors NKp30 and NKp44. Interestingly, the lab previously identified a conserved HIV-1 gp41 epitope that induce expression of NKp44 ligand on $CD4^+$ T cells making them susceptible to lyses by NK-$NKp44^+$ cells. After various studies, the lab established a vaccine strategy based on a peptide from the conserved gp41 epitope that induced in mice Neutralizing Antibodies (Nab W614A-3S) against HIV-1 infection. Whereas HIV-2 infection could be considered as a HIV control infection unique model, data on NK cells are very limited. We found a down-modulation of NKp30 receptor and an increased of its ligands that lead to functional impairments of NK cells and could represent a new viral persistence mechanism. Then, during the HCV chronic infection we found a high proportion of intrahepatic NK cells expressing NKp44 that correlates with fibrosis and viral load. Furthermore we identified a conserved épitope of HCV core protein that induced NKp44 ligand on hepatic cell lines. These data suggest that destruction of hepatocyte might occur by a similar mechanism observed during HIV-1 infection. Finally, a study on HIV-1 controllers patients allow us to identify the presence of Nab W614A-3S that correlates with viral control and the preservation of functional $CD4^+$ T cells. These data confirm the potency of this Nab and their induction by vaccination has been also confirmed in rabbit and macaques. Thus, these studies highlight new data regarding relationship between NK cells and HIV or HCV that could represent new therapeutic approaches. These studies especially confirm the potency of Nab W614A-3S to implement a vaccine against HIV-1.

Keywords: HIV, HCV, NK cells, NKp30/44, neutralizing antibodies, immune evasion

Bibliographie

- Abdelwahab, K.S., and Ahmed Said, Z.N. (2016). Status of hepatitis C virus vaccination: Recent update. World J. Gastroenterol. *22*, 862–873.
- Abram, M.E., Ferris, A.L., Shao, W., Alvord, W.G., and Hughes, S.H. (2010). Nature, Position, and Frequency of Mutations Made in a Single Cycle of HIV-1 Replication. Journal of Virology *84*, 9864–9878.
- Ahmad, F., Hong, H.S., Jäckel, M., Jablonka, A., Lu, I.-N., Bhatnagar, N., Eberhard, J.M., Bollmann, B.A., Ballmaier, M., Zielinska-Skowronek, M., et al. (2014). High frequencies of polyfunctional CD8+ NK cells in chronic HIV-1 infection are associated with slower disease progression. J. Virol. *88*, 12397–12408.
- Alatrakchi, N., Damond, F., Matheron, S., Beretta-Tempelhoff, S., Campa, P., Carcelain, G., Brun-Vezinet, F., Autran, B., and French HIV-2 study group (2006). Proliferative, IFNgamma and IL-2-producing T-cell responses to HIV-2 in untreated HIV-2 infection. AIDS *20*, 29–34.
- Alfsen, A., and Bomsel, M. (2002). HIV-1 gp41 envelope residues 650-685 exposed on native virus act as a lectin to bind epithelial cell galactosyl ceramide. J. Biol. Chem. *277*, 25649–25659.
- Alsahafi, N., Richard, J., Prévost, J., Coutu, M., Brassard, N., Parsons, M.S., Kaufmann, D.E., Brockman, M., and Finzi, A. (2017). Impaired Downregulation of NKG2D Ligands by Nef Proteins from Elite Controllers Sensitizes HIV-1-Infected Cells to Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. J. Virol. *91*.
- Alter, G., Jost, S., Rihn, S., Reyor, L.L., Nolan, B.E., Ghebremichael, M., Bosch, R., Altfeld, M., and Lauer, G.M. (2011). Reduced frequencies of NKp30+NKp46+, CD161+, and NKG2D+ NK cells in acute HCV infection may predict viral clearance. J. Hepatol. *55*, 278–288.
- Amadei, B., Urbani, S., Cazaly, A., Fisicaro, P., Zerbini, A., Ahmed, P., Missale, G., Ferrari, C., and Khakoo, S.I. (2010). Activation of natural killer cells during acute infection with hepatitis C virus. Gastroenterology *138*, 1536–1545.
- Amand, M., Iserentant, G., Poli, A., Sleiman, M., Fievez, V., Sanchez, I.P., Sauvageot, N., Michel, T., Aouali, N., Janji, B., et al. (2017). Human CD56(dim)CD16(dim) Cells As an Individualized Natural Killer Cell Subset. Front Immunol *8*, 699.
- Amanna, I.J., Messaoudi, I., and Slifka, M.K. (2008). Protective immunity following vaccination: how is it defined? Hum Vaccin *4*, 316–319.
- Angin, M., Wong, G., Papagno, L., Versmisse, P., David, A., Bayard, C., Charmeteau-De Muylder, B., Besseghir, A., Thiébaut, R., Boufassa, F., et al. (2016). Preservation of Lymphopoietic Potential and Virus Suppressive Capacity by CD8+ T Cells in HIV-2-Infected Controllers. J. Immunol. *197*, 2787–2795.
- Anthony, D.A., Andrews, D.M., Watt, S.V., Trapani, J.A., and Smyth, M.J. (2010). Functional dissection of the granzyme family: cell death and inflammation. Immunol. Rev. *235*, 73–92.
- Apostólico, J. de S., Lunardelli, V.A.S., Coirada, F.C., Boscardin, S.B., and Rosa, D.S. (2016). Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing. J Immunol Res *2016*, 1459394.
- Apps, R., Del Prete, G.Q., Chatterjee, P., Lara, A., Brumme, Z.L., Brockman, M.A., Neil, S., Pickering, S., Schneider, D.K., Piechocka-Trocha, A., et al. (2016). HIV-1 Vpu Mediates HLA-C Downregulation. Cell Host Microbe *19*, 686–695.
- Arnon, T.I., Achdout, H., Levi, O., Markel, G., Saleh, N., Katz, G., Gazit, R., Gonen-

Gross, T., Hanna, J., Nahari, E., et al. (2005). Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. Nat. Immunol. *6*, 515–523.

- Aucouturier, J., Dupuis, L., Deville, S., Ascarateil, S., and Ganne, V. (2002). Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. Expert Rev Vaccines *1*, 111–118.
- Awate, S., Babiuk, L.A., and Mutwiri, G. (2013). Mechanisms of action of adjuvants. Front Immunol *4*, 114.
- Bächle, S.M., Malone, D.F.G., Buggert, M., Karlsson, A.C., Isberg, P.-E., Biague, A.J., Norrgren, H., Medstrand, P., Moll, M., Sandberg, J.K., et al. (2016). Elevated levels of invariant natural killer T-cell and natural killer cell activation correlate with disease progression in HIV-1 and HIV-2 infections. AIDS *30*, 1713–1722.
- Bailey, J.R., Flyak, A.I., Cohen, V.J., Li, H., Wasilewski, L.N., Snider, A.E., Wang, S., Learn, G.H., Kose, N., Loerinc, L., et al. (2017). Broadly neutralizing antibodies with few somatic mutations and hepatitis C virus clearance. JCI Insight *2*.
- Barnes, E., Folgori, A., Capone, S., Swadling, L., Aston, S., Kurioka, A., Meyer, J., Huddart, R., Smith, K., Townsend, R., et al. (2012). Novel Adenovirus-Based Vaccines Induce Broad and Sustained T Cell Responses to HCV in Man. Science Translational Medicine *4*, 115ra1–115ra1.
- Barouch, D.H., and Picker, L.J. (2014). Novel vaccine vectors for HIV-1. Nat. Rev. Microbiol. *12*, 765–771.
- Barouch, D.H., Whitney, J.B., Moldt, B., Klein, F., Oliveira, T.Y., Liu, J., Stephenson, K.E., Chang, H.-W., Shekhar, K., Gupta, S., et al. (2013). Therapeutic efficacy of potent neutralizing HIV-1-specific monoclonal antibodies in SHIV-infected rhesus monkeys. Nature *503*, 224–228.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science *220*, 868–871.
- Barton, K., Hiener, B., Winckelmann, A., Rasmussen, T.A., Shao, W., Byth, K., Lanfear, R., Solomon, A., McMahon, J., Harrington, S., et al. (2016). Broad activation of latent HIV-1 in vivo. Nat Commun *7*, 12731.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. Science *285*, 727–729.
- Baychelier, F., Sennepin, A., Ermonval, M., Dorgham, K., Debré, P., and Vieillard, V. (2013). Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. Blood *122*, 2935–2942.
- Béziat, V., Dalgard, O., Asselah, T., Halfon, P., Bedossa, P., Boudifa, A., Hervier, B., Theodorou, I., Martinot, M., Debré, P., et al. (2012). CMV drives clonal expansion of NKG2C+ NK cells expressing self-specific KIRs in chronic hepatitis patients. Eur. J. Immunol. *42*, 447–457.
- Bi, J., and Tian, Z. (2017). NK Cell Exhaustion. Front Immunol *8*, 760.
- Biron, C.A., Nguyen, K.B., Pien, G.C., Cousens, L.P., and Salazar-Mather, T.P. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. Annu. Rev. Immunol. *17*, 189–220.
- Björkström, N.K., Lindgren, T., Stoltz, M., Fauriat, C., Braun, M., Evander, M., Michaëlsson, J., Malmberg, K.-J., Klingström, J., Ahlm, C., et al. (2011). Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus. J. Exp. Med. *208*, 13–21.

- Bomsel, M., Tudor, D., Drillet, A.-S., Alfsen, A., Ganor, Y., Roger, M.-G., Mouz, N., Amacker, M., Chalifour, A., Diomede, L., et al. (2011). Immunization with HIV-1 gp41 subunit virosomes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges. Immunity *34*, 269–280.
- Bottino, C., Castriconi, R., Pende, D., Rivera, P., Nanni, M., Carnemolla, B., Cantoni, C., Grassi, J., Marcenaro, S., Reymond, N., et al. (2003). Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. J. Exp. Med. *198*, 557–567.
- Le Bouteiller, P., Tabiasco, J., Polgar, B., Kozma, N., Giustiniani, J., Siewiera, J., Berrebi, A., Aguerre-Girr, M., Bensussan, A., and Jabrane-Ferrat, N. (2011). CD160: a unique activating NK cell receptor. Immunol. Lett. *138*, 93–96.
- Boyington, J.C., Brooks, A.G., and Sun, P.D. (2001). Structure of killer cell immunoglobulin-like receptors and their recognition of the class I MHC molecules. Immunological Reviews *181*, 66–78.
- Bozzano, F., Picciotto, A., Costa, P., Marras, F., Fazio, V., Hirsch, I., Olive, D., Moretta, L., and De Maria, A. (2011). Activating NK cell receptor expression/function (NKp30, NKp46, DNAM-1) during chronic viraemic HCV infection is associated with the outcome of combined treatment. Eur. J. Immunol. *41*, 2905–2914.
- Bradley, T., Trama, A., Tumba, N., Gray, E., Lu, X., Madani, N., Jahanbakhsh, F., Eaton, A., Xia, S.-M., Parks, R., et al. (2016). Amino Acid Changes in the HIV-1 gp41 Membrane Proximal Region Control Virus Neutralization Sensitivity. EBioMedicine *12*, 196–207.
- Braud, V.M., Allan, D.S., O'Callaghan, C.A., Söderström, K., D'Andrea, A., Ogg, G.S., Lazetic, S., Young, N.T., Bell, J.I., Phillips, J.H., et al. (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. Nature *391*, 795–799.
- Brenchley, J.M., and Douek, D.C. (2008). The mucosal barrier and immune activation in HIV pathogenesis. Curr Opin HIV AIDS *3*, 356–361.
- Brunetta, E., Fogli, M., Varchetta, S., Bozzo, L., Hudspeth, K.L., Marcenaro, E., Moretta, A., and Mavilio, D. (2009). The decreased expression of Siglec-7 represents an early marker of dysfunctional natural killer-cell subsets associated with high levels of HIV-1 viremia. Blood *114*, 3822–3830.
- Brunetta, E., Hudspeth, K.L., and Mavilio, D. (2010). Pathologic natural killer cell subset redistribution in HIV-1 infection: new insights in pathophysiology and clinical outcomes. Journal of Leukocyte Biology *88*, 1119–1130.
- Bukh, J. (2016). The history of hepatitis C virus (HCV): Basic research reveals unique features in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control. J. Hepatol. *65*, S2–S21.
- Byrd, A., Hoffmann, S.C., Jarahian, M., Momburg, F., and Watzl, C. (2007). Expression analysis of the ligands for the Natural Killer cell receptors NKp30 and NKp44. PLoS ONE *2*, e1339.
- Calvez, V., Hocqueloux, L., Meynard, J.-L., Muret, P., Castan, B., Tardy, J.-C., Peytavin, G., and Landman, R. (2017). Less-drug regimen including atazanavir in maintenance treatment of HIV infection: how, who, when, why? Journal of Antimicrobial Chemotherapy *72*, 19–28.
- Campbell, E.M., and Hope, T.J. (2015). HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. Nature Reviews Microbiology *13*, 471–483.
- Caskey, M., Klein, F., Lorenzi, J.C.C., Seaman, M.S., West, A.P., Buckley, N., Kremer, G., Nogueira, L., Braunschweig, M., Scheid, J.F., et al. (2015). Viraemia suppressed in HIV-1-infected humans by broadly neutralizing antibody 3BNC117.

Nature *522*, 487–491.

- Cerboni, C., Neri, F., Casartelli, N., Zingoni, A., Cosman, D., Rossi, P., Santoni, A., and Doria, M. (2007). Human immunodeficiency virus 1 Nef protein downmodulates the ligands of the activating receptor NKG2D and inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity. Journal of General Virology *88*, 242–250.
- Chávez-Galán, L., Arenas-Del Angel, M.C., Zenteno, E., Chávez, R., and Lascurain, R. (2009). Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. Cell. Mol. Immunol. *6*, 15–25.
- Chayama, K., and Hayes, C.N. (2015). HCV Drug Resistance Challenges in Japan: The Role of Pre-Existing Variants and Emerging Resistant Strains in Direct Acting Antiviral Therapy. Viruses *7*, 5328–5342.
- Clavel, F., Guétard, D., Brun-Vézinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., and Rouzioux, C. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science *233*, 343–346.
- Cohen, K.W., and Frahm, N. (2017). Current views on the potential for development of a HIV vaccine. Expert Opin Biol Ther *17*, 295–303.
- Colonna, M. (2006). Cytolytic responses: cadherins put out the fire. J. Exp. Med. *203*, 261–264.
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., and Caligiuri, M.A. (2001a). The biology of human natural killer-cell subsets. Trends Immunol. *22*, 633–640.
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Turner, S.C., Chen, K.S., Ghaheri, B.A., Ghayur, T., Carson, W.E., and Caligiuri, M.A. (2001b). Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. Blood *97*, 3146–3151.
- Corti, D., and Lanzavecchia, A. (2013). Broadly neutralizing antiviral antibodies. Annu. Rev. Immunol. *31*, 705–742.
- Cosgrove, C., Berger, C.T., Kroy, D.C., Cheney, P.C., Ghebremichael, M., Aneja, J., Tomlinson, M., Kim, A.Y., Lauer, G.M., and Alter, G. (2014). Chronic HCV infection affects the NK cell phenotype in the blood more than in the liver. PLoS ONE *9*, e105950.
- Crotta, S., Stilla, A., Wack, A., D'Andrea, A., Nuti, S., D'Oro, U., Mosca, M., Filliponi, F., Brunetto, R.M., Bonino, F., et al. (2002). Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. J. Exp. Med. *195*, 35–41.
- Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Mechanisms of granule-dependent killing. Cell Death Differ. *15*, 251–262.
- Cummings, K.L., Rosen, H.R., and Hahn, Y.S. (2009). Frequency of gC1qR+CD4+ T cells increases during acute hepatitis C virus infection and remains elevated in patients with chronic infection. Clin. Immunol. *132*, 401–411.
- D'arc, M., Ayouba, A., Esteban, A., Learn, G.H., Boué, V., Liegeois, F., Etienne, L., Tagg, N., Leendertz, F.H., Boesch, C., et al. (2015). Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *112*, E1343–1352.
- Declercq, W., Denecker, G., Fiers, W., and Vandenabeele, P. (1998). Cooperation of both TNF receptors in inducing apoptosis: involvement of the TNF receptor-associated factor binding domain of the TNF receptor 75. J. Immunol. *161*, 390–399.
- Delahaye, N.F., Rusakiewicz, S., Martins, I., Ménard, C., Roux, S., Lyonnet, L., Paul, P., Sarabi, M., Chaput, N., Semeraro, M., et al. (2011). Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. Nature Medicine *17*, 700–707.

- Dembitzer, F.R., Kinoshita, Y., Burstein, D., Phelps, R.G., Beasley, M.B., Garcia, R., Harpaz, N., Jaffer, S., Thung, S.N., Unger, P.D., et al. (2012). gC1qR expression in normal and pathologic human tissues: differential expression in tissues of epithelial and mesenchymal origin. J. Histochem. Cytochem. *60*, 467–474.
- Descours, B., Cribier, A., Chable-Bessia, C., Ayinde, D., Rice, G., Crow, Y., Yatim, A., Schwartz, O., Laguette, N., and Benkirane, M. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4(+) T-cells. Retrovirology *9*, 87.
- Descours, B., Petitjean, G., López-Zaragoza, J.-L., Bruel, T., Raffel, R., Psomas, C., Reynes, J., Lacabaratz, C., Levy, Y., Schwartz, O., et al. (2017). CD32a is a marker of a CD4 T-cell HIV reservoir harbouring replication-competent proviruses. Nature *543*, 564–567.
- Devasthanam, A.S. (2014). Mechanisms underlying the inhibition of interferon signaling by viruses. Virulence *5*, 270–277.
- Doria-Rose, N.A., Klein, R.M., Daniels, M.G., O'Dell, S., Nason, M., Lapedes, A., Bhattacharya, T., Migueles, S.A., Wyatt, R.T., Korber, B.T., et al. (2010). Breadth of human immunodeficiency virus-specific neutralizing activity in sera: clustering analysis and association with clinical variables. J. Virol. *84*, 1631–1636.
- Dugast, A.-S., Arnold, K., Lofano, G., Moore, S., Hoffner, M., Simek, M., Poignard, P., Seaman, M., Suscovich, T.J., Pereyra, F., et al. (2017). Virus-driven Inflammation Is Associated With the Development of bNAbs in Spontaneous Controllers of HIV. Clin. Infect. Dis. *64*, 1098–1104.
- Edwards, J.C.W., Szczepanski, L., Szechinski, J., Filipowicz-Sosnowska, A., Emery, P., Close, D.R., Stevens, R.M., and Shaw, T. (2004). Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. N. Engl. J. Med. *350*, 2572–2581.
- Engelman, A., and Cherepanov, P. (2012). The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. Nature Reviews Microbiology *10*, 279–290.
- Faria, N.R., Rambaut, A., Suchard, M.A., Baele, G., Bedford, T., Ward, M.J., Tatem, A.J., Sousa, J.D., Arinaminpathy, N., Pépin, J., et al. (2014). HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. Science *346*, 56–61.
- Fauriat, C., Long, E.O., Ljunggren, H.-G., and Bryceson, Y.T. (2010). Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. Blood *115*, 2167–2176.
- Fausther-Bovendo, H., Wauquier, N., Cherfils-Vicini, J., Cremer, I., Debré, P., and Vieillard, V. (2008). NKG2C is a major triggering receptor involved in the V[delta]1 T cell-mediated cytotoxicity against HIV-infected CD4 T cells. AIDS *22*, 217–226.
- Fausther-Bovendo, H., Sol-Foulon, N., Candotti, D., Agut, H., Schwartz, O., Debré, P., and Vieillard, V. (2009). HIV escape from natural killer cytotoxicity: nef inhibits NKp44L expression on CD4+ T cells. AIDS *23*, 1077–1087.
- Fausther-Bovendo, H., Vieillard, V., Sagan, S., Bismuth, G., and Debré, P. (2010). HIV gp41 engages gC1qR on CD4+ T cells to induce the expression of an NK ligand through the PIP3/H2O2 pathway. PLoS Pathog. *6*, e1000975.
- Fehniger, T.A., Shah, M.H., Turner, M.J., VanDeusen, J.B., Whitman, S.P., Cooper, M.A., Suzuki, K., Wechser, M., Goodsaid, F., and Caligiuri, M.A. (1999). Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. J. Immunol. *162*, 4511–4520.
- Fernandes, S.M., Pires, A.R., Matoso, P., Ferreira, C., Nunes-Cabaço, H., Correia, L.,

Valadas, E., Poças, J., Pacheco, P., Veiga-Fernandes, H., et al. (2017). HIV-2 infection is associated with preserved GALT homeostasis and epithelial integrity despite ongoing mucosal viral replication. Mucosal Immunol.

- Frazier, A.D., Zhang, C.L., Ni, L., Ma, C.J., Zhang, Y., Wu, X.Y., Atia, A.N., Yao, Z.Q., and Moorman, J.P. (2010). Programmed death-1 affects suppressor of cytokine signaling-1 expression in T cells during hepatitis C infection. Viral Immunol. *23*, 487–495.
- Freed, E.O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. Nature Reviews Microbiology *13*, 484–496.
- Freud, A.G., and Caligiuri, M.A. (2006). Human natural killer cell development. Immunol. Rev. *214*, 56–72.
- Freund, N.T., Wang, H., Scharf, L., Nogueira, L., Horwitz, J.A., Bar-On, Y., Golijanin, J., Sievers, S.A., Sok, D., Cai, H., et al. (2017). Coexistence of potent HIV-1 broadly neutralizing antibodies and antibody-sensitive viruses in a viremic controller. Science Translational Medicine *9*, eaal2144.
- Fugier, E., Marche, H., Thélu, M.-A., Macek Jílková, Z., Van Campenhout, N., Dufeu-Duchesne, T., Leroy, V., Zarski, J.-P., Sturm, N., Marche, P.N., et al. (2014). Functions of liver natural killer cells are dependent on the severity of liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. PLoS ONE *9*, e95614.
- Fukuhara, T., Ono, C., Puig-Basagoiti, F., and Matsuura, Y. (2015). Roles of Lipoproteins and Apolipoproteins in Particle Formation of Hepatitis C Virus. Trends in Microbiology *23*, 618–629.
- Gallo, R.C. (2006). A reflection on HIV/AIDS research after 25 years. Retrovirology *3*, 72.
- Garber, D.A., Silvestri, G., Barry, A.P., Fedanov, A., Kozyr, N., McClure, H., Montefiori, D.C., Larsen, C.P., Altman, J.D., Staprans, S.I., et al. (2004). Blockade of T cell costimulation reveals interrelated actions of CD4+ and CD8+ T cells in control of SIV replication. J. Clin. Invest. *113*, 836–845.
- Gather, T., Walter, S., Todt, D., Pfaender, S., Brown, R.J.P., Postel, A., Becher, P., Moritz, A., Hansmann, F., Baumgaertner, W., et al. (2016). Vertical transmission of hepatitis C virus-like non-primate hepacivirus in horses. J. Gen. Virol. *97*, 2540–2551.
- Ghebrehiwet, B., Lim, B.L., Peerschke, E.I., Willis, A.C., and Reid, K.B. (1994). Isolation, cDNA cloning, and overexpression of a 33-kD cell surface glycoprotein that binds to the globular "heads" of C1q. J. Exp. Med. *179*, 1809–1821.
- Gilmour, K.C., Fujii, H., Cranston, T., Davies, E.G., Kinnon, C., and Gaspar, H.B. (2001). Defective expression of the interleukin-2/interleukin-15 receptor beta subunit leads to a natural killer cell-deficient form of severe combined immunodeficiency. Blood *98*, 877–879.
- Van Gils, M.J., Bunnik, E.M., Burger, J.A., Jacob, Y., Schweighardt, B., Wrin, T., and Schuitemaker, H. (2010). Rapid escape from preserved cross-reactive neutralizing humoral immunity without loss of viral fitness in HIV-1-infected progressors and long-term nonprogressors. J. Virol. *84*, 3576–3585.
- Golden-Mason, L., and Rosen, H.R. (2013). Natural killer cells: multifaceted players with key roles in hepatitis C immunity. Immunol. Rev. *255*, 68–81.
- Golden-Mason, L., Cox, A.L., Randall, J.A., Cheng, L., and Rosen, H.R. (2010). Increased natural killer cell cytotoxicity and NKp30 expression protects against hepatitis C virus infection in high-risk individuals and inhibits replication in vitro. Hepatology *52*, 1581–1589.
- Gonzalez, V.D., Falconer, K., Björkström, N.K., Blom, K.G., Weiland, O., Ljunggren,

H.-G., Alaeus, A., and Sandberg, J.K. (2009). Expansion of functionally skewed CD56-negative NK cells in chronic hepatitis C virus infection: correlation with outcome of pegylated IFN-alpha and ribavirin treatment. J. Immunol. *183*, 6612–6618.

- Gottlieb, G.S., Hawes, S.E., Agne, H.D., Stern, J.E., Critchlow, C.W., Kiviat, N.B., and Sow, P.S. (2006). Lower levels of HIV RNA in semen in HIV-2 compared with HIV-1 infection: implications for differences in transmission. AIDS *20*, 895–900.
- Gower, E., Estes, C., Blach, S., Razavi-Shearer, K., and Razavi, H. (2014). Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. J. Hepatol. *61*, S45–57.
- Grabar, S., Selinger-Leneman, H., Abgrall, S., Pialoux, G., Weiss, L., and Costagliola, D. (2009). Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV. AIDS *23*, 1163–1169.
- Grebely, J., Dore, G.J., Morin, S., Rockstroh, J.K., and Klein, M.B. (2017). Elimination of HCV as a public health concern among people who inject drugs by 2030 - What will it take to get there? J Int AIDS Soc *20*, 1–8.
- Greene, W.C. (2007). A history of AIDS: looking back to see ahead. Eur. J. Immunol. *37 Suppl 1*, S94–102.
- Guiguet, M., Boué, F., Cadranel, J., Lang, J.-M., Rosenthal, E., Costagliola, D., and Clinical Epidemiology Group of the FHDH-ANRS CO4 cohort (2009). Effect of immunodeficiency, HIV viral load, and antiretroviral therapy on the risk of individual malignancies (FHDH-ANRS CO4): a prospective cohort study. Lancet Oncol. *10*, 1152–1159.
- Gurdasani, D., Iles, L., Dillon, D.G., Young, E.H., Olson, A.D., Naranbhai, V., Fidler, S., Gkrania-Klotsas, E., Post, F.A., Kellam, P., et al. (2014). A systematic review of definitions of extreme phenotypes of HIV control and progression. AIDS *28*, 149–162.
- Guyader, M., Emerman, M., Sonigo, P., Clavel, F., Montagnier, L., and Alizon, M. (1987). Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. Nature *326*, 662–669.
- Hajarizadeh, B., Grebely, J., and Dore, G.J. (2013). Epidemiology and natural history of HCV infection. Nat Rev Gastroenterol Hepatol *10*, 553–562.
- Hatziioannou, T., Del Prete, G.Q., Keele, B.F., Estes, J.D., McNatt, M.W., Bitzegeio, J., Raymond, A., Rodriguez, A., Schmidt, F., Mac Trubey, C., et al. (2014). HIV-1-induced AIDS in monkeys. Science *344*, 1401–1405.
- Heim, M.H. (2013). 25 years of interferon-based treatment of chronic hepatitis C: an epoch coming to an end. Nat. Rev. Immunol. *13*, 535–542.
- Hendricks, D.W., Balfour, H.H., Dunmire, S.K., Schmeling, D.O., Hogquist, K.A., and Lanier, L.L. (2014). Cutting edge: NKG2C(hi)CD57+ NK cells respond specifically to acute infection with cytomegalovirus and not Epstein-Barr virus. J. Immunol. *192*, 4492–4496.
- Hengst, J., Falk, C.S., Schlaphoff, V., Deterding, K., Manns, M.P., Cornberg, M., and Wedemeyer, H. (2016). Direct-Acting Antiviral-Induced Hepatitis C Virus Clearance Does Not Completely Restore the Altered Cytokine and Chemokine Milieu in Patients With Chronic Hepatitis C. J. Infect. Dis. *214*, 1965–1974.
- Hershkovitz, O., Rosental, B., Rosenberg, L.A., Navarro-Sanchez, M.E., Jivov, S., Zilka, A., Gershoni-Yahalom, O., Brient-Litzler, E., Bedouelle, H., Ho, J.W., et al. (2009). NKp44 Receptor Mediates Interaction of the Envelope Glycoproteins from the West Nile and Dengue Viruses with NK Cells. The Journal of Immunology *183*, 2610–2621.

- Hertoghs, N., Geijtenbeek, T.B.H., and Ribeiro, C.M.S. (2017). Interplay between HIV-1 innate sensing and restriction in mucosal dendritic cells: balancing defense and viral transmission. Current Opinion in Virology *22*, 112–119.
- Holder, K.A., Stapleton, S.N., Gallant, M.E., Russell, R.S., and Grant, M.D. (2013). Hepatitis C Virus-Infected Cells Downregulate NKp30 and Inhibit Ex Vivo NK Cell Functions. The Journal of Immunology *191*, 3308–3318.
- Horowitz, A., Strauss-Albee, D.M., Leipold, M., Kubo, J., Nemat-Gorgani, N., Dogan, O.C., Dekker, C.L., Mackey, S., Maecker, H., Swan, G.E., et al. (2013). Genetic and environmental determinants of human NK cell diversity revealed by mass cytometry. Sci Transl Med *5*, 208ra145.
- Houchins, J.P., Yabe, T., McSherry, C., and Bach, F.H. (1991). DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. J. Exp. Med. *173*, 1017–1020.
- Houghton, M. (2009). Discovery of the hepatitis C virus. Liver Int. *29 Suppl 1*, 82–88.
- Houghton, M. (2011). Prospects for prophylactic and therapeutic vaccines against the hepatitis C viruses: HCV vaccines. Immunological Reviews *239*, 99–108.
- Hraber, P., Seaman, M.S., Bailer, R.T., Mascola, J.R., Montefiori, D.C., and Korber, B.T. (2014). Prevalence of broadly neutralizing antibody responses during chronic HIV-1 infection. AIDS *28*, 163–169.
- Huang, J., Kang, B.H., Pancera, M., Lee, J.H., Tong, T., Feng, Y., Imamichi, H., Georgiev, I.S., Chuang, G.-Y., Druz, A., et al. (2014). Broad and potent HIV-1 neutralization by a human antibody that binds the gp41-gp120 interface. Nature *515*, 138–142.
- Hudspeth, K., Silva-Santos, B., and Mavilio, D. (2013). Natural cytotoxicity receptors: broader expression patterns and functions in innate and adaptive immune cells. Front Immunol *4*, 69.
- Huot, N., Jacquelin, B., Garcia-Tellez, T., Rascle, P., Ploquin, M.J., Madec, Y., Reeves, R.K., Derreudre-Bosquet, N., and Müller-Trutwin, M. (2017). Natural killer cells migrate into and control simian immunodeficiency virus replication in lymph node follicles in African green monkeys. Nat. Med.
- Hütter, G., Nowak, D., Mossner, M., Ganepola, S., Müssig, A., Allers, K., Schneider, T., Hofmann, J., Kücherer, C., Blau, O., et al. (2009). Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. N. Engl. J. Med. *360*, 692–698.
- Iwai, A., Marusawa, H., Takada, Y., Egawa, H., Ikeda, K., Nabeshima, M., Uemoto, S., and Chiba, T. (2006). Identification of novel defective HCV clones in liver transplant recipients with recurrent HCV infection. Journal of Viral Hepatitis *13*, 523–531.
- Joncker, N.T., and Raulet, D.H. (2008). Regulation of NK cell responsiveness to achieve self-tolerance and maximal responses to diseased target cells. Immunol. Rev. *224*, 85–97.
- Jonjic, S. (2010). Functional plasticity and robustness are essential characteristics of biological systems: lessons learned from KLRG1-deficient mice. Eur. J. Immunol. *40*, 1241–1243.
- Jost, S., and Altfeld, M. (2012). Evasion from NK cell-mediated immune responses by HIV-1. Microbes Infect. *14*, 904–915.
- Jost, S., and Altfeld, M. (2013). Control of human viral infections by natural killer cells. Annu. Rev. Immunol. *31*, 163–194.
- Ju, Y., Hou, N., Meng, J., Wang, X., Zhang, X., Zhao, D., Liu, Y., Zhu, F., Zhang, L., Sun, W., et al. (2010). T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing

molecule-3 (Tim-3) mediates natural killer cell suppression in chronic hepatitis B. J. Hepatol. *52*, 322–329.

- Kared, H., Martelli, S., Ng, T.P., Pender, S.L.F., and Larbi, A. (2016). CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes. Cancer Immunol. Immunother. *65*, 441–452.
- Katlama, C., Deeks, S.G., Autran, B., Martinez-Picado, J., Van Lunzen, J., Rouzioux, C., Miller, M., Vella, S., Schmitz, J.E., Ahlers, J., et al. (2013). Barriers to a cure for HIV: new ways to target and eradicate HIV-1 reservoirs. Lancet *381*, 2109–2117.
- Katsarou, K., Serti, E., Tsitoura, P., Lavdas, A.A., Varaklioti, A., Pickl-Herk, A.-M., Blaas, D., Oz-Arslan, D., Zhu, R., Hinterdorfer, P., et al. (2009). Green fluorescent protein – Tagged HCV non-enveloped capsid like particles: Development of a new tool for tracking HCV core uptake. Biochimie *91*, 903–915.
- Keele, B.F., Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M.L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y., Wain, L.V., Liegeois, F., et al. (2006). Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. Science *313*, 523–526.
- Khasawneh, A.I., Laumaea, A., Harrison, D.N., Bellamy-McIntyre, A.K., Drummer, H.E., and Poumbourios, P. (2013). Forced virus evolution reveals functional crosstalk between the disulfide bonded region and membrane proximal ectodomain region of HIV-1 gp41. Retrovirology *10*, 44.
- Khelef, N., Lecuit, M., Bierne, H., and Cossart, P. (2006). Species specificity of the Listeria monocytogenes InlB protein. Cell. Microbiol. *8*, 457–470.
- Kim, J.H., Excler, J.-L., and Michael, N.L. (2015). Lessons from the RV144 Thai phase III HIV-1 vaccine trial and the search for correlates of protection. Annu. Rev. Med. *66*, 423–437.
- Kinashi, T. (2005). Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. Nat. Rev. Immunol. *5*, 546–559.
- Kirchhoff, F. (2010). Immune Evasion and Counteraction of Restriction Factors by HIV-1 and Other Primate Lentiviruses. Cell Host & Microbe *8*, 55–67.
- Kittlesen, D.J., Chianese-Bullock, K.A., Yao, Z.Q., Braciale, T.J., and Hahn, Y.S. (2000). Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. J. Clin. Invest. *106*, 1239–1249.
- Kong, R., Li, H., Bibollet-Ruche, F., Decker, J.M., Zheng, N.N., Gottlieb, G.S., Kiviat, N.B., Sow, P.S., Georgiev, I., Hahn, B.H., et al. (2012). Broad and potent neutralizing antibody responses elicited in natural HIV-2 infection. J. Virol. *86*, 947–960.
- Krämer, B., Körner, C., Kebschull, M., Glässner, A., Eisenhardt, M., Nischalke, H.-D., Alexander, M., Sauerbruch, T., Spengler, U., and Nattermann, J. (2012). Natural killer p46High expression defines a natural killer cell subset that is potentially involved in control of hepatitis C virus replication and modulation of liver fibrosis. Hepatology *56*, 1201–1213.
- Kruse, P.H., Matta, J., Ugolini, S., and Vivier, E. (2014). Natural cytotoxicity receptors and their ligands. Immunol. Cell Biol. *92*, 221–229.
- Kulkarni, A., Kurle, S., Shete, A., Ghate, M., Godbole, S., Madhavi, V., Kent, S.J., Paranjape, R., and Thakar, M. (2017). Indian Long-term Non-Progressors Show Broad ADCC Responses with Preferential Recognition of V3 Region of Envelope and a Region from Tat Protein. Front Immunol *8*, 5.
- Kulkarni, S., Martin, M.P., and Carrington, M. (2008). The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. Semin. Immunol. *20*, 343–352.
- Kwong, P.D., Mascola, J.R., and Nabel, G.J. (2013). Broadly neutralizing antibodies and the search for an HIV-1 vaccine: the end of the beginning. Nature Reviews

Immunology *13*, 693–701.

- Laguette, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringeard, M., Chable-Bessia, C., Ségéral, E., Yatim, A., Emiliani, S., Schwartz, O., and Benkirane, M. (2011). SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. Nature *474*, 654–657.
- Lanier, L.L. (2005). NK cell recognition. Annu. Rev. Immunol. *23*, 225–274.
- Lanier, L.L., Chang, C., and Phillips, J.H. (1994). Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. J. Immunol. *153*, 2417–2428.
- Large, M.K., Kittlesen, D.J., and Hahn, Y.S. (1999). Suppression of host immune response by the core protein of hepatitis C virus: possible implications for hepatitis C virus persistence. J. Immunol. *162*, 931–938.
- Lee, J.H., Ozorowski, G., and Ward, A.B. (2016). Cryo-EM structure of a native, fully glycosylated, cleaved HIV-1 envelope trimer. Science *351*, 1043–1048.
- Leroux-Roels, G., Maes, C., Clement, F., Van Engelenburg, F., Van den Dobbelsteen, M., Adler, M., Amacker, M., Lopalco, L., Bomsel, M., Chalifour, A., et al. (2013). Randomized Phase I: Safety, Immunogenicity and Mucosal Antiviral Activity in Young Healthy Women Vaccinated with HIV-1 Gp41 P1 Peptide on Virosomes. PLoS ONE *8*, e55438.
- Lewis, G.K., DeVico, A.L., and Gallo, R.C. (2014). Antibody persistence and T-cell balance: two key factors confronting HIV vaccine development. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *111*, 15614–15621.
- Li, Y., and Mariuzza, R.A. (2014). Structural basis for recognition of cellular and viral ligands by NK cell receptors. Front Immunol *5*, 123.
- Li, Y.-P., Ramirez, S., Jensen, S.B., Purcell, R.H., Gottwein, J.M., and Bukh, J. (2012). Highly efficient full-length hepatitis C virus genotype 1 (strain TN) infectious culture system. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *109*, 19757–19762.
- Liang, T.J. (2013). Current progress in development of hepatitis C virus vaccines. Nat. Med. *19*, 869–878.
- Lindenbach, B.D., and Rice, C.M. (2013). The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. Nat. Rev. Microbiol. *11*, 688–700.
- Liu, Z.-X., Nishida, H., He, J.-W., Lai, M.M.C., Feng, N., and Dennert, G. (2002). Hepatitis C virus genotype 1b core protein does not exert immunomodulatory effects on virus-induced cellular immunity. J. Virol. *76*, 990–997.
- Llibre, A., Klenerman, P., and Willberg, C.B. (2016). Multi-functional lectin-like transcript-1: A new player in human immune regulation. Immunol. Lett. *177*, 62–69.
- Long, E.O., Kim, H.S., Liu, D., Peterson, M.E., and Rajagopalan, S. (2013). Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. Annu. Rev. Immunol. *31*, 227–258.
- Lorenzo-Redondo, R., Fryer, H.R., Bedford, T., Kim, E.-Y., Archer, J., Pond, S.L.K., Chung, Y.-S., Penugonda, S., Chipman, J., Fletcher, C.V., et al. (2016). Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. Nature *530*, 51–56.
- Madhavi, V., Wines, B.D., Amin, J., Emery, S., ENCORE1 Study Group, Lopez, E., Kelleher, A., Sydney LTNP Study Group, Center, R.J., Hogarth, P.M., et al. (2017). HIV-1 Env- and Vpu-Specific Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Responses Associated with Elite Control of HIV. Journal of Virology *91*, e00700–17.
- Maghazachi, A.A. (2010). Role of chemokines in the biology of natural killer cells. Curr. Top. Microbiol. Immunol. *341*, 37–58.
- Maher, S.G., Romero-Weaver, A.L., Scarzello, A.J., and Gamero, A.M. (2007).

Interferon: cellular executioner or white knight? Curr. Med. Chem. *14*, 1279–1289.

- Maillard, P., Krawczynski, K., Nitkiewicz, J., Bronnert, C., Sidorkiewicz, M., Gounon, P., Dubuisson, J., Faure, G., Crainic, R., and Budkowska, A. (2001). Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. J. Virol. *75*, 8240–8250.
- Makvandi-Nejad, S., and Rowland-Jones, S. (2015). How does the humoral response to HIV-2 infection differ from HIV-1 and can this explain the distinct natural history of infection with these two human retroviruses? Immunol. Lett. *163*, 69–75.
- Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T.I., Bushkin, Y., Davis, D.M., Strominger, J.L., Yewdell, J.W., and Porgador, A. (2001). Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. Nature *409*, 1055–1060.
- Manickam, C., Rajakumar, P., Wachtman, L., Kramer, J.A., Martinot, A.J., Varner, V., Giavedoni, L.D., and Reeves, R.K. (2016). Acute Liver Damage Associated with Innate Immune Activation in a Small Nonhuman Primate Model of Hepacivirus Infection. J. Virol. *90*, 9153–9162.
- Markov, P.V., Pepin, J., Frost, E., Deslandes, S., Labbé, A.-C., and Pybus, O.G. (2009). Phylogeography and molecular epidemiology of hepatitis C virus genotype 2 in Africa. J. Gen. Virol. *90*, 2086–2096.
- Martin, G., Pace, M., Thornhill, J., Phetsouphanh, C., Meyerowitz, J., Gossez, M., Hopkins, E., Brown, H., Robinson, N., Olejniczak, N., et al. (2017). Enrichment of the HIV reservoir in CD32+ CD4 T cells occurs early in blood and tissue.
- Matoba, N., Geyer, B.C., Kilbourne, J., Alfsen, A., Bomsel, M., and Mor, T.S. (2006). Humoral immune responses by prime-boost heterologous route immunizations with CTB-MPR(649-684), a mucosal subunit HIV/AIDS vaccine candidate. Vaccine *24*, 5047–5055.
- Matoba, N., Griffin, T.A., Mittman, M., Doran, J.D., Alfsen, A., Montefiori, D.C., Hanson, C.V., Bomsel, M., and Mor, T.S. (2008). Transcytosis-blocking abs elicited by an oligomeric immunogen based on the membrane proximal region of HIV-1 gp41 target non-neutralizing epitopes. Curr. HIV Res. *6*, 218–229.
- Matusali, G., Potestà, M., Santoni, A., Cerboni, C., and Doria, M. (2012). The human immunodeficiency virus type 1 Nef and Vpu proteins downregulate the natural killer cell-activating ligand PVR. J. Virol. *86*, 4496–4504.
- Mavilio, D., Lombardo, G., Benjamin, J., Kim, D., Follman, D., Marcenaro, E., O'Shea, M.A., Kinter, A., Kovacs, C., Moretta, A., et al. (2005). Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *102*, 2886–2891.
- McMichael, A.J., Borrow, P., Tomaras, G.D., Goonetilleke, N., and Haynes, B.F. (2010). The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. Nature Reviews Immunology *10*, 11–23.
- Mikell, I., Sather, D.N., Kalams, S.A., Altfeld, M., Alter, G., and Stamatatos, L. (2011). Characteristics of the earliest cross-neutralizing antibody response to HIV-1. PLoS Pathog. *7*, e1001251.
- Mikulak, J., Di Vito, C., Zaghi, E., and Mavilio, D. (2017). Host Immune Responses in HIV-1 Infection: The Emerging Pathogenic Role of Siglecs and Their Clinical Correlates. Front Immunol *8*, 314.
- Miller, M.M. (2017). Sofosbuvir-velpatasvir: A single-tablet treatment for hepatitis C infection of all genotypes. Am J Health Syst Pharm *74*, 1045–1052.
- Molfetta, R., Quatrini, L., Santoni, A., and Paolini, R. (2017). Regulation of NKG2D-

Dependent NK Cell Functions: The Yin and the Yang of Receptor Endocytosis. Int J Mol Sci *18*.

- Lo Monaco, E., Tremante, E., Cerboni, C., Melucci, E., Sibilio, L., Zingoni, A., Nicotra, M.R., Natali, P.G., and Giacomini, P. (2011). Human leukocyte antigen E contributes to protect tumor cells from lysis by natural killer cells. Neoplasia *13*, 822–830.
- Mondelli, M.U., Varchetta, S., and Oliviero, B. (2010). Natural killer cells in viral hepatitis: facts and controversies. Eur. J. Clin. Invest. *40*, 851–863.
- Montoya, C.J., Velilla, P.A., Chougnet, C., Landay, A.L., and Rugeles, M.T. (2006). Increased IFN-gamma production by NK and CD3+/CD56+ cells in sexually HIV-1-exposed but uninfected individuals. Clin. Immunol. *120*, 138–146.
- Munro, J.B., Gorman, J., Ma, X., Zhou, Z., Arthos, J., Burton, D.R., Koff, W.C., Courter, J.R., Smith, A.B., Kwong, P.D., et al. (2014). Conformational dynamics of single HIV-1 envelope trimers on the surface of native virions. Science *346*, 759–763.
- Nagler, A., Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1988). The effects of IL-4 on human natural killer cells. A potent regulator of IL-2 activation and proliferation. J. Immunol. *141*, 2349–2351.
- Nagler, A., Lanier, L.L., Cwirla, S., and Phillips, J.H. (1989). Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. J. Immunol. *143*, 3183–3191.
- Nagler, A., Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1990). Constitutive expression of high affinity interleukin 2 receptors on human CD16-natural killer cells in vivo. J. Exp. Med. *171*, 1527–1533.
- Narni-Mancinelli, E., Gauthier, L., Baratin, M., Guia, S., Fenis, A., Deghmane, A.-E., Rossi, B., Fourquet, P., Escalière, B., Kerdiles, Y.M., et al. (2017). Complement factor P is a ligand for the natural killer cell-activating receptor NKp46. Sci Immunol *2*.
- Ndongo-Thiam, N., Berthillon, P., Errazuriz, E., Bordes, I., De Sequeira, S., Trépo, C., and Petit, M.-A. (2011). Long-term propagation of serum hepatitis C virus (HCV) with production of enveloped HCV particles in human HepaRG hepatocytes. Hepatology *54*, 406–417.
- Nicoll, G., Avril, T., Lock, K., Furukawa, K., Bovin, N., and Crocker, P.R. (2003). Ganglioside GD3 expression on target cells can modulate NK cell cytotoxicity via siglec-7-dependent and -independent mechanisms. Eur. J. Immunol. *33*, 1642–1648.
- Nikolopoulos, G.K., Christaki, E., Paraskevis, D., and Bonovas, S. (2017). Pre-Exposure Prophylaxis for HIV: Evidence and Perspectives. Curr. Pharm. Des. *23*, 2579–2591.
- Nisole, S., and Saïb, A. (2004). Early steps of retrovirus replicative cycle. Retrovirology *1*, 9.
- Nuvor, S.V., Van der Sande, M., Rowland-Jones, S., Whittle, H., and Jaye, A. (2006). Natural killer cell function is well preserved in asymptomatic human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infection but similar to that of HIV-1 infection when CD4 T-cell counts fall. J. Virol. *80*, 2529–2538.
- Nyamweya, S., Hegedus, A., Jaye, A., Rowland-Jones, S., Flanagan, K.L., and Macallan, D.C. (2013). Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. Rev. Med. Virol. *23*, 221–240.
- O'Hagan, D.T., Ott, G.S., De Gregorio, E., and Seubert, A. (2012). The mechanism of action of MF59 - an innately attractive adjuvant formulation. Vaccine *30*, 4341–4348.
- O'Leary, J.G., Goodarzi, M., Drayton, D.L., and Von Andrian, U.H. (2006). T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. Nat. Immunol. *7*, 507–516.

- Okoye, A.A., and Picker, L.J. (2013). CD4(+) T-cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure. Immunol. Rev. *254*, 54–64.
- Oliviero, B., Varchetta, S., Paudice, E., Michelone, G., Zaramella, M., Mavilio, D., De Filippi, F., Bruno, S., and Mondelli, M.U. (2009). Natural killer cell functional dichotomy in chronic hepatitis B and chronic hepatitis C virus infections. Gastroenterology *137*, 1151–1160, 1160.e1–7.
- Orr, M.T., and Lanier, L.L. (2010). Natural Killer Cell Education and Tolerance. Cell *142*, 847–856.
- Osburn, W.O., Snider, A.E., Wells, B.L., Latanich, R., Bailey, J.R., Thomas, D.L., Cox, A.L., and Ray, S.C. (2014). Clearance of hepatitis C infection is associated with the early appearance of broad neutralizing antibody responses. Hepatology *59*, 2140–2151.
- Pancera, M., Zhou, T., Druz, A., Georgiev, I.S., Soto, C., Gorman, J., Huang, J., Acharya, P., Chuang, G.-Y., Ofek, G., et al. (2014). Structure and immune recognition of trimeric pre-fusion HIV-1 Env. Nature *514*, 455–461.
- Parikh, U.M., and Mellors, J.W. (2016). Should we fear resistance from tenofovir/emtricitabine preexposure prophylaxis?: Current Opinion in HIV and AIDS *11*, 49–55.
- Park, S.-H., and Rehermann, B. (2014). Immune responses to HCV and other hepatitis viruses. Immunity *40*, 13–24.
- Parris, G.E. (2007). How did the ancestral HIV-1 group M retrovirus get to Leopoldville from southeastern Cameroon? Med. Hypotheses *69*, 1098–1101.
- Paust, S., Blish, C.A., and Reeves, R.K. (2017). Redefining Memory: Building the Case for Adaptive NK Cells. Journal of Virology *91*, e00169–17.
- Pazina, T., Shemesh, A., Brusilovsky, M., Porgador, A., and Campbell, K.S. (2017). Regulation of the Functions of Natural Cytotoxicity Receptors by Interactions with Diverse Ligands and Alterations in Splice Variant Expression. Front Immunol *8*, 369.
- Pednekar, L., Valentino, A., Ji, Y., Tumma, N., Valentino, C., Kadoor, A., Hosszu, K.K., Ramadass, M., Kew, R.R., Kishore, U., et al. (2016). Identification of the gC1qR sites for the HIV-1 viral envelope protein gp41 and the HCV core protein: Implications in viral-specific pathogenesis and therapy. Mol. Immunol. *74*, 18–26.
- Peerschke, E.I., and Ghebrehiwet, B. (2001). Human blood platelet gC1qR/p33. Immunol. Rev. *180*, 56–64.
- Peeters, M., Courgnaud, V., Abela, B., Auzel, P., Pourrut, X., Bibollet-Ruche, F., Loul, S., Liegeois, F., Butel, C., Koulagna, D., et al. (2002). Risk to human health from a plethora of simian immunodeficiency viruses in primate bushmeat. Emerging Infect. Dis. *8*, 451–457.
- Peeters, M., D'Arc, M., and Delaporte, E. (2014). Origin and diversity of human retroviruses. AIDS Rev *16*, 23–34.
- Pembroke, T., Christian, A., Jones, E., Hills, R.K., Wang, E.C.Y., Gallimore, A.M., and Godkin, A. (2014). The paradox of NKp46+ natural killer cells: drivers of severe hepatitis C virus-induced pathology but in-vivo resistance to interferon α treatment. Gut *63*, 515–524.
- Pende, D., Spaggiari, G.M., Marcenaro, S., Martini, S., Rivera, P., Capobianco, A., Falco, M., Lanino, E., Pierri, I., Zambello, R., et al. (2005). Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). Blood *105*, 2066–2073.
- Pende, D., Castriconi, R., Romagnani, P., Spaggiari, G.M., Marcenaro, S., Dondero,

A., Lazzeri, E., Lasagni, L., Martini, S., Rivera, P., et al. (2006). Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: relevance for natural killer-dendritic cell interaction. Blood *107*, 2030–2036.

- Pesce, S., Greppi, M., Tabellini, G., Rampinelli, F., Parolini, S., Olive, D., Moretta, L., Moretta, A., and Marcenaro, E. (2017). Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: A phenotypic and functional characterization. J. Allergy Clin. Immunol. *139*, 335–346.e3.
- Petitdemange, C., Becquart, P., Wauquier, N., Béziat, V., Debré, P., Leroy, E.M., and Vieillard, V. (2011). Unconventional repertoire profile is imprinted during acute chikungunya infection for natural killer cells polarization toward cytotoxicity. PLoS Pathog. *7*, e1002268.
- Petitdemange, C., Achour, A., Dispinseri, S., Malet, I., Sennepin, A., Ho Tsong Fang, R., Crouzet, J., Marcelin, A.-G., Calvez, V., Scarlatti, G., et al. (2013). A single amino-acid change in a highly conserved motif of gp41 elicits HIV-1 neutralization and protects against CD4 depletion. Clin. Infect. Dis. *57*, 745–755.
- Pfaender, S., Walter, S., Grabski, E., Todt, D., Bruening, J., Romero-Brey, I., Gather, T., Brown, R.J.P., Hahn, K., Puff, C., et al. (2017). Immune protection against reinfection with nonprimate hepacivirus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *114*, E2430–E2439.
- Pichichero, M.E. (2013). Protein carriers of conjugate vaccines: characteristics, development, and clinical trials. Hum Vaccin Immunother *9*, 2505–2523.
- Piver, E., Boyer, A., Gaillard, J., Bull, A., Beaumont, E., Roingeard, P., and Meunier, J.-C. (2017). Ultrastructural organisation of HCV from the bloodstream of infected patients revealed by electron microscopy after specific immunocapture. Gut *66*, 1487–1495.
- Pogge von Strandmann, E., Simhadri, V.R., Von Tresckow, B., Sasse, S., Reiners, K.S., Hansen, H.P., Rothe, A., Böll, B., Simhadri, V.L., Borchmann, P., et al. (2007). Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. Immunity *27*, 965–974.
- Polaris Observatory HCV Collaborators (2017). Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. Lancet Gastroenterol Hepatol *2*, 161–176.
- Poli, A., Michel, T., Thérésine, M., Andrès, E., Hentges, F., and Zimmer, J. (2009). CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. Immunology *126*, 458–465.
- Pybus, O.G., Charleston, M.A., Gupta, S., Rambaut, A., Holmes, E.C., and Harvey, P.H. (2001). The epidemic behavior of the hepatitis C virus. Science *292*, 2323–2325.
- Radaeva, S., Sun, R., Jaruga, B., Nguyen, V.T., Tian, Z., and Gao, B. (2006). Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. Gastroenterology *130*, 435–452.
- Rajagopalan, S., and Long, E.O. (2012). KIR2DL4 (CD158d): An activation receptor for HLA-G. Frontiers in Immunology *3*.
- Rao, M., and Alving, C.R. (2016). Adjuvants for HIV vaccines. Curr Opin HIV AIDS *11*, 585–592.
- Rasmussen, T.A., Tolstrup, M., Brinkmann, C.R., Olesen, R., Erikstrup, C., Solomon, A., Winckelmann, A., Palmer, S., Dinarello, C., Buzon, M., et al. (2014). Panobinostat, a histone deacetylase inhibitor, for latent-virus reactivation in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy: a phase 1/2, single group,

clinical trial. Lancet HIV *1*, e13–21.

- Raulet, D.H., Gasser, S., Gowen, B.G., Deng, W., and Jung, H. (2013). Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. Annu. Rev. Immunol. *31*, 413–441.
- Ravet, S., Scott-Algara, D., Bonnet, E., Tran, H.K., Tran, T., Nguyen, N., Truong, L.X., Theodorou, I., Barre-Sinoussi, F., Pancino, G., et al. (2007). Distinctive NK-cell receptor repertoires sustain high-level constitutive NK-cell activation in HIV-exposed uninfected individuals. Blood *109*, 4296–4305.
- Razi, N., and Varki, A. (1999). Cryptic sialic acid binding lectins on human blood leukocytes can be unmasked by sialidase treatment or cellular activation. Glycobiology *9*, 1225–1234.
- Rerks-Ngarm, S., Pitisuttithum, P., Nitayaphan, S., Kaewkungwal, J., Chiu, J., Paris, R., Premsri, N., Namwat, C., De Souza, M., Adams, E., et al. (2009). Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. N. Engl. J. Med. *361*, 2209–2220.
- Robbins, S.H., Nguyen, K.B., Takahashi, N., Mikayama, T., Biron, C.A., and Brossay, L. (2002). Cutting edge: inhibitory functions of the killer cell lectin-like receptor G1 molecule during the activation of mouse NK cells. J. Immunol. *168*, 2585–2589.
- Rosental, B., Brusilovsky, M., Hadad, U., Oz, D., Appel, M.Y., Afergan, F., Yossef, R., Rosenberg, L.A., Aharoni, A., Cerwenka, A., et al. (2011). Proliferating cell nuclear antigen is a novel inhibitory ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. J. Immunol. *187*, 5693–5702.
- Sadanand, S., Suscovich, T.J., and Alter, G. (2016). Broadly Neutralizing Antibodies Against HIV: New Insights to Inform Vaccine Design. Annu. Rev. Med. *67*, 185–200.
- Sanchez-Correa, B., Morgado, S., Gayoso, I., Bergua, J.M., Casado, J.G., Arcos, M.J., Bengochea, M.L., Duran, E., Solana, R., and Tarazona, R. (2011). Human NK cells in acute myeloid leukaemia patients: analysis of NK cell-activating receptors and their ligands. Cancer Immunol. Immunother. *60*, 1195–1205.
- Sanders, R.W., Derking, R., Cupo, A., Julien, J.-P., Yasmeen, A., De Val, N., Kim, H.J., Blattner, C., De la Peña, A.T., Korzun, J., et al. (2013). A next-generation cleaved, soluble HIV-1 Env trimer, BG505 SOSIP.664 gp140, expresses multiple epitopes for broadly neutralizing but not non-neutralizing antibodies. PLoS Pathog. *9*, e1003618.
- Sansonno, D., Lauletta, G., and Dammacco, F. (2004). Detection and quantitation of HCV core protein in single hepatocytes by means of laser capture microdissection and enzyme-linked immunosorbent assay. J. Viral Hepat. *11*, 27–32.
- Sarhan, M.A., Pham, T.N.Q., Chen, A.Y., and Michalak, T.I. (2012). Hepatitis C virus infection of human T lymphocytes is mediated by CD5. J. Virol. *86*, 3723–3735.
- Sauce, D., Larsen, M., Fastenackels, S., Pauchard, M., Ait-Mohand, H., Schneider, L., Guihot, A., Boufassa, F., Zaunders, J., Iguertsira, M., et al. (2011). HIV disease progression despite suppression of viral replication is associated with exhaustion of lymphopoiesis. Blood *117*, 5142–5151.
- Sauter, D., Schindler, M., Specht, A., Landford, W.N., Münch, J., Kim, K.-A., Votteler, J., Schubert, U., Bibollet-Ruche, F., Keele, B.F., et al. (2009). Tetherin-driven adaptation of Vpu and Nef function and the evolution of pandemic and nonpandemic HIV-1 strains. Cell Host Microbe *6*, 409–421.
- Scheel, T.K.H., Kapoor, A., Nishiuchi, E., Brock, K.V., Yu, Y., Andrus, L., Gu, M., Renshaw, R.W., Dubovi, E.J., McDonough, S.P., et al. (2015). Characterization of nonprimate hepacivirus and construction of a functional molecular clone. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *112*, 2192–2197.

- Scheid, J.F., Mouquet, H., Feldhahn, N., Walker, B.D., Pereyra, F., Cutrell, E., Seaman, M.S., Mascola, J.R., Wyatt, R.T., Wardemann, H., et al. (2009). A method for identification of HIV gp140 binding memory B cells in human blood. J. Immunol. Methods *343*, 65–67.
- Schramm, B., Penn, M.L., Palacios, E.H., Grant, R.M., Kirchhoff, F., and Goldsmith, M.A. (2000). Cytopathicity of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in human lymphoid tissue is coreceptor dependent and comparable to that of HIV-1. J. Virol. *74*, 9594–9600.
- Scott-Algara, D., Truong, L.X., Versmisse, P., David, A., Luong, T.T., Nguyen, N.V., Theodorou, I., Barré-Sinoussi, F., and Pancino, G. (2003). Cutting edge: increased NK cell activity in HIV-1-exposed but uninfected Vietnamese intravascular drug users. J. Immunol. *171*, 5663–5667.
- Sène, D., Levasseur, F., Abel, M., Lambert, M., Camous, X., Hernandez, C., Pène, V., Rosenberg, A.R., Jouvin-Marche, E., Marche, P.N., et al. (2010). Hepatitis C virus (HCV) evades NKG2D-dependent NK cell responses through NS5A-mediated imbalance of inflammatory cytokines. PLoS Pathog. *6*, e1001184.
- Sennepin, A., Baychelier, F., Guihot, A., Nel, I., Ho Tsong Fang, R., Calin, R., Katlama, C., Simon, A., Crouzet, J., Debré, P., et al. (2013). NKp44L expression on CD4+ T cells is associated with impaired immunological recovery in HIV-infected patients under highly active antiretroviral therapy. AIDS *27*, 1857–1866.
- Serre, S.B.N., Jensen, S.B., Ghanem, L., Humes, D.G., Ramirez, S., Li, Y.-P., Krarup, H., Bukh, J., and Gottwein, J.M. (2016). Hepatitis C Virus Genotype 1 to 6 Protease Inhibitor Escape Variants: In Vitro Selection, Fitness, and Resistance Patterns in the Context of the Infectious Viral Life Cycle. Antimicrob. Agents Chemother. *60*, 3563–3578.
- Sethi, S., Herrmann, M., Roller, J., Von Müller, L., Peerschke, E.I., Ghebrehiwet, B., Bajric, I., Menger, M.D., and Laschke, M.W. (2011). Blockade of gC1qR/p33, a receptor for C1q, inhibits adherence of Staphylococcus aureus to the microvascular endothelium. Microvasc. Res. *82*, 66–72.
- Shao, J.-Y., Yin, W.-W., Zhang, Q.-F., Liu, Q., Peng, M.-L., Hu, H.-D., Hu, P., Ren, H., and Zhang, D.-Z. (2016). Siglec-7 Defines a Highly Functional Natural Killer Cell Subset and Inhibits Cell-Mediated Activities. Scand. J. Immunol. *84*, 182–190.
- Shi, Y., Brandin, E., Vincic, E., Jansson, M., Blaxhult, A., Gyllensten, K., Moberg, L., Broström, C., Fenyö, E.M., and Albert, J. (2005). Evolution of human immunodeficiency virus type 2 coreceptor usage, autologous neutralization, envelope sequence and glycosylation. J. Gen. Virol. *86*, 3385–3396.
- Shibuya, A., Campbell, D., Hannum, C., Yssel, H., Franz-Bacon, K., McClanahan, T., Kitamura, T., Nicholl, J., Sutherland, G.R., Lanier, L.L., et al. (1996). DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. Immunity *4*, 573–581.
- Shirasago, Y., Sekizuka, T., Saito, K., Suzuki, T., Wakita, T., Hanada, K., Kuroda, M., Abe, R., and Fukasawa, M. (2015). Isolation and characterization of an Huh.7.5.1-derived cell clone highly permissive to hepatitis C virus. Jpn. J. Infect. Dis. *68*, 81–88.
- Siewiera, J., Gouilly, J., Hocine, H.-R., Cartron, G., Levy, C., Al-Daccak, R., and Jabrane-Ferrat, N. (2015). Natural cytotoxicity receptor splice variants orchestrate the distinct functions of human natural killer cell subtypes. Nat Commun *6*, 10183.
- Siliciano, J.D., and Siliciano, R.F. (2014). Recent developments in the search for a cure for HIV-1 infection: targeting the latent reservoir for HIV-1. J. Allergy Clin. Immunol. *134*, 12–19.

- Silvestri, G., Sodora, D.L., Koup, R.A., Paiardini, M., O'Neil, S.P., McClure, H.M., Staprans, S.I., and Feinberg, M.B. (2003). Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. Immunity *18*, 441–452.
- Smallman-Raynor, M.R., and Cliff, A.D. (1992). Seasonality in tropical AIDS: a geographical analysis. Int J Epidemiol *21*, 547–556.
- Smith, D.B., Pathirana, S., Davidson, F., Lawlor, E., Power, J., Yap, P.L., and Simmonds, P. (1997). The origin of hepatitis C virus genotypes. J. Gen. Virol. *78 (Pt 2)*, 321–328.
- Smith, D.B., Bukh, J., Kuiken, C., Muerhoff, A.S., Rice, C.M., Stapleton, J.T., and Simmonds, P. (2014). Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment Web resource. Hepatology *59*, 318–327.
- Sok, D., Le, K.M., Vadnais, M., Saye-Francisco, K.L., Jardine, J.G., Torres, J.L., Berndsen, Z.T., Kong, L., Stanfield, R., Ruiz, J., et al. (2017). Rapid elicitation of broadly neutralizing antibodies to HIV by immunization in cows. Nature *548*, 108–111.
- Song, X., Yao, Z., Yang, J., Zhang, Z., Deng, Y., Li, M., Ma, C., Yang, L., Gao, X., Li, W., et al. (2016). HCV core protein binds to gC1qR to induce A20 expression and inhibit cytokine production through MAPKs and NF-κB signaling pathways. Oncotarget *7*, 33796–33808.
- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., et al. (2013). Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. Nat. Rev. Immunol. *13*, 145–149.
- Sun, C., Fu, B., Gao, Y., Liao, X., Sun, R., Tian, Z., and Wei, H. (2012). TGF-β1 down-regulation of NKG2D/DAP10 and 2B4/SAP expression on human NK cells contributes to HBV persistence. PLoS Pathog. *8*, e1002594.
- Sun, C., Xu, J., Huang, Q., Huang, M., Wen, H., Zhang, C., Wang, J., Song, J., Zheng, M., Sun, H., et al. (2017). High NKG2A expression contributes to NK cell exhaustion and predicts a poor prognosis of patients with liver cancer. Oncoimmunology *6*, e1264562.
- Sun, H., Sun, C., Tian, Z., and Xiao, W. (2013). NK cells in immunotolerant organs. Cell. Mol. Immunol. *10*, 202–212.
- Sun, J.C., Beilke, J.N., and Lanier, L.L. (2009). Adaptive immune features of natural killer cells. Nature *457*, 557–561.
- Swadling, L., Capone, S., Antrobus, R.D., Brown, A., Richardson, R., Newell, E.W., Halliday, J., Kelly, C., Bowen, D., Fergusson, J., et al. (2014). A human vaccine strategy based on chimpanzee adenoviral and MVA vectors that primes, boosts, and sustains functional HCV-specific T cell memory. Science Translational Medicine *6*, 261ra153–261ra153.
- Symons, J., Vandekerckhove, L., Hütter, G., Wensing, A.M.J., Van Ham, P.M., Deeks, S.G., and Nijhuis, M. (2014). Dependence on the CCR5 coreceptor for viral replication explains the lack of rebound of CXCR4-predicted HIV variants in the Berlin patient. Clin. Infect. Dis. *59*, 596–600.
- Taiwo, B., Barcena, L., and Tressler, R. (2013). Understanding and controlling chronic immune activation in the HIV-infected patients suppressed on combination antiretroviral therapy. Curr HIV/AIDS Rep *10*, 21–32.
- Taylor, B.S., Sobieszczyk, M.E., McCutchan, F.E., and Hammer, S.M. (2008). The Challenge of HIV-1 Subtype Diversity. New England Journal of Medicine *358*, 1590–

1602.
- Tebit, D.M., and Arts, E.J. (2011). Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. Lancet Infect Dis *11*, 45–56.
- Thiébaut, R., Matheron, S., Taieb, A., Brun-Vezinet, F., Chêne, G., Autran, B., and Immunology group of the ANRS CO5 HIV-2 cohort (2011). Long-term nonprogressors and elite controllers in the ANRS CO5 HIV-2 cohort. AIDS *25*, 865–867.
- Thorburn, A. (2004). Death receptor-induced cell killing. Cell. Signal. *16*, 139–144.
- Tobinai, K., Klein, C., Oya, N., and Fingerle-Rowson, G. (2017). A Review of Obinutuzumab (GA101), a Novel Type II Anti-CD20 Monoclonal Antibody, for the Treatment of Patients with B-Cell Malignancies. Adv Ther *34*, 324–356.
- Todesco, E., Rodriguez, C., Morand-Joubert, L., Mercier-Darty, M., Desire, N., Wirden, M., Girard, P.-M., Katlama, C., Calvez, V., and Marcelin, A.-G. (2015). Improved detection of resistance at failure to a tenofovir, emtricitabine and efavirenz regimen by ultradeep sequencing. J. Antimicrob. Chemother. *70*, 1503–1506.
- Tomescu, C., Duh, F.-M., Lanier, M.A., Kapalko, A., Mounzer, K.C., Martin, M.P., Carrington, M., Metzger, D.S., and Montaner, L.J. (2010). Increased plasmacytoid dendritic cell maturation and natural killer cell activation in HIV-1 exposed, uninfected intravenous drug users. AIDS *24*, 2151–2160.
- Tsitoura, P., Georgopoulou, U., Pêtres, S., Varaklioti, A., Karafoulidou, A., Vagena, D., Politis, C., and Mavromara, P. (2007). Evidence for cellular uptake of recombinant hepatitis C virus non-enveloped capsid-like particles. FEBS Lett. *581*, 4049–4057.
- Tsuboi, S., Sutoh, M., Hatakeyama, S., Hiraoka, N., Habuchi, T., Horikawa, Y., Hashimoto, Y., Yoneyama, T., Mori, K., Koie, T., et al. (2011). A novel strategy for evasion of NK cell immunity by tumours expressing core2 O-glycans. EMBO J. *30*, 3173–3185.
- Tudor, D., Derrien, M., Diomede, L., Drillet, A.-S., Houimel, M., Moog, C., Reynes, J.-M., Lopalco, L., and Bomsel, M. (2009). HIV-1 gp41-specific monoclonal mucosal IgAs derived from highly exposed but IgG-seronegative individuals block HIV-1 epithelial transcytosis and neutralize CD4(+) cell infection: an IgA gene and functional analysis. Mucosal Immunol *2*, 412–426.
- Varchetta, S., Mele, D., Lombardi, A., Oliviero, B., Mantovani, S., Tinelli, C., Spreafico, M., Prati, D., Ludovisi, S., Ferraioli, G., et al. (2016). Lack of Siglec-7 expression identifies a dysfunctional natural killer cell subset associated with liver inflammation and fibrosis in chronic HCV infection. Gut *65*, 1998–2006.
- Vieillard, V., Strominger, J.L., and Debré, P. (2005). NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *102*, 10981–10986.
- Vieillard, V., Costagliola, D., Simon, A., Debré, P., and French Asymptomatiques à Long Terme (ALT) Study Group (2006). Specific adaptive humoral response against a gp41 motif inhibits CD4 T-cell sensitivity to NK lysis during HIV-1 infection. AIDS *20*, 1795–1804.
- Vieillard, V., Le Grand, R., Dausset, J., and Debré, P. (2008a). A vaccine strategy against AIDS: an HIV gp41 peptide immunization prevents NKp44L expression and CD4+ T cell depletion in SHIV-infected macaques. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *105*, 2100–2104.
- Vieillard, V., Habib, R.E., Brochard, P., Delache, B., Bovendo, H.F., Calvo, J., Morin, J., Picq, I., Martinon, F., Vaslin, B., et al. (2008b). CCR5 or CXCR4 use influences

the relationship between CD4 cell depletion, NKp44L expression and NK cytotoxicity in SHIV-infected macaques. AIDS *22*, 185–192.

- Vieillard, V., Fausther-Bovendo, H., Samri, A., Debré, P., and French Asymptomatiques à Long Terme (ALT) ANRS-CO15 Study Group (2010). Specific phenotypic and functional features of natural killer cells from HIV-infected long-term nonprogressors and HIV controllers. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. *53*, 564–573.
- Vieillard, V., Dereuddre-Bosquet, N., Mangeot-Méderlé, I., Le Grand, R., and Debré, P. (2012). An HIVgp41 vaccine protects CD4 central memory T cells in SHIV-infected macaques. Vaccine *30*, 6883–6891.
- Vieillard, V., Gharakhanian, S., Lucar, O., Katlama, C., Launay, O., Autran, B., Ho Tsong Fang, R., Crouzet, J., Murphy, R.L., and Debré, P. (2016). Perspectives for immunotherapy: which applications might achieve an HIV functional cure? Oncotarget *7*, 38946–38958.
- Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Moretta, L., and Moretta, A. (1998). NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. J. Exp. Med. *187*, 2065–2072.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., and Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. Nat. Immunol. *9*, 503–510.
- Voss, S.D., Sondel, P.M., and Robb, R.J. (1992). Characterization of the interleukin 2 receptors (IL-2R) expressed on human natural killer cells activated in vivo by IL-2: association of the p64 IL-2R gamma chain with the IL-2R beta chain in functional intermediate-affinity IL-2R. J. Exp. Med. *176*, 531–541.
- Waggoner, S.N., Hall, C.H.T., and Hahn, Y.S. (2007). HCV core protein interaction with gC1q receptor inhibits Th1 differentiation of CD4+ T cells via suppression of dendritic cell IL-12 production. J. Leukoc. Biol. *82*, 1407–1419.
- Wagtmann, N., Biassoni, R., Cantoni, C., Verdiani, S., Malnati, M.S., Vitale, M., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A., and Long, E.O. (1995). Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. Immunity *2*, 439–449.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Kräusslich, H.-G., Mizokami, M., et al. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. Nat. Med. *11*, 791–796.
- Walker, C.M. (2017). Designing an HCV vaccine: a unique convergence of prevention and therapy? Curr Opin Virol *23*, 113–119.
- Walker, B.D., and Yu, X.G. (2013). Unravelling the mechanisms of durable control of HIV-1. Nat. Rev. Immunol. *13*, 487–498.
- Walker, L.M., Phogat, S.K., Chan-Hui, P.-Y., Wagner, D., Phung, P., Goss, J.L., Wrin, T., Simek, M.D., Fling, S., Mitcham, J.L., et al. (2009). Broad and Potent Neutralizing Antibodies from an African Donor Reveal a New HIV-1 Vaccine Target. Science *326*, 285–289.
- Wallach, D., Fellous, M., and Revel, M. (1982). Preferential effect of gamma interferon on the synthesis of HLA antigens and their mRNAs in human cells. Nature *299*, 833–836.
- Ward, J., Bonaparte, M., Sacks, J., Guterman, J., Fogli, M., Mavilio, D., and Barker, E. (2007). HIV modulates the expression of ligands important in triggering natural killer cell cytotoxic responses on infected primary T-cell blasts. Blood *110*, 1207–

1214.

- Wenbin Tuo, D.Z. (2015). QS-21: A Potent Vaccine Adjuvant. Natural Products Chemistry & Research *03*.
- Werner, J.M., Heller, T., Gordon, A.M., Sheets, A., Sherker, A.H., Kessler, E., Bean, K.S., Stevens, M., Schmitt, J., and Rehermann, B. (2013). Innate immune responses in hepatitis C virus-exposed healthcare workers who do not develop acute infection. Hepatology *58*, 1621–1631.
- West, A.P., Scharf, L., Scheid, J.F., Klein, F., Bjorkman, P.J., and Nussenzweig, M.C. (2014). Structural insights on the role of antibodies in HIV-1 vaccine and therapy. Cell *156*, 633–648.
- Whitney, J.B., Hill, A.L., Sanisetty, S., Penaloza-MacMaster, P., Liu, J., Shetty, M., Parenteau, L., Cabral, C., Shields, J., Blackmore, S., et al. (2014). Rapid seeding of the viral reservoir prior to SIV viraemia in rhesus monkeys. Nature *512*, 74–77.
- Wilen, C.B., Tilton, J.C., and Doms, R.W. (2012). HIV: Cell Binding and Entry. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine *2*, a006866–a006866.
- Wu, J., Song, Y., Bakker, A.B., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1999). An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. Science *285*, 730–732.
- Yagi, S., Mori, K., Tanaka, E., Matsumoto, A., Sunaga, F., Kiyosawa, K., and Yamaguchi, K. (2005). Identification of novel HCV subgenome replicating persistently in chronic active hepatitis C patients. Journal of Medical Virology *77*, 399–413.
- Yamagiwa, S., Kamimura, H., and Ichida, T. (2009). Natural killer cell receptors and their ligands in liver diseases. Med Mol Morphol *42*, 1–8.
- Yang, C.M., Yoon, J.C., Park, J.H., and Lee, J.M. (2017). Hepatitis C virus impairs natural killer cell activity via viral serine protease NS3. PLoS ONE *12*, e0175793.
- Yao, Z.Q., Eisen-Vandervelde, A., Ray, S., and Hahn, Y.S. (2003). HCV core/gC1qR interaction arrests T cell cycle progression through stabilization of the cell cycle inhibitor p27Kip1. Virology *314*, 271–282.
- Yao, Z.Q., Eisen-Vandervelde, A., Waggoner, S.N., Cale, E.M., and Hahn, Y.S. (2004). Direct binding of hepatitis C virus core to gC1qR on CD4+ and CD8+ T cells leads to impaired activation of Lck and Akt. J. Virol. *78*, 6409–6419.
- Yu, L., and Guan, Y. (2014). Immunologic Basis for Long HCDR3s in Broadly Neutralizing Antibodies Against HIV-1. Front Immunol *5*, 250.
- Zhang, S., Saha, B., Kodys, K., and Szabo, G. (2013). IFN-γ production by human natural killer cells in response to HCV-infected hepatoma cells is dependent on accessory cells. J. Hepatol. *59*, 442–449.

Annexe 1

www.impactjournals.com/oncotarget/ Oncotarget, Advance Publications 2016

Perspectives for immunotherapy: which applications might achieve an HIV functional cure?

Vincent Vieillard[1], Shahin Gharakhanian[2], Olivier Lucar[1,3], Christine Katlama[4], Odile Launay[5], Brigitte Autran[1,6], Raphael Ho Tsong Fang[3], Joël Crouzet[3], Robert L. Murphy[7] and Patrice Debré[1,6]

[1] Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, INSERM, CNRS, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), Paris, France

[2] InnaVirVax, Cambridge Innovation Center, Cambridge, MA, USA

[3] InnaVirVax, Génopole, Evry, France

[4] AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Paris, France

[5] Université Paris Descartes, INSERM, CIC 1417, AP-HP, Hôpital Cochin, Paris, France

[6] AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Département d'Immunologie, Paris, France

[7] Center for Global Health, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, IL, USA

***Correspondence to**: Vincent Vieillard, **email**: vincent.vieillard@upmc.fr*

Keywords: HIV, immunotherapy, functional cure

***Received**: December 14, 2015* ***Accepted**: February 21, 2016* ***Published**: February 29, 2016*

ABSTRACT

The major advances achieved in devising successful combined antiretroviral therapy (cART) have enabled the sustained control of HIV replication. However, this is associated with costly lifelong treatment, partial immune restoration, chronic inflammation and persistent viral reservoirs. In this context, new therapeutic strategies deserve investigation as adjuncts to cART so as to potentiate immune responses that are capable of completely containing HIV pathogenicity, particularly if cART is discontinued. This may seem a dauntingly high hurdle given the results to date. This review outlines the key research efforts that have recently resurrected immunotherapeutic options, and some of the approaches tested to date. These areas include promising cytokines or vaccine strategies, using different viral or non-viral vectors based on polyvalent "mosaic" antigens and highly conserved HIV envelope peptides, broadly neutralizing antibodies or new properties of antibodies to improve the control of immune system homeostasis. These novel immunotherapeutic strategies appear promising *per se*, or in combination with TLR-agonists in order to bypass the complexity of the interplay between immune activation, massive $CD4^+$ T-cell loss and viral persistence.

INTRODUCTION

Effective treatment with combined antiretroviral therapy (cART) has achieved impressive reductions in morbidity and mortality among patients infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Despite these advances, the success of cART is nevertheless frustrated by the need for costly lifelong treatment because it is impossible to completely eliminate the virus from patients, even when viral replication is suppressed at the periphery [1]. cART has also been associated with the development of viral resistance, and the increased risk of several non-AIDS disorders is now well documented, including that of cardiovascular, vascular, hepatic, renal, metabolic, neurological and some oncological diseases, more particularly in individuals who initiated cART at later stages of the infection [2]. This problem was recently demonstrated in a macaque model of SIV infection where even the initiation of treatment during the first three days post-infection was unable to prevent the constitution of a viral reservoir [3]. Furthermore, Lorenzo-Redondo et al showed very nicely that HIV can continue to replicate and replenish the viral reservoir despite potent cART [4]. New immunotherapeutic strategies therefore need to be explored, as an alternative or supplement to cART, targeting a cure and/or normalization of the immune status

Table 1: Principal factors implicated in the HIV-induced loss of CD4$^+$ T lymphocytes and immune functions, listed in alphabetical order

Antibody-dependent cellular toxicity and cytotoxic T-lymphocytes via the attachment of circulating gp120 to normal CD4$^+$ T-cells:
Anti-CD4$^+$ T-cell action via auto-antibodies,
Anti-CD4$^+$ T-cell suppressive factors by CD8$^+$ T-cells and/or NK cells.
Apoptosis via immune activation.
Cytokine cytotoxicity.
Cytopathic effect of HIV on CD4$^+$ T-cells and CD4 progenitors.
Destruction of the bone marrow, lymph nodes architecture
Immunosuppression by gp120, gp41, gag, Tat.
Infiltrating malignancies affecting the bone marrow and other sites.
Nutritional deficiencies.
Opportunistic infections of the bone marrow.
Permeability of the CD4$^+$ T-cell membrane.
Production of cytokines
Selective destruction of memory CD4$^+$ T-cells.
Suppressive effect on immune complexes.

of treated patients.

The first approach concerns a "sterilizing cure" to enable complete eradication of the virus. The prototypical, and unique, example is the well-known "Berlin patient", diagnosed with acute myeloid leukemia and then transplanted with CD34$^+$ stem cells from a donor who was homozygous for CCR5 Δ32, and in whom viral replication remained absent, despite the discontinuation of cART [5]. Recently published follow-ups of this patient strongly suggest that a cure of HIV-1 has indeed been achieved [6]. However, hematopoietic stem cell transplantation is too risky, too complex and too costly for the majority of HIV-infected individuals worldwide, so it is likely that therapeutic strategies targeting eradication will not see widespread use in the near future. Strategies that induce latently infected cells to produce virus have recently generated considerable enthusiasm, including treatments with histone deacetylase (HDAC) inhibitors and other latency reversing agents; however, the clinical effects to date have been modest or not yet demonstrated [7-11].

The second approach is a "functional cure" without the complete eradication of HIV-1, associated with the development of effective host immunity to fight HIV-1 [12]. This is based on the strong immune responses observed in a very small proportion of untreated HIV-infected patients, namely long-term non-progressors and elite controllers, who are able to sustain high CD4$^+$ T-cell counts and/or control HIV-1 replication below detectable levels [13, 14], and patients who experience long-term virological remission following the discontinuation of antiretroviral therapy that was initiated at an early stage [15].

HOW IMMUNE RESTORATION CAN BE ACHIEVED IN THE HIV SETTING

HIV-1 infection causes profound and often irreversible changes to the innate and adaptive immune systems. CD4$^+$ T-cells are progressively depleted, whereas the CD8$^+$ T-cell population expands, and much of the immune system is chronically activated. Even under cART, immune activation and chronic inflammation can persist for years, and certainly participate in the continuous replenishment of viral reservoirs, thus constituting an obstacle to an HIV cure [16-18]. The strongest evidence that HIV triggers immune activation has come from recent treatment intensification studies. The addition of raltegravir caused a concomitant reduction in the frequencies of both infected and activated cells [18-20]. The association between residual levels of immune activation and viral persistence after cART thus suggests that these two phenomena may be connected, which is in line with the recent findings of the START study [21]. These observations have increasingly focused clinical research on more robust endpoints that include preservation of the CD4$^+$ T-cell count, associated with the control of immune activation and chronic inflammation (Figure 1).

To improve the effectiveness of treatments, a clearer understanding of the mechanisms underlying immune deterioration is necessary; without this knowledge, an efficacious clinical strategy will remain elusive. One of the most intriguing phenomena is the massive depletion of bystander non-infected CD4$^+$ T-cells (Table 1). For example, several reports have shown that HIV-1 proteins, including gp120, Tat and Nef, can follow a variety of death pathways to initiate apoptosis in uninfected CD4$^+$ T-cells [22-24]. An alternative proposal is that CD4$^+$ T-cells may be killed by NK cells, and notably by the presence of stress molecules such as NKp44L, the cellular ligand of the activated natural killer (NK) NKp44 receptor [25]. In the context of HIV, this ligand is expressed specifically on bystander non-infected CD4$^+$T-cells [26, 27], whereas it is sequestrated by the HIV Nef protein within HIV-infected CD4$^+$ T-cells. Taken together, these data may, at least partially, explain the preferential depletion of bystander non-infected CD4$^+$ T-cells and development of the viral reservoir [28, 29]. It is interesting to note that this massive loss of non-infected CD4$^+$ T-cells is associated with high

levels of tissue inflammation and immune cell activation, which could increase both the number of potential HIV target cells susceptible to infection, and the homeostatic proliferation of latently infected cells [30, 31].

There are many reasons why the drastic reduction in viral load seen under cART does not result in normalization of the immune system; as well as the classic causes ($CD4^+$ T-cell nadir, HIV RNA level, and host genetic factors), several other factors can be considered:

(i) Age; generally speaking, immune senescence may be both a cause and a consequence of immune activation, leading to a vicious circle [32].

(ii) Co-infections; hepatitis C virus (HCV) co-infection results in a higher level of immune activation [33]. Likewise, cytomegalovirus has been identified as a cause of $CD8^+$ T-cell activation in HIV-infected subjects under cART [34].

(iii) Microbial translocation; the irreversible destruction by HIV of gut-associated lymphoid tissues (GALT), even after years of cART [35, 36]. This has been linked to the proportion of $CD8^+$ T-cells over-expressing CD38 and type I interferons in the blood [37]. Microbial translocation may therefore be a driver of immune activation, and thereby of $CD4^+$ T-cell loss [38]. This systemic activation of tissues in the gastrointestinal tract also contributes to the general increase in inflammation [17, 39, 40].

Furthermore, from a qualitative point of view, if $CD4^+$ T-cell recovery under cART is based on the production of new $CD4^+$ T-cells, then the T-cell repertoire may at least be partially restored. However, if the rise in the CD4 count results mainly from $CD4^+$ T-cell proliferation and survival, the repertoire will remain uncompleted, even though the total number of $CD4^+$ T-cells has normalized [41-43].

The complexity of the interplay between immune activation, massive $CD4^+$ T-cell loss and viral persistence, as outlined in Figure 1, therefore suggests that important account needs to be taken of controlling immune system homeostasis when developing novel immunotherapy strategies to combat AIDS.

IMMUNOTHERAPY IN THE DISEASE SETTING

Objectives

Immunotherapy should aim to elicit immune restoration, because the immune responses work in concert to control HIV disease. The great majority of past and

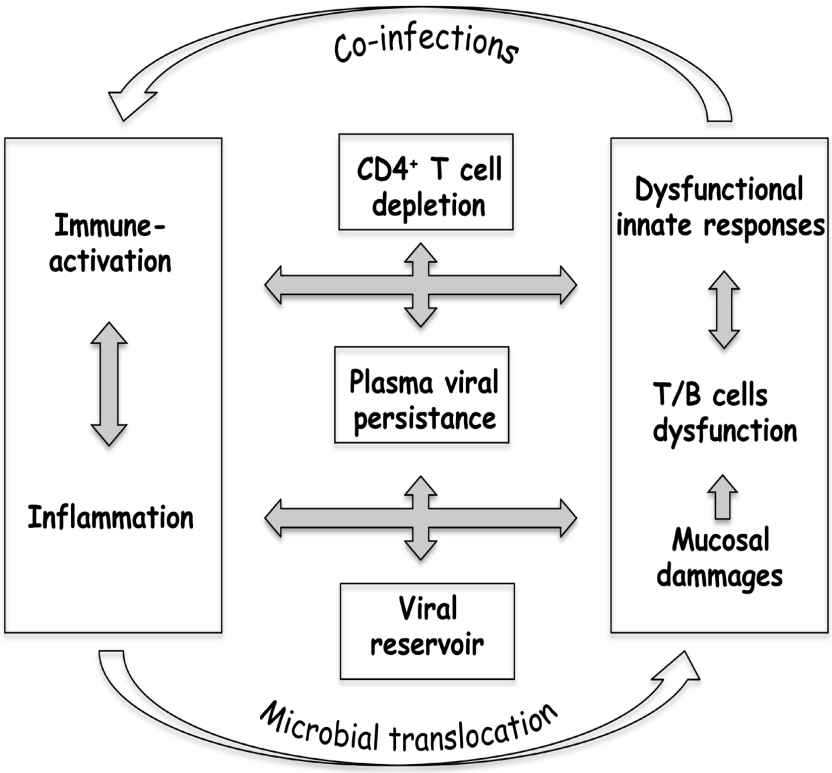


Figure 1: Poor immune restoration under cART sustains a "vicious circle" in HIV-1 infection.

current strategies have focused on the viral component, but a key question has arisen: is it possible to generate HIV-specific immune responses capable of completely containing viral replication, even in tissue sanctuaries, when cART is discontinued? During randomized trials, no strategy has yet demonstrated its lasting and potent effectiveness in terms of controlling viral load, or delaying clinical progression [44]. This review focuses mainly on immunotherapy to control pathogenicity, prevent immune activation by HIV-1 and reduce inflammation, thereby normalizing the immune system, as an alternative strategy designed to promote directly effective and specific immune responses. It is likely that the efficacy of therapeutic interventions will depend on the disease stage at the initiation of antiretroviral therapy [45]. Different approaches are being tested, including cytokine therapies, therapeutic vaccines, and antibody therapies with different molecular targets.

What about cytokine therapy?

Cytokines play a pivotal role in modulating immune responses. Both agonist and antagonist therapies directed against cytokines, cytokine receptors or signaling pathways are currently the subject of intense investigation. Treatments based on interleukin (IL)-2, IL-7 IL-15, and IL-21, which all utilize the common CD132 γ-chain in their receptor complexes, seem to be able to improve the $CD4^+$ T-cell count. A trial involving intermittent IL-2 therapy in cART-naive patients was able to demonstrate sustained increases in $CD4^+$ T-cell numbers that enabled the deferral of cART [46]. However, larger international randomized trials designed to assess the effects of IL-2 in HIV-1-infected individuals with cART-induced viral suppression revealed no evidence of an improvement in HIV-1 immunity [47], with IL-2 promoting the expansion of $FOXP3^+$ regulatory T-cell populations [48]. These disappointing findings, as well as the toxicity associated with IL-2 therapy, thus prompted research on the immunomodulating properties of other cytokines such as IL-7 and IL-15 in terms of improving T-cell homeostasis. A dose escalation trial in cART-treated HIV-infected patients showed that IL-7 was well-tolerated and could improve the available TCR repertoire, potentiate cytotoxic T-cell activity and restore $CD4^+$ T-cell homeostasis [49, 50]. On the other hand, supplementation with IL-15 promoted the differentiation of central memory $CD4^+$ T-cells into shorter-lived transitional or effector memory T $CD4^+$, which are crucial to immune control [51, 52]. Finally, IL-21 improved T-cell cytotoxicity as well as enhancing antibody production and not increasing viral load in chronically untreated SIV-infected macaques. In particular, higher levels of intestinal Th17 cells were associated with lower rates of intestinal T-cell proliferation, microbial translocation and systemic activation/inflammation [53].

To date, these cytokine-based agents are of uncertain benefit in HIV-infected patients; indeed, high levels of certain cytokines may participate in tissue inflammation and immune cell activation, which in turn could increase

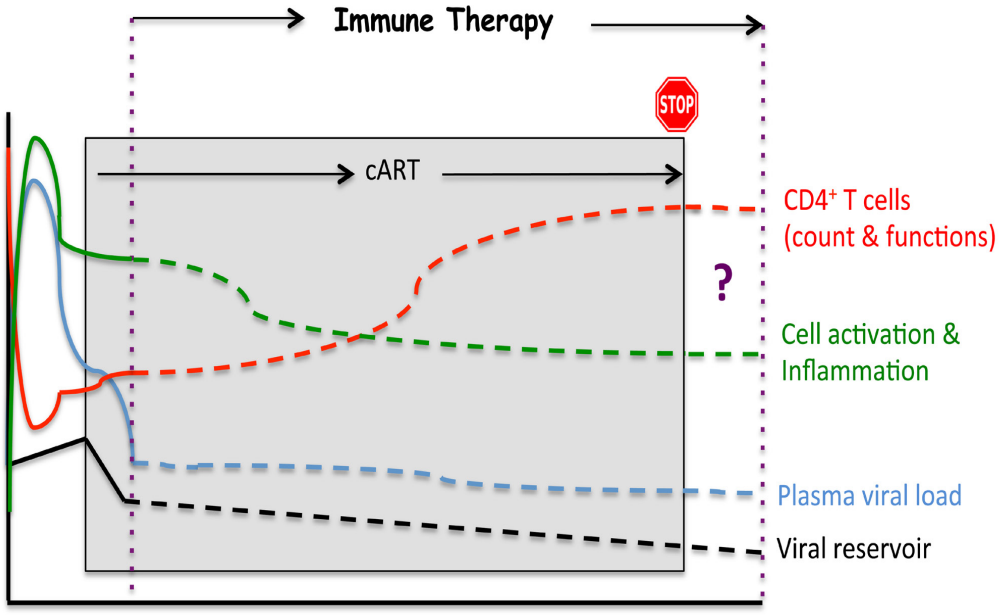


Figure 2: Potential impacts of an immunotherapeutic strategy.

Table 2: The principal therapeutic vaccines

Vaccine	Additional description	Phase	Trial Registry Identifier*	Reference
vCP1452	ALVAC-based vaccine	2	NCT00056797	
MRK Ad5 HIV-1 gag	Adenovirus-based vaccine	2	NCT00080106	[56,57]
ISS T-002	HIV Tat-based vaccine	2	NCT00751595	[58,59]
GTU-multiHIV B + LIPO-5	DNA + lipopeptide vaccines	2	NCT01492985	
DermaVir LC002	DNA-based vaccine	1/2	NCT00270205	[60-62]
Synthetic vaccine	HIV Tat-based vaccine	1/2	NCT01793818	
THV01	Lentiviral-based vaccine	1/2	NCT02054286	
DNA-GTU	Plasmid DNA-based vaccine	1/2	NCT02457689	
AGS-004	Patient-derived dendritic cells + HIV antigens	1/2	NCT01069809	
Epimmune	DNA-based vaccine	1	NCT00052182	[64]
rMVA-HIV (env/gag [TBC-M358] + tat/rev/nef [TBC-M335])	Vaccina Ankara-based vaccine	1	NCT00107549	[65]
rFPV-HIV (env/gag [TBC-F357] + tat/rev/nef [TBC-F349])	Fowlpox-based vaccine	1	NCT00107549	[65]
MVA.HIVconsv	MVA-based vaccine	1	NCT01024842	
MAG pDNA + rSVIN HIV-Gag	DNA + VSV-based vaccine	1	NCT01266616	
HIVAX	Lentiviral-based vaccine	1	NCT01428596	
ChAdV63.HIVconsv + MVA.HIVconsv	Adenovirus + MVA-based vaccines	1	NCT01712425	
iHIVARNA-01	TriMix + HIV antigen naked messenger RNA	1	NCT02413645	
D-GPE DNA + M-GPE MVA	DNA and MVA viral vector vaccines	1	NCT01881581	

the number of potential HIV target cells susceptible to infection. Recently, Herasimtschuk *et al.* [54] reported a randomized immunotherapeutic study in cART-treated HIV$^+$ individuals designed to investigate the effects of combining IL-2 with therapeutic immunization using a clade B DNA vaccine; their preliminary data suggest that this strategy may improve the CD4$^+$ T-cell count, restore anti-HIV-1 responses and reduce immune activation. Therefore, carefully administered at the correct time, cytokines might perhaps be combined with other strategies to achieve a clinical benefit.

What about therapeutic vaccination?

Although no product has yet reached the stage of a phase III clinical trial, a growing number of candidate vaccines are being evaluated in phase I/II or phase II trials conducted in treatment-naive and/or cART-treated patients [55-65] (Table 2), as recently reviewed by Barouch *et al.* [66]. Some of these viral and non-viral vectors induce HIV-antigen-specific CD8$^+$ T-cell responses, associated in some instances with HIV-specific B-cell responses. Some of these vaccines have also achieved modest effects on viral load in HIV-infected patients [67]. This argues in favor of improving the vectors and/or antigens. In addition, a combination of such vaccines with other immunotherapeutic approaches could act in synergy (see below). Other strategies are based on HIV peptides; they benefit from a relatively simple design which allows for a thorough characterization of the immune responses induced and avoidance of the complications that have been associated with complex viral vaccine preparations. To date, peptide vaccines to protect CD4$^+$ T-cells have received relatively little attention in terms of vaccine design, although these cells are the primary targets of HIV infection and protecting them will inevitably interfere with this infection; such an effect could contribute to protection against the disease, mainly by controlling immune-mediated inflammation and cell activation (Figure 2) [68-70].

Subdominant peptide epitopes from HIV-1 restricted to common HLA have been used in combination with an adjuvant to vaccinate treatment-naive HIV-1-infected individuals. New HIV-1 specific CD4$^+$ and CD8$^+$ T-cell responses were induced in all patients; however, there were no significant changes to HIV-1 viral load or the CD4$^+$ T-cell count [71]. This highlights the importance of selecting optimum peptides for vaccination, because of the problem of HIV-1 diversity. This challenge could be resolved using inert mosaic sequences created by computer algorithms to maximize the coverage of potential epitopes from worldwide strains [72]. Studies in macaques have shown that mosaic sequences can enhance T-cell responses, but they have not yet been evaluated in humans, and the immune response they will elicit remains

unknown [73]. In an attempt to address the issue of HIV-1 diversity, highly conserved motifs can also be used to elicit immune responses capable of recognizing viruses from multiple clades.

Here, we briefly review the most representative peptide vaccine approaches tested to date:

(i) A C4-V3 polyvalent peptide vaccine comprising four peptides which contain T-helper epitopes from four constant regions of gp120, all HLA-B7-restricted cytotoxic T-lymphocytes and B-cell neutralizing epitopes from the gp120 variable region (V3) of four clade B isolates. A pilot Phase I study (DATRI-010) in 10 HIV-infected patients revealed both immunogenicity and safety in the patients, with no modulation of the $CD4^+$ T-cell count or plasma HIV RNA levels [74].

(ii) Vacc-4x is based on four synthetic peptides corresponding to HLA-A2-restricted conserved domains of the HIV-1 protein p24. A phase II randomized, double-blind, placebo-controlled trial was performed in 136 HIV-infected patients on cART who were randomly assigned

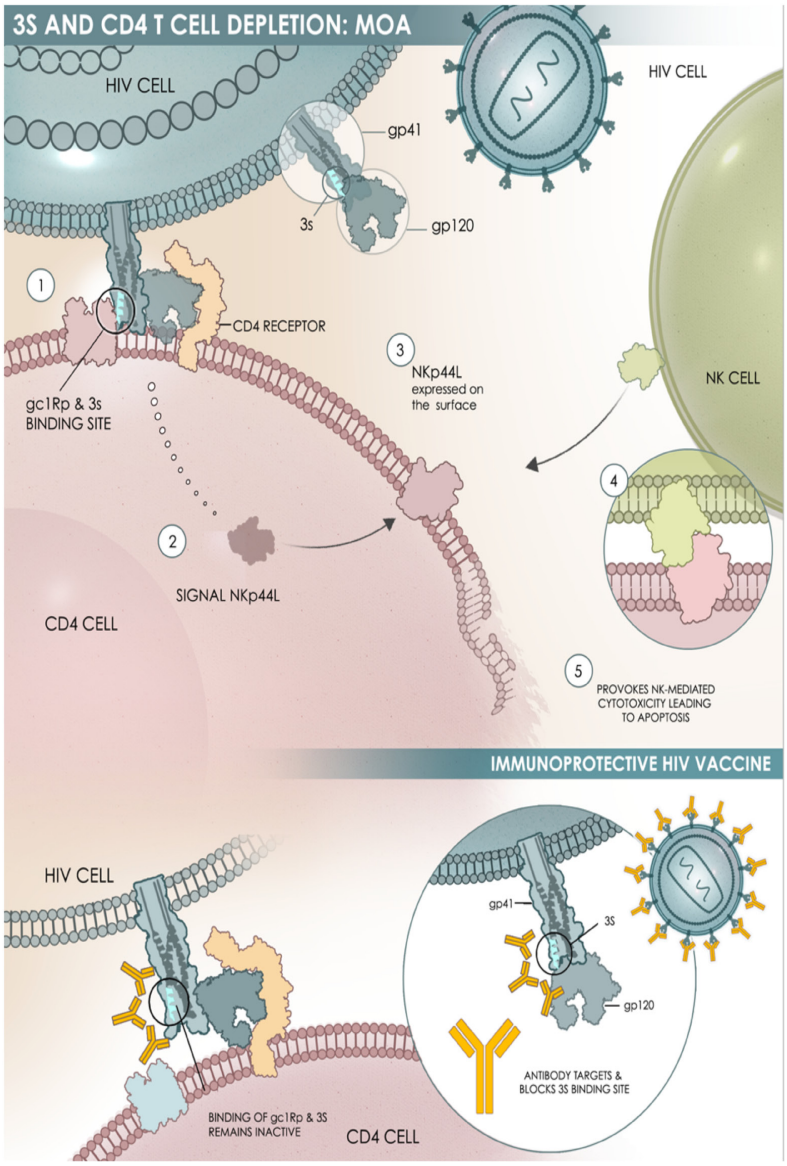


Figure 3: Schematic representation of the mechanism of action of 3S. The 3S motif of the gp41 envelope protein of HIV-1 acts through a subsequent cascade of interactions: Steps 1 & 2: The 3S motif binds to its specific receptor (gC1qR) on $CD4^+$T-cells (CD4); Step 3: This interaction induces a molecular pathway that leads to NKp44L translocation at the surface of $CD4^+$ T-cells; Steps 4 & 5: the interaction between NKp44L and its receptor, with NKp44 expressed on activated NK cells, induces NK-mediated cytotoxicity and then $CD4^+$ T-cell depletion.

to receive Vacc-4x. After the discontinuation of cART, a modest but significant reduction in viral load was noted, but the changes to $CD4^+$ T-cell counts were not significant, although proliferative responses were induced in both $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cell populations [75].

(iii) VAC-3S is a peptide vaccine based on the highly specific and conserved 3S motif localized in a gp41 HIV-1 region, exposed to the surface of the envelope protein (Pancera & Kwong, NIAID, USA - Personal communication). This motif interacts with the gC1qR, a receptor for the globular form of the C1q complement factor, to induce both a decline of the $CD4^+$ T-cell count and an increase in viral load [26, 76]. In simian HIV (SHIV)-infected macaques immunized with the 3S-derived peptide, the decline of the $CD4^+$ T-cell count was prevented in both peripheral and secondary lymphoid tissues [77, 78]. Alongside these observations, we highlighted an inhibition of immune inflammation (production of C-reactive protein, and TNF-α) (personal data), and the activation and proliferation of $CD4^+$ T-cells, linked to a significant protection of central memory $CD4^+$ T-cells [78, 79]. Overall, these data revealed a mechanism of action for the 3S motif composed of successive steps, which are outlined in Figure 3. Blocking this pathway in HIV-infected patients could protect $CD4^+$ T-cells and decrease immune activation and inflammation, thereby achieving immune protection and restoring immune homeostasis. A First-In-Human study performed in 33 HIV-infected patients under cART revealed that VAC-3S is immunogenic and safe [80]. Significant changes from baseline in VAC-3S vaccine responders were observed (increase in the percentage of $CD4^+$ T-cells and in the $CD4^+/CD8^+$ T-cell ratio, reduction of total proviral DNA) indicating that this therapeutic vaccine approach is of interest (manuscript in preparation) [81, 82]. An international phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled study is currently evaluating the safety, tolerability and immunogenicity of three different VAC-3S immunization schemes in 90 virologically-controlled HIV-1 infected patients with $CD4^+$ T-cell counts of between 200 and 500 cells/mm^3 [*ClinicalTrials.gov identifier NCT02041247*] [83].

The studies performed to date have demonstrated that safe and effective vaccines based on a highly conserved motif are possible; they can protect $CD4^+$ T-cells and have made important contributions to our understanding of the path towards developing such a vaccine with immune homeostatic properties.

What about antibody therapy?

Antibodies (Abs) are used to either enhance immune responses or inhibit negative regulatory pathways. The ultimate goal is to reduce inflammation, prevent immune activation by HIV-1 and promote immune responses. This can be illustrated in three different situations, which reflect some putative new concepts:

(i) The therapeutic blocking of PD-1 and CTLA-4: Programmed cell death 1 (PD1) and cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) are over-expressed in $CD4^+$ T-cells, and more particularly in the memory cells of all infected subjects, except elite controllers. The administration of monoclonal Abs (mAbs) to block PD-1 during chronic SIV infection in macaques prolonged survival; it also reduced immune over-activation and the expression of type 1 IFN stimulated genes, and enhanced immunity to gut-associated pathogens [84, 85]. Similarly, the administration of an anti-PD-1 ligand promoted a lower rebound viral load in infected macaques [86].

The results obtained with anti-CTLA-4 mAbs in macaques were unfortunately less encouraging, with an increased activation of $CD4^+$ T-cells and viral replication at mucosal sites [87].

(ii) The lesson of RV144: in this vaccine, which is able to confer protection of 30% against HIV-1 acquisition [88], Env-directed IgA Abs can block the IgG-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) effector function [89, 90]. While the underlying mechanism remains unclear, non-neutralizing Abs may offer protection through effector functions such as ADCC, which occur in conjunction with cells of the innate immune system [91]. While much work remains, these new results represent potentially crucial clues to better understanding the protective function of Abs in the context of HIV-1.

(iii) The role of HIV-1 broadly neutralizing Abs: our understanding of what constitutes a broadly neutralizing antibody against HIV has recently been revolutionized by the isolation of extremely broad and potent neutralizing mAb from HIV-infected individuals [92-96]. Few of them are being studied in man regarding the protective therapeutic benefit of passive immunization [97-100]. While their infusions are well-tolerated, transient decreases of viral load have been observed, in line with the pharmacokinetics of the antibodies [99, 100]. One issue concerns the emergence of resistant HIV-1 viruses, so it is necessary to either combine broadly neutralizing mAbs together or with other immunotherapies.

(iv) The role of anti-3S Abs: These are inversely associated with the rate of $CD4^+$ T-cell count decrease, although they do not neutralize the virus [101]. Importantly, patients with high levels of anti-3S Abs experience a significantly delayed progression to $CD4^+$ T-cell levels below 200 cells/mm^3, and a very significantly lower level of cellular viral DNA [102]. Taken together, these data have led us to propose a possible application for anti-3S Abs as a "functional cure" [103]. Although much work still needs to be done, these new results offer potentially important clues to a clearer understanding the function of Abs during HIV-1 progression.

What about other immunotherapies?

The strategies described above that are used to block various immune pathways need to be investigated in more depth, as does their potential synergy with other clinical approaches. In particular, in order to achieve a more efficient HIV cure, immunotherapy strategies could be combined with new types of drug such as the toll-like receptor 7 (TLR7) agonist, which can induce a transient activation of $CD8^+$ T-cells (and of $CD4^+$ and NK cells) and reduce the amount of viral DNA within cells from HIV-positive donors on cART [104], or by using a TLR9 agonist capable of reducing the viral reservoir in HIV-infected patients and enhancing HIV-specific $CD8^+$ T-cell immunity [105].

CONCLUSIONS

The current clinical and therapeutic picture of HIV infection argues strongly in favor of new strategies that could promote restoration of the immune defenses. We hypothesize that an immunotherapeutic strategy enabling the re-establishment of T-cell homeostasis in HIV-infected patients is necessary to permit a sustainable peripheral and central control of viral burst in the context of a "functional cure". Indeed, immunotherapeutic approaches that can directly enhance effector functions against HIV and/or HIV-infected cells could be combined, and their expected synergy with immunotherapies would result in immune restoration. At all events, future progress will depend on an iterative relationship between novel findings from preclinical studies, including the impact in innate and other immune effector participants beyond conventional $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cells [90], and the proposal of combined, multiple immune-based therapeutic strategies to fight HIV disease and enable patients to be off therapy for long periods of time.

ACKNOWLEDGMENTS

The work is supported by grants from the French Agence National de la Recherche sur le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS) and Agence Nationale de la Recherche (ANR).

The authors acknowledge the assistance of Victoria Hawken (Bolney, UK) regarding English language editing of the manuscript. Lynsey Ekema (Graniteville, USA) is the medical illustrator of Figure 3.

CONFLICTS OF INTERESTS

SG has been consultant for InnaVirVax. RHTF is employee of InnaVirVax. JC is founder, Chief Executive Officer and shareholder of InnaVirVax. PD and VV are founders and shareholders of InnaVirVax. All other authors declare no conflict of interests.

REFERENCES

1. Pinkevych M, Cromer D, Tolstrup M, Grimm AJ, Cooper DA, Lewin SR, Søgaard OS, Rasmussen TA, Kent SJ, Kelleher AD, Davenport MP. HIV Reactivation from Latency after Treatment Interruption Occurs on Average Every 5-8 Days-Implications for HIV Remission. PLoS Pathog. 2015; 11: e1005000.
2. Guiguet M, Boué F, Cadranel J, Lang JM, Rosenthal E, Costagliola D; Clinical Epidemiology Group of the FHDH-ANRS CO4 cohort. Clinical Epidemiology Group of the FHDH-ANRS CO4 cohort. Effect of immunodeficiency, HIV viral load, and antiretroviral therapy on the risk of individual malignancies (FHDH-ANRS CO4): a prospective cohort study. Lancet Oncol. 2009; 10: 1152-1159.
3. Whitney JB, Hill AL, Sanisetty S, Penaloza-MacMaster P, Liu J, Shetty M, Parenteau L, Cabral C, Shields J, Blackmore S, Smith JY, Brinkman AL, Peter LE, Mathew SI, Smith KM, Borducchi EN, Rosenbloom DI, Lewis MG, Hattersley J, Li B, Hesselgesser J, Geleziunas R, Robb ML, Kim JH, Michael NL, Barouch DH. Rapid seeding of the viral reservoir prior to SIV viraemia in rhesus monkeys. Nature. 2014; 512: 74-77.
4. Lorenzo-Redondo R, Fryer HR, Bedford T, Kim EY, Archer J, Kosakovsky Pond SL, Chung YS, Penugonda S, Chipman JG, Fletcher CV, Schacker TW, Malim MH, Rambaut A, Haase AT, McLean AR, Wolinsky SM. Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. Nature. 2016;530: 51-56.
5. Hütter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Müssig A, Allers K, Schneider T, Hofmann J, Kücherer C, Blau O, Blau IW, Hofmann WK, Thiel E. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. N Engl J Med. 2009; 360: 692-698.
6. Symons J, Vandekerckhove L, Hütter G, Wensing AM, van Ham PM, Deeks SG, Nijhuis M. Dependence on the CCR5 coreceptor for viral replication explains the lack of rebound of CXCR4-predicted HIV variants in the Berlin patient. Clin Infect Dis. 2014; 59: 596-600.
7. Rasmussen TA, Tolstrup M, Brinkmann CR, Olesen R, Erikstrup C, Solomon A, Winckelmann A, Palmer S, Dinarello C, Buzon M, Lichterfeld M, Lewin SR, Østergaard L, Søgaard OS. Panobinostat, a histone deacetylase inhibitor, for latent-virus reactivation in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy: a phase 1/2, single group, clinical trial. Lancet HIV. 2014; 1: e13-e21
8. Katlama C, Deeks SG, Autran B, Martinez-Picado J, van Lunzen J, Rouzioux C, Miller M, Vella S, Schmitz JE, Ahlers J, Richman DD, Sekaly RP. Barriers to a cure for HIV: new ways to target and eradicate HIV-1 reservoirs. Lancet. 2013; 381: 2109-2117.

9. Siliciano JD, Siliciano RF. Recent developments in the search for a cure for HIV-1 infection: targeting the latent reservoir for HIV-1. J Allergy Clin Immunol. 2014; 134: 12-19.
10. Dahabieh MS, Battivelli E, Verdin E. Understanding HIV latency: the road to an HIV cure. Annu Rev Med. 2015; 66: 407-421.
11. Søgaard OS, Graversen ME, Leth S, Olesen R, Brinkmann CR, Nissen SK, Kjaer AS, Schleimann MH, Denton PW, Hey-Cunningham WJ, Koelsch KK, Pantaleo G, Krogsgaard K, Sommerfelt M, Fromentin R, Chomont N, Rasmussen TA, Østergaard L, Tolstrup M. The Depsipeptide Romidepsin Reverses HIV-1 Latency In Vivo. PLoS Pathog. 2015; 11: e1005142.
12. International AIDS Society Scientific Working Group on HIV Cure, Deeks SG, Autran B, Berkhout B, Benkirane M, Cairns S, Chomont N, Chun TW, Churchill M, Di Mascio M, Katlama C, Lafeuillade A, Landay A, et al. Towards an HIV cure: a global scientific strategy. Nat Rev Immunol. 2012; 12: 607-614.
13. Grabar S, Selinger-Leneman H, Abgrall S, Pialoux G, Weiss L, Costagliola D. Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV. AIDS. 2009; 23: 1163-1169.
14. Saag M, Deeks SG. How do HIV elite controllers do what they do? Clin Infect Dis. 2010; 51: 239-241.
15. Sáez-Cirión A, Bacchus C, Hocqueloux L, Avettand-Fenoel V, Girault I, Lecuroux C, Potard V, Versmisse P, Melard A, Prazuck T, Descours B, Guergnon J, Viard JP, et al. Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study. PLoS Pathog. 2013; 9: e1003211.
16. Okulicz JF, Le TD, Agan BK, Camargo JF, Landrum ML, Wright E, Dolan MJ, Ganesan A, Ferguson TM, Smith DM, Richman DD, Little SJ, Clark RA, He W, Ahuja SK. Influence of the timing of antiretroviral therapy on the potential for normalization of immune status in human immunodeficiency virus 1-infected individuals. JAMA Intern Med. 2015; 175: 88-99.
17. Chun TW, Moir S, Fauci AS. HIV reservoirs as obstacles and opportunities for an HIV cure. Nat Immunol. 2015; 16: 584-589.
18. Klatt NR, Chomont N, Douek DC, Deeks SG. Immune activation and HIV persistence: implications for curative approaches to HIV infection. Immunol Rev. 2013; 254: 326-342.
19. Buzón MJ, Massanella M, Llibre JM, Esteve A, Dahl V, Puertas MC, Gatell JM, Domingo P, Paredes R, Sharkey M, Palmer S, Stevenson M, Clotet B, Blanco J, Martinez-Picado J. HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects. Nat Med. 2010; 16: 460-465.
20. Hatano H, Hayes TL, Dahl V, Sinclair E, Lee TH, Hoh R, Lampiris H, Hunt PW, Palmer S, McCune JM, Martin JN, Busch MP, Shacklett BL, Deeks SG. A randomized, controlled trial of raltegravir intensification in antiretroviral-treated, HIV-infected patients with a suboptimal CD4+ T cell response. J Infect Dis. 2011; 203: 960-968.
21. INSIGHT START Study Group. Lundgren JD, Babiker AG, Gordin F, Emery S, Grund B, Sharma S, Avihingsanon A, Cooper DA, Fätkenheuer G, Llibre JM, Molina JM, Munderi P, et al. Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. N Engl J Med. 2015; 373: 795-807.
22. Simon V, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: implications for therapy. Nat Rev Microbiol. 2003; 1: 181-190.
23. Levy JA. HIV and the Pathogenesis of AIDS. 3rd Edition. Washington DC: ASM Press, 2007.
24. Alimonti JB, Ball TB, Fowke KR. Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. J Gen Virol. 2003; 84: 1649-1661.
25. Baychelier F, Sennepin A, Ermonval M, Dorgham K, Debré P, Vieillard V. Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. Blood. 2013; 122: 2935-2942.
26. Vieillard V, Strominger JL, Debré P. NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102: 10981-10986.
27. Sennepin A, Baychelier F, Guihot A, Nel I, Ho Tsong Fang R, Calin R, Katlama C, Simon A, Crouzet J, Debré P, Vieillard V. NKp44L expression on CD4+ T cells is associated with impaired immunological recovery in HIV-infected patients under highly active antiretroviral therapy. AIDS. 2013; 27: 1857-1866.
28. Ward J, Bonaparte M, Sacks J, Guterman J, Fogli M, Mavilio D, Barker E. HIV modulates the expression of ligands important in triggering natural killer cell cytotoxic responses on infected primary T-cell blasts. Blood. 2007; 110: 1207-1214.
29. Fausther-Bovendo H, Sol-Foulon N, Candotti D, Agut H, Schwartz O, Debré P, Vieillard V. HIV escape from natural killer cytotoxicity: nef inhibits NKp44L expression on CD4+ T cells. AIDS. 2009; 23: 1077-1087.
30. Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. J Pathol. 2008; 214: 231-241.
31. Deeks SG. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. Ann Rev Med. 2011; 62: 141-155.
32. Appay V, Almeida JR, Sauce D, Autran B, Papagno L. Accelerated immune senescence and HIV-1 infection. Exp Gerontol. 2007; 42: 432-437.
33. Gonzalez VD, Falconer K, Blom KG, Reichard O, Mørn B, Laursen AL, Weis N, Alaeus A, Sandberg JK. High levels of chronic immune activation in the T-cell compartments

of patients coinfected with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type 1 and on highly active antiretroviral therapy are reverted by alpha interferon and ribavirin treatment. J Virol. 2009; 83: 11407-11411.

34. Lichtner M, Cicconi P, Vita S, Cozzi-Lepri A, Galli M, Lo Caputo S, Saracino A, De Luca A, Moioli M, Maggiolo F, Marchetti G, Vullo V, d'Arminio Monforte A; ICONA Foundation Study. Cytomegalovirus coinfection is associated with an increased risk of severe non-AIDS-defining events in a large cohort of HIV-infected patients. J Infect Dis. 2015; 211: 178-186.
35. BenMarzouk-Hidalgo OJ, Torres-Cornejo A, Gutiérrez-Valencia A, Ruiz-Valderas R, Viciana P, López-Cortés LF. Differential effects of viremia and microbial translocation on immune activation in HIV-infected patients throughout ritonavir-boosted darunavir monotherapy. Medicine (Baltimore). 2015; 94: e781.
36. Nowak P, Troseid M, Avershina E, Barqasho B, Neogi U, Holm K, Hov JR, Noyan K, Vesterbacka J, Svärd J, Rudi K, Sönnerborg A. Gut microbiota diversity predicts immune status in HIV-1 infection. AIDS. 2015; 29: 2409-2418.
37. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, Nguyen PL, Khoruts A, Larson M, Haase AT, Douek DC. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. J Exp Med. 2004; 200: 749-759.
38. Assimakopoulos SF, Dimitropoulou D, Marangos M, Gogos CA. Intestinal barrier dysfunction in HIV infection: pathophysiology, clinical implications and potential therapies. Infection. 2014; 42: 951-959.
39. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Jean-Pierre P, Manuelli V, Lopez P, Shet A, Low A, Mohri H, Boden D, Racz P, Markowitz M. Lack of mucosal immune reconstitution during prolonged treatment of acute and early HIV-1 infection. PLoS Med. 2006; 3: e484.
40. Mavigner M, Cazabat M, Dubois M, L'Faqihi FE, Requena M, Pasquier C, Klopp P, Amar J, Alric L, Barange K, Vinel JP, Marchou B, Massip P, Izopet J, Delobel P. Altered CD4+ T cell homing to the gut impairs mucosal immune reconstitution in treated HIV-infected individuals. J Clin Invest. 2012; 122: 62-69.
41. Cossarizza A, Poccia F, Agrati C, D'Offizi G, Bugarini R, Pinti M, Borghi V, Mussini C, Esposito R, Ippolito G, Narciso P. Highly active antiretroviral therapy restores CD4+ Vbeta T-cell repertoire in patients with primary acute HIV infection but not in treatment-naive HIV+ patients with sevechronic infection. J Acquir Immune Defic Syndr. 2004; 35: 213-222.
42. Vrisekoop N, van Gent R, de Boer AB, Otto SA, Borleffs JC, Steingrover R, Prins JM, Kuijpers TW, Wolfs TF, Geelen SP, Vulto I, Lansdorp P, Tesselaar K, Borghans JA, Miedema F. Restoration of the CD4 T cell compartment after long-term highly active antiretroviral therapy without phenotypical signs of accelerated immunological aging. J Immunol. 2008; 181: 1573-1581.
43. Yin L, Kou ZC, Rodriguez C, Hou W, Goodenow MM, Sleasman JW. Antiretroviral therapy restores diversity in the T-cell receptor Vbeta repertoire of CD4 T-cell subpopulations among human immunodeficiency virus type 1-infected children and adolescents. Clin Vaccine Immunol. 2009; 16: 1293-1301.
44. Carcelain G, Autran B. Immune interventions in HIV infection. Immunol Rev. 2013; 254: 355-371.
45. Archin NM, Vaidya NK, Kuruc JD, Liberty AL, Wiegand A, Kearney MF, Cohen MS, Coffin JM, Bosch RJ, Gay CL, Eron JJ, Margolis DM, Perelson AS. Immediate antiviral therapy appears to restrict resting CD4+ cell HIV-1 infection without accelerating the decay of latent infection. Proc Acad Natl Sci U S A. 2012; 109: 9523-9528.
46. Molina JM, Levy Y, Fournier I, Hamonic S, Bentata M, Beck-Wirth G, Gougeon ML, Venet A, Madelaine I, Sereni D, Jeanblanc F, Boulet T, Simon F, Aboulker JP; Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS) 119 Interstart Study Team. Interleukin-2 before antiretroviral therapy in patients with HIV infection: a randomized trial (ANRS 119). J Infect Dis. 2009; 200: 206-215.
47. INSIGHT-ESPRIT Study Group; SILCAAT Scientific Committee, Abrams D, Lévy Y, Losso MH, Babiker A, Collins G, Cooper DA, Darbyshire J, Emery S, Fox L, Gordin F, Lane HC, et al. Interleukin-2 therapy in patients with HIV infection. N Engl J Med. 2009; 361: 1548-1559.
48. Weiss L, Letimier FA, Carriere M, Maiella S, Donkova-Petrini V, Targat B, Benecke A, Rogge L, Levy Y. In vivo expansion of naive and activated CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cell populations in interleukin-2-treated HIV patients. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107: 10632-10637.
49. Levy Y, Lacabaratz C, Weiss L, Viard JP, Goujard C, Lelièvre JD, Boué F, Molina JM, Rouzioux C, Avettand-Fénoël V, Croughs T, Beq S, Thiébaut R, Chêne G, Morre M, Delfraissy JF. Enhanced T cell recovery in HIV-1-infected adults through IL-7 treatment. J Clin Invest. 2009; 119: 997-1007.
50. Levey Y, Sereti I, Tambussi G, Routy JP, Lelièvre JD, Delfraissy JF, Molina JM, Fischl M, Goujard C, Rodriguez B, Rouzioux C, Avettand-Fenoël V, Croughs T, 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. 2012; 55: 291-300.
51. Croce M, Orengo AM, Azzarone B, Ferrini S. Immunotherapeutic applications of IL-15. Immunotherapy. 2012; 4: 957-969.
52. Li J, Valentin A, Ng S, Beach RK, Alicea C, Bergamaschi C, Felber BK, Pavlakis GN. Differential effects of IL-15 on the generation, maintenance and cytotoxic potential of adaptive cellular responses induced by DNA vaccination. Vaccine. 2015; 33: 1188-1196.

53. Pallikkuth S, Micci L, Ende ZS, Iriele RI, Cervasi B, Lawson B, McGary CS, Rogers KA, Else JG, Silvestri G, Easley K, Estes JD, Villinger F, Pahwa S, Paiardini M. Maintenance of intestinal Th17 cells and reduced microbial translocation in SIV-infected rhesus macaques treated with interleukin (IL)-21. PLoS Pathog. 2013; 9: e1003471.
54. Herasimtschuk A, Downey J, Nelson M, Moyle G, Mandalia S, Sikut R, Adojaan M, Stanescu I, Gotch F, Imami N. Therapeutic immunisation plus cytokine and hormone therapy improves CD4 T-cell counts, restores anti-HIV-1 responses and reduces immune activation in treated chronic HIV-1 infection. Vaccine. 2014; 32: 7005-7013.
55. Jefferys R. Research Toword a Cure and Immune-based and gene-therapies. HIV i-base/treatment action group. 2015 Pipeline report. pp81-101.
56. Li JZ, Brumme ZL, Brumme CJ, Wang H, Spritzler J, Robertson MN, Lederman MM, Carrington M, Walker BD, Schooley RT, Kuritzkes DR; AIDS Clinical Trials Group A5197 Study Team. Factors associated with viral rebound in HIV-1-infected individuals enrolled in a therapeutic HIV-1 gag vaccine trial. J Infect Dis. 2011; 203: 976-983.
57. Li JZ, Brumme CJ, Lederman MM, Brumme ZL, Wang H, Spritzler J, Carrington M, Medvik K, Walker BD, Schooley RT, Kuritzkes DR; AIDS Clinical Trials Group A5197 Study Team. Characteristics and outcomes of initial virologic suppressors during analytic treatment interruption in a therapeutic HIV-1 gag vaccine trial. PLoS One. 2012; 7: e34134.
58. Ensoli B, Fiorelli V, Ensoli F, Lazzarin A, Visintini R, Narciso P, Di Carlo A, Monini P, Magnani M, Garaci E. The therapeutic phase I trial of the recombinant native HIV-1 Tat protein. AIDS. 2008; 22: 2207-2209.
59. Ensoli B, Fiorelli V, Ensoli F, Lazzarin A, Visintini R, Narciso P, Di Carlo A, Tripiciano A, Longo O, Bellino S, Francavilla V, Paniccia G, Arancio A, et al. The preventive phase I trial with the HIV-1 Tat-based vaccine. Vaccine. 2009; 28: 371-378.
60. Lisziewicz J, Trocio J, Xu J, Whitman L, Ryder A, Bakare N, Lewis MG, Wagner W, Pistorio A, Arya S, Lori F. Control of viral rebound through therapeutic immunization with DermaVir. AIDS. 2005; 19: 35-43.
61. Cristillo AD, Lisziewicz J, He L, Lori F, Galmin L, Trocio JN, Unangst T, Whitman L, Hudacik L, Bakare N, Whitney S, Restrepo S, Suschak J, Ferrari MG, Chung HK, Kalyanaraman VS, Markham P, Pal R. HIV-1 prophylactic vaccine comprised of topical DermaVir prime and protein boost elicits cellular immune responses and controls pathogenic R5 SHIV162P3. Virology. 2007; 366: 197-211.
62. Rodriguez B, Asmuth DM, Matining RM, Spritzler J, Jacobson JM, Mailliard RB, Li XD, Martinez AI, Tenorio AR, Lori F, Lisziewicz J, Yesmin S, Rinaldo CR, Pollard RB. Safety, tolerability, and immunogenicity of repeated doses of dermavir, a candidate therapeutic HIV vaccine, in HIV-infected patients receiving combination antiretroviral therapy: results of the ACTG 5176 trial. J Acquir Immune Defic Syndr. 2013; 64: 351-359.
63. Andrés C, Plana M, Guardo AC, Alvarez-Fernández C, Climent N, Gallart T, León A, Clotet B, Autran B, Chomont N, Gatell JM, Sánchez-Palomino S, García F. HIV-1 Reservoir Dynamics after Vaccination and Antiretroviral Therapy Interruption Are Associated with Dendritic Cell Vaccine-Induced T Cell Responses. J Virol. 2015; 89: 9189-9199.
64. Wilson CC, McKinney D, Anders M, MaWhinney S, Forster J, Crimi C, Southwood S, Sette A, Chesnut R, Newman MJ, Livingston BD. Development of a DNA vaccine designed to induce cytotoxic T lymphocyte responses to multiple conserved epitopes in HIV-1. J Immunol. 2003; 171: 5611-5623.
65. Shiu C, Cunningham CK, Greenough T, Muresan P, Sanchez-Merino V, Carey V, Jackson JB, Ziemniak C, Fox L, Belzer M, Ray SC, Luzuriaga K, Persaud D; Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1059 Team. Identification of ongoing human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication in residual viremia during recombinant HIV-1 poxvirus immunizations in patients with clinically undetectable viral loads on durable suppressive highly active antiretroviral therapy. J Virol. 2009; 83: 9731-9742.
66. Barouch DH, Picker LJ. Novel vaccine vectors for HIV-1. Nat Rev Microbiol. 2014; 12: 765-771.
67. Vardas E, Stanescu I, Leinonen M, Ellefsen K, Pantaleo G, Valtavaara M, Ustav M, Reijonen K. Indicators of therapeutic effect in FIT-06, a Phase II trial of a DNA vaccine, GTU(®)-Multi-HIVB, in untreated HIV-1 infected subjects. Vaccine. 2012; 30: 4046-4654.
68. Ensoli B, Cafaro A, Monini P, Marcotullio S, Ensoli F. Challenges in HIV Vaccine Research for Treatment and Prevention. Front Immunol. 2014; 5: 417.
69. Graziani GM, Angel JB. Evaluating the efficacy of therapeutic HIV vaccines through analytical treatment interruptions. J Int AIDS Soc. 2015; 18: 20497.
70. Mylvaganam GH, Silvestri G, Amara RR. HIV therapeutic vaccines: moving towards a functional cure. Curr Opin Immunol. 2015; 35: 1-8.
71. Karlsson I, Brandt L, Vinner L, Kromann I, Andreasen LV, Andersen P, Gerstoft J, Kronborg G, Fomsgaard A. Adjuvanted HLA-supertype restricted subdominant peptides induce new T-cell immunity during untreated HIV-1-infection. Clin Immunol. 2013; 146: 120-130.
72. Excler JL, Robb ML, Kim JH. Prospects for a globally effective HIV-1 vaccine. Vaccine 2015; 33 Suppl 4: D4-D12.
73. Barouch DH, O'Brien KL, Simmons NL, King SL, Abbink P, Maxfield LF, Sun YH, La Porte A, Riggs AM, Lynch DM, Clark SL, Backus K, Perry JR, et al. Mosaic HIV-1 vaccines expand the breadth and depth of cellular immune responses in rhesus monkeys. Nat Med. 2010; 16: 319-323.
74. Bartlett JA, Wasserman SS, Hicks CB, Dodge RT, Weinhold KJ, Tacket CO, Ketter N, Wittek AE, Palker TJ,

Haynes BF. Safety and immunogenicity of an HLA-based HIV envelope polyvalent synthetic peptide immunogen. DATRI 010 Study Group. Division of AIDS Treatment Research Initiative. AIDS. 1998; 12: 1291-300.

75. Pollard RB, Rockstroh JK, Pantaleo G, Asmuth DM, Peters B, Lazzarin A, Garcia F, Ellefsen K, Podzamczer D, van Lunzen J, Arastéh K, Schürmann D, Clotet B, et al. Safety and efficacy of the peptide-based therapeutic vaccine for HIV-1, Vacc-4x: a phase 2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet Infect Dis. 2014; 14: 291-300.
76. Fausther-Bovendo H, Vieillard V, Sagan S, Bismuth G, Debré P. HIV gp41 engages gC1qR on CD4+ T cells to induce the expression of an NK ligand through the PIP3/H2O2 pathway. PLoS Pathog. 2010; 6: e1000975.
77. Vieillard V, Habib RE, Brochard P, Delache B, Bovendo HF, Calvo J, Morin J, Picq I, Martinon F, Vaslin B, Le Grand R, Debré P. CCR5 or CXCR4 use influences the relationship between CD4 cell depletion, NKp44L expression and NK cytotoxicity in SHIV-infected macaques. AIDS. 2008; 22: 185-192.
78. Vieillard V, Dereuddre-Bosquet N, Mangeot-Méderlé I, Le Grand R, Debré P. An HIVgp41 vaccine protects CD4 central memory T cells in SHIV-infected macaques. Vaccine. 2012; 30: 6883-6891.
79. Vieillard V, Le Grand R, Dausset J, Debré P. A vaccine strategy against AIDS: an HIV gp41 peptide immunization prevents NKp44L expression and CD4+ T cell depletion in SHIV-infected macaques. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105: 2100-2104.
80. Gharakhanian S. Katlama K, Launey O, Bodilis H, Calin R. Fang R, Marcu M, Autran B, Vieillard V, Crouzet J. VAC-3S, an immunoprotecive HIV Vaccine directed to the 3S motif of gp41, in patients receiving ART: safety, dose and immunization schedule assessment. AIDS Vaccine Conference 2013, 7-10 October, Barcelona, Spain. [Poster #13.57].
81. Katlama C, Launay O, Ho Tsong Fang R, Bodilis H, Calin R, Autran B, Gharakhanian S, Vieillard V, Crouzet J, Debre P. A randomized, placebo-controlled, double-blind, phase I/IIa dose escalation study of an HIV immunotherapeutic vaccine, VAC-3S, directed to the gp41 3S motif of HIV-1. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). Atlanta, Georgia, 3-6March, 2013. [Abstract #392].
82. Ho Tsong Fang R, Launay O, Katlama C, J Crouzet J, B Autran A, V Vieillard V, Debré P, Gharakhanian S. VAC-3S vaccine, a novel approche to the theapeutoc management of HIV infection. Overview of phase I and phase II clinical vaccine development programs. J Vaccines 2014; 5: 5
83. Ho Tsong Fang R, Launay O, Rouzioux C, Autran B, Capeau J, Melard A, Marcu M, Calin R, Bodilis, H, Crouzet J, Vieillard V, Debre D, Gharakhanian S, Katlama C. VAC-3S, a safe immunotherapeutic HIV vaccine decreased total HIV DNA ad increased CD4/CD8 ratio: phase I final results. Towards an HIV Cure Symposium, 2015, 18-19 July, IAS: Vancouver, Canada. [Poster #PE67-LB].
84. Macatangay BJ, Rinaldo CR. PD-1 blockade: A promising immunotherapy for HIV? CellsScience. 2009; 5: 61-65.
85. Dyavar Shetty R, Velu V, Titanji K Bosinger SE, Freeman GJ, Silvestri G, Amara RR. PD-1 blockade during chronic SIV infection reduces hyperimmune activation and microbial translocation in rhesus macaques. J Clin Invest. 2012; 122: 1712-1716.
86. Mason SW, Sanisetty S, Osuna C. Viral Suppression Induced by Anti-PDL1 Following ARV-Interruption in SIV-Infected Monkeys. 21st Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, March 3 - 6, 2014, Boston, MA. [Poster #318LB].
87. Hryniewicz A, Boasso A, Edghill-Smith Y, Vaccari M, Fuchs D, Venzon D, Nacsa J, Betts MR, Tsai WP, Heraud JM, Beer B, Blanset D, Chougnet C, Lowy I, Shearer GM, Franchini G. CTLA-4 blockade decreases TGF-beta, IDO, and viral RNA expression in tissues of SIVmac251-infected macaques. Blood. 2006; 108: 3834-3842.
88. Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, Premsri N, Namwat C, de Souza M, Adams E, Benenson M, Gurunathan S, Tartaglia J, et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. N Engl J Med. 2009; 361: 2209-2220.
89. Barouch DH, Liu J, Li H, Maxfield LF, Abbink P, Lynch DM, Iampietro MJ, SanMiguel A, Seaman MS, Ferrari G, Forthal DN, Ourmanov I, Hirsch VM, et al. Vaccine protection against acquisition of neutralization-resistant SIV challenges in rhesus monkeys. Nature. 2012; 482: 89-93.
90. Tomaras GD, Ferrari G, Shen X, Alam SM, Liao HX, Pollara J, Bonsignori M, Moody MA, Fong Y, Chen X, Poling B, Nicholson CO, Zhang R, et al. Vaccine-induced plasma IgA specific for the C1 region of the HIV-1 envelope blocks binding and effector function of IgG. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013; 110: 9019-9024.
91. Ackerman ME, Dugast AS, Alter G. Emerging concepts on the role of innate immunity in the prevention and control of HIV infection. Annu Rev Med. 2012; 63: 113-130.
92. West AP Jr, Scharf L, Scheid JF, Klein F, Bjorkman PJ, Nussenzweig MC. Structural insights on the role of antibodies in HIV-1 vaccine and therapy. Cell. 2014; 156: 633-648.
93. Klein F, Nogueira L, Nishimura Y, Phad G, West AP Jr, Halper-Stromberg A, Horwitz JA, Gazumyan A, Liu C, Eisenreich TR, Lehmann C, Fätkenheuer G, Williams C, et al. Enhanced HIV-1 immunotherapy by commonly arising antibodies that target virus escape variants. J Exp Med. 2014; 211: 2361-2372.
94. Burton DR, Mascola JR. Antibody responses to envelope glycoproteins in HIV-1 infection. Nat Immunol. 2015; 16: 571-576.
95. Sadanand S, Suscovich TJ, Alter G. Broadly Neutralizing

Antibodies Against HIV: New Insights to Inform Vaccine Design. Annu Rev Med. 2016; 67: 185-200.

96. Alter G, Barouch DH. Natural evolution of broadly neutralizing antibodies. Cell. 2015; 161: 427-428.
97. Zhou T, Georgiev I, Wu X, Yang ZY, Dai K, Finzi A, Kwon YD, Scheid JF, Shi W, Xu L, Yang Y, Zhu J, Nussenzweig MC, Sodroski J, Shapiro L, Nabel GJ, Mascola JR, Kwong PD. Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. Science. 2010; 329: 811-817.
98. Zhou T, Zhu J, Wu X, Moquin S, Zhang B, Acharya P, Georgiev IS, Altae-Tran HR, Chuang GY, Joyce MG, Kwon YD, Longo NS, Louder MK, et al. Multidonor analysis reveals structural elements, genetic determinants, and maturation pathway for HIV-1 neutralization by VRC01-class antibodies. Immunity. 2013; 39: 245-258.
99. Caskey M, Klein F, Lorenzi JC, Seaman MS, West AP Jr, Buckley N, Kremer G, Nogueira L, Braunschweig M, Scheid JF, Horwitz JA, Shimeliovich I, Ben-Avraham S, et al. Viraemia suppressed in HIV-1-infected humans by broadly neutralizing antibody 3BNC117. Nature. 2015; 522: 487-491.
100. Lynch RM, Boritz E, Coates EE, DeZure A, Madden P, Costner P, Enama ME, Plummer S, Holman L, Hendel CS, Gordon I, Casazza J, Conan-Cibotti M, et al. Virologic effects of broadly neutralizing antibody VRC01 administration during chronic HIV-1 infection. Sci Transl Med. 2015; 7: 319ra206.
101. Vieillard V, Costagliola D, Simon A, Debré P; French Asymptomatiques à Long Terme (ALT) Study Group. Specific adaptive humoral response against a gp41 motif inhibits CD4 T-cell sensitivity to NK lysis during HIV-1 infection. AIDS. 2006; 20: 1795-1804.
102. Vieillard V, Crouzet J, Boufassa F, Sennepin A, Ho Tsong Fang R, Debré P, Meyer L. Specific anti-gp41 antibodies predict HIV-1 disease progression. J Acquir Immune Defic Syndr. 2012; 61: 403-405.
103. Crouzet J, Vieillard V, Debre P, Katlama C, Launay O, Ho Tsong Fang R, Desfontaines- Batéjat D, Marcu M, Gharakhanian S. Potential role of anti-3S antibodies in an HIV medical cure strategy? Workshop on HIV Cure and Eradication. 24-25 January, 2013, Milan, Italy.
104. Sloan D, Irrinki A, Tsai A, Kaur J, Lalezari J, Murry J, Cihlar T. TLR7 Agonist GS-9620 Activates HIV-1 in PBMCs from HIV-Infected Patients on cART. 22th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). 23- 26 February, 2015 Seattle, WA [Poster #417].
105. Winckelmann AA, Munk-Petersen LV, Rasmussen TA, Melchjorsen J, Hjelholt TJ, Montefiori D, Østergaard L, Søgaard OS, Tolstrup M. Administration of a Toll-like receptor 9 agonist decreases the proviral reservoir in virologically suppressed HIV-infected patients. PLoS One. 2013; 8: e62074.