

Table des matières

Remerciements	i
Liste des figures	xix
Liste des tables	xx
Abréviations	xxi
Introduction	1
I. Infection par le virus de l'immunodéficience humaine de type 1	2
1. Généralités	2
a. Epidémiologie	2
b. Structure du VIH-1 et génome viral	4
c. Cibles cellulaires du virus et cycle de réplication	6
2. Physiopathologie de l'infection par le VIH-1	9
a. Evolution naturelle de l'infection.....	9
b. Apport des traitements antirétroviraux.....	12
3. Spécificité des traitements antirétroviraux.....	14
a. Différentes classes d'antirétroviraux.....	14
b. Pharmacocinétique : formulation et diffusion des antirétroviraux.....	16
c. Comorbidités liées à la persistance virale et à la toxicité des antirétroviraux....	17
II. Persistance virale et réponses immunitaires altérées.....	19
1. Persistance du virus.....	19
a. Persistance virale et cinétique d'établissement des réservoirs	19

b.	Réservoirs cellulaires et anatomiques	21
c.	Mécanismes de persistance virale et identification des cellules réservoirs.....	26
2.	La réponse immunitaire anti-VIH.....	27
a.	La réponse innée en première ligne de défense.....	27
b.	L'inflammation aiguë.....	30
c.	Les réponses lymphocytaires T CD4 et CD8.....	33
d.	La réponse lymphocytaire B	35
3.	Altérations de la réponse immunitaire en phase chronique de l'infection.....	36
a.	Inflammation à bas bruit	37
b.	L'activation immunitaire persistante.....	39
c.	Epuisement T et rôles des immunes checkpoints.....	40
d.	Immunosénescence et sénescence réplivative	48
4.	Le bénéfice potentiel des immunothérapies.....	52
a.	Lever l'épuisement pour un double objectif	54
b.	Une stratégie alternative : réduire l'inflammation	57
III. Les modèles animaux pour l'étude de l'infection par le VIH-1		62
1.	Deux modèles expérimentaux : le primate non-humain et la souris humanisée....	62
a.	Un besoin aigu de modèles précliniques	62
b.	Le primate non-humain	63
c.	La souris humanisée pour le système immunitaire	66
2.	Modèles de souris humanisées pour le système immunitaire	70
a.	Les souris immunodéficientes	70

b.	Différentes stratégies d'humanisation	75
3.	Vers de nouveaux avancements en souris humanisées	81
a.	Développements progressifs et continus des modèles humanisés.....	81
b.	Les modèles HIS dans le développement de thérapies contre le VIH-1	90
IV.	Objectifs des travaux de thèse.....	96
Résultats		101
	Article 1 : Exhaustion and senescence marker profiles on human T cell in BRGSF-A2-humanized mice resemble those in human samples.....	102
	Article 2 : Pharmacokinetics and tissue distribution of Tenofovir, Emtricitabine and Dolutegravir in a murine model humanized for the immune system.....	127
	Article 3 : Combination of immunotherapies and ART during chronic HIV infection: Blocking type I interferon signaling reduces PD-L1 expression on T cells in BRGSF-A2 humanized mice	152
Discussion		215
I.	Pertinence des modèle HIS comme outil préclinique dans l'infection VIH-1	218
	Quels sont les avantages théoriques d'un modèle HIS ?.....	218
	Quelles sont les limitations conceptuelles et pratiques des modèles HIS ?	220
II.	Caractérisation du modèle BRGSF-A2 : évaluation des profils d'épuisement et de sénescence.....	230
	Le profil d'épuisement est-il comparable à l'homme ? Quelles sont les spécificités du modèle BRGSF-A2 ?	230
	Le profil de sénescence est-il comparable à l'homme ? Quelles sont les spécificités du modèle BRGSF-A2 ?	232

III. Infection expérimentale au VIH-1 et contrôle efficace	236
Quels sont les paramètres de l'infection expérimentale au VIH-1 dans le modèle BRGSF-A2 ?	236
Comment l'axe PD1/PD-L1 est-il modulé durant les phases aiguë et chronique de l'infection VIH-1 ?	239
Quelle stratégie antirétrovirale choisir pour un contrôle efficace de l'infection ?.....	241
Quels sont les effets du traitement ART dans l'infection VIH-1 ?	243
IV. Evaluation de deux stratégies d'immunothérapies dans le contexte chronique de l'infection VIH-1.....	249
Quelle stratégie choisir pour agir sur l'épuisement ?	249
Quels sont les impacts des α PD1 dans l'infection chronique au VIH-1 ?.....	251
Quelle stratégie alternative de modulation de la voie PD1/PD-L1 choisir ?	254
Quels sont les impacts de l'association ART/ α JAK dans l'infection chronique au VIH- 1 ?	255
V. Perspectives et conclusions	257
Quels sont les axes d'amélioration de ces travaux de thèse ?	258
Doit-on envisager différentes immunothérapies en combinaison aux ARV ?.....	261
Bibliographie.....	265

Liste des figures

Figure 1 : Estimation du nombre de personnes vivant avec le VIH-1 par région du monde et ayant accès à un traitement ART en 2018	3
Figure 2 : Structure du VIH-1 et ses principaux composants.....	5
Figure 3 : Représentation schématique du génome du VIH-1	6
Figure 4 : Les différentes étapes du cycle de réplication du VIH-1.....	9
Figure 5 : Phases de l'infection par le VIH-1 et évolution naturelle en l'absence de traitement ART.	10
Figure 6 : Définition clinique du réservoir viral.....	20
Figure 7 : Cascade cytokinique survenant en amont du pic de la charge virale en phase aiguë de l'infection VIH-1.....	30
Figure 8 : Voies de signalisation des IFN de type I, II et III après leur liaison à leur récepteur IFNAR.....	32
Figure 9 : Principaux mécanismes contribuant à l'activation immunitaire chronique associée au VIH-1	37
Figure 10 : Voie de signalisation PD1.....	43
Figure 11 : Immune checkpoints et leurs ligands associés impliqués dans le processus d'épuisement des lymphocytes T.	45
Figure 12 : Progression de l'épuisement (PD1) en fonction du statut virologique.....	46
Figure 13 : Développement chronologique des modèles immunodéficients.....	70
Figure 14 : Stratégies d'humanisation cellulaire des modèles immunodéficients	75

Liste des tables

Table 1 : Avantages, limites et similitudes des modèles de primates non-humains et de souris humanisées utilisés dans la recherche sur le VIH-1.....	69
Table 2 : Avantages et limites des modèles de souris immunodéficientes utilisés pour l’humanisation du système immunitaire	74
Table 3 : Les nouvelles générations de souris HIS	90



Abréviations

3TC : Lamivudine (2',3'-didéoxy-3'-thiacytidine)

ABC : Abacavir

ADCC : Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity

ADN : Acide désoxyribonucléique

APOBEC3G : Apolipoprotein B mRNA-editing, enzyme-catalytic, polypeptide-like 3G

ARN : Acide ribonucléique

ART : Traitement antiretroviral

ARV : Antirétroviraux

AZT : Azidothymidine

BAFF : B-cell activating factor

BCR : B cell receptor

BIC : Bictegravir

BLT : Bone marrow, liver, thymus

BRG : BALB/c Rag2^{tm1Fwa} IL-2R γ ^{tm1Cgn}

BST2 : bone marrow stromal antigen 2 (tetherin)

BTLA : B And T lymphocyte associated

CCR5 : Récepteur aux chimiokines CC type 5

CD : Cluster de différenciation

cDC : Cellules dendritiques conventionnelles

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cellules présentatrices de l'antigène

CRP : Protéine C réactive

CSH : Cellules souches hématopoïétiques

CTL : Lymphocyte T cytotoxique

CTLA4 : Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4

CXCR : C-X-C chemokine receptor type 4

DC : Cellules dendritiques

DTG : Dolutégravir

EBV : Virus d'Epstein-Barr

Env : Précurseurs polyprotéiques de glycoprotéines d'enveloppe

EPO : Erythropoïétine

Fas-L : Fas ligand

FDA : Food and Drug Administration

fDC : Cellules dendritiques folliculaires

FLK2 : Fetal liver kinase-2

FLT3 : Fms-like tyrosine kinase 3

FTC : Emtricitabine

Gag : Précurseurs polyprotéiques de protéines associées à l'ARN et de la capsid

GALT : Gut-associated lymphoid tissue

G-CSF : Granulocyte colony-stimulating factor

GM-CSF : Granulocyte macrophage colony-stimulating factor

GvHD : Graft versus host disease

HIS : Human immune system

HLA : Human leucocyte antigen

Hu-PBL : Human peripheral blood leucocyte

Hu-SRC : Human scid repopulating cells

i.f. : Intrafémoral

i.h. : Intrahépatique

i.p. : Intrapéritonéal

i.v. : Intraveineuse

ICP : Immune checkpoint

IDO : Indoleamine 2,3-dioxygenase

IF : Inhibiteur de fusion

IFIT1 : Interferon-induced protein with tetratricopeptide

IFITM1 : Interferon-induced transmembrane protein 1

IFN : Interféron

IFNAR : IFN α/β receptor

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

ILC : Innate lymphoid cell

INI : Inhibiteur de l'intégrase

INNTI : Inhibiteur non nucléosidiques de la transcriptase inverse

INR : Immunological non-responders

INTI : Inhibiteur nucléosidiques de la transcriptase inverse

IP : Inhibiteur de la protéase

IP-10 : Interferon-gamma inducible protein 10

IR : Immunological responders

IRF : Interferon regulatory factor

ISG : Interferon-stimulated genes

ISGF3 : Interferon-stimulated gene factor 3

ISRE : IFN-stimulated response element

JAK : Janus kinase

KIR : Killer cell immunoglobulin like receptor

KLRG1 : Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1

LAG3 : Lymphocyte-activation gene 3

LB : Lymphocyte B

LCMV : Lymphocytic choriomeningitis virus

LT : Lymphocyte T

LTR : Long terminal repeat

MCP : Monocyte chemoattractant protein

MIP1 : Macrophage inflammatory protein 1

MO : Moelle osseuse

Mx : Myxovirus resistance

Nef : Negative regulator factor

NFAT : Nuclear factor of activated T-cells

NF- κ B : Nuclear factor-kappa B

NK : Natural Killer

NOD : Non obese diabetic

NOG : NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL2R γ ^{tm1Sug}/JicTac

NSG : NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL2R γ ^{tm1Wjl}/SzJ

OMS : Organisation mondiale de la santé

p.i. : post-infection

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell

PD1 : Programmed cell death protein 1

pDC : Cellules dendritiques plasmacytoïdes

PD-L1 : Programmed cell death-ligand 1

PMN : Polynucléaire neutrophile

PNH : Primates non humains

Pol : Précurseurs polyprotéiques d'enzyme virales ; reverse transcriptase, intégrase, polymérase

PRR : Pattern recognition receptor

Rag : Recombination-activating genes

RAL : Raltégravir

RANTES : Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted

Rev : Regulator of expression of virion proteins

RGMb : Repulsive guidance molecule B

SAMHD1 : SAM domain and HD domain-containing protein 1

Scid : Severe combined immunodeficient

SHIV : Virus de l'immunodéficience simienne et humaine

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

SIMOA : Single molecule array

SIRP α : Signal regulatory protein α

SIV : Virus de l'immunodéficience simienne

SNC : Système nerveux central

SP1 : Specificity protein 1

STAT : Signal transducers and activators of transcription

SV40 : Simian virus 40

TA : Tissu adipeux

Tat : Trans-activator of transcription

T_{CM} : Lymphocyte T central mémoire

TCR : T cell receptor

TDF : Ténofovir disoproxil fumarate

T_E : Lymphocyte T effecteur

T_{EM} : Lymphocyte T effecteur mémoire

T_{EMRA} : Effectrice mémoire exprimant CD45RA

T_{ET} : Lymphocyte T effecteur terminal

T_{fh} : Lymphocyte T folliculaire

T_{fh} : Lymphocyte T folliculaire

T_h : T helper cell

TIGIT : T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains

TIM3 : T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3

TLR : Toll-like receptor

T_M : Lymphocyte T mémoire

T_N : Lymphocyte T naïf

TNF α : Tumor necrosis factor α

TPO : Thrombopoïétine

TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand

TREC : T-Cell Receptor Excision Circles

Tregs : Lymphocytes T régulateurs

TRIM5 α : Tripartite motif-containing protein 5

T_{SCM} : Lymphocyte T mémoire souche

TSLP : Thymic stromal lymphopoietin

T_{TM} : Lymphocyte T mémoire transitionnel

Vif : Virion infectivity factor

VIH-1 : Virus de l'immunodéficience humaine de type 1

Vpr : Viral protein R

Vpu : Viral protein U

Introduction

I. Infection par le virus de l'immunodéficience humaine de type 1

1. Généralités

a. Epidémiologie

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) est un agent pathogène infectant l'homme et responsable d'une pandémie mondiale persistante. En l'absence de traitement efficace, l'infection par le VIH-1 conduit inéluctablement à la progression de la maladie vers le stade du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) rendant l'homme vulnérable à de multiples pathologies infectieuses (Low et al. 2016) ou tumorales rares (Shiels and Engels 2017) dites opportunistes, et conduisant au décès. Depuis le début de l'épidémie en 1981, le VIH-1 est responsable de la mort de plus de 32 millions de personnes. En 2018, l'organisation mondiale de la santé (OMS) et le programme commun des Nations Unies sur le VIH/Sida (ONUSIDA) estimaient que 37,9 millions de personnes dans le monde vivaient avec le VIH-1 (UNAIDS 2019). Toutefois, l'épidémiologie mondiale de l'infection par le VIH-1 a considérablement changée grâce à l'avènement des thérapies antirétrovirales au milieu des années 1990. Celle-ci est désormais caractérisée par une prévalence globale croissante mais une diminution du nombre de décès et une diminution du nombre de nouvelles infections chaque année. La mortalité associée au VIH-1 concernait 1,7 millions de personnes en 2004 contre 0,8 millions en 2018 (UNAIDS 2019; W. D. Hardy 2019).

En raison d'initiatives à l'échelle mondiale, le nombre annuel de nouvelles infections et de décès ont connu une baisse spectaculaire en 2017 par rapport à 2000 (-24% et -35% respectivement) mais il existe des disparités géographiques. Les infections et décès ont diminué

au cours de cette période en Amériques du nord et latine (-5% et -20%) et en Asie du Sud-Est (-27% et -40%). La région du Proche Orient a connu une augmentation à la fois des infections et des décès (+27% et +59%) et les tendances en Europe (+20% et -5%) et dans les régions du Pacifique (+7% et -45%) sont mitigées (W. D. Hardy 2019). L'Afrique reste le continent le plus durement touché par le VIH-1 et représente 68% des cas d'infection en 2018 (**Figure 1**).

37,9 millions de personnes infectées par le VIH-1 dont 23,3 millions sous traitement ART dans le monde

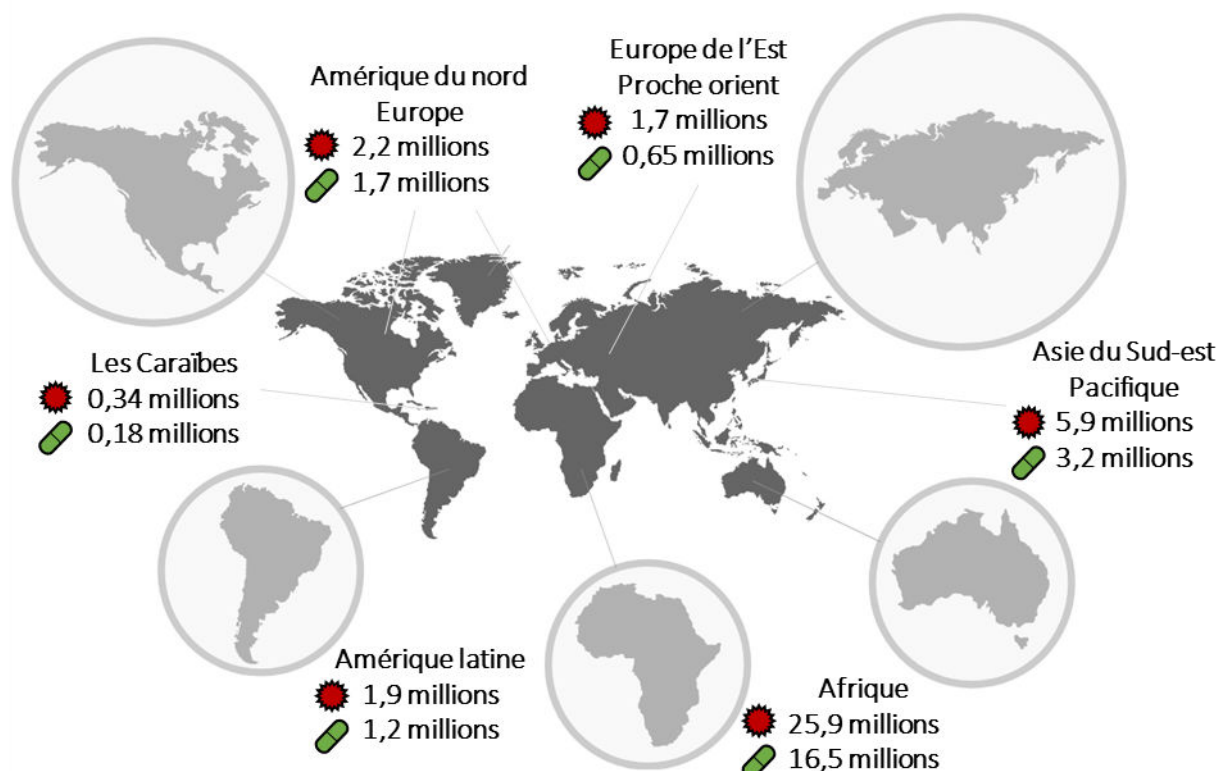


Figure 1 : Estimation du nombre de personnes vivant avec le VIH-1 par région du monde et ayant accès à un traitement ART en 2018 (adaptée de (UNAIDS 2019))

En 2018, 23,3 millions de personnes infectées avaient accès à un traitement antirétroviral (ART), soit une augmentation de 1,6 millions depuis 2017 et de 15,6 millions depuis 2010. De plus, 82 % des femmes enceintes infectées avaient accès à des antirétroviraux (ARV) évitant ainsi la transmission de la mère à l'enfant. En dépit de ces avancées majeures dans la lutte mondiale contre le VIH-1, il reste encore beaucoup à faire ; 38% des personnes

séropositives dans le monde ne reçoivent toujours pas de traitement (**Figure 1**) et 47% n'ont pas une charge virale contrôlée. Aujourd'hui, il persiste encore d'importantes disparités géographiques entre les pays occidentaux et les pays en voie de développement sur l'accès au traitement ART. En Bolivie, Egypte, Libye, mais aussi en Russie et en Chine, moins de 20% des malades sont placés sous ARV alors que ce chiffre tombe sous le seuil des 10% au Pakistan et en Afghanistan. Il reste ainsi des lacunes importantes à combler pour atteindre l'objectif 90-90-90 initialement fixé à l'horizon 2020 (90% des personnes infectées recevront un diagnostic, 90% seront traitées et 90% auront une charge virale durablement contrôlée) (UNAIDS 2019).

Dans les pays développés, plus de 50% des causes de décès chez les personnes infectées sous traitement ART ne sont pas directement imputables au SIDA (Trickey et al. 2016) mais sont associés à la survenue de cancers (23,5%), de pathologies cardiovasculaires (15,7%) et de pathologies hépatiques (14,1%). Des résultats similaires ont été obtenus dans l'analyse des causes de décès en France entre 2000 et 2010 (Morlat et al. 2014) et souligne une part de morbidité et de mortalité non associée au SIDA de plus en plus importante. Aujourd'hui, l'infection par le VIH-1 n'est plus une maladie mortelle mais une maladie chronique associée à des complications principalement non-infectieuses.

b. Structure du VIH-1 et génome viral

Le VIH-1 est un virus à ARN appartenant à la famille des *Retroviridae* et au genre *Lentivirus*, virus responsables de maladies à évolution très lente. Il a été découvert et caractérisé pour la première fois en 1983 par l'équipe de Luc Montagnier (Barre-Sinoussi et al. 1983). Il s'agit d'un virus enveloppé mesurant 120 nm constitué d'une bicouche lipidique, d'une capsidie et d'un génome viral. La bicouche lipidique provient de la cellule hôte et deux glycoprotéines d'enveloppe sont ancrées à cette membrane : la protéine de surface gp120 stabilisée par la

protéine transmembranaire gp41. Sous la bicouche lipidique, les protéines de la matrice p17 permettent de protéger la capside composée des protéines p24. A l'extérieur de la capside, les protéases p11 sont nécessaires à l'assemblage et à la maturation du virus (Turner and Summers 1999). A l'intérieur de la capside, le génome viral est constitué de deux copies d'ARN simple brin de polarité positive associées à (i) deux molécules de transcriptase inverse p66 et p51 permettant la rétrotranscription de l'ARN viral simple brin en ADN double brin, (ii) l'intégrase p32 qui intègre l'ADN viral à l'ADN cellulaire, (iii) aux protéines accessoires Tat, Rev, Vpr, Vif, Vpu et Nef, (Robinson 2002) (**Figure 2**). Les trois enzymes - transcriptase inverse, intégrase et protéase - sont les principales cibles des ARV puisqu'elles sont spécifiques aux rétrovirus.

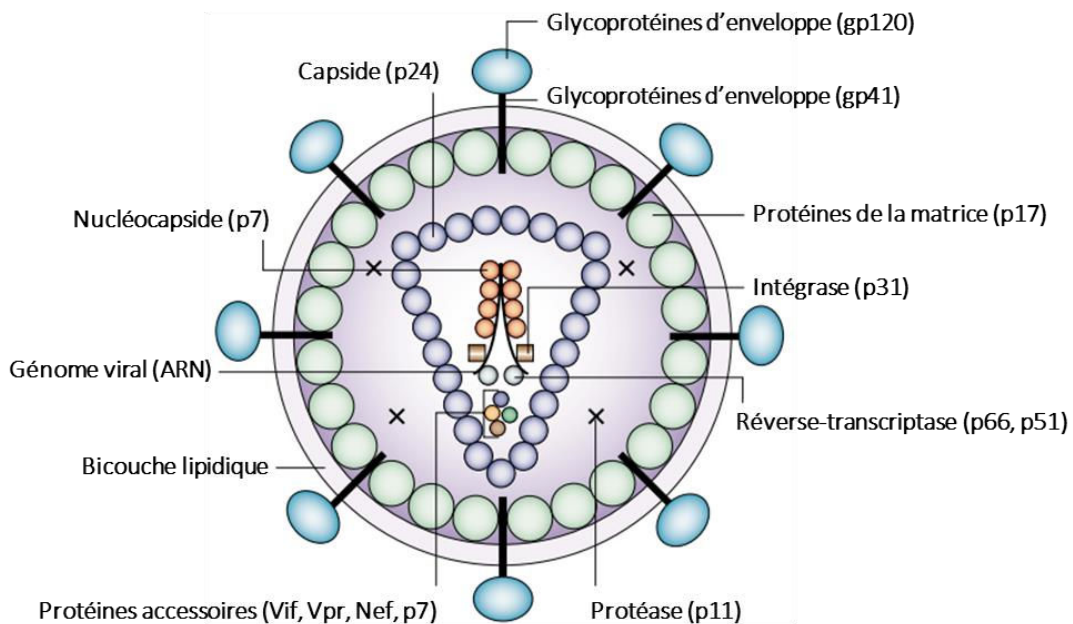


Figure 2 : Structure du VIH-1 et ses principaux composants (adaptée de (Robinson 2002))

L'enveloppe est constituée d'une membrane lipidique et de glycoprotéines. Les protéines de la matrice p17 protègent la capside, celle-ci étant composée de protéines p24. L'intégrase, la reverse-transcriptase, les protéines accessoires et le génome viral à ARN se situent à l'intérieur de la capside. Les protéases p11 sont localisées à l'extérieur de la capside.

Le génome du VIH-1 est composé de neuf gènes compris entre deux régions LTR (Long-Terminal Repeat). Les trois gènes principaux *gag* (group-antigen), *pol* (polymerase) et

env (enveloppe) définissent la structure du virus et sont communs à tous les rétrovirus. Les six autres gènes *tat*, *rev*, *vpr*, *vif*, *vpu* et *nef*, sont des gènes régulateurs codant les protéines virales accessoires qui ont un rôle central dans la modulation de la réplication du virus (Colin and Van Lint 2009) (**Figure 3**).

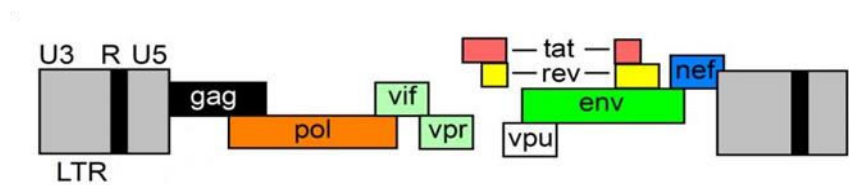


Figure 3 : Représentation schématique du génome du VIH-1 (*d'après* (Wilén, Tilton, and Doms 2012)). La région *gag* code pour les protéines de la nucléocapside (p17, p24 et p7), la région *pol* code pour les enzymes (protéase p11, transcriptase inverse p66/p51 et intégrase p31) et la région *env* code pour les protéines d'enveloppe gp120 et gp41.

c. Cibles cellulaires du virus et cycle de réplication

Le tropisme du VIH-1 est important car prédictif de la progression de la maladie (Connor et al. 1997; Burger and Hoover 2008). Le récepteur CD4 a été le premier récepteur identifié comme facteur rendant la cellule hôte sensible au virus (Dalglish et al. 1984; Klatzmann et al. 1984). Par la suite, les récepteurs aux chimiokines CCR5 et CXCR4 ont été identifiés comme corécepteurs essentiels (H. Deng et al. 1996; Doranz et al. 1996) rendant la cellule hôte à la fois sensible et permissive à la multiplication du virus. Ces derniers sont les principaux déterminants du tropisme viral.

Les cibles cellulaires principales du VIH-1 sont les lymphocytes T CD4⁺ (LT CD4⁺), les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques (DC) qui expriment à la fois le récepteur CD4 et les corécepteurs CXCR4 ou CCR5 (Coleman and Wu 2009; Popov et al. 2005; Klatzmann et al. 1984; Dalglish et al. 1984). On parle alors de tropisme X4 ou de tropisme R5. En outre, des études antérieures ont montré que le tropisme viral pour les LT CD4⁺ dépend

de l'expression inductible de CCR5 lors de la différenciation cellulaire. En effet, son expression est quasi exclusive à la surface des cellules mémoires et maximale au sein des LT mémoires effecteurs par rapport aux autres sous-populations (Ebert and McColl 2002). L'expression de CXCR4 reste relativement constante. Contrairement aux LT CD4⁺, les macrophages sont relativement peu susceptibles à l'effet cytopathique du virus (Gendelman et al. 1988; C. A. Carter and Ehrlich 2008) et permettent la production de virus pendant une longue durée chez les patients infectés (Kelly et al. 2008). De plus, les macrophages sont présents dans la plupart des organes, ce qui permet une dissémination importante du virus à travers des réservoirs viraux anatomiques et cellulaires (Gavegnano and Schinazi 2009). L'utilisation du corécepteur par les souches virales X4 ou R5 définit en plus la capacité cytopathique et la cinétique de réplication du virus. Les souches R5 sont observées après la transmission virale et au cours des premiers stades de la maladie (Vicenzi et al. 1999), suggérant un avantage potentiel de ces souches dans les mécanismes de transmission. Les virus X4 provoquent une déplétion drastique pouvant entraîner une mort plus rapide par immunodéficience (J. M. McCune 2001; Ambrose et al. 2007) et apparaissent plus tardivement au cours de la phase chronique de l'infection.

Le cycle de réplication du VIH-1 se résume en six étapes majeures (Rambaut et al. 2004; Barré-Sinoussi, Ross, and Delfraissy 2013) (**Figure 4**) :

- 1) Attachement et fusion : l'attachement initial du virus à la surface de la cellule cible nécessite une interaction entre la glycoprotéine gp120 et le récepteur CD4 et corécepteur CXCR4 ou CCR5. Cette interaction entraîne des changements de conformation séquentiels et déclenche le processus de fusion assuré par la protéine gp41 entre la membrane cellulaire et virale.
- 2) Décapsidation : la capsid, contenant le matériel génétique, les différentes enzymes et protéines accessoires du virus, est libérée dans le cytoplasme de la cellule hôte.

- 3) Transcription inverse : au cours du transport vers le noyau, l'ARN viral est rétrotranscrit en ADN double brin (ADN proviral) sous l'action de la transcriptase inverse. A noter que la transcriptase inverse introduit de nombreuses erreurs responsables d'une grande variabilité génétique du VIH-1.
- 4) Intégration : l'ADN proviral s'associe à l'intégrase et à d'autres protéines cellulaires et virales pour former le complexe de pré-intégration, activement transporté jusqu'au noyau par des propriétés particulières assurées par la protéine virale Vpr. En effet, celle-ci permet le passage par les pores du noyau sans attendre nécessairement la mitose de la cellule et donc l'ouverture du noyau pour s'y introduire. L'intégrase virale permet d'insérer l'ADN viral grâce aux séquences LTR de façon aléatoire dans le génome de la cellule hôte.
- 5) Transcription et traduction : l'ADN viral est alors transcrit, de la même façon que l'ADN cellulaire grâce à l'ARN polymérase cellulaire, en de multiples ARNm 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. Les ARN produits sont ensuite traduits dans le réticulum endoplasmique en polypeptides : la gp160 (précurseur des protéines d'enveloppes gp120 et gp41), la polyprotéine Gag contenant les protéines de structure (matrice, capsid, nucléocapsid), la polyprotéine GagPol contenant la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase.
- 6) Assemblage, bourgeonnement et maturation : les protéines virales s'autoassemblent en encapsidant l'ARN viral génomique au niveau de la membrane cellulaire puis sont libérées de la cellule hôte par bourgeonnement. Une fois libérés, les virions achèvent leur maturation grâce à l'action des protéases et au clivage des polyprotéines Gag et GagPol et peuvent infecter une nouvelle cellule (Freed 2015).

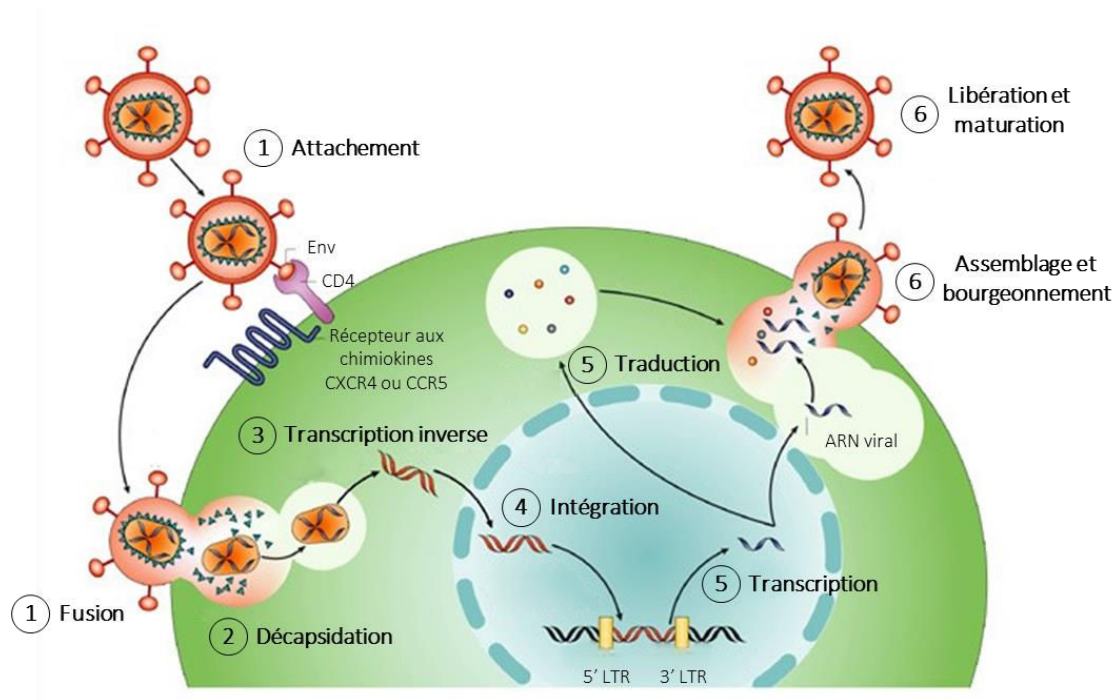


Figure 4 : Les différentes étapes du cycle de réplication du VIH-1 (d'après (Rambaut et al. 2004)). Le virus fusionne avec la membrane de la cellule hôte et libère le contenu de sa capsid dans le cytoplasme. La transcription inverse permet d'obtenir de l'ADN proviral à partir de l'ARN viral, qui sera transporté dans le noyau sous la forme d'un complexe de pré-intégration. La machinerie cellulaire détournée assure la transcription puis la traduction du génome viral. Les virions s'auto-assemblent et sont libérés par bourgeonnement à la surface de la cellule infectée. La maturation s'achève sous l'action des protéases.

2. Physiopathologie de l'infection par le VIH-1

a. Evolution naturelle de l'infection

Le VIH-1 est un virus qui se transmet par plusieurs fluides corporels tels que le sang, les sécrétions vaginales, le sperme et le lait maternel. Alors qu'environ 80% des adultes séropositifs ont été infectés par une exposition des muqueuses vaginales ou rectales lors d'un rapport sexuel, 20% l'ont été par voies percutanées ou intraveineuses. La principale caractéristique immunologique de l'infection par le VIH-1 est une diminution du nombre de LT CD4⁺ (Rowland-Jones 2003). Rapidement, la déplétion des LT CD4⁺ est devenue le principal marqueur de sévérité de l'infection et de l'immunodéficience liée au VIH-1.

La maladie évolue naturellement à travers trois phases successives (**Figure 5**) :

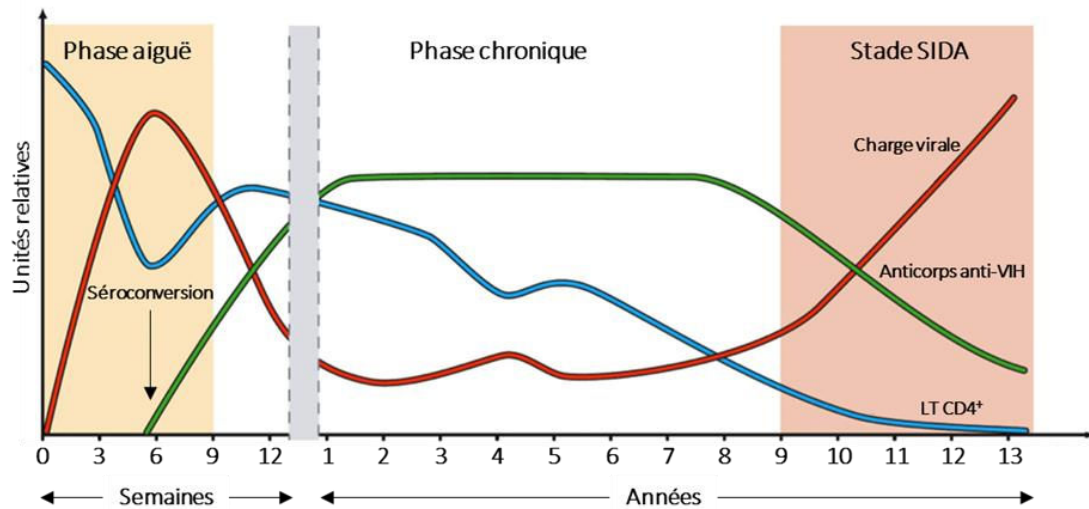


Figure 5 : Phases de l'infection par le VIH-1 et évolution naturelle en l'absence de traitement ART. Dans le sang, la phase aiguë se caractérise par la déplétion des LT CD4⁺ parallèlement à une augmentation exponentielle de la charge virale plasmatique. L'initiation de la réponse LT CD8⁺ spécifique permet de stabiliser la charge virale et de restaurer le nombre de LT CD4⁺ dans le sang. Pendant la phase chronique, la réplication virale continue et la pression exercée par la réponse immunitaire adaptative entraîne la sélection de virus mutés échappant au système immunitaire ; le nombre de LT CD4⁺ diminue progressivement et la réponse adaptative s'épuise. Le patient devient vulnérable aux infections opportunistes et à certaines tumeurs malignes, c'est l'entrée dans le stade SIDA.

1) la phase aiguë aussi appelée primo-infection : elle peut être asymptomatique chez certains patients ou bien notable par l'apparition de symptômes 5 à 30 jours après l'exposition au virus. Il peut s'agir de maux de tête, de maux de ventre, de diarrhées, d'un état pseudo-grippal ou d'éruptions cutanées sur le corps et le visage (Timothy Schacker et al. 1996). Immédiatement, après l'exposition au virus, l'inflammation induite par l'infection favorise le recrutement des LT CD4⁺CCR5⁺, principales cellules cibles du virus au site d'infection. Le VIH-1 se réplique alors activement dans la muqueuse et sous-muqueuse génitale. Cette phase est qualifiée de phase éclipse et a lieu entre 7 et 21 jours post-infection ; le virus n'est pas détectable au niveau plasmatique (Brandon F. Keele et al. 2008). Par la suite, le virus et les cellules infectées rejoignent la circulation lymphatique puis les organes lymphoïdes secondaires (Xu, Wang, and Veazey 2013). Le virus se propage rapidement et particulièrement au niveau du tissu lymphoïde

associé à l'intestin, le GALT (Gut-Associated Lymphoid Tissue) dans lequel les LT mémoires activés CD4⁺CCR5⁺ sont présents en très grand nombre (Brenchley, Schacker, et al. 2004; Mattapallil et al. 2005; R. S. Veazey et al. 2000). Environ 80% des LT CD4⁺ du GALT sont éliminés par apoptose au cours des trois premières semaines. En parallèle, plus de 50% des centres germinatifs de l'intestin sont perdus 80 jours après l'infection et impactent ainsi de façon indirecte les lymphocytes B (LB) (McMichael et al. 2010). A ce stade, entre 14 et 25 jours post-infection, la charge virale augmente de façon exponentielle et atteint un pic supérieur à 1.10⁶ copies/ml dans le sang (Little et al. 1999). Il coïncide avec une très forte production de cytokines inflammatoires par les cellules de l'immunité innée dite « tempête cytokinique » (Roberts et al. 2010). Celle-ci joue un rôle dans la mortalité des LT CD4⁺ et contribue à une forte activation cellulaire. De plus, le processus d'apoptose associé provoque la libération de particules apoptotiques possédant des propriétés immunosuppressives. De ce fait, alors que la déplétion des LT CD4⁺ est en partie liée à l'élimination des cellules directement infectées, l'ensemble de ces mécanismes indirects (activation immunitaire et immunosuppression) favorisent aussi la propagation virale et impacte négativement l'homéostasie immunitaire (Okoye and Picker 2013; Février, Dorgham, and Rebollo 2011). Enfin, la charge virale plasmatique se stabilise avec l'initiation de la réponse T CD8 spécifique, parallèlement à un nombre de LT CD4⁺ qui revient à un niveau proche de la normale dans le sang mais pas dans le GALT (Mattapallil et al. 2005). Parallèlement, la réponse anticorps par les LB se met en place entre 3 et 4 semaines après l'infection (Tomaras et al. 2008). A ce stade, la dissémination virale est déjà suffisamment avancée pour permettre la formation de réservoirs viraux à travers l'organisme (Bruner et al. 2016; Pilcher et al. 2004; T Schacker et al. 2000).

2) la phase chronique, aussi appelée la phase de latence clinique : elle est asymptomatique et peut durer entre 5 à 12 ans mais varie considérablement d'un patient à un autre (Lemp et al.

1990). Durant cette période, le virus continue à se répliquer. La pression exercée par la réponse immunitaire adaptative sur la réplication virale associée aux erreurs non corrigées de la transcriptase inverse contribuent à l'apparition de virus mutés échappant à la reconnaissance des antigènes viraux, aux anticorps neutralisants et à la réponse des LT cytotoxiques (Hunt et al. 2008; Wei et al. 2003). La formation de réservoirs viraux est entretenue au sein des LT CD4⁺ mémoires (Siliciano et al. 2003) et des macrophages (Kruize and Kootstra 2019). Ces réservoirs permettent au virus de se réactiver malgré la pression exercée par le système immunitaire (Pace et al. 2011). A cette persistance virale, sont associées des altérations quantitatives et qualitatives des cellules immunitaires : activation immunitaire et inflammation chronique. Ces processus seront abordés plus spécifiquement en partie II.

3) le stade SIDA : c'est la phase terminale de l'infection en l'absence de traitement. Il est défini par un nombre absolu de LT CD4⁺ inférieur au seuil de 200 cellules par mm³ dans le sang et par la survenue de symptômes cliniques. Cette phase s'accompagne d'une mortalité cellulaire accrue, une activation immunitaire forte, un changement du profil de LT CD4⁺ Th1 vers un profil Th2, une diminution de la réponse CD8 spécifique via une altération des fonctions cytotoxiques et une mort cellulaire importante (Langford, Ananworanich, and Cooper 2007). Le patient devient susceptible aux infections opportunistes (Low et al. 2016) et à certaines tumeurs malignes (Shiels and Engels 2017) et meurent rapidement.

b. Apport des traitements antirétroviraux

Au début de l'épidémie par le VIH-1 dans les années 1980, les patients étaient traités tardivement et uniquement pour les infections opportunistes, sans toutefois changer le pronostic vital du patient. Le premier traitement ART efficace à avoir été développé est l'azidothymidine

(AZT) et apparait en 1987. Il s'agit d'une molécule permettant de bloquer une des enzymes majeures du cycle de réplication virale : la transcriptase inverse. Les premiers essais cliniques ont mis en évidence une augmentation du nombre de LT CD4⁺ et une espérance de vie prolongée des patients en stade SIDA (Fischl et al. 1987). Cette stratégie a permis de réduire la mortalité et la morbidité associées à l'apparition de maladies opportunistes avec en revanche des effets secondaires très importants pour le patient. Cependant, le VIH-1 s'est rapidement adapté à cette monothérapie et a développé des résistances (Larder, Darby, and Richman 1989). Ce n'est qu'en 1996 que le développement de molécules ciblant d'autres protéines virales comme la protéase et l'intégrase (Hammer et al. 1996; Laskey and Siliciano 2014) permet d'envisager des combinaisons de plusieurs ARV et de limiter les résistances.

L'objectif principal du traitement ART est d'empêcher la progression vers le stade SIDA en restaurant et maintenant un nombre de LT CD4⁺ supérieur à 500 cellules/mm³. Pour cela, le traitement doit réduire drastiquement la charge virale plasmatique à un niveau indétectable de l'ordre de 50 copies/mL. En effet, ce seuil maximise la restauration immunitaire et minimise le risque de sélectionner des virus résistants. Il réduit également la morbidité associée à l'infection. L'OMS recommande de traiter toute personne infectée le plus tôt possible après le diagnostic. En effet, le traitement ART constitue un moyen performant de réduire le risque de transmission du virus par voie sexuelle (Donnell et al. 2010) en plus des bénéfices apportés par le contrôle de la réplication virale sur la morbidité et mortalité associée (Iwuji et al. 2011).

L'impact des traitements ART sur la réponse immunitaire est notable et d'autant plus lorsque l'initiation du traitement est précoce (Cellerai et al. 2011; Hocqueloux et al. 2013). Ils permettent en premier lieu de réduire drastiquement la charge virale et ainsi d'optimiser la restauration du nombre de LT CD4⁺ à un taux supérieur à 500 cellules/mm³. Il a été montré un bénéfice immunologique associé à un ratio CD4/CD8 supérieur à 1, à la préservation du nombre de LT CD4⁺ mémoires, au maintien d'une diversité du répertoire T et notamment de la réponse

T CD8 spécifique, à une réduction de la fibrose des tissus lymphoïdes (M. Zeng et al. 2012; Hocqueloux et al. 2013; Celleraï et al. 2011). De plus, le traitement ART diminue également l'activation du système immunitaire, l'épuisement (Maartens, Celum, and Lewin 2014; Trautmann et al. 2006), et l'inflammation systémique chronique dont les conséquences délétères ont été mises en évidence au niveau cardio-vasculaire, métabolique, osseux et neurologique (Sandler et al. 2011).

3. Spécificité des traitements antirétroviraux

a. Différentes classes d'antirétroviraux

Les ARV sont regroupés en six classes différentes en fonction de l'étape du cycle de réplication bloquée : les antagonistes du corécepteur d'entrée CCR5 (anti-CCR5), les inhibiteurs de fusion (IF), les inhibiteurs nucléosidiques (INTI) et les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI), les inhibiteurs de l'intégrase (INI) et les inhibiteurs de la protéase (IP). Actuellement, l'OMS préconise l'association de trois ARV afin de limiter l'émergence de virus résistants et de s'adapter à la variabilité de réponses aux traitements des patients (Calvez et al. 2017; Todesco et al. 2015), avec en première intention l'association de deux INTI avec un troisième agent. La combinaison de la trithérapie pourra être adaptée en fonction de la réponse virologique et immunologique du patient mais aussi de la tolérance. Le traitement ART doit réduire la charge virale plasmatique à 50 copies/mL en six mois avec des objectifs intermédiaires de référence après 1 et 3 mois de prise du traitement. L'échec de ces objectifs implique la recherche d'une mauvaise observance chez le patient, la possibilité d'interaction médicamenteuse ou un sous-dosage du traitement ART, et de corriger la cause identifiée dans les plus brefs délais.

Il existe désormais une trentaine de molécules antirétrovirales sur le marché. Les interactions médicamenteuses entre les ARV, ou bien avec d'autres médicaments, sont nombreuses. Ces interactions potentialisent ou antagonisent l'effet d'un médicament. Ces dernières se manifestent principalement au niveau de l'absorption intestinale et du métabolisme hépatique. Elles sont majoritairement basées sur le cytochrome P450 3A4 (CYP 3A4) qui est l'une des enzymes majeures impliquées dans le métabolisme de plus de 60% des médicaments commercialisés.

Malgré le développement de nouveaux ARV agissant sur des sites d'actions différents, aujourd'hui deux associations fixes d'INTI sont recommandées préférentiellement pour leur efficacité, leur tolérance ainsi que la facilité de prise du traitement (1 comprimé par jour) qui permet une meilleure compliance du patient. Il s'agit de l'association ténofovir disoproxil fumarate (TDF)/emtricitabine (FTC) et de l'association abacavir (ABC)/lamivudine (3TC). Elles présentent la même efficacité sur le plan virologique et immunologique lorsqu'elles sont associées à l'inhibiteur d'intégrase dolutégravir (DTG), contrairement à ce que suggéraient des études plus anciennes où ces molécules étaient associées à l'éfavirenz ou des IP (Arribas et al. 2008; Gallant et al. 2006; Sax et al. 2011; Post et al. 2010). L'association ABC/3TC constitue une alternative au TDF/FTC chez les patients à risque rénal ou osseux, et elle est fortement préconisée si le patient ne porte pas l'allèle HLA B*5701 afin de limiter une réaction d'hypersensibilité de type IV pouvant être mortelle. La majorité des patients infectés par le VIH-1 est traitée par une trithérapie composée de TDF/FTC ou ABC/3TC associée à un inhibiteur d'intégrase de première génération, le raltégravir (RAL) ou de seconde génération, le dolutégravir (DTG) ou le bictégravir (BIC). A noter qu'un test génotypique incluant la recherche de mutation de résistance dans le gène de l'intégrase est recommandé avant l'initiation du premier traitement ART associant un INI. Quelques différences sont observées entre RAL et DTG ou BIC. Le RAL est le premier représentant de la classe des INI et présente

une efficacité et une tolérance globalement bonne. En revanche, en cas d'échec virologique l'apparition de virus résistants est forte contrairement au DTG et au BIC qui présentent l'avantage d'une sélection de virus résistants plus faible. Associé au TDF/FTC, son efficacité et sa tolérance sont bonnes et ont été démontrées dans plusieurs essais cliniques de phase 3 (Raffi et al. 2013; S. Walmsley et al. 2015; S. L. Walmsley et al. 2013; Clotet et al. 2014). Le RAL et DTG ont montré des effets indésirables neuropsychiques (troubles du sommeil, anxiété, céphalées, vertiges et troubles de la concentration) et sont associés à des arrêts plus fréquents du traitement dans le cas du DTG (Hoffmann et al. 2017; Peñafiel et al. 2017). De plus, des travaux ont mis en évidence un effet possible du DTG dans la prise de poids (Norwood et al. 2017) et du RAL dans des modifications de composition de la graisse corporelle (McComsey et al. 2016), des effets initialement sous-évalués. Compte tenu du recul clinique désormais significatif et les effets indésirables limités par rapport à d'autres combinaisons, ces schémas thérapeutiques restent les plus prescrits en première intention.

b. Pharmacocinétique : formulation et diffusion des antirétroviraux

Le virus, bien qu'il soit contrôlé, persiste à l'état latent à travers des réservoirs (Lambotte et al. 2004; Trono et al. 2010), difficilement accessibles à la diffusion des ARV. Les connaissances sur la capacité de diffusion des ARV dans ces différents réservoirs représentent actuellement un enjeu fondamental pour pouvoir envisager un traitement curatif du VIH-1. Ils constituent actuellement le facteur limitant pouvant conduire à un échec thérapeutique, et ce malgré un traitement ART efficace et une observance optimale. D'une façon générale, plusieurs facteurs conditionnent la diffusion tissulaire des médicaments : leurs propriétés physicochimiques comme leur poids moléculaire et leur lipophilie, la fixation aux protéines plasmatiques pouvant ralentir la diffusion du médicament, les propriétés anatomiques et

physiologiques du compartiment viral, c'est-à-dire le pH, la concentration en protéines cellulaires ou tissulaires capables de lier le médicament ou encore la lipophilie. Enfin, des transporteurs peuvent faciliter ou empêcher l'entrée des ARV au sein des cellules et à travers les barrières anatomiques. Les degrés de pénétrance des ARV les plus faibles sont retrouvés dans le système nerveux central (SNC) lié à la présence de la barrière hématoencéphalique (Ene, Duiculescu, and Ruta 2011). La diffusion dans les liquides génitaux est variable. A l'inverse, la muqueuse rectale qui présente la caractéristique d'être lipophile, richement vascularisée et contenant de nombreuses protéines de transport, permet une diffusion très importante des ARV (Thompson, Cohen, and Kashuba 2013; Else et al. 2011; S. Taylor and Davies 2010). Toutefois, le degré de pénétrance des ARV dans ce tissu reste très variable selon la classe de médicaments et au sein même de celle-ci (Cottrell, Srinivas, and Kashuba 2015).

c. Comorbidités liées à la persistance virale et à la toxicité des antirétroviraux

Le développement des ARV et les progrès de la recherche ont permis d'améliorer sensiblement l'efficacité et la tolérance de ces médicaments mais certains effets indésirables subsistent. Les effets combinés de l'infection (persistance du virus, associée à une inflammation et une activation du système immunitaire) et des ARV peuvent mener à l'apparition de comorbidités.

Les troubles métaboliques sont des effets indésirables caractéristiques d'une prise du traitement ART au long cours et concernent la très grande majorité des ARV. Ils sont basés sur les troubles du métabolisme lipidique (lipodystrophie) et glucidique (insulinorésistance). La lipodystrophie, c'est-à-dire la modification de la répartition du tissu adipeux corporel, est une complication historique du traitement ART et représente un surrisque cardiovasculaire. A la suite des stratégies thérapeutiques recommandées depuis 2010 qui préconisent l'abandon des

INTI et des IP les plus pourvoyeurs d'anomalies métaboliques, les symptômes cliniques se sont améliorés. La perturbation du métabolisme glucidique repose principalement sur un état d'insulinorésistance pouvant conduire au risque de développer un diabète de type 2. Le rôle de certains ARV, en particulier les IP, ayant des effets néfastes sur la sécrétion d'insuline (B. Sharma 2014) favorisant la survenue d'un diabète, a été montré avec l'utilisation d'association antirétrovirales de premières générations (De Wit et al. 2008; Ledergerber et al. 2007; Capeau et al. 2012; Riyaten et al. 2015). Il n'a pas été retrouvé d'association entre le risque de diabète et la mise en place des stratégies thérapeutiques recommandées depuis 2010. Il faut cependant noter que le virus contribue également à l'installation de ces désordres métaboliques (Giralt, Domingo, and Villarroya 2011).

De nombreuses autres comorbidités ont été observées (Allavena et al. 2018) : ostéoporose, sarcopénie, apparition de myopathies et de fatigue musculaire. On note également diverses manifestations cardiovasculaires telles que l'athérosclérose, l'hypertension artérielle, l'insuffisance cardiaque et l'infarctus du myocarde. En France, les maladies cardiovasculaires constituent la troisième cause de décès des patients infectés. L'essai clinique SMART montrent que le VIH-1 lui-même est un facteur de risque d'athérosclérose (Ross et al. 2009; Grunfeld et al. 2009) et certaines études insistent sur le rôle de l'activation immunitaire prolongée et l'inflammation à bas bruit comme facteurs de risques de développer ces pathologies cardiovasculaires (Nou, Lo, and Grinspoon 2016; S. Lang et al. 2012). Des atteintes rénales sont également à considérer en lien avec la forte prévalence des comorbidités cardiovasculaires et métaboliques, du vieillissement de la population, et de l'impact de l'exposition cumulée et prolongée à certains ARV. Enfin, les maladies neurodégénératives (Nightingale et al. 2014; Robertson et al. 2010; A. Shah et al. 2016) et l'apparition de troubles psychiatriques (troubles dépressifs, anxieux, état de stress) (Langebeek et al. 2017) sont également notables.

Malgré l'apport du traitement ART, deux problématiques majeures restent à prendre en considération dans la prise en charge de cette maladie afin de limiter l'incidence des comorbidités : la persistance du virus au sein de réservoirs viraux et les défauts de la réponse immunitaire associés à cette persistance.

II. Persistance virale et réponses immunitaires altérées

1. Persistance du virus

a. Persistance virale et cinétique d'établissement des réservoirs

Les réservoirs viraux sont définis comme des populations cellulaires ou sites anatomiques dans lesquels des formes virales compétentes pour la réplication virale s'accumulent et persistent avec une cinétique de renouvellement lente (Blankson, Persaud, and Siliciano 2002). La preuve clinique de l'existence de ces réservoirs repose sur l'observation d'un rebond viral rapide pour la grande majorité des patients interrompant leur traitement alors que le virus n'était pas détectable dans le sang périphérique (Davey et al. 1999; Finzi et al. 1999; Kulpa and Chomont 2015) (**Figure 6**). L'hypothèse de cellules dormantes pouvant contenir le virus intégré naît en 1997 avec les travaux de Robert Siliciano. Il revient alors sur son hypothèse initiale, basée sur un modèle mathématique, d'une éradication complète du virus en moins de trois ans et estime finalement nécessaire plus de 60 ans de prise d'un traitement ART pour parvenir à cet objectif (Finzi et al. 1999; Siliciano et al. 2003; Strain et al. 2003). Aujourd'hui, trois arguments expliquent cette durée :

- La persistance d'un faible nombre de cellules dormantes à longue durée de vie contenant du génome viral intégré pouvant relancer l'infection (Siliciano et al. 2003)

- L'existence d'une réplication virale résiduelle via des cycles d'infection productifs à bas bruits, principalement dans les tissus où la diffusion des ARV est limitée (van Zyl, Bale, and Kearney 2018)
- Les altérations persistantes de la réponse immunitaire, détaillées en partie II.3

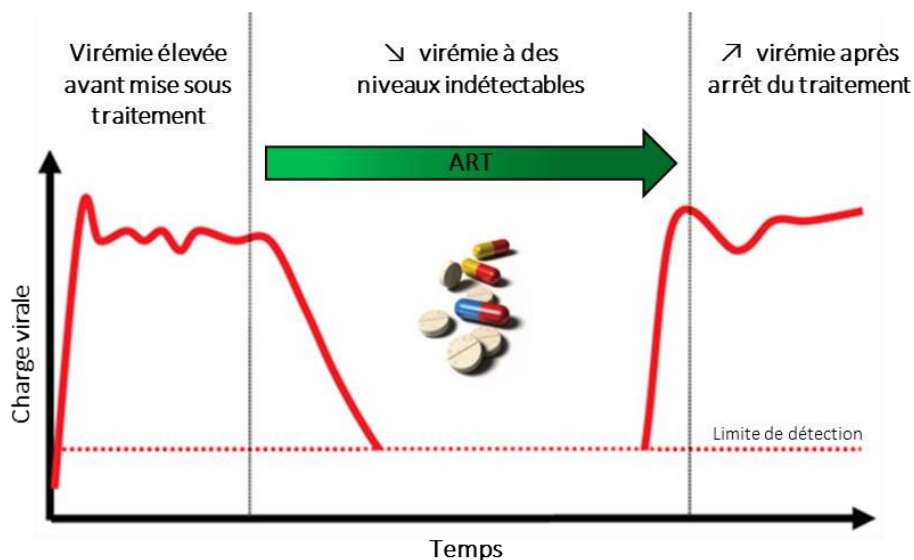


Figure 6 : Définition clinique du réservoir viral (adaptée de (Kulpa and Chomont 2015)). Alors que l'infection VIH-1 est caractérisée par une virémie élevée, le traitement ART permet de réduire drastiquement la charge virale à des niveaux indétectables par les méthodes utilisées en clinique (<50 copies/mL). En revanche, lorsque le traitement est interrompu, la réplication virale reprend et la virémie augmente de nouveau ; on parle de rebond viral. Celui-ci est révélateur de la persistance du virus au sein de réservoirs cellulaires et anatomiques pendant la phase de traitement.

L'établissement des réservoirs viraux se fait très précocement au cours de l'infection. L'initiation d'un traitement ART dix jours après le début des symptômes en phase aigüe n'empêche pas la génération de cellules infectées de manière latente (T. W. Chun et al. 1998). Ce résultat a été confirmé dans le modèle de primates non-humain (PNH) d'infection par le virus de l'immunodéficience simienne (SIV) pour lequel le traitement ART a été initié trois jours post-infection puis interrompu après 24 semaines de traitement. Un rebond viral a été observé rapidement en phase de post-arrêt indiquant la formation de réservoirs dès les trois premiers jours de l'infection (Whitney et al. 2014). Déterminer la cinétique d'établissement des

réservoirs est une question à part entière. Brièvement, deux modèles ont émergé : la latence avant activation suggère que les cellules quiescentes sont directement infectées (Swiggard et al. 2005; Cameron et al. 2010; Saleh et al. 2007) tandis que la latence post-activation indique que les cellules mémoires activées sont infectées lors de l'activation, échappent à la mort cellulaire et reviennent à l'état de repos (Bosque and Planelles 2009). Alors que le second scénario implique que les réservoirs latents ne peuvent être établis avant la génération de cellules mémoires, le premier suggère qu'ils peuvent être constitués dès les premiers jours de l'infection (Kulpa and Chomont 2015). De plus, l'identification du moment précis est techniquement difficile à élucider car dans les premiers temps, la majorité des cellules infectées sont susceptibles de l'être de manière productive, ce qui complique l'effort d'identification de la faible fraction de cellules réservoirs qui persisteront sous traitement ART.

Bien que les ARV ne peuvent avoir un impact sur les réservoirs déjà constitués (T. W. Chun et al. 1998; Geeraert, Kraus, and Pomerantz 2008), ils restent cependant intéressants pour interrompre leur constitution à travers l'organisme et réduire leur taille globale, ce qui pourrait prolonger le délai avant le rebond viral en phase de post-arrêt. Plusieurs études indépendantes ont démontré le bénéfice thérapeutique d'initier le plus rapidement possible un traitement ART en phase aiguë de l'infection (Ananworanich, Dubé, and Chomont 2015). Fait intéressant, le délai entre l'interruption des ARV et le début du rebond viral est en corrélation avec la virémie observée en phase aiguë et avec l'ADN proviral à l'arrêt du traitement (J. P. Williams et al. 2014).

b. Réservoirs cellulaires et anatomiques

Les LT CD4⁺ représentent le principal réservoir cellulaire (Finzi et al. 1997; Chomont et al. 2009). D'une part, ce sont des cibles naturelles du VIH-1, elles expriment à la fois le

récepteur CD4 et les corécepteurs CXCR4 ou CCR5 nécessaires à l'entrée du virus. D'autre part, le VIH-1 a tiré profit d'une caractéristique fondamentale du système immunitaire ; la génération de LT mémoires, maintenus au repos et à longue durée de vie. Il existe des différences importantes en termes de susceptibilité à la latence virale en fonction de l'état de différenciation des LT CD4⁺. On distingue classiquement les cellules naïves qui n'ont pas rencontré l'antigène spécifique, les cellules effectrices induites par contact avec l'antigène spécifique et à courte durée de vie, et les cellules mémoires à longue durée de vie où l'on différencie les LT mémoires souches (T_{SCM}), mémoires centrales (T_{CM}), mémoires transitionnelles (T_{TM}) et mémoires effectrices (T_{EM}). En phase chronique, on estime entre 1 et 10 cellules CD4⁺ infectées de manière latentes et compétentes pour la réplication virale par million de LT CD4⁺ infectés (Siliciano et al. 2003; Abreu et al. 2019). Les LT CD4⁺ naïfs sont peu permissifs à l'infection et contribuent très faiblement à l'augmentation du pool de cellules réservoirs (Fabre-Mersseman et al. 2011; Wightman et al. 2010). Les LT CD4⁺ T_{SCM}, récemment identifiés, sont caractérisés par leur grande capacité d'auto-renouvellement, une très longue durée de vie et leur capacité à se différencier en T_{CM} et T_{EM} (Gattinoni et al. 2011; Cieri et al. 2013). Ces cellules en proportion très faible alimentent peu le réservoir mais possèdent néanmoins les caractéristiques d'un réservoir viral durable (Jaafoura et al. 2014; Buzon et al. 2014). Les LT CD4⁺ T_{TM}, encore mal définis fonctionnellement, semblaient représenter un réservoir important avant que des travaux mettent en avant une forte proportion de virus défectueux incapables de se répliquer au sein de ces cellules (Soriano-Sarabia et al. 2014). Les LT CD4⁺ T_{CM} sont décrits comme le réservoir principal du fait de leur longue durée de vie, de leurs capacités à produire activement du virus après réactivation, à proliférer et à migrer dans les organes lymphoïdes (Chomont et al. 2009). Enfin, les LT CD4⁺ T_{EM} sont les cellules mémoires à plus courte durée de vie mais sont capables d'initier une réponse effectrice rapidement, avec un fort potentiel de prolifération. Ce sont également des cellules capables de

migrer dans les tissus non lymphoïdes, responsables de l'établissement de réservoirs anatomiques. Le rôle majeur des T_{CM} dans la constitution du réservoir cellulaire est largement décrit (Chomont et al. 2009; Soriano-Sarabia et al. 2014). Enfin, d'autres LT CD4⁺ tels que les LT régulateurs (Tregs) et les LT folliculaires (Tfh) ont été identifiés comme réservoirs (Lindqvist et al. 2012; Perreau et al. 2013; Tran et al. 2008).

Le compartiment LT CD4⁺ quiescent n'est pas le seul à être à l'origine du rebond viral lorsque le traitement ART est interrompu. Les travaux de Chun et al. ont révélé le rôle des macrophages en mettant en évidence une différence de séquences au sein des LT CD4⁺ réservoirs préexistants et celles détectées immédiatement après l'arrêt du traitement ART (T. W. Chun et al. 2000). Cette diversité virale soulève également le concept de compartimentalisation du virus au sein de réservoirs tissulaires (Delobel et al. 2005). Les macrophages présentent plusieurs caractéristiques leur conférant un rôle important dans le maintien du réservoir : une durée de vie de quelques jours à plusieurs années selon les tissus (Blankson, Persaud, and Siliciano 2002; Sharova et al. 2005), une dissémination tissulaire importante (Crowe, Zhu, and Muller 2003) dans des tissus à faible pénétrance des ARV (Sigal and Baltimore 2012; Perno et al. 1998; Aquaro et al. 2002), un effet cytopathique du virus limité (Swingler et al. 2007), la capacité à transmettre efficacement le virus aux LT CD4⁺ entraînant indirectement leur déplétion (Duncan, Russell, and Sattentau 2013; Groot, Welsch, and Sattentau 2008). En revanche, elles présentent un faible taux d'infectiosité (~50 cellules infectées par million de macrophages de ganglions lymphatiques) (T. W. Chun et al. 1997) attribué à une faible expression de CD4 mais aussi à des complications lors de la transcription inverse et l'importation nucléaire conduisant à une infection abortive (O'Brien 1994; Diamond et al. 2004).

Parmi les autres populations cellulaires impliquées dans la latence virale, notons la contribution des DC. Bien qu'elles expriment peu le récepteur CD4 et les corécepteurs CXCR4

et CCR5, elles sont capables de capter le virus à leur surface grâce à la lectine DC-sign (Geijtenbeek et al. 2000). Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), localisées principalement dans les muqueuses, peuvent être infectées et produire du virus (O'Brien, Manches, and Bhardwaj 2012; G. Li et al. 2014). Les cellules dendritiques folliculaires (fDC), présentes dans les centres germinatifs, peuvent capter un grand nombre de virus, de souches variées, à leur surface, jouant ainsi un rôle de réservoir dynamique grâce à leur durée de vie de quelques jours (J. Zhang and Perelson 2013; B. F. Keele et al. 2008). Enfin, le rôle d'autres populations cellulaires dans le processus de latence virale reste à préciser. C'est le cas des cellules NK (Valentin et al. 2002; Bernstein et al. 2006), des LB (S Moir et al. 1999), et des cellules souches hématopoïétiques (CSH) CD34⁺ (C. C. Carter et al. 2010).

La notion de réservoir se situe aussi à l'échelle tissulaire (Wong and Yukl 2016). Le réservoir anatomique principal est représenté par les organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate) et les tissus lymphoïdes associés à la muqueuse intestinale et bronchique. Des réservoirs viraux sont également détectés au sein de la moelle osseuse et du thymus (Haase 1999). Les ganglions lymphatiques sont décrits comme étant le premier réservoir anatomique du fait de la multitude de sites de réplication virale possibles et indépendants entre eux (Ganusov and De Boer 2007; Horiike et al. 2012). En outre, ce tissu est enrichi en fDC, T_{fh} et T_{CM} aggravant localement la transmission et la réplication virale. Une étude récente dans un modèle d'infection SIV indique que les zones B folliculaires constituent un site sanctuaire de réplication virale, en raison de l'exclusion relative des LT CD8⁺ cytotoxiques sur ce site (Fukazawa et al. 2015). De plus, chez le PNH de type Sooty Mangabey, hôtes naturels du SIV, la clairance du virus au sein des ganglions lymphatiques est rapide et associée à une infection mieux contrôlée (Martinot et al. 2013), soulignant le rôle de l'infection persistante des centres germinatifs dans la maladie (Tenner-Racz et al. 1998; 1988; Burton et al. 2002). Enfin, la

concentration des ARV est plus faible dans les ganglions par rapport au sang périphérique, conduisant à une réplication virale continue (Fletcher et al. 2014).

Le GALT est un autre réservoir majeur (T. Chun et al. 2008; Poles et al. 2006). L'infection de l'intestin est une étape précoce dans la pathogénèse de l'infection par le VIH-1 et les LT CD4⁺ subissent une très forte déplétion dès les premiers jours de l'infection (jusqu'à 60%) (Ronald S. Veazey et al. 1998; Mehandru et al. 2004; Brenchley, Schacker, et al. 2004). Les cellules qui survivent persistent sous forme quiescente et intègrent une forme latente du VIH-1 malgré l'initiation du traitement ART (Finzi et al. 1999; T. W. Chun et al. 1998; Joos et al. 2008). Plusieurs études indépendantes mettent en évidence l'existence de réservoirs viraux de nature différente selon la section du tube digestif considérée rendant compte de compartiments anatomiques immunologiquement distincts (Yukl et al. 2013). Par exemple, la répartition des macrophages dans l'intestin indique qu'il existe trois fois plus de macrophages CCR5⁺ dans les sections distales de l'intestin que dans les sections plus proximales (McElrath et al. 2013) et que les niveaux d'infection sont différents entre celles-ci (Yukl et al. 2010; McElrath et al. 2013). Enfin, le GALT est également le siège d'une diversité virale selon la section considérée (Avettand-Fenoel et al. 2011; van Marle et al. 2007).

Plusieurs autres tissus servent de réservoirs durables. L'infection au sein du SNC a principalement été décrite à la suite d'autopsie de patients en stade SIDA. L'infection du tractus génital masculin et féminin est mise en avant par la détection de formes libres ou intégrés du virus au sein de lymphocytes ou macrophages (Coombs, Reichelderfer, and Landay 2003). D'autres réservoirs potentiels précédemment négligés tels que le rein (Canaud et al. 2014), le foie (Penton and Blackard 2014), et le tissu adipeux (Damouche et al. 2015) jouent un rôle dans la persistance virale.

c. Mécanismes de persistance virale et identification des cellules réservoirs

Des efforts importants sont menés sur l'identification des mécanismes par lesquels le virus persiste avec un double objectif ; empêcher la constitution des réservoirs, mobiliser de nouveau ces réservoirs afin d'éliminer le virus en phase chronique de l'infection. A l'échelle moléculaire, alors que le génome viral s'intègre préférentiellement dans les régions transcriptionnellement actives (Lewinski et al. 2006), certains gènes viraux non activés ont un rôle important dans la latence virale (Van Der Sluis, Jeeninga, and Berkhout 2013). Les mécanismes de latence moléculaire sont complexes et peuvent inclure (Coiras et al. 2009) : des mécanismes épigénétiques par modifications post-transcriptionnelles (comme l'acétylation, méthylation, phosphorylation, sumoylation et ubiquitinylation), la régulation de facteurs de transcription comme NF- κ B, NFAT et SP1, la présence de répresseurs transcriptionnels tels que SV40 tardif, APOBEC3G, I κ B α , l'élongation inefficace des transcrits viraux, un dysfonctionnement de l'épissage des ARN viraux, des processus antiviraux de l'hôte (ARNi et miARN).

Un paradoxe intéressant repose sur le très faible nombre de cellules contenant de l'ADN viral permettant une infection productive, par rapport au nombre de cellules potentiellement infectables (Brenchley, Hill, et al. 2004; Rouzioux and Richman 2013). En effet, le nombre de LT CD4⁺ quiescents contenant de l'ADN viral défectueux est environ 300 fois plus élevé que le nombre de cellules infectées et productives après activation cellulaire (Eriksson et al. 2013). Ainsi, l'identification de biomarqueurs spécifiques à la surface de ces cellules latentes capables d'infection productive est devenue une haute priorité scientifique. De nombreuses études ont démontré une association entre l'expression de marqueurs d'épuisement et les réservoirs viraux. Les travaux de Chew et al. (Chew et al. 2016), renforcés par les travaux de Fromentin et al. soulignent que les LT CD4⁺ épuisés sont enrichis en ADN viral (Fromentin et al. 2016).

Récemment, des études complémentaires ont montré que l'expression de PD1 (Programmed cell death 1) serait un marqueur prédictif de la latence virale avant même l'initiation du traitement ART (Ghiglione et al. 2019) et qu'il existe un enrichissement du virus au sein des cellules qui expriment simultanément plusieurs marqueurs d'épuisement. Ces marqueurs peuvent constituer des indicateurs importants et ouvrent de nouvelles perspectives sur l'identification des réservoirs viraux. En outre, une étude *in vitro* permettant d'étudier les LT CD4⁺ infectés de manière latente a révélé une augmentation de l'expression de plus de 100 gènes au sein de ces cellules, dont 16 codant pour des protéines transmembranaires (Descours et al. 2017). Parmi elles CD32a, un récepteur de faible affinité pour le fragment Fc des IgG, serait un marqueur potentiel de certaines sous-populations de LT CD4⁺ infectés de manière latente et capables d'une infection productive. La pertinence de ce marqueur suscite toutefois une controverse (Descours et al. 2017; Wittner et al. 2018; Martin et al. 2018; Coindre et al. 2018).

2. La réponse immunitaire anti-VIH

a. La réponse innée en première ligne de défense

La réponse immunitaire innée se met en place rapidement grâce à la coordination de plusieurs acteurs cellulaires capables de reconnaître le virus de manière non spécifique via des senseurs universels de type PRR (pattern-recognition receptors). En raison de leur localisation et de leurs capacités à reconnaître l'antigène et à orchestrer les réponses immunitaires innées et adaptatives (Z. Ahmed et al. 2015), les DC - sentinelles du système immunitaires stratégiquement situées dans la peau, les muqueuses et le sang - sont particulièrement impliquées dès la phase précoce de l'infection par le VIH-1. L'interaction entre le virus et les

DC peut impliquer la reconnaissance de composants viraux par les PRR, la capture de virions et l'infection des DC (Persephone Borrow and Bhardwaj 2008). Ces interactions conduisent à l'activation des DC mais également à l'altération de leur maturation, et participent à la dissémination et l'amplification de l'infection (L. Wu and KewalRamani 2006). Sur le versant immunitaire, ces cellules assurent la présentation de l'antigène, contribuent à la production de cytokines pro-inflammatoires (Lubong Sabado et al. 2010), assurent en partie l'activation immunitaire (Manches, Frleta, and Bhardwaj 2014). Parmi les différentes populations de DC, les pDC jouent un rôle pro-inflammatoire crucial, très précocement lors de l'infection, via la production d'IFN-I (Liu 2005; Malleret et al. 2008; Fonteneau et al. 2004) et contribuent à l'engagement des LT CD4⁺ vers les voies d'apoptose (Herbeuval, Grivel, et al. 2005; Herbeuval, Hardy, et al. 2005).

Cette première vague de production cytokinique conduit à l'activation d'autres fractions cellulaires durant l'infection aiguë. Plus résistants à l'infection productive par l'expression augmentée des facteurs de restriction SAMHD1 et APOBEC3G, les monocytes sont néanmoins affectés quantitativement et qualitativement. Les populations CD16⁺ intermédiaires et non classiques qui produisent fortement certaines cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α (Dutertre et al. 2012), l'IL-1 β (Guo et al. 2014) et IP-10 (Simmons et al. 2013) sont augmentées. De plus, le VIH-1 affecte leurs fonctions ; la protéine Tat permet une production accrue d'IL-10 provoquant une activité immunosuppressive (Leghmari, Bennasser, and Bahraoui 2008). Les molécules de costimulation CD80/CD86 et d'inhibition PD-L1 (Programmed death-ligand 1) (Boasso et al. 2008; Meier et al. 2008) sont surexprimées sur les fractions monocytaires contribuant à l'altération de la réponse.

Les cellules NK sont également recrutées au stade précoce de l'infection et contribuent au contrôle viral par différents mécanismes. Certaines fractions de NK exercent des fonctions cytotoxiques (CD56^{low}CD16^{high}) et d'autres (CD56^{high}) exercent des fonctions

immunorégulatrices par leurs capacités à sécréter des cytokines inflammatoires (IFN γ , TNF α) (Cooper, Fehniger, and Caligiuri 2001). Les NK cytotoxiques contribuent au contrôle initial de la réplication virale par cytolysse des cellules infectées (Fogli et al. 2008). En phase aiguë, les NK cytotoxiques augmentent en nombre de même que leurs capacités de dégranulation et de production d'IFN γ (Alter et al. 2005). En revanche, des altérations de ces cellules ont été décrites durant la phase chronique avec i) des capacités cytotoxiques dirigées contre les LT CD4⁺ infectés diminuées par régulation à la baisse de l'expression des récepteurs activateurs des cellules NK, peu réversible sous traitement ART (Mela et al. 2005; Ward et al. 2007), ii) la présence de populations NK non fonctionnelles (CD56⁻CD16⁺) (Mavilio et al. 2003; 2005), iii) une diminution progressive du nombre de NK (Hu et al. 1995). Les cellules NK ont été associées à la progression de la maladie et à l'expression de CD14 soluble et d'IP-10 confirmant leur potentiel pro-inflammatoire et leur rôle dans l'activation immunitaire (Kuri-Cervantes et al. 2014). Les récepteurs KIR influencent fortement l'activation des cellules NK. La reconnaissance des molécules du CMH de classe I par ces récepteurs conduit à l'induction de signaux inhibiteurs. La régulation à la baisse des molécules HLA par la protéine virale Nef protège les cellules infectées des LT CD8⁺ et offre théoriquement le signal manquant aux cellules NK pour leur activation. Cependant, la régulation à la baisse des HLA A et B par Nef est couplée à la préservation des HLA C et E et empêche l'activation des cellules NK (Specht et al. 2008). Le VIH-1 est ainsi capable de moduler la réponse NK par le biais de ses protéines accessoires (Richard et al. 2010; A. H. Shah et al. 2010).

Enfin, les neutrophiles sont également sollicités et recrutés vers les sites d'infection. Ils exercent un rôle double, anti-infectieux mais également inducteur de dommages tissulaires. Dans le contexte de l'infection par le VIH-1, une perte de fonction est décrite (neutropénie, fonction antimicrobienne altérée) (Hensley-McBain and Klatt 2018). Leurs caractéristiques phénotypiques au cours de la phase précoce ont été récemment évaluées dans un modèle

d'infection SIV. L'instauration d'un traitement ART ne permet pas de restaurer la fonction des neutrophiles qui montrent un phénotype principalement immature (Lemaitre et al. 2020). De plus, ils exercent également une activité régulatrice de la réponse T. Le niveau d'expression de PD-L1 par les neutrophiles est en corrélation avec l'expression de PD1 et de CD57 à la surface des LT CD4⁺ et CD8⁺ (Bowers et al. 2014). Des dysfonctionnements de ces cellules sont ainsi observés et soulignent un état d'hyperactivation (Elbim et al. 1995; Michailidis et al. 2012; Campillo-Gimenez et al. 2014).

b. L'inflammation aigüe

L'activation du système immunitaire innée conduit à une tempête cytokinique qui précède le pic de la charge virale (**Figure 7**).

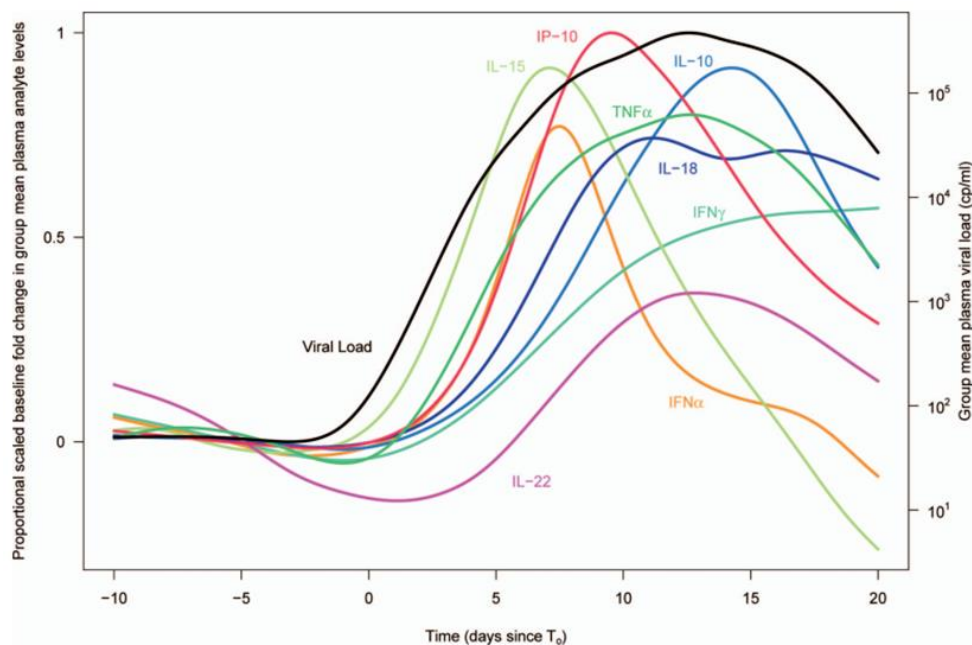


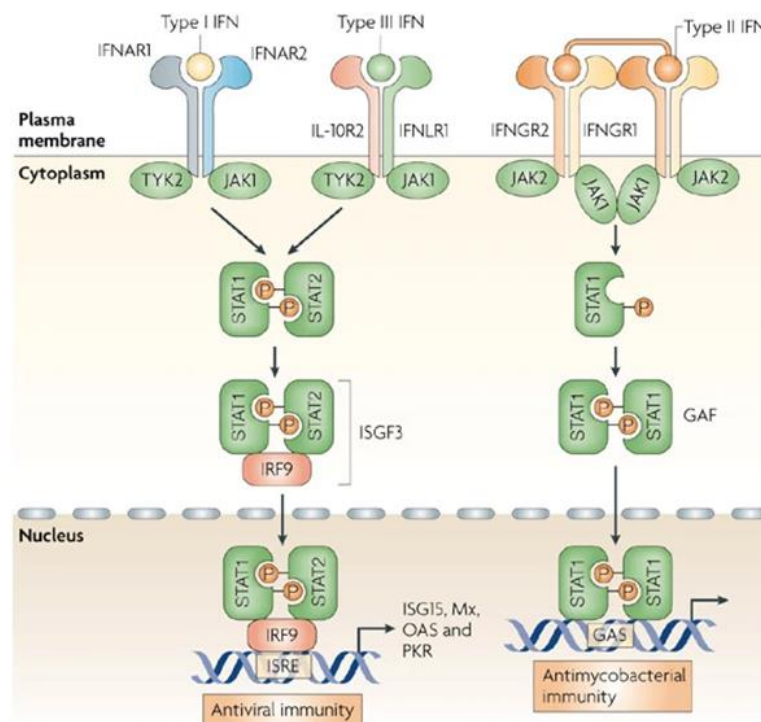
Figure 7 : Cascade cytokinique survenant en amont du pic de la charge virale en phase aigüe de l'infection VIH-1 (d'après (Stacey et al. 2009). L'évolution au cours du temps des niveaux plasmatiques de certaines cytokines par rapport à la baseline chez des sujets infectés de manière aigüe par le VIH-1 montre une cascade cytokinique qui précède le pic de la charge virale, vers J+6.

On observe en particulier une élévation séquentielle du niveau plasmatique de nombreuses cytokines et chimiokines : une augmentation rapide et transitoire d'IFN α et d'IL-15, une forte augmentation d'IP-10, une augmentation rapide et plus soutenue de TNF α et MCP-1, une augmentation plus lente d'IL-6, IL-8, IL-18 et IFN γ , et une augmentation tardive d'IL-10. L'ensemble de ces cytokines contribuent au contrôle de la réplication virale directement et/ou indirectement par l'activation d'autres mécanismes effecteurs. Cette réponse cytokinique exagérée contribue aussi à l'immunopathologie précoce de l'infection. Nous nous focaliserons sur les IFN-I dont le rôle est double dans le contexte de l'infection par le VIH-1 : protecteur par son activité anti-virale, et délétère par sa contribution à l'hyperactivation du système immunitaire (Hunt 2012; Nganou-Makamdop and Douek 2019).

La famille des IFN-I est une famille de cytokines multigéniques codant pour 13 sous-types d'IFN α , un seul IFN β et plusieurs produits monogéniques encore mal définis (IFN ϵ , IFN τ , IFN κ , IFN ω , IFN δ , IFN ζ). Dans l'infection par le VIH-1, ces cytokines sont produites en abondance et contribuent à une réponse anti-virale efficace qui interfère avec plusieurs aspects de la réplication virale (Yan and Chen 2012). Tous les IFN-I se lient avec diverses affinités à leur récepteur commun IFNAR dont l'engagement déclenche la voie de signalisation JAK/STAT (**Figure 8**). Les deux kinases JAK1 et TYK2 sont activées et phosphorylent les facteurs cytoplasmiques STAT1 et STAT2. Ces derniers s'assemblent ensuite au facteur IRF9 pour former le facteur de transcription ISGF3 (IFN Stimulated Genes factor 3). Après translocation nucléaire, ISGF3 se fixe à son promoteur ISRE (IFN Stimulated Response Elements) qui permet la transcription d'une multitude de gènes stimulés par l'IFN appelés ISG (interferon-stimulated gene) (Sadler and Williams 2008).

Plus de 500 ISG ont été décrits et leurs rôles sont vastes. Ils peuvent : i) coder pour des protéines anti-virales telles que Mx1, IFITM, IFIT, ii) agir plus spécifiquement sur le cycle de réplication

virale via les facteurs de restriction inhibant l'entrée cellulaire (TRIM5 α), la transcriptase inverse (APOBEC3G, SAMHD1), l'entrée et l'intégration nucléaire (Mx2), la traduction et l'assemblage (SLFN 11 et GBP5), et le bourgeonnement (téthérine) (Soper et al. 2018), iii) avoir une activité pro-inflammatoire telle que IP-10 dont le taux est associé à la progression de la maladie (Stylianou et al. 2000; A. S. Liovat et al. 2012; Noel et al. 2014), ou encore iv) être impliqués dans les mécanismes pro- ou anti-apoptotiques (Kaser, Nagata, and Tilg 1999; Herbeuval, Boasso, et al. 2005). A noter que les IFN-I sont les principaux inducteurs des ISG, mais les IFN de type II et III sont également capables d'induire leurs productions. Par exemple,



Nature Reviews | Immunology

Figure 8 : Voies de signalisation des IFN de type I, II et III après leur liaison à leur récepteur IFNAR (d'après (Sadler and Williams 2008)). La liaison des IFN de type I, II et III active les voies de signalisation JAK/STAT pour permettre la transcription des ISG dont les propriétés antivirales et immunomodulatrices jouent un rôle majeur dans l'infection VIH-1.

IP-10 et IFTM1 peuvent être induits à la fois par les IFN α et IFN γ alors que d'autres s'avèrent être plus spécifiques d'une réponse médiée par l'IFN γ . La régulation de l'expression des ISG

est complexe et reste incomplètement élucidée. Elle peut mettre en jeu des boucles autocrines d'auto-amplification, des boucles de rétrocontrôle négatives (Ivashkiv and Donlin 2014; Schneider, Chevillotte, and Rice 2014), être indépendante de l'IFN en utilisant la voie directe des TLR (Harman et al. 2011) ou encore varier en fonction de l'âge, le sexe, la consommation de tabac ou d'alcool.

c. Les réponses lymphocytaires T CD4 et CD8

Immédiatement après l'exposition au virus, l'inflammation induite par l'infection favorise le recrutement des cellules cibles LT CD4⁺ au site d'infection. Par la suite, le virus se propage rapidement dans les organes lymphoïdes secondaires et particulièrement au niveau du GALT dans lequel les LT CD4⁺ mémoires sont présents en grand nombre (Brenchley, Schacker, et al. 2004; Mattapallil et al. 2005; R. S. Veazey et al. 2000). La déplétion sévère du nombre de LT CD4⁺ se reflète ensuite dans le sang circulant et constituera le principal marqueur de sévérité de l'infection (Rowland-Jones 2003). L'infection cible préférentiellement les cellules spécifiques (Douek et al. 2002) expliquant l'inefficacité de la réponse CD4 chez les patients progressifs, puis se propage aux cellules activées et aux cellules du thymus. La déplétion LT CD4⁺ est entretenue par de multiples mécanismes imputables directement au virus ou indirectement à l'inflammation aiguë : l'effet cytolytique du virus dans les LT CD4⁺ infectés, des capacités de prolifération limitée, une plus grande susceptibilité à l'apoptose des LT CD4⁺ résiduels (Hazenberg et al. 2000), une forte activation cellulaire. L'activation exacerbée des LT survient précocement au cours de l'infection et persiste malgré un traitement ART efficace (Catalfamo et al. 2011; Paiardini and Müller-Trutwin 2013). Les dysfonctionnements de la réponse CD4 se manifestent par la perte de leurs capacités de prolifération et de production de cytokines (Younes et al. 2003). Seule la population de LT CD4⁺ producteurs d'IFN γ persiste.

Néanmoins, il semblerait que la contribution de la réponse CD4 dans le contrôle de la charge virale serait plus associée à la prolifération des cellules mémoires qu'à la production d'IFN γ soulignant à nouveau la fragilité de la réponse CD4 observée chez les patients progressseurs. L'atteinte du compartiment CD4 est en partie responsable du défaut de fonctionnalité des LT CD8⁺ en raison du rôle des cellules CD4⁺ dans l'activation et la réponse helper nécessaire à la coordination des réponses CD8 (Lichterfeld et al. 2004).

Les LT CD8⁺ ont une place importante dans la physiopathologie de l'infection en raison de leurs fonctions cytotoxiques et pro-inflammatoires : lyse antigène-spécifique des cellules cibles via la reconnaissance restreinte au CMH-I et sécrétion de perforine et granzyme, production de cytokines pro-inflammatoires (IFN γ , TNF α , IL-2) et de chimiokines (MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES). L'activation des réponses T CD8 a lieu durant la phase aigüe de l'infection et persiste jusqu'à la phase chronique. Environ 20% des LT CD8⁺ circulants peuvent être spécifiques du VIH-1 chez les patients chroniques non traités (Betts et al. 2001). La mise en place de la réponse innée et de l'inflammation amplifie leur état d'activation déjà élevé (Decrion et al. 2005). Si la mise en place très précoce de la réponse CD8 spécifique ne permet pas l'élimination du virus, elle est associée à la résolution du pic viral en fin de phase aigüe où seul le virus autologue est présent (Koup et al. 1994; P Borrow et al. 1994). La qualité de la réponse CD8 est notamment définie par sa polyfonctionnalité. Celle-ci est plus fréquemment retrouvée chez les patients non progressseurs et Elite Controllers (Betts et al. 2006; Hersperger et al. 2010; Migueles et al. 2008). Parallèlement, une sensibilité antigénique élevée et une avidité forte du TCR contribuent à la plus forte capacité des LT CD8⁺ à éliminer les cellules infectées (Price et al. 2005; Almeida et al. 2009). La réponse CD8 spécifique permet un contrôle viral à long terme (Betts et al. 2006), qui s'épuise progressivement à cause de l'émergence de variants viraux, de l'activation chronique et de l'atteinte des réponses helper.

Le nombre de LT CD4⁺ et le ratio CD4/CD8 sont des marqueurs consensuels de l'infection car fortement corrélés à la progression de la maladie (Wei et al. 1995). Les réponses CD4 et parallèlement CD8 sont quantitativement et qualitativement supérieures chez les patients Elite Controllers et participent au contrôle naturel de la réplication virale (Potter et al. 2007; Sáez-Cirión et al. 2007; Zaunders and Van Bockel 2013). En ce sens, ils constituent aussi des marqueurs d'efficacité du traitement ART. La restauration immunitaire sous ARV se produit généralement en tandem avec le déclin viral, mais ce n'est pas systématiquement le cas. Jusqu'à 30% des patients traités avec succès qui parviennent à une suppression totale du virus voient peu d'amélioration du nombre de LT CD4⁺ (répondeurs virologiques) et restent exposés à un risque plus élevé de complications cliniques à long terme (G. R. Kaufmann et al. 2005; Battegay et al. 2006; Tan et al. 2008; Tuboi et al. 2010).

d. La réponse lymphocytaire B

Une réponse anticorps se développe rapidement au cours de l'infection, mais avec une faible activité neutralisante. Les premiers anticorps anti-VIH sont détectés dans le sang environ trois à quatre semaines post-infection et leur détection est utilisée en stratégie diagnostique. S'ils limitent la propagation virale sans la contrôler, ils restent néanmoins importants dans la réponse NK et ADCC (Antigen-depend cell-mediated cytotoxicity). C'est seulement à partir de la 9^{ème} semaine post-infection qu'apparaît la réponse anticorps neutralisante, peu efficace, qui ciblera uniquement les protéines d'enveloppes du virus autologue (Tomaras et al. 2008; Wei et al. 2003). Depuis plusieurs années, des efforts se sont concentrés sur le potentiel d'anticorps très puissants produits par moins de 1% des patients plusieurs années après l'infection, appelés bNAbs pour anticorps neutralisants à large spectre. Ces bNAbs ont la capacité de neutraliser le virus en ciblant des régions très conservées de l'enveloppe virale nommés « site de

vulnérabilité », et de limiter la transmission du virus de cellule à cellule (Dufloo, Bruel, and Schwartz 2018). Ils suscitent alors un intérêt particulier dans le développement d'approches vaccinales (Subbaraman, Schanz, and Trkola 2018).

L'infection par le VIH-1 entraîne un grand nombre d'altérations de la réponse humorale à l'échelle cellulaire : (i) l'échappement à la réponse B par l'émergence de variants viraux, (ii) une diminution de la proportion de LB mémoires (Titanji et al. 2006) résultant d'une susceptibilité accrue à l'apoptose (Titanji et al. 2006; Van Grevenynghe et al. 2011; Rethi et al. 2013), (iii) un maintien des LB de faible affinité et une diminution de leur différenciation en LB mémoires (Lindqvist et al. 2012), (v) une diminution de l'expression des molécules de costimulation réduisant l'efficacité des coopérations T-B (Legendre et al. 1998), (vi) l'épuisement des LB lié à leur état d'activation (Susan Moir and Fauci 2009; Kardava et al. 2011).

3. Altérations de la réponse immunitaire en phase chronique de l'infection

L'établissement d'un état inflammatoire et d'activation sont le résultat de plusieurs mécanismes directement et indirectement associés à la réplication virale non contrôlée. Les mécanismes impliqués sont résumés en **Figure 9** et incluent la persistance virale, l'apparition de nouveaux variants viraux entraînant de nouvelles stimulations antigéniques permanentes, l'altération de la muqueuse intestinale conduisant à une translocation microbienne favorisant l'activation immunitaire, une perturbation des équilibres LT CD4⁺ Treg/Th17, les altérations métaboliques et immunologiques, les co-infections, la toxicité associée aux ARV, les facteurs de comorbidités (Deeks, Tracy, and Douek 2013).

a. Inflammation à bas bruit

L'inflammation chronique à bas bruit souvent associée à l'infection par le VIH-1 reste difficile à évaluer du fait de l'absence de paramètres consensus. En effet, des travaux ont caractérisé 34 marqueurs d'inflammation différents associés au risque cardiovasculaire chez les patients infectés (Vos et al. 2017) alors que certains marqueurs sont peu spécifiques (CRP, IL-6, IL-1 β , TNF α) et permettent de quantifier l'inflammation globale sans en préciser la source.

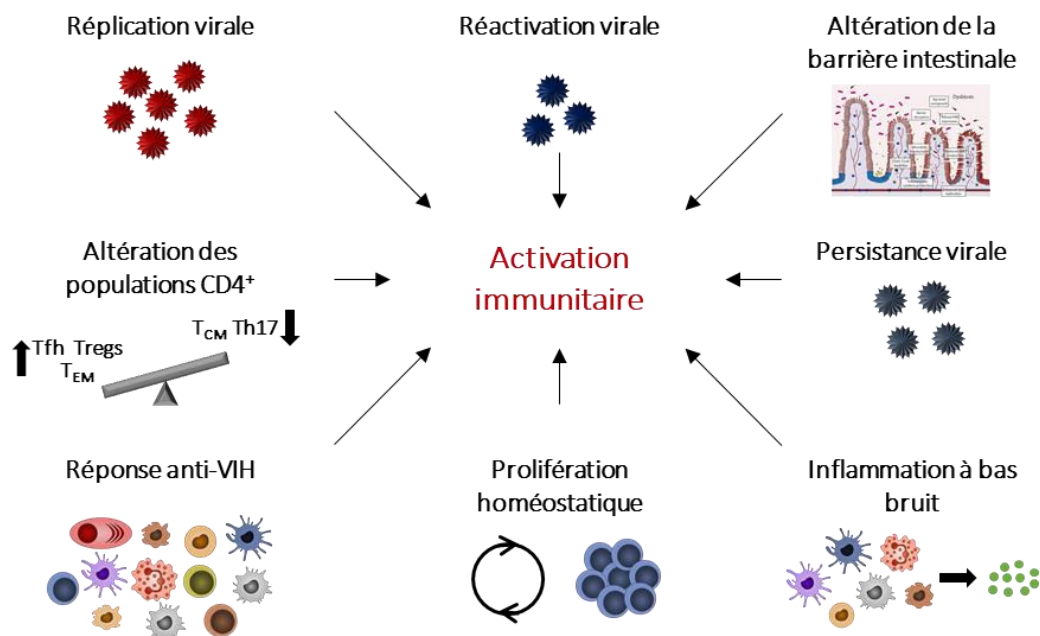


Figure 9: Principaux mécanismes contribuant à l'activation immunitaire chronique associée au VIH-1 (adaptée de (Paiardini and Müller-Trutwin 2013)). De multiples mécanismes moléculaires et cellulaires sont responsables de l'activation immunitaire généralisée. Parmi ceux-ci : la réplication virale et les fonctions immunomodulatrices des protéines virales, les infections réactivées, la perte de l'intégrité des muqueuses causée par la translocation bactérienne, l'altération de l'équilibre entre les populations CD4⁺, la persistance virale à travers des réservoirs viraux, la réponse immunitaire anti-VIH, l'augmentation de la prolifération homéostatique en réponse à la déplétion des LT CD4⁺, la production accrue de cytokines pro-inflammatoires. A noter que chaque mécanisme peut amplifier les autres, créant une rétroaction positive non contrôlée. Aussi, il est probable que la contribution relative de chacun varie en fonction des personnes infectées, le stade de l'infection et la mise sous ARV.

Il est désormais décrit que l'inflammation à bas bruit est sans lien avec la sévérité de l'infection (nombre LT CD4⁺, charge virale) mais constitue un indicateur de la progression de la maladie

au même titre que l'activation immunitaire chez les patients traités (Bastard et al. 2015). Ainsi, sous traitement ART, il n'est alors pas surprenant de voir que l'ensemble des paramètres de l'inflammation ne soit pas restauré et évolue indépendamment de l'efficacité du traitement sur la charge virale plasmatique et le nombre de LT CD4⁺. C'est le cas d'IP-10, MCP-1, TNF α , IL-6, CD14 soluble ou encore la CRP (French et al. 2009; Wada et al. 2015). D'autre part, certains marqueurs d'inflammation comme CD14 soluble montrent des données hétérogènes selon les études menées, avec des valeurs pouvant rester élevées ou bien revenir à la normale (Taiwo et al. 2013; Sereti et al. 2017).

La voie IFN-I a un rôle dual associant activité antivirale et pro-inflammatoire contribuant à l'activation immunitaire chronique. Dans la phase chronique, la persistance d'une signature IFN-I contribue à la mauvaise restauration des LT CD4⁺, en favorisant l'apoptose médiée par TRAIL/DR5 et Fas/FasL (Kaser, Nagata, and Tilg 1999; Herbeuval, Boasso, et al. 2005; Herbeuval, Grivel, et al. 2005; Herbeuval, Hardy, et al. 2005), à l'altération des muqueuses par induction de molécules d'immunorégulation (IDO) contribuant au défaut du ratio Th17/Tregs (Malleret et al. 2008; Favre et al. 2009) et au maintien de l'activation chronique des LT (Sedaghat et al. 2008). Jusqu'à récemment, les techniques de dosage classique ne permettaient pas de doser les IFN-I en phase chronique, présents à des quantités inférieures aux seuils de détection. La mise en place de nouvelles techniques, de type SIMOA (Single Molecule Array) a permis de lever ce frein technique (Rodero et al. 2017) et de révéler qu'ils sont plus fréquemment produits et détectables au sein des organes lymphoïdes (Nascimbeni et al. 2009; Lehmann et al. 2010) qu'en périphérie (Killian et al. 2006; G. A. D. Hardy et al. 2013). Une autre approche consiste alors à étudier les ISG comme indicateur de la signature IFN-I. Celle-ci est réduite mais persiste à bas bruit en phase chronique, alors même que le traitement soit initié tardivement (Neuhaus et al. 2010; Lederman et al. 2013) ou précocement (Sereti et

al. 2017). En effet, au long cours les pDC, principales cellules productrices des IFN-I, deviennent réfractaires aux stimulations répétées par le virus. Il en est de même pour les monocytes, autre source importante des IFN-I, en raison d'une désensibilisation causée par la diminution de l'expression des récepteurs IFNAR (Hardy et al., 2009).

b. L'activation immunitaire persistante

De cet environnement inflammatoire et riche en antigènes résulte une activation et une prolifération cellulaire accrue des LT. L'activation immunitaire reflète généralement un renforcement de la réponse anti-virale mais lorsqu'elle est durable et exacerbée, des effets néfastes apparaissent. Le niveau d'activation immunitaire est d'ailleurs un indicateur de l'évolution de la maladie vers le stade SIDA (Giorgi and Detels 1989; Deeks et al. 2004). L'activation immunitaire induit la mort cellulaire par apoptose (Février, Dorgham, and Rebollo 2011), qui entretient secondairement l'inflammation par le relargage de débris cellulaires (Gougeon et al. 1997).

Bien que le consensus général soit en faveur d'un lien entre l'inflammation et l'activation immunitaire, les mécanismes précis reliant ces deux processus ne sont pas clairement définis (V. Appay and Sauce 2008). Les modèles animaux d'infection SIV soulignent toutefois l'importance de ces deux processus dans la pathogénèse de l'infection. En effet, les PNH africains, hôtes naturels, normalisent rapidement les ISG induits lors de la phase aiguë et l'activation immunitaire reste transitoire en phase chronique, contrairement aux macaques rhésus asiatiques (Harris et al. 2010; Jacquelin et al. 2009). Des observations similaires sont retrouvées chez les patients Elite Controllers, les différenciant des patients progresseurs. Les traitements ART ont amené un bénéfice majeur en réduisant de façon importante l'état d'activation immunitaire et d'inflammation (Autran et al. 1997). Pourtant, ils

n'ont pas permis de les réduire à un niveau basal ; l'activation, comme l'inflammation à bas bruit, persiste après plus de 10 ans de contrôle thérapeutique efficace de la charge virale (Amélie Guihot et al. 2011; 2010). A plus long terme, l'activation immunitaire s'accompagne d'épuisement immunitaire.

c. Epuisement T et rôles des immunes checkpoints

- Définition de l'épuisement :

Les réponses immunitaires chroniques sont classiquement associées à un phénomène d'épuisement. L'épuisement est associé à une perte progressive des capacités fonctionnelles qui débutent par une diminution de la sécrétion d'IL-2, de la polyfonctionnalité des cytokines et du potentiel de prolifération. Les défauts fonctionnels évoluent ensuite vers la perte des capacités cytotoxiques et de la sécrétion de TNF α . A un stade sévère d'épuisement, la production d'IFN γ est compromise (Fuller and Zajac 2003; Wherry et al. 2003; Welsh 2001). Les cellules épuisées répondent mal aux cytokines homéostatiques, dont l'IL-7 et l'IL-15, et persistent par des signaux provenant d'antigènes qui favorisent leur prolifération. Elles peuvent se maintenir *in vivo* pendant des années. En phase finale d'épuisement, une altération de l'expression de facteurs de transcription (Man et al. 2017), du profil métabolique (Bensch et al. 2016), et des modifications épigénétiques (Youngblood et al. 2013) sont observées et les distinguent des autres cellules mémoires. Bien que l'épuisement des cellules T ait d'abord été identifié au sein des LT CD8⁺, il est maintenant admis que les LT CD4⁺ sont également soumis à l'épuisement (Antoine et al. 2012; Wherry 2011; D. E. Kaufmann and Walker 2009; Crawford et al. 2014).

L'épuisement se caractérise par l'expression de récepteurs inhibiteurs appelés points de contrôles du système immunitaire ou immune checkpoints (ICP), tels que PD1, CTLA4, LAG3,

TIM3, TIGIT. L'expression de ces molécules, ou plus exactement la balance d'expression de signaux activateurs et inhibiteurs, est finement régulée tout au long de la réponse immunitaire.

- La voie PD1/PD-L1 :

L'épuisement T dans le contexte des infections virales chronique a d'abord été décrit dans le modèle murin d'infection par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV). Dans une étude historique, Zajac et al. ont montré que les LT CD8⁺ spécifiques du virus persistaient au long cours mais perdaient progressivement leurs capacités cytotoxiques. Dans ces conditions, les LT deviennent insensibles aux antigènes viraux et persistent dans un état d'épuisement fonctionnel, dans lequel elles sont incapables d'éliminer efficacement le virus (R. Ahmed et al. 1984; Zajac et al. 1998). Ces travaux ont également caractérisé la modulation de l'expression du récepteur inhibiteur PD1, comme voie importante de régulation de l'épuisement pendant l'infection chronique (Barber et al. 2006; Wherry et al. 2007).

Il est important de noter que l'expression à la hausse de PD1 est un processus physiologique lorsqu'elle est transitoire. La molécule PD1 agit comme frein naturel pour tempérer la suractivation des réponses T. Elle est aussi identifiée comme le rhéostat de l'activation immunitaire, assurant l'équilibre entre signaux activateurs/inhibiteurs. La molécule PD1 fait partie de la superfamille CD80/CD86 et CD28/CTLA-4 qui est essentielle pour l'activation et la tolérance périphérique (Sansom 2000). Ce n'est que lorsque la stimulation à l'antigène est chronique et persistante que les LT entrent dans un état d'épuisement délétère. Par ailleurs, l'activité suppressive n'est déclenchée que lorsque les ligands sont exprimés, rajoutant un niveau supplémentaire de modulation de l'épuisement.

PD-L1 et PD-L2 sont les deux ligands du récepteur PD1. PD-L1 est exprimé par de nombreux types cellulaires comprenant à la fois les cellules hématopoïétiques (DC,

monocytes/macrophages, LT, LB) et non hématopoïétiques (cellules endothéliales vasculaires et stromales, cellules des îlots de Langerhans, kératinocytes). PD-L2 est exprimé principalement par les CPA (cellules présentatrices de l'antigène), c'est-à-dire les DC, macrophages et LB. Leur expression est faible à l'état basal et induite en réponse aux signaux proinflammatoires. Les cytokines sont des régulateurs essentiels de l'expression de PD-L1 et PD-L2, en particulier les IFN-I et IFN-II sont parmi les plus puissants médiateurs de l'expression de PD-L1 (Sharpe and Pauken 2018). La capacité des IFN à réguler l'expression de PD-L1 a contribué au concept de « résistance adaptative » favorisant l'immunosuppression dans le contexte tumoral.

L'activité de frein portée par PD1 repose sur différents mécanismes. Lorsqu'il est engagé avec son ligand, PD1 est phosphorylé (sur deux motifs de tyrosine dans son domaine cytoplasmique) ce qui entraîne la liaison avec des phosphatases dont SHP2. Ce recrutement conduit à la déphosphorylation des kinases impliquées dans l'activation TCR médiée (**Figure 10**). Il en résulte une diminution de l'activation des LT, de la prolifération, de la production cytokinique et de la survie. Un impact de la voie PD1 sur la machinerie métabolique des LT est également décrit (Patsoukis et al. 2015). Notre compréhension des mécanismes par lesquels PD1 module les fonctions des LT épuisés est moins claire. Les LT épuisés ont besoin d'un engagement continu du TCR pour survivre (Wherry et al. 2004; Shin et al. 2007). Des travaux récents suggèrent que la restauration des LT CD8⁺ épuisés par un α PD1 dépend de la signalisation CD28 (Kamphorst et al. 2017), mais il reste à définir comment PD1 module spécifiquement la signalisation CD28 par rapport au TCR dans ce contexte. Des travaux complémentaires sont nécessaires pour clarifier l'effet spécifique de la voie PD1/PD-L1 sur les autres voies de signalisation. En plus d'interagir avec PD1, PD-L1 et PD-L2 se fixent à d'autres récepteurs présents à la surface des CPA ou autres types cellulaires (cellules épithéliales,

cellules tumorales). C'est le cas des interactions PD-L1/CD80 et PD-L2/RGMb décrites comme étant généralement inhibitrices (Xiao et al. 2014; Butte et al. 2007). Ces autres interactions peuvent expliquer en partie les différences observées dans l'efficacité des thérapies ciblant PD1, PD-L1 ou PD-L2.

PD1 est devenue le paradigme pour comprendre à la fois les rôles physiologiques des récepteurs inhibiteurs (régulation de l'activation initiale, fonction effectrices, tolérance, homéostasie immunitaire) et des dysfonctionnements immunitaires (épuisement). Cependant, PD1 n'est pas strictement nécessaire pour l'induction de l'épuisement des LT (Odorizzi et al. 2015) mais joue un rôle dans son maintien (Barber et al. 2006).

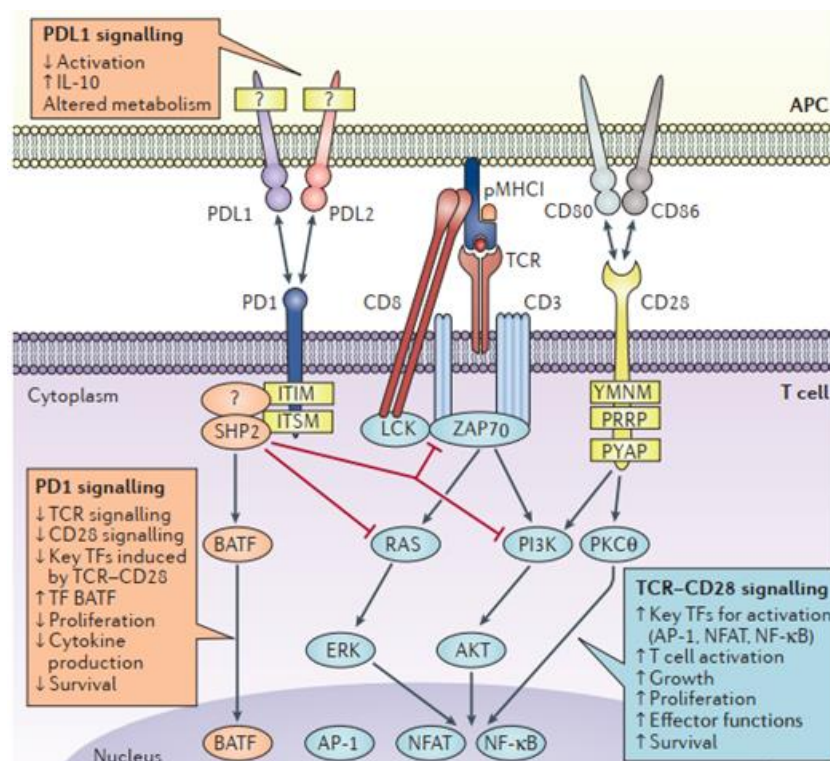


Figure 10 : Voie de signalisation PD1 (d'après (Sharpe and Pauken 2018)). L'interaction de PD1 avec son ligand entraîne le recrutement de phosphatases dont SHP2, qui inhibe les signalisations activatrices déclenchées par l'interaction CMH/TCR et CD28/CD80-CD86 ; par exemple, ZAP70 et les voies de signalisation PI3K et RAS. Collectivement, il en résulte une diminution de l'activation des facteurs de transcription AP-1, NFAT, NF-κB importants pour l'activation des LT, leur prolifération, les fonctions effectrices et la survie. En outre, PD1 peut inhiber les fonctions des LT en augmentant l'expression du facteur de transcription BATF.

- Les autres ICP :

L'épuisement s'accompagne également de l'augmentation de l'expression d'autres ICP tels que CTLA4, TIM3, LAG3, TIGIT, 2B4 (CD244), CD160, BTLA (**Figure 11**) et leurs ligands respectifs (Wherry and Kurachi 2015; Attanasio and Wherry 2016). La sévérité de l'épuisement est généralement associée au nombre d'ICP coexprimés par les cellules affectées ; les LT CD8⁺ pouvant en coexprimer jusqu'à sept. Cette coexpression est associée à un dysfonctionnement et une progression de la maladie plus grave (Blackburn et al. 2009). Il a également été montré que les ICP coexprimés avec PD1 sont plus révélateurs d'un état d'épuisement sévère.

La coexpression de plusieurs ICP à la surface de cellules fortement épuisées serait potentiellement plus difficilement réversibles par des approches thérapeutiques (Pauken and Wherry 2015; Jenkins, Barbie, and Flaherty 2018). Mais certaines études ont démontré que le ciblage de PD1 et d'un autre ICP tel que CTLA4, TIM3, CD160, TIGIT ou LAG3 a facilité la restauration des LT CD8⁺ caractérisée par une prolifération et une cytotoxicité accrue, une production d'IFN γ et d'IL-2 (Woo et al. 2012; Nakamoto et al. 2009; Sakuishi et al. 2010). Il n'est toutefois pas clair si le blocage α PD1 est une condition préalable majeure à la restauration de l'épuisement et à cet effet synergique. En effet, l'expression sélective ou l'expression à des niveaux plus élevés de PD1 par rapport à d'autres ICP pourraient être des facteurs contribuant à ce résultat (Blackburn et al. 2009). A terme, la compréhension de la contribution relative des différents ICP dans le processus d'épuisement facilitera l'élaboration de stratégies thérapeutiques.

Enfin, il existe des mécanismes cellulaires compensatoires par lequel le blocage d'un ICP en monothérapie conduit à la régulation à la hausse d'ICP supplémentaires potentialisant l'activité suppressive des LT. Dans un contexte tumoral, une étude a évalué l'impact d'un blocage en mono-, bi- ou trithérapie α ICP et a démontré qu'il existerait un ordre hiérarchique

de la fonction des ICP (Huang et al. 2017). Ces résultats ont des implications à la fois pour la compréhension des mécanismes de résistance aux α ICP et pour la conception rationnelle de thérapie combinant plusieurs α ICP.

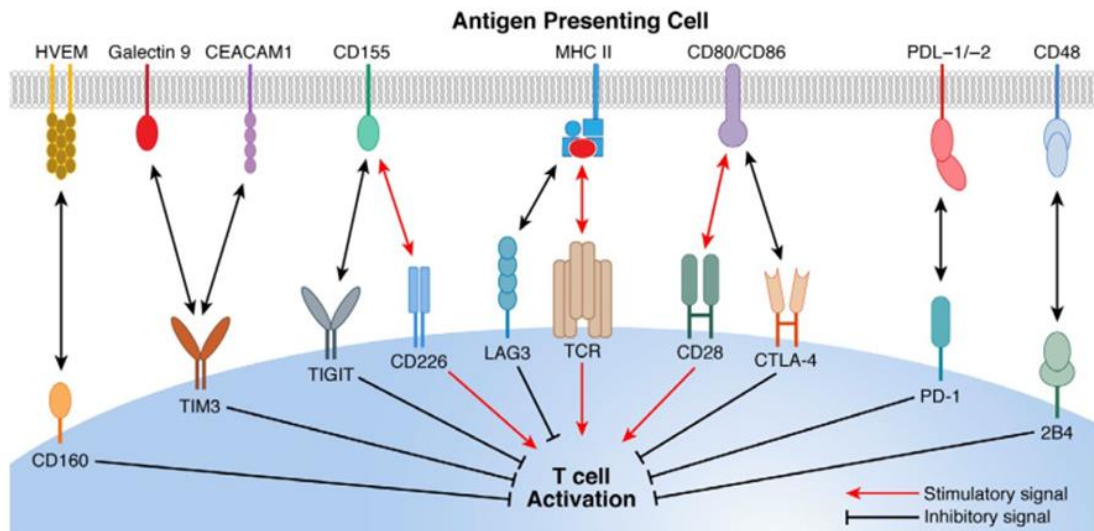


Figure 11: Immune checkpoints et leurs ligands associés impliqués dans le processus d'épuisement des lymphocytes T (d'après (Fenwick, Joo, et al. 2019)). L'interaction du TCR avec le complexe CMH-peptide présenté par les CPA fournit le premier signal pour l'activation des LT. Le corécepteur CD28 et d'autres molécules de costimulations constituent le deuxième signal. Les immune checkpoints comme PD1, CTLA4, LAG3, TIGIT, TIM3, CD160, et 2B4 agissent pour réguler l'activation des LT suite à l'interaction avec leurs ligands exprimés à la surface des CPA.

- L'épuisement dans le contexte VIH-1 :

Les mêmes principes d'épuisement s'appliquent à l'infection chronique par le VIH-1 ; la persistance de niveaux élevés d'antigènes viraux entraîne un épuisement des LT spécifiques du virus. Outre la stimulation antigénique permanente, la forte activation immunitaire, l'inflammation et l'homéostasie compromise contribuent à la mise en place de cet état d'épuisement. Des études ont montré que l'expression de PD1 était corrélée à l'altération de la fonctionnalité des LT CD8⁺, à la charge virale et à la réduction du nombre de LT CD4⁺ (Day et al. 2006; Trautmann et al. 2006; Petrovas et al. 2006). Les LT CD8⁺ spécifiques avec des niveaux élevés de PD1 montrent également une plus grande sensibilité à l'apoptose qui a été

attribuée à des niveaux plus faibles de Bcl-2 et des niveaux plus élevés du récepteur Fas par rapport aux LT exprimant faiblement PD1 (Petrovas et al. 2007). Des études longitudinales montrent qu'après l'initiation du traitement ART, les niveaux d'expression de PD1 diminuent progressivement au sein des LT CD8⁺ spécifiques du VIH-1. Les patients Elite Controllers montrent des niveaux d'expression de PD1 plus faibles par rapport aux patients progresseurs (Day et al. 2006; Trautmann et al. 2006) (**Figure 12**). D'autres ICP, dont LAG3, Tim3, TIGIT, 2B4 et CD160, exprimés indépendamment ou combinés, conduisent à des stades plus prononcés d'épuisement des LT CD8⁺ (Day et al. 2006; Blackburn et al. 2009; Chew et al. 2016; Jones et al. 2008; Peretz et al. 2012; H. T. Jin et al. 2010; Pombo et al. 2015). Il a été démontré que la coexpression de PD1 avec TIGIT est corrélée à la progression de la maladie chez les patients infectés par le VIH-1 et les macaques infectés par le SIV (Chew et al. 2016).

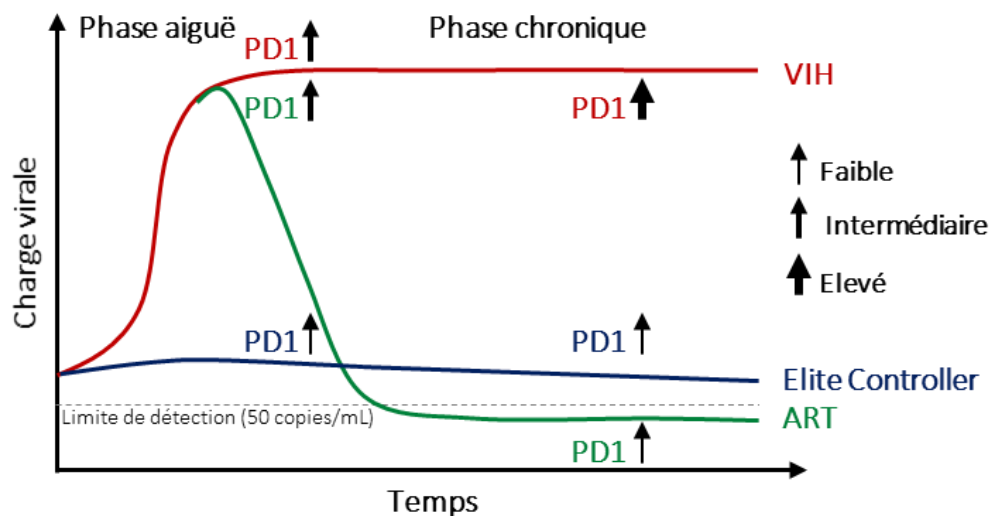


Figure 12: Progression de l'épuisement (PD1) en fonction du statut virologique (*adaptée de* Fenwick, Joo, et al. 2019). Au cours de la phase aiguë, la majorité des patients connaissent une augmentation de la charge virale et de l'expression de PD1 à la surface des LT spécifiques. En revanche, les patients Elite Controllers maintiennent une charge virale et une expression de PD1 faibles. Les patients non traités évoluent vers la phase chronique, où des niveaux élevés et persistants d'antigènes viraux entraînent l'épuisement des LT. Chez la plupart des patients, le traitement ART inhibe de manière significative la réplication virale permettant une virémie contrôlée sous la limite de détection des tests standards. Les antigènes viraux faiblement présents permettent une diminution de l'expression de PD1.

Les LT CD4⁺ spécifiques expriment également fortement PD1, en corrélation avec la progression de la maladie, la charge virale et la déplétion CD4 (D'Souza et al. 2007). Comme pour les LT CD8⁺, l'expression de multiples ICP, dont PD1, CTLA4 et TIM3, est associée à un état d'épuisement fonctionnel plus prononcé des LT CD4⁺ (Kassu et al. 2010). Aussi, des études ont démontré une association entre l'expression des ICP et les réservoirs viraux. Les LT CD4⁺ épuisés sont enrichis en ADN viral (Chew et al. 2016; Fromentin et al. 2016). Récemment, des études complémentaires ont montré un enrichissement du virus au sein des cellules qui expriment simultanément plusieurs ICP, notamment PD1, TIGIT et LAG3. Ce résultat suggère que les ICP ne suppriment pas seulement l'activation des LT, mais limitent également la transcription du virus, l'exportation d'ARN et la traduction d'ARN favorisant ainsi la latence virale (Fromentin et al. 2016; V. A. Evans et al. 2018). Enfin, sous traitement ART, il existe une corrélation significative entre la fréquence de LT CD4⁺ PD1⁺ et la persistance du virus dans les tissus (Khoury et al. 2017; Banga et al. 2016). Une étude récente a montré que l'expression de PD1 serait d'ailleurs un marqueur prédictif de la latence virale avant même l'initiation du traitement ART (Ghiglione et al. 2019).

A long terme, l'épuisement des LT représente une barrière qui paraît difficilement surmontable par les médiateurs cellulaires. En effet, une étude longitudinale montre que l'épuisement des LT joue un rôle important dans la perte de contrôle du virus par les rares patients Elite Controllers ($\leq 1\%$ des personnes infectées (Deeks and Walker 2007)). Ces études ont montré qu'une augmentation de l'expression de PD1 à la surface des LT CD8⁺ spécifiques précède l'augmentation de la virémie chez ces patients et que leurs capacités cytotoxiques sont réduites (Rosás-Umbert et al. 2019). Ainsi, un équilibre délicat existe entre le contrôle de la charge virale et l'épuisement progressif des LT. Sous ART, les patients voient progressivement l'expression des ICP diminuer, bien que leurs niveaux restent plus élevés par rapport aux sujets

sains (Pallikkuth, Fischl, and Pahwa 2013). La fonctionnalité des LT spécifiques s'améliore ; les LT CD4⁺ et CD8⁺ produisent des niveaux accrus d'IL-2 après stimulation (Harari et al. 2004; Rehr et al. 2008). Cependant l'expression de PD1, TIM3 et LAG3 à l'arrêt du traitement s'est avérée être un marqueur prédictif du rebond viral après interruption du traitement ART (Hurst et al. 2015). Limiter la progression de l'épuisement semble donc constituer un axe thérapeutique important.

d. Immunosénescence et sénescence réplivative

- Définition de la sénescence :

Il convient de souligner que l'immunosénescence correspond à une notion très vaste, qui contraste avec la sénescence réplivative en biologie cellulaire avec lequel l'immunosénescence est souvent confondue. La sénescence réplivative est un mécanisme selon lequel les cellules humaines somatiques cessent de se diviser à la « limite de Hayflick » après un nombre fini de divisions cellulaires en raison de l'érosion des télomères (Hayflick 1968; Harley, Futcher, and Greider 1990). La sénescence réplivative est apparue comme une cause possible des maladies chroniques liées à l'âge et aux dysfonctionnements des tissus (Kirkland and Tchkonja 2015; Muñoz-Espín and Serrano 2014). L'arrêt du cycle cellulaire est irréversible et se produit en réponse à divers facteurs de stress cellulaires, tels que l'érosion des télomères, les dommages à l'ADN, le stress oxydatif et l'activation oncogène, et participe en partie à limiter le développement de cancers (Sager 1991). Aucun stimulus physiologique connu ne peut stimuler les cellules sénescents à réintégrer le cycle cellulaire.

L'immunosénescence fait référence plus largement au déclin des fonctions du système immunitaire lié à l'âge. Le fait que le système immunitaire se comporte différemment chez les personnes âgées et les jeunes adultes est sans équivoque. L'immunosénescence est associée à

une plus grande vulnérabilité aux maladies infectieuses et contribue à de nombreuses maladies dégénératives, en particulier la neurodégénérescence, les cancers, les maladies cardiovasculaires et auto-immunes (Stahl and Brown 2015).

- Conséquences sur les réponses immunitaires :

Par rapport aux jeunes adultes, le système immunitaire des personnes âgées se caractérise par : (i) une diminution du nombre et de la fonctionnalité des cellules souches hématopoïétiques, (ii) une involution thymique, (iii) une diminution des LT naïfs circulants, (iv) une augmentation de la fraction de LT CD28⁻ au potentiel prolifératif limité, (v) une augmentation de la production cytokinique pro-inflammatoire (IL-6, TNF α), (vi) une diminution du ratio CD4/CD8 (Czesnikiewicz-Guzik et al. 2008; Y. Deng et al. 2004). Ces changements du système immunitaire liés à l'âge et associés à la morbidité et mortalités définissent le processus d'immunosénescence.

A l'échelle cellulaire, la sénescence se traduit par une perte de capacité proliférative. Pour rappel, le déclenchement de la réponse T nécessite la molécule de costimulation CD28, dont l'expression diminue à mesure que les LT mémoires centrales se différencient en cellules effectrices. La population de cellules effectrices CD28⁻ possède des télomères plus courts et des capacités prolifératives moindres. Bien que beaucoup de ces cellules meurent rapidement, certaines peuvent devenir résistantes à l'apoptose et perdurer. Ces cellules sénescents sont pro-inflammatoires et leur expansion peut contribuer à une inflammation systémique néfaste (Effros et al. 2005). Parce que l'exposition chronique à un antigène et l'inflammation entraînent l'expansion progressive de ces cellules CD28⁻, les infections virales chroniques sont généralement associées à une accumulation progressive de cellules sénescents.

- Caractérisation de l'immunosénescence :

Le phénotype associé à l'immunosénescence reste mal défini mais il est généralement admis que le raccourcissement des télomères et pour les analyses phénotypiques, la surexpression des molécules CD57 et KLRG1 sont des marqueurs de sénescence.

CD57 est un marqueur couramment utilisé, bien qu'il soit sujet à débat (Kared et al. 2016). Il a été associé à la sénescence répllicative : les LT CD8⁺CD57⁺ présentent une faible capacité de prolifération et une sensibilité élevée à l'apoptose (Brenchley et al. 2003). L'expression de CD57 identifie également les LT terminales différenciées, capables de produire des cytokines et qui ont un potentiel cytotoxique élevé (Chattopadhyay et al. 2008; Le Priol et al. 2006). Toutefois, la caractérisation des LT CD8⁺ T_{EMRA} grâce à CD57 reste ambiguë. Certains travaux décrivent une population de LT CD8⁺ T_{EMRA} fonctionnellement « jeune » avec des capacités de prolifération et une plasticité de différenciation élevées ; ces cellules pourtant terminales différenciées n'expriment pas CD57 (Verma et al. 2017). A l'inverse, *in vitro*, l'expression de CD57 à la surface des LT CD8⁺ a également été associée à des fonctions immunosuppressives (Sadat-Sowti et al. 1994). Une étude récente a montré que la fraction CD57⁺ présentait une plasticité fonctionnelle très faible (Verma et al. 2017), soulignant qu'une forte proportion de LT CD57⁺ peut être associée à une mauvaise réponse immunitaire (Victor Appay et al. 2007). Ainsi, l'expression de CD57 ne semble pas suffisante pour définir une population comme sénescence et doit s'accompagner de la caractérisation d'autres paramètres (taille des télomères, autres marqueurs de sénescence, TREC).

KLRG1 est un autre marqueur associé à la sénescence. La proportion de LT CD8⁺KLRG1⁺ augmente de façon spectaculaire avec l'âge (Ouyang et al. 2003; Henson et al. 2009), reflet de l'augmentation des proportions de LT mémoires liée à l'âge et des cellules terminales différenciées qui expriment KLRG1. Tout comme CD57, KLRG1 est probablement plus qu'un marqueur de sénescence (Henson and Akbar 2009). Des données semblent indiquer

que KLRG1 pourrait aussi jouer un rôle inhibiteur au sein des cellules NK et LT (Schwartzkopff et al. 2007). Conformément aux fonctions divergentes attribuées à CD57 et KLRG1, les populations KLRG1⁺CD57⁻ conservent la capacité de proliférer et de sécréter de l'IFN γ , tandis que les fractions KLRG1⁺CD57⁺ ne prolifèrent pas et secrètent très peu d'IFN γ (Ibegbu et al. 2005).

- La sénescence dans le contexte VIH-1 :

Les patients infectés par le VIH-1 traités à long terme présentent un risque accru de complications non liées au SIDA (cancers, maladies cardiovasculaires, hépatiques, rénales, osseuses, déclin neurocognitif) qui peuvent affecter leur espérance de vie. Nombre de ces complications sont similaires à celles observées chez les personnes âgées et a suscité un parallèle intrigant entre ces deux contextes (Desai and Landay 2010; Victor Appay et al. 2007; Effros et al. 2005) : un faible ratio CD4/CD8 et naïf/mémoire, un répertoire de LT réduit, et une expansion des LT effecteurs mémoires CD28⁻ (Kalayjian et al. 2003; Van Baarle et al. 2005). Il a été montré que les LT CD8⁺ expriment des niveaux plus élevés de CD57 que les individus sains, quel que soit le groupe considéré (virémique, sous traitement ART, Elite Controller) (Le Priol et al. 2006; Victor Appay et al. 2011; Ladell et al. 2008; Simonetta et al. 2014; C. D. Palmer et al. 2016). De plus, la fraction CD57⁺ augmente chez les patients chroniquement infectés (Victor Appay et al. 2007) et les caractéristiques associées à la sénescence sont plus fréquemment retrouvées chez les patients qui ne parviennent pas à restaurer le nombre de LT CD4⁺ sous traitement ART (Robbins et al. 2009; Teixeira et al. 2001; Molina-Pinelo et al. 2009). Notre équipe a montré que l'expression de CD57 était principalement liée à la fraction effectrice et qu'il existe une hétérogénéité fonctionnelle au sein des fractions CD57⁺ (Simonetta et al. 2014), mais également une plus faible proportion de cellules CD57⁺ au sein des effecteurs chez les patients Elite Controllers (Henriquez et al. 2019).

La question de savoir si l'infection par le VIH-1 est responsable d'un vieillissement accéléré reste controversée. Les modifications du système immunitaire liées à l'âge ne sont pas unidirectionnelles et ne sont pas toutes préjudiciables. Les changements immunitaires et inflammatoires induits par l'infection par le VIH-1 sont beaucoup plus marqués que ceux associés au vieillissement physiologique et de fait, les maladies cardiovasculaires surviennent plus précocement (10 à 15 ans plus tôt) chez les patients infectés traitées que dans la population générale (Bhatia, Ryscavage, and Taiwo 2012; Althoff et al. 2015). Ainsi, des études complémentaires sont nécessaires pour dissocier l'effet du vieillissement en soi et l'effet de l'infection via l'inflammation et l'activation chronique, et leur relation. A ce jour, les études sur l'impact réciproque de l'infection par le VIH-1 et de l'âge ont souvent été divergentes (Jeffrey and Volberding 2010).

4. Le bénéfice potentiel des immunothérapies

La découverte de molécules associées à l'épuisement a conduit au développement de nouveaux traitements basés sur des anticorps neutralisants ciblant spécifiquement les ICP, dans les contextes tumoraux. Ces immunothérapies, visant à lever les freins imposés au système immunitaire de l'individu par la tumeur ont connu un succès spectaculaire dans le cas de tumeurs malignes, même très agressives telles que le mélanome. Même si l'ensemble des types de cancers et des patients ne répondent pas à ces traitements, ces résultats constituent une avancée majeure. Les anticorps α PD1 (pembrolizumab, nivolumab), α CTLA4 (ipilimumab) et α PD-L1 (atézolizumab, avelumab) sont actuellement autorisés en tant que monothérapie pour différents cancers (Mellman, Coukos, and Dranoff 2011; P. Sharma and Allison 2015; Callahan, Postow, and Wolchok 2016). En outre, il a été démontré que le ciblage thérapeutique combiné de PD1 et CTLA4 est plus efficace que l'une ou l'autre des thérapies seules pour le traitement

du mélanome (Larkin et al. 2015). Bien que cette thérapie combinée entraîne également une toxicité accrue chez les patients avec un risque de développer une maladie auto-immune, le bénéfice reste très supérieur au risque tumoral. Les thérapies ciblant plusieurs autres ICP tels que TIM3, LAG3, CD244, BTLA se sont également révélées prometteuses (Pardoll 2012). L'un des principaux défis de l'immunothérapie est désormais de comprendre pourquoi les réponses au traitement sont variables entre les individus (Brahmer et al. 2010; P. L. Chen et al. 2016). Etant donné le coût et la toxicité des anti-ICP, identifier les biomarqueurs qui prédisent les facteurs de réponses ou de non-réponses au traitement est actuellement une priorité.

La question de savoir si les immunothérapies peuvent également être efficaces dans des contextes cliniques moins sévères, comme les infections virales chroniques, est encore à explorer. Cette approche est notamment envisagée en combinant ces dernières avec des stratégies de vaccination et de traitements. Dans le contexte de l'infection par le VIH-1 contrôlée sous traitement ART, l'utilisation de stratégies anti-ICP pourrait avoir de multiples effets bénéfiques pour parvenir à une guérison ou permettre aux individus d'arrêter les ARV en toute sécurité. Les critères d'efficacité sont (i) la restauration des réponses effectrices en levant l'épuisement des LT CD8⁺ et CD4⁺, (ii) l'éradication/diminution de la charge virale résiduelle en réactivant les cellules infectées de manière latente, et (iii) l'induction d'un contrôle post-arrêt, c'est-à-dire le maintien d'une charge virale basse après l'interruption des ARV. Le rapport bénéfice/risque devra incontestablement être évalué. En effet, une considération primordiale dans ce contexte sera la toxicité des médicaments. En sachant que la mise en place de la trithérapie supprime efficacement les charges virales chez la plupart des patients avec des effets indésirables jugés acceptables pendant des décennies, les exigences seront très hautes pour justifier un besoin médical de l'utilisation de stratégies anti-ICP qui peuvent présenter un danger à long terme sur la santé des patients. En outre, des recherches parallèles de

biomarqueurs qui renseignent sur la meilleure stratégie thérapeutique et indiquent la fenêtre thérapeutique où celle-ci serait la plus efficace seront également d'une grande importance.

a. Lever l'épuisement pour un double objectif

L'expression de PD1 simultanément sur les cibles du virus (LT CD4⁺) et les cellules effectrices (LT CD8⁺) suggère une double activité des stratégies α PD1 dans le contexte de l'infection par le VIH-1. Puisque les LT CD4⁺ PD1⁺ sont des cellules réservoirs préférentielles, la levée des dysfonctions associées pourrait permettre une activation du compartiment réservoir et favoriser l'élimination des virus. A l'inverse, et de manière similaire à ce qui est décrit dans le contexte tumoral, la levée de l'épuisement pourrait conduire à une meilleure efficacité des réponses LT CD8⁺ contribuant à un meilleur contrôle de l'infection résiduelle. Chez le macaque rhésus infecté par le SIV, l'administration d'anticorps α PD1 a entraîné l'expansion rapide des LT CD8⁺ spécifiques avec une polyfonctionnalité améliorée, la diminution de l'ARN viral plasmatique et la survie prolongée des animaux (Velu et al. 2009). Parmi les autres effets bénéfiques du blocage de PD1, nous pouvons citer une diminution de la signalisation IFN et de la perméabilité intestinale (Shetty et al. 2012). Dans des travaux évaluant l'administration des anticorps α PD1 (Mylvaganam et al. 2018) ou α PD-L1 (Gill et al. 2016) à des macaques infectés et placés sous ARV, aucun effet indésirable n'a été détecté. Cependant, contrairement aux études sans ARV, il y a eu une expansion plus limitée des LT CD8⁺ spécifiques. Les travaux de Mylvaganam et al. ont souligné l'importance de la fenêtre thérapeutique dans l'efficacité du blocage α PD1. L'administration d'un anticorps α PD1 10 jours avant le début du traitement ART a rapidement amélioré la fonctionnalité des LT CD8⁺ et diminué l'expression des ISG. Il en a résulté une suppression plus rapide de la virémie et une meilleure reconstitution des cellules Th17 dans la muqueuse rectale après l'initiation du traitement ART. Le blocage α PD1 pendant

le traitement ART a entraîné une diminution des réservoirs cellulaires. Après l'interruption des ARV, les animaux traités par les α PD1 ont montré une expansion plus importante des LT CD8⁺ effecteurs et une proportion de Tregs plus faible, contribuant à un meilleur contrôle de la virémie et à un retard du rebond viral par rapport aux animaux sous traitement ART seul (Mylvaganam et al. 2018). Malgré le succès de ces études à stimuler l'activité anti-virale médiée par les LT, les animaux infectés par le SIV, traités par les α PD1 étaient incapables de maintenir à long terme un contrôle virologique.

L'expression augmentée de CTLA4 après interruption du traitement ART, comme pour PD1, a été associée à la progression de la maladie (D. E. Kaufmann et al. 2007). Le traitement par un anticorps dirigé contre CTLA4 chez des animaux SIV traités ou non par ARV a entraîné une augmentation significative de la réplication virale, probablement en raison du nombre accru de LT CD4⁺ réactivés (Cecchinato et al. 2008). Dans une autre étude chez le macaque, les α CTLA4 ont conduit à une augmentation modeste du nombre de LT CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques et une réduction significative de l'ARN viral associé aux cellules des ganglions lymphatiques (Hryniewicz et al. 2006). Ces données semblent suggérer que les α CTLA4 peuvent agir par un mécanisme d'action différent de celui des α PD1, conduisant à une réduction de l'ARNv au sein des tissus.

Chez les patients infectés par le VIH-1, des études *in vitro* ont établi une preuve de principe claire du bénéfice de l'utilisation d'anticorps α PD1 ou α PD-L1 pour lever l'épuisement et améliorer la polyfonctionnalité des LT spécifiques. En clinique, l'utilisation des traitements α PD1 est actuellement limitée aux patients atteints d'un cancer en phase terminale en raison du faible taux de réponse et de leur toxicité. Basée sur l'association entre la persistance virale et l'expression des ICP, plusieurs études chez des patients atteints du VIH-1 et de cancers ont permis de mettre en évidence une réactivation potentielle des marqueurs du réservoir viral et

une augmentation significative des ARNv (Van der Sluis et al. 2020; Wightman et al. 2015; Garff et al. 2017; Fromentin et al. 2019). En revanche, une seule étude a fait état d'une diminution ultérieure de la taille du réservoir (A Guihot et al. 2018). Bien que ces résultats soient préliminaires, les patients infectés traités et présentant un cancer, n'ont montré jusqu'à présent qu'une réponse modeste au blocage α PD1. Une immunothérapie ciblant plusieurs ICP en combinaison avec d'autres stratégies pour réactiver le virus pourrait être nécessaire. Des résultats encourageants ont montré que le blocage de TIGIT et de PD-L1 a permis une amélioration significative de la fonctionnalité des LT CD4⁺ spécifiques chez les patients sous ARV (Chew et al. 2016). Plusieurs essais cliniques aux États-Unis et en France évaluent actuellement les effets des α PD1 et des α CTLA4, seuls ou en combinaison sur les malignités associées au VIH-1 (Rasmussen et al. 2017).

A ce jour, une seule étude clinique de phase II utilisant des α PD-L1 chez des patients infectés ne présentant pas de tumeurs malignes a été réalisée (Gay et al. 2017). Cette étude a reposé sur l'augmentation de la dose du traitement α PD-L1 et a été interrompue après l'administration de la dose la plus faible à six patients infectés et traités sous ARV. Son interruption a été donnée en raison de la toxicité rétinienne observée dans une étude simultanée sur le modèle macaque. Il est intéressant de noter que, bien qu'il n'y ait pas eu de changements dans l'ARNv ou l'ADNv, il y a eu une nette augmentation du nombre de LT CD8⁺ et CD4⁺ spécifiques de Gag chez deux des six participants. En revanche, un patient a développé une inflammation de l'hypophyse plusieurs mois après avoir reçu la thérapie α PD-L1. Comme attendu, la toxicité de ces médicaments reste donc une problématique importante. Aussi, les anticorps contre LAG3, TIM3 et TIGIT sont tous en début de développement clinique et, compte tenu de leur profil de toxicité plus favorable, ils pourraient être des agents plus appropriés chez les personnes infectées par le VIH-1 (Anderson, Joller, and Kuchroo 2016).

Le succès thérapeutique des anti-ICP dans le contexte tumoral est à modérer puisque le traitement combiné de plusieurs anticorps neutralisants entraîne fréquemment des phénomènes de résistances et de rechutes (Postow 2015; Pitt et al. 2016). Ces limites soulignent la nécessité de mieux comprendre les mécanismes par lesquels les thérapies α PD1 agissent et d'en identifier de nouvelles pour favoriser une synergie. Récemment, une étude a identifié un nouvel anticorps α PD1 ayant une activité antitumorale plus puissante et/ou agissant par le biais du corécepteur CD28 qui rétablit la signalisation par la voie AKT/NF- κ B. Les combinaisons α PD1 bloquants et non bloquants agissent par un mécanisme d'action distinct et se combinent pour restaurer plus efficacement l'activité fonctionnelle des LT CD8⁺ épuisées (Fenwick, Loredó-Varela, et al. 2019). En outre, un des mécanismes importants de résistance aux anti-ICP a été associé à la régulation à la hausse de PD-L1 par les cellules tumorales. En effet, jusqu'à 50 % des patients avec des tumeurs dites PD-L1⁺ sont résistants à ce type de stratégie thérapeutique ou rechutent après le blocage de PD1 ou de PD-L1 (Herbst et al. 2014; Taube et al. 2014; Topalian, Drake, and Pardoll 2015; TumeH et al. 2014). Ces résultats soulignent la nécessité de devoir explorer les mécanismes de régulation parallèles, indépendants des ICP ou de cibler conjointement les ICP et leurs ligands.

b. Une stratégie alternative : réduire l'inflammation

L'inflammation chronique à bas bruit contribue au développement de différentes comorbidités (Maciel et al. 2018; Deeks, Tracy, and Douek 2013; Zicari et al. 2019). Un autre objectif thérapeutique important à atteindre serait alors de contrôler l'inflammation systémique pour espérer les réduire. Toutefois, l'inflammation reste une réponse physiologique au processus de défense de l'organisme. Il est alors important d'identifier des approches thérapeutiques permettant de réduire l'inflammation sans l'éteindre. Différentes stratégies sont

considérées : i) le passage d'une trithérapie à une bithérapie pour limiter les toxicités des ARV et notamment des INTI (Llibre et al. 2018), ii) utilisation d'anti-inflammatoires tels que les inhibiteurs purinergiques des récepteurs P2X (récepteurs connus pour être exprimés sur les cellules cibles LT CD4⁺, et impliqués dans la régulation des voies inflammatoires), des statines (Chastain, Stover, and Riche 2017), le canakinumab (anticorps monoclonal dirigé contre l'IL-1 β déjà approuvé par la FDA pour la réduction du risque de maladie cardiovasculaire) (Hsue et al. 2018). Dans le cadre de ce document, nous nous concentrerons plus spécifiquement sur le potentiel impact de la réduction de l'inflammation pour limiter l'épuisement.

Les études dans les modèles tumoraux sont riches en enseignement concernant le lien entre inflammation et épuisement. Dans des conditions d'exposition prolongées aux IFN et où l'antigène persiste, les IFN peuvent avoir un rôle immunosuppresseur (Minn and Wherry 2016). Les cellules tumorales sont sensibles aux IFN par la régulation à la hausse de PD-L1, contribuant à inhiber la réponse immunitaire et influencer l'équilibre entre élimination et échappement immunitaire (Spranger et al. 2013; Taube et al. 2012). Un des mécanismes importants de résistances adaptatives aux anti-ICP a d'ailleurs été associé à l'augmentation de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales (Herbst et al. 2014; Taube et al. 2014; Topalian, Drake, and Pardoll 2015; Tumeh et al. 2014). Les travaux de Benci et al. sont les premiers à explorer ces mécanismes de résistance. Ils ont démontré que la signalisation prolongée des IFN de type I et II permet aux tumeurs d'acquérir des modifications épigénétiques liées à STAT1, augmentant l'expression des ISG tels que PD-L1, Galectine 9 ou MX1 et IFIT1. Le blocage des voies IFN permet de lever la résistance aux anti-ICP en combinaison, et mieux, il rend les cellules tumorales plus sensibles aux anti-ICP en monothérapie. Ainsi, l'inhibition des voies IFN lève le mécanisme de résistance adaptative médiée par PD-L1 et contourne la nécessité d'utiliser une combinaison d'anti-ICP (Benci et al.

2016). Ce travail démontre un lien entre l'inflammation médiée par la voie IFN et les mécanismes d'épuisement, un aspect qu'il semble important d'évaluer dans le contexte de l'infection par le VIH-1.

Par analogie au contexte tumoral, la question de savoir s'il est possible de moduler l'épuisement des réponses T en agissant sur l'inflammation dans le contexte de l'infection VIH-1, reste encore à explorer. Pendant les phases chroniques de l'infection, même chez les patients présentant une virémie contrôlée, l'inflammation résiduelle et la signature IFN persiste et la réponse immunitaire est fragile. Des réflexions ont été menées au cours des dernières années sur la manière de réduire l'inflammation résiduelle associée à la voie IFN : (i) diminuer la production endogène d'IFN-I en limitant l'induction par les cellules productrices d'IFN, (ii) limiter la transduction du signal dans les cellules cibles en inhibant la signalisation IFN par des anticorps anti-IFNAR ou des inhibiteurs des JAK1/2. Toutes ces stratégies devront être combinées aux ARV pour améliorer le contrôle de la réplication virale.

En 2017, deux équipes ont rapporté l'impact du blocage des récepteurs IFNAR sur la restauration des fonctions immunitaires et les réservoirs viraux en modèles de souris humanisées pour le système immunitaire (HIS) (Zhen et al. 2017; Cheng et al. 2017; Deeks, Odorizzi, and Sekaly 2017). Zhen et al. ont utilisé un anticorps anti-IFNAR2 dans un modèle de souris NSG-BLT infecté par le VIH-1. Comme attendu, l'expression des ISG a été réduite ainsi que l'épuisement des LT CD8⁺ (PD1, TIM3) et des marqueurs d'activation (CD38). De plus, le blocage du récepteur IFNAR a réduit efficacement la charge virale en phase chronique, et l'association avec le traitement ART a permis une suppression virale plus rapide et des réservoirs viraux réduits (Zhen et al. 2017). De même, Cheng et ses collègues ont utilisé un anticorps anti-IFNAR1 chez des souris humanisées NRG-BLT. Les ARV ont été introduits 4 semaines post-infection et les anti-IFNAR1 ont été administrés après 7 semaines. Les ARV ont

ensuite été interrompus après 12 semaines post-infection. Cette stratégie a montré une préservation du nombre de LT CD4⁺ ainsi qu'une restauration de la fonctionnalité des LT CD8⁺. De plus, les mesures de charges virales ont montré une réduction des réservoirs inductibles après l'arrêt du traitement (Cheng et al. 2017). Dans l'ensemble, ces études ont donné des résultats très prometteurs. L'anifrolumab est un anticorps monoclonal anti-IFNAR1 actuellement développé dans les maladies auto-immunes (Furie et al. 2017). A ce jour, aucun essai clinique n'a été enregistré pour évaluer une telle stratégie chez l'homme.

L'inhibition des JAK1 et 2 est intéressante par sa capacité à réduire l'inflammation systémique. En revanche, l'inhibition de JAK3 est associée à une toxicité non spécifique. En effet, l'administration d'un α JAK3 chez les macaques infectés par le SIV a montré une diminution des cellules NK et une augmentation de la charge virale (Takahashi et al. 2013; 2014). Il existe actuellement trois inhibiteurs de JAK1 et JAK2 disponibles et approuvés dans différents contextes. Le ruxolitinib est utilisé dans le cadre de la myélofibrose et de la maladie de Vaquez, le tofacitinib pour la polyarthrite rhumatoïde (Kremer et al. 2009; Lee et al. 2014; Salgado et al. 2014) et l'arthrite psoriasique. Le baricitinib est également utilisé pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (P. C. Taylor et al. 2017; Keystone et al. 2015). Dans l'infection VIH-1, en 2014 Gavegnano et al. ont démontré que l'utilisation du ruxolitinib et du tofacitinib limitait la réplication virale et la réactivation du virus *in vitro*. Ces deux médicaments ont permis de réduire l'infection des LT primaires et des macrophages humains par différentes souches, y compris des souches résistantes aux INTI. La combinaison des médicaments a permis une activité antivirale plus puissante, et la viabilité des cellules cultivées est restée satisfaisante, sauf pour les concentrations de médicaments très élevées (Gavegnano et al. 2014). Ces résultats ont été confirmés pour le ruxolitinib dans un modèle murin d'encéphalite due au VIH-1 (Haile et al. 2016), suggérant un rôle intéressant en traversant la barrière hémato-encéphalique pour lutter contre les réservoirs viraux du SNC. Spivak et al. ont aussi montré que

le ruxolitinib était capable de limiter la production d'IL-6, TNF α , IL-1 β et IFN γ par les PBMC exposées à un agoniste de la PKC, sans impacter la latence virale (Spivak et al. 2016). Cette étude a suggéré que les α JAK avaient différents mécanismes pour réguler l'inflammation et contrôler la latence virale. Enfin, Gavegnano et al. ont récemment démontré que les α JAK étaient capables de réduire la transmission de l'infection de cellule à cellule en réduisant l'activation immunitaire de manière dépendante de pSTAT5. Ils mettent également en évidence une réduction accélérée de la taille globale du réservoir viral en interférant avec la durée de vie des LT infectés par la réduction de l'expression de Bcl-2 (Gavegnano et al. 2017). Dans l'ensemble, ces données renforcent l'intérêt des α JAK. Le ruxolitinib est actuellement testé dans un essai international randomisé de phase 2 (NCT02475655) en association avec les ARV pour évaluer la sécurité et l'impact sur la suppression virale et la numération des LT CD4⁺ chez les patients infectés par le VIH-1.

Ainsi, agir sur l'épuisement et/ou l'inflammation à bas bruit représentent deux approches thérapeutiques prometteuses, chacune basée sur une fenêtre thérapeutique qui reste à mieux définir au cours de l'infection. L'évaluation de l'efficacité de ces immunothérapies, en association avec les ARV, et de leurs effets indésirables dans le contexte de l'infection VIH-1 nécessite la mise en place d'un modèle préclinique robuste, accessible et compatible avec l'évaluation des différents schémas thérapeutiques.

III. Les modèles animaux pour l'étude de l'infection par le VIH-1

1. Deux modèles expérimentaux : le primate non-humain et la souris humanisée

a. Un besoin aigu de modèles précliniques

Les modèles animaux représentent un outil préclinique déterminant pour la compréhension des pathologies humaines et le développement de traitements thérapeutiques. La recherche biomédicale a largement bénéficié des connaissances accumulées au travers d'études effectuées sur les modèles animaux, en particulier chez la souris. Toutefois, la souris présente des limitations importantes notamment lorsque ce modèle expérimental est confronté au tropisme exclusivement humain de certains pathogènes, limitant sérieusement leur étude *in vivo*. C'est particulièrement le cas d'un grand nombre de maladies infectieuses, telles que les infections par le VIH-1, les virus de l'hépatite B et C, ou encore par les parasites de l'espèce *Plasmodium malariae*, l'agent causal du paludisme. Ces restrictions s'appliquent également en termes de développement et d'évaluation de nouvelles approches thérapeutiques.

Pour contourner ces limitations, des modèles animaux spécifiques permettant l'établissement de réponses immunitaires fonctionnelles le plus proche possible de l'homme sont nécessaires. Dans le contexte de l'infection par le VIH-1, le modèle idéal devrait permettre de modéliser la transmission du virus, la pathogénie et la distribution tissulaire avec la formation de réservoirs viraux, d'étudier les dysfonctionnements immunitaires causés directement ou indirectement par la réplication virale ou encore d'évaluer l'efficacité de stratégies thérapeutiques. Malheureusement, ce modèle n'existe pas. En revanche, les modèles de PNH (Van Rompay 2012; D. T. Evans and Silvestri 2013; Karlsson et al. 2007; Bourry et al. 2010) et de souris HIS (Paul W. Denton and García 2011) répondent en partie à ces critères

avec des limites propres à chaque modèle. A noter que les souris standards, comme d'autres rongeurs, ne sont pas des hôtes naturels des *Retroviridae* et ne peuvent être infectées par le VIH-1 (Morrow et al. 1987). Le PNH et la souris HIS sont souvent utilisés indépendamment ou en combinaison pour l'étude de l'infection par le VIH-1.

b. Le primate non-humain

Le PNH avec qui nous partageons environ 98% de notre génome (Gibbs et al. 2007) présentent des similitudes anatomiques, physiologiques et physiopathologiques proches de l'homme, ce qui en fait un modèle de grand intérêt dans l'étude des maladies infectieuses et particulièrement de l'infection par le VIH-1 (Gardner and Luciw 2008). Néanmoins, leur proximité à l'homme soulève des considérations éthiques et le cout financier associé à la complexité des structures d'hébergement et de soins est important. Dès le début de l'épidémie, l'infection par le SIV a été le modèle de référence pour les études physiopathologiques. Le SIV est un lentivirus caractérisé depuis la fin des années 1980 (Hirsch et al. 1989). Parmi la diversité des espèces de PNH, on distingue classiquement les hôtes naturels et non naturels du SIV. Les premiers correspondent aux singes d'Afrique et ne développent pas de maladie, alors que les seconds, représentés par les singes d'Asie, en développe une lors de l'infection par les souches SIV. En particulier, des dysfonctionnement immunitaires similaires à ceux observés lors de l'infection VIH-1 chez l'homme sont retrouvées : une charge virale élevée, une déplétion progressive des LT CD4⁺, une phase chronique durable qui favorise l'apparition de maladies opportunistes et de comorbidités (Brenchley and Paiardini 2011).

L'infection chronique des singes africains par le SIV est non pathogène malgré des charges virales plasmatiques élevées. Ces modèles non progressseurs sont précieux pour étudier

les mécanismes d'une réponse immunitaire efficace (A.-S. Liovat et al. 2009). Les modèles non pathogènes les mieux étudiés sont l'infection par la souche SIV_{smm} présente chez le sooty mangabey (*Cercocebus atys*) et l'infection par la souche SIV_{agm} du singe vert africain (*Chlorocebus aethiops*) (Hirsch et al. 1989). Bien que l'infection SIV entraîne une forte réplication virale et une déplétion drastique des LT CD4⁺ dans le GALT dès les premiers jours de l'infection aiguë (Gordon et al. 2007), la charge virale reste faible dans les ganglions lymphatiques de ces hôtes naturels, suggérant un contrôle du virus dans les tissus (Beer et al. 1996; Diop et al. 2000). De plus, l'infection persistante n'entraîne pas d'altérations immunitaires majeures en phase chronique. La restauration du nombre de LT CD4⁺ est presque complète, l'intégrité tissulaire des ganglions lymphatiques et du GALT est rétablie ou faiblement altérée (Pandrea, Gautam, et al. 2007), l'activation immunitaire chronique et l'épuisement progressif des réponses T sont très faibles en comparaison d'un modèle d'infection progressifs ou de l'infection VIH-1 chez l'homme. La normalisation rapide de l'activation immunitaire constitue une différence marquante de ces modèles. Différents travaux mettent en évidence l'interdépendance de plusieurs mécanismes cellulaires contribuant à réguler fortement cet état d'activation et à maintenir une réponse antivirale efficace : une prolifération cellulaire normale (Chakrabarti et al. 2000), une architecture des organes lymphoïdes secondaires maintenue (Silvestri et al. 2003), un équilibre inflammatoire (Kornfeld et al. 2005), l'induction rapide d'une réponse suppressive (Pereira et al. 2007; Estes et al. 2008).

A l'inverse, les singes asiatiques dits progressifs sont sensibles à l'infection exogène par les souches SIV de laboratoires. Les efforts de la recherche sur le VIH-1 se sont concentrés sur les macaques à queue de cochon (*Macaca nemestrina*), les macaques rhésus (*Macaca mulatta*) d'origine indienne et chinoise et les macaques cynomolgus (*Macaca fascicularis*). L'infection SIV induit une infection pathogène persistante proche de celle observée par le VIH-1 chez l'homme (Fauci and Desrosiers 1997), avec une progression vers le stade SIDA dont

l'évolution dépend de la souche virale (D. T. Evans and Silvestri 2013) et des espèces : une progression très rapide (< à 6 mois) chez les macaques à queue de cocon (Klatt et al. 2012), une progression rapide (6 mois à 1 an) pour les macaques rhésus indiens et un profil de progression lente (> à 1 an) pour les macaques rhésus chinois et cynomolgus (Reimann et al. 2005). Toutefois, la durée de la phase chronique n'atteint pas celle observée chez l'homme qui varie de 5 à 12 ans chez les patients infectés par le VIH-1 ne recevant pas de traitement ART.

Pour expliquer les différences entre hôtes naturels et non naturels, différents mécanismes sont proposés. Les variants de la protéine Nef, présents dans les souches endogènes, jouent un rôle dans la protection des hôtes naturels au SIV. Ils induisent (i) la régulation négative de l'expression du CD3 et du TCR et empêchent la formation de la synapse immunologique, réduisant l'activation, la mort cellulaire induite par l'activation et l'induction de PD1, (ii) la régulation négative du CMH-I, limitant l'activation des LT CD8⁺ et la lyse des LT CD4⁺ infectés (Kirchhoff and Silvestri 2008; Schindler et al. 2008; Joas et al. 2020). De plus, la surexpression de facteurs de restriction a été mise en évidence chez les singes africains diminuant l'expression de CD4 et de CCR5 et réduisant ainsi l'entrée du virus au sein des cellules cibles (Beaumier et al. 2009; Paiardini et al. 2011; Pandrea, Apetrei, et al. 2007). Enfin, les modalités de mise en place de la réponse innée sont différentes entre les deux modèles de macaques et joueraient un rôle déterminant dans le contrôle de la maladie (Bosinger et al. 2009; Jacquelin et al. 2009; Lederer et al. 2009). En particulier, l'arrêt plus précoce de la réponse IFN-I et de la production d'ISG associés jouerait un rôle dans le contrôle de l'activation immunitaire et de l'inflammation en phase chronique chez les singes non progressseurs par rapport aux hôtes progressseurs (Jacquelin et al. 2009).

c. La souris humanisée pour le système immunitaire

Comme pour le PNH, le principal moteur de développement de la souris HIS repose sur l'accès à un modèle animal avant les essais cliniques chez l'homme. On distingue classiquement deux types d'humanisation : l'humanisation génétique et l'humanisation cellulaire. L'humanisation génétique pour des composants moléculaires implique des mutations permettant l'expression de gènes humains et, par exemple, l'étude et la validation d'une stratégie thérapeutique ciblant la molécule humaine dont l'expression a été induite. Actuellement, grâce à la technique de CRISPR-Cas9 qui agit comme ciseaux moléculaires, l'humanisation génétique de plusieurs loci murins codant pour des composants du système immunitaire est largement facilitée (Bournazos, DiLillo, and Ravetch 2014; Lute et al. 2005; X. Chen et al. 2018). Toutefois, pour permettre une compréhension plus complète des mécanismes pathologiques *in vivo* et faciliter les études précliniques, il est important d'utiliser une approche d'humanisation cellulaire. Celle-ci repose sur la xénotransplantation de tissus et/ou de CSH humaines au sein d'une souris immunodéficiente. Les modèles de souris HIS existent depuis plus de 30 ans et ont largement bénéficié d'améliorations au cours du temps (J. McCune et al. 1991; Leonard D. Shultz et al. 2012; R. Ito et al. 2012; R. Ito, Takahashi, and Ito 2018). La souris HIS dispose d'un système immunitaire chimérique humain/murin et repose sur un équilibre fragile visant à empêcher le développement de GvHD (graft versus host disease) tout en reconstituant un système immunitaire humain fonctionnel. Au cours du temps, plusieurs avancées révolutionnaires ont été possibles principalement grâce à deux approches. Premièrement, en modifiant génétiquement la souris pour éliminer davantage les cellules immunitaires murines et limiter leur influence, et deuxièmement, en affinant les stratégies d'humanisation via l'implantation de tissus fœtaux humains et/ou de CSH humaines, pour atteindre un niveau satisfaisant de reconstitution immunitaire humaine dans les tissus

lymphoïdes et non lymphoïdes, y compris les muqueuses. Les modèles de souris HIS montrent désormais un fort potentiel pour l'étude de l'infection par le VIH-1. Aujourd'hui, plus de 20 modèles HIS, chacun avec des caractéristiques propres, sont disponibles (Akkina et al. 2016).

Les nouvelles générations de souris HIS sont utilisées pour plusieurs raisons. Il s'agit du seul modèle animal permettant d'étudier directement l'infection par le VIH-1. Le système immunitaire est partiellement humanisé et fonctionnel, et peut récapituler de nombreux dysfonctionnements du système immunitaire notamment la déplétion des LT CD4⁺ (Berges et al. 2006), l'épuisement des réponses T (Brainard et al. 2009), l'activation immunitaire et l'inflammation chronique (Long and Stoddart 2012). L'étude de la transmission du VIH-1 par les muqueuses (Sun et al. 2007; Wahl et al. 2012), la pathogenèse (Long and Stoddart 2012; Berges et al. 2006; Dudek et al. 2012), la prévention (Neff et al. 2010; Paul W. Denton et al. 2010), les traitements (Joseph et al. 2010; Klein et al. 2012; Nischang et al. 2012; Dash et al. 2019) et la latence virale (P. W. Denton et al. 2012; S. K. Choudhary et al. 2012; Satheesan et al. 2018; Llewellyn et al. 2019) peuvent être étudiés. Notons en particulier, une dissémination du virus mise en évidence dans le modèle NSG (Araínga et al. 2016) et DRAG (J. Kim et al. 2017) au sein de différents tissus et notamment le cerveau, entraînant une neuro-inflammation (Gorantla et al. 2010) décrite chez certains patients ; des voies de transmission semblables à l'homme chez la souris BLT qui peut être infectée par voie sanguine, rectale et vaginale (Berges et al. 2008) ; un contrôle efficace de la charge virale par traitement ART (Nischang et al. 2012) et un rebond de la charge virale à son arrêt révélant la présence de réservoirs viraux (P. W. Denton et al. 2012). Enfin, le modèle HIS est considérablement moins cher que les modèles PNH.

Il est néanmoins important de considérer les limites du modèle et de les reconnaître. Il s'agit d'un modèle chimérique de cellules et de tissus ; le système immunitaire humain est

partiellement reconstitué et les cellules non lymphoïdes et les tissus restent d'origine murine. Malgré une réponse immunitaire robuste, un retard des réponses humorales (entre 6 et 12 semaines post-infection) et cellulaires (9 semaines post-infection) spécifiques a été observé dans le modèle BLT infecté par le VIH-1, par rapport au modèle PNH infecté par le SIV et l'homme par le VIH-1 (2 semaines post-infection) (Brainard et al. 2009), reflétant probablement un défaut de la maturité du système immunitaire humain pour ces souris. Les réponses adaptatives doivent encore être améliorées dans ces modèles, en particulier la réponse IgG (J. Lang et al. 2013; Y. Watanabe et al. 2009). Enfin, la cinétique d'infection du VIH-1 chez la souris HIS semble différente du SIV chez le macaque et du VIH-1 chez l'homme. En effet, le pic de la charge virale est observé environ 2 semaines après l'infection, mais se maintient pendant plusieurs semaines avant de décliner, indiquant un retard dans le contrôle de la réplication virale (Brainard et al. 2009; Llewellyn et al. 2019; Dash et al. 2011; Wahl et al. 2012). Les modèles de souris HIS et PNH ont le potentiel pour servir de modèles complémentaires dans l'étude de l'infection VIH-1, avec leurs forces et leurs limites (**Table 1**).

	Primate non-humain	Souris humanisée pour le système immunitaire
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> • Proximité génétique, anatomique, physiologique avec l'homme • Similitude entre pathogenèse SIV et VIH-1 • Réponse immunitaire innée et adaptative proche de l'homme • Quantité importante de matériels biologiques 	<ul style="list-style-type: none"> • Seul modèle animal sensible au VIH-1 • Système immunitaire humain fonctionnel • Pathogenèse proche : déplétion LT CD4⁺, épuisement, activation et inflammation chronique • Sensible à tous les ARV utilisés chez l'homme • Petit animal, relativement peu cher et facilement accessible
Limites	<ul style="list-style-type: none"> • Insensible au VIH-1 mais SIV et virus apparentés (Env-SHIV, RT-SHIV) • SIV diffère génétiquement du VIH-1 : gène Vpu absent, génétique du CMH et TCR plus complexe • Nombre de virus SIV limité avec une sensibilité différente • SIV naturellement résistant à de nombreux ARV approuvés par la FDA (INNTI, certains IP et anti-CCR5) • Coût, disponibilité, considérations éthiques 	<ul style="list-style-type: none"> • Système immunitaire chimérique humain/murin • Certaines structures lymphoïdes fragilisées/absentes • Délai des réponses T et B spécifiques • Cinétique virale différente • Maturation cellulaire à améliorer • Quantité limitée de matériels biologiques
Similitudes	<ul style="list-style-type: none"> • Etude de la transmission, pathogenèse, prévention, traitement et latence virale • Souche virale, dose, voie d'infection, cinétique d'infection connues • Approche multi-tissus et étude des réservoirs persistants • Possibilité d'interventions à risques élevés (expériences invasives, euthanasies) • Diversité des modèles PNH ou souris HIS 	
Références	<p>PNH : (Gibbs et al. 2007; Van Rompay 2012; Yasutomi et al. 1993; Allen et al. 2000; X. Jin et al. 1999; Matano et al. 1998; Schmitz et al. 2003; C. J. Miller et al. 2007) ; (Hatzioannou et al. 2009; Witvrouw et al. 2004; Parkin and Schapiro 2004; Giuffre et al. 2003; Vlasak and Ruprecht 2006; F. Wu et al. 2012; Lopker et al. 2013; Watkins et al. 2008; Daza-Vamenta et al. 2004; Otting et al. 2005)</p> <p>Souris HIS : (Berges et al. 2006; Sun et al. 2007; Y. Watanabe et al. 2009; Brainard et al. 2009; Shimizu et al. 2010; Paul W. Denton et al. 2010; Joseph et al. 2010; Neff et al. 2010; Billerbeck et al. 2011; P. W. Denton et al. 2012; Wahl et al. 2012; Dudek et al. 2012; Klein et al. 2012; Long and Stoddart 2012; B. E. Palmer et al. 2013; J. Lang et al. 2013)</p>	

Table 1: Avantages, limites et similitudes des modèles de primates non-humains et de souris humanisées utilisés dans la recherche sur le VIH-1

2. Modèles de souris humanisées pour le système immunitaire

a. Les souris immunodéficientes

L'humanisation cellulaire nécessite l'utilisation d'une souris immunodéficiente comme receveur afin de bénéficier d'un environnement permissif à la xénotransplantation humaine. Les souris « nude », caractérisées par une mutation du gène *FoxN1* responsable d'anomalies du développement du thymus, une déficience des LT et une perte de pilosité, ont été les premières utilisées (Flanagan 1966). Toutefois, la faible reproductibilité et efficacité de prise de greffe ont conduit au développement d'autres modèles de souris immunodéficientes. La première étape de développement de ces modèles repose sur la génération de souris totalement dépourvues en LT et LB murins afin de limiter le rejet de greffe humaine. Pour cela, plusieurs stratégies ont été menées de front à la fin des années 1980 et les souris immunodéficientes utilisées reposent sur des modifications génétiques de plus en plus complexes (**Figure 13**) :

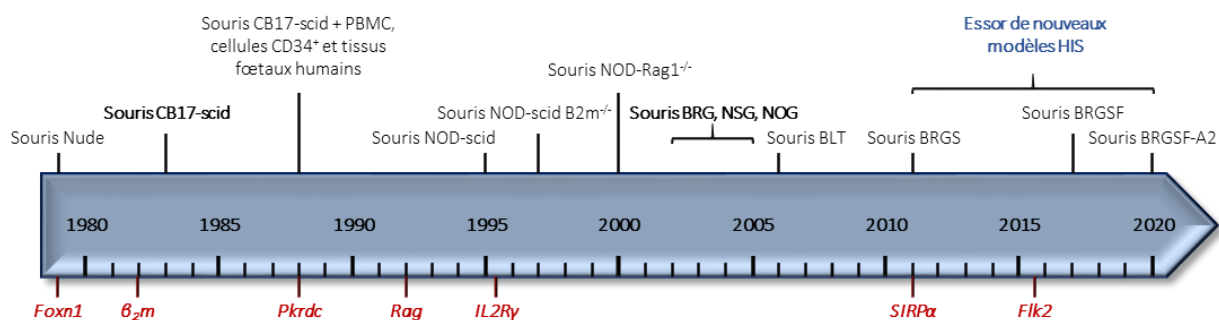


Figure 13 : Développement chronologique des modèles immunodéficients (Adaptée de (Leonard D. Shultz, Ishikawa, and Greiner 2007)). Depuis les années 1980, plusieurs modèles de souris immunodéficientes ont été développées grâce à l'introduction de mutations génétiques (en rouge). L'utilisation de ces modèles a permis la xénotransplantation humaine de PBMC, de CSH ou de tissus foetaux humains pour permettre l'essor des modèles HIS depuis les années 2010.

i) La souris CB17-*scid* (severe combined immunodeficiency) (G. C. Bosma, Custer, and Bosma 1983), mutée pour le gène *prkdc* (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit)

impliqué dans les mécanismes de réparation de l'ADN dont la recombinaison des gènes du TCR et du BCR. Cette souche qui est associée à un défaut de développement des LT et LB et une sensibilité élevée à l'irradiation a représenté une étape clé dans le domaine de la souris HIS (M. J. Bosma and Carroll 1991). Ces modèles *scid* sont capables de tolérer une xénogreffe de PBMC (Mosier et al. 1988), de CSH (Lapidot et al. 1992) ou encore de tissus fœtaux humains (J. M. McCune et al. 1988) et ont donné les bases conceptuelles et techniques à l'humanisation. Ces modèles ont d'abord servi à l'étude de l'infection par le VIH-1 (J. McCune et al. 1991).

ii) La souris BALB/c mutée pour les gènes *Rag-1* ou *Rag-2* (Recombination-activating gene), impliqués dans la recombinaison V(D)J des TCR et BCR. Ces souris sont caractérisées par un blocage du développement et de la survie des LT et LB. La souris *Rag2^{-/-}* est plus utilisée bien que les deux modèles existent (Mombaerts et al. 1992; Shinkai et al. 1992). A noter que ces souris sont peu sensibles à l'irradiation, elles survivent jusqu'à 8 Gy contrairement aux souris *CB17-scid* qui meurent dès 4 Gy.

Cependant, ces deux modèles présentent un taux de cellules hématopoïétiques humaines (hCD45⁺) faible et transitoire dans le temps, causé par la présence de cellules immunitaires murines. La mutation *scid* est dite « fuyante » et conduit à l'apparition de LT et LB murins fonctionnels avec l'âge, en partie responsable de ces fragilités. Cette fuite s'explique dans de nombreux cas par la capacité du processus de recombinaison V(D)J des souris *CB17-scid* à former occasionnellement des jonctions V(D)J fonctionnelles (Hendrickson, Schlissel, and Weaver 1990; Petrini, Carroll, and Bosma 1990; G. C. Bosma et al. 1988). L'absence de fuite des modèles *Rag1^{-/-}* et *Rag2^{-/-}* est cohérente avec une mutation qui se limite uniquement au processus de recombinaison V(D)J, contrairement à la mutation *prkdc* aux effets pléiotropes ne ciblant pas spécifiquement le processus de recombinaison.

Au début des années 1990, le développement continu de souris immunodéficientes plus performantes pour la reconstitution de cellules hCD45⁺ a conduit au croisement de souris CB17-*scid* avec des souris de fond génétique NOD (Non Obese Diabetic) afin de bénéficier de l'activité réduite des cellules NK, des macrophages et des voies du complément spécifique à ce fond génétique (Kataoka et al. 1983). Les souris NOD.*scid* qui résultent de ce croisement, présentent 5 à 10 fois plus de cellules hCD45⁺ que les souris CB17-*scid* initiales (L D Shultz et al. 1995; Hesselton et al. 1995). Cependant, ces souris HIS présentent une espérance de vie réduite et meurent dès 15 semaines post-transplantation : les cellules immunitaires murines résiduelles maintenaient une activité importante conduisant au rejet de la greffe humaine. L'étape suivante a reposé sur la génération de souris déficientes pour le gène codant la chaîne γ commune du récepteur à l'IL-2 (*IL2R γ c*), chaîne partagée aux récepteurs à l'IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21 (Disanto et al. 1995; Cao et al. 1995; Asao et al. 2001) permettant en plus l'absence totale de cellules NK murines (Ishikawa et al. 2005; M. Ito et al. 2002; Traggiai et al. 2004). Cette étape a été décisive pour produire une nouvelle génération de modèles sévèrement immunodéprimés, en associant la mutation *scid* ou *Rag2*^{-/-} à la mutation *IL-2R γ c*. Ainsi, trois modèles se sont principalement distingués : les souris NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL2R γ ^{tm1Sug/JicTac}) (M. Ito et al. 2002), les souris NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL2R γ ^{tm1Wjl/SzJ}) (Leonard D. Shultz et al. 2005; Ishikawa et al. 2005) et les souris BRG (BALB/c Rag2^{tm1Fwa} IL-2R γ ^{tm1Cgn}) (Traggiai et al. 2004). Ces souris présentent toutes une absence totale de LT, LB et cellules NK associée à une activité réduite des macrophages et DC murines. A noter que la délétion de la chaîne γ commune du récepteur à l'IL-2 est différemment induite dans les modèles ; elle est totale pour les souris NSG et partielle pour les souris NOG où seule la queue cytoplasmique est non-fonctionnelle. Également, la prise de greffe semble meilleure dans la moelle osseuse des souris NSG par rapport aux souris NOG (McDermott et al. 2010).

Le modèle BRG restait toutefois moins tolérant à la greffe hématopoïétique humaine par rapport aux souris NSG et NOG. Les travaux de Takenaka et al. en 2007 ont mis en évidence l'implication de la protéine SIRP α (signal regulatory protein alpha) dans ce phénomène (Takenaka et al. 2007; Takizawa and Manz 2007; van den Berg and van der Schoot 2008; Legrand et al. 2011). Cette protéine est exprimée essentiellement par les macrophages mais aussi par les DC, les granulocytes et les neurones, et induit un signal « don't eat me » en interagissant avec son ligand CD47 exprimé de façon ubiquitaire. L'interaction optimale SIRP α /CD47 permet d'induire une tolérance phagocytaire. A la différence des souris NOG et NSG, les souris BRG possèdent des macrophages dont la protéine SIRP α murine ne reconnaît pas la molécule CD47 humaine. En effet, le fond génétique NOD code pour un gène *sirpa* murin dont le polymorphisme permet à la protéine de se lier au CD47 humain (Kwong et al. 2014). Les macrophages murins tolèrent alors mieux les cellules humaines dans les modèles NOG et NSG. Ces découvertes ont permis d'améliorer le modèle BRG, soit par la transduction du CD47 murin dans les cellules hCD45⁺ avant la greffe, soit par la production de souris congéniques pour l'allèle du gène SIRP α NOD ou humain. Ces souris dites BRGS (Balb/c Rag2^{tm1Fwa} IL-2R γ ^{tm1Cgn} Sirpa^{NOD}) présentent un taux de cellules hCD45⁺ et une distribution proche des modèles NSG et NOG (Legrand et al. 2011; Strowig et al. 2011) (**Table 2**). En outre, les souris BRGS présentent certains avantages par rapport aux souris NSG/NOG : i) une radiosensibilité réduite déjà observée dans le modèle BRG (Gimeno et al. 2004; Traggiai et al. 2004), ii) un thymus de taille supérieure (Legrand et al. 2011), iii) un système du complément murin intact, contrairement aux souris de fond génétique NOD pour lesquelles la voie C5 est défectueuse (Baxter and Cooke 1993), iv) une durée de vie plus longue (> 1 an post-transplantation contre 4 à 6 mois pour les souris NSG/NOG) grâce à l'absence de la mutation *scid* (Strowig et al. 2011), et v) l'accumulation de LT naïves et une réduction de l'inflammation (Legrand et al. 2011).

Modèle	Avantages	Limites	Références
Nude (B6.Cg-Foxn1 ^{nu})	Athymique ∅ LT mature	Forte activité des NK Immunité innée intacte Pas/peu de prise de greffe hCD45 ⁺	(Flanagan 1966)
CB17-scid (C.BKa Igh ^b -Prkdc ^{scid} /IcrSmn)	∅ LT et LB	Forte activité des NK Immunité innée intacte Très faible prise de greffe hCD45 ⁺ Fuite des LT et LB murins avec l'âge Radiosensible	(G. C. Bosma, Custer, and Bosma 1983)
Rag1 et Rag2 (C57BL/6-Rag1 ^{tm1mom} ou Rag2 ^{tm1Fwa})	∅ LT et LB Radiorésistant ou ∅ fuite du modèle	Faible activité des NK Immunité innée intacte Très faible prise de greffe hCD45 ⁺	(Mombaerts et al. 1992; Shinkai et al. 1992)
NOD-scid (NOD.CB17-Prkdc ^{scid})	∅ LT et LB Faible activité des NK ∩ Immunité innée ∩ Fuite du modèle : 10% ∩ Greffe hCD45 ⁺	Activité des NK présente Immunité innée résiduelle Défaillance du complément (C5) Faible espérance de vie (lymphomes thymiques) Radiosensible	(L D Shultz et al. 1995)
NOG (NOD.Cg-Prkdc ^{scid} IL2Ry ^{tm1Sug} /JicTac)	∅ LT, LB, NK Immunité innée très réduite Tolérance macrophagique Bonne greffe hCD45 ⁺ Durée de vie réduite (<6-9 mois)	Défaillance du complément (C5) ∅ CMH approprié pour sélection thymique ∅ Cytokines humaines spécifiques au développement, maturation et survie des cellules hCD45 ⁺ Faible réponse anticorps Immunité innée résiduelle Altérations ganglions lymphatiques Radiosensible	(M. Ito et al. 2002)
NSG (NOD.Cg-Prkdc ^{scid} IL2Ry ^{tm1Wjl} /SzJ)	Similaire modèle NOG, sauf chaîne γ absente et non tronquée Meilleure greffe hCD45 ⁺ que NOG	Similaire modèle NOG	(Ishikawa et al. 2005)
BRG (Balb/c Rag2 ^{tm1Fwa} IL-2Ry ^{tm1Cgn})	∅ LT, LB, NK Immunité innée très réduite Système du complément intact Bonne greffe hCD45 ⁺ Longue durée de vie (>1 an) Radiorésistant	Similaire modèle NOG, NSG, excepté ∅ tolérance macrophagique et greffe hCD45 ⁺ réduite	(Traggiai et al. 2004)
BRGS (Balb/c Rag2 ^{tm1Fwa} IL-2Ry ^{tm1Cgn} Sirpa ^{NOD})	Similaire modèle BRG Greffe hCD45 ⁺ similaire aux modèles NOG, NSG Tolérance macrophagique ∩ Taille du thymus par rapport aux NOG, NSG, BRG	Similaire modèle NOG, NSG Similaire modèle BRG, excepté tolérance macrophagique	(Legrand et al. 2011; Strowig et al. 2011)

Table 2 : Avantages et limites des modèles de souris immunodéficientes utilisés pour l'humanisation du système immunitaire. (Adaptée de (Leonard D. Shultz, Ishikawa, and Greiner 2007)). Plusieurs modèles de souris immunodéficientes ont été développés permettant *in fine* de distinguer trois grands modèles adaptés à la xénotransplantation humaine de PBMC, CSH ou tissus fœtaux humains : les modèles NOG, NSG et BRG(S).

b. Différentes stratégies d'humanisation

Sur la base des modèles immunodéficients précédemment décrits, trois stratégies d'humanisation sont utilisées pour l'établissement d'un système immunitaire humain et fonctionnel. Elles reposent sur l'injection de PBMC ou de CSH humaines $CD34^+$, qui peut être associée à l'implantation par microchirurgie de tissus fœtaux (**Figure 14**).

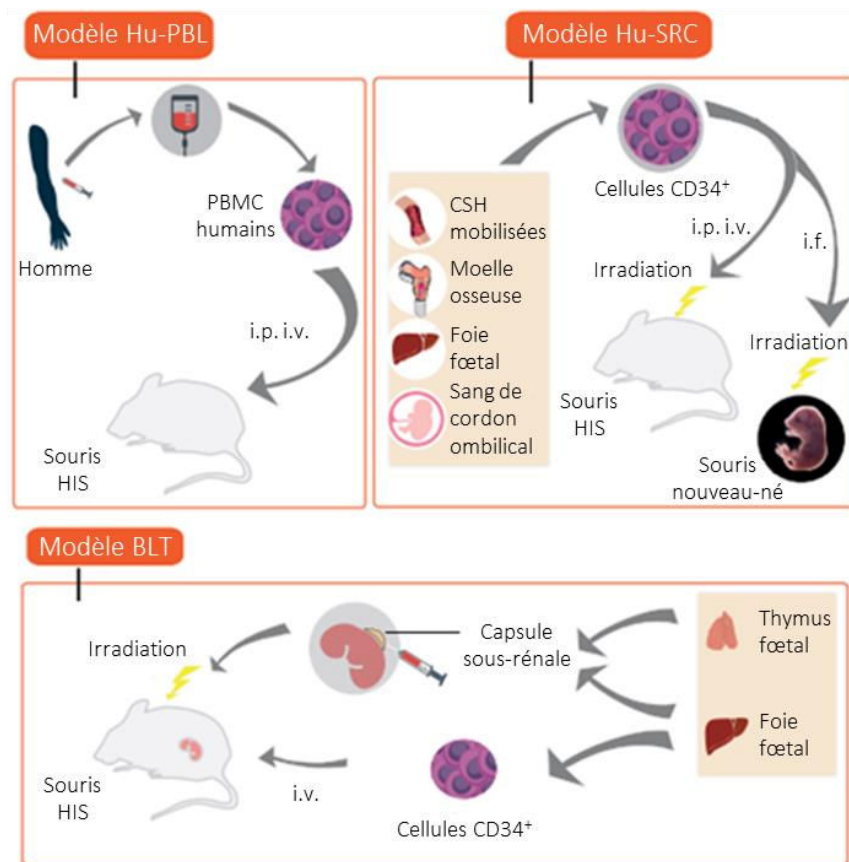


Figure 14 : Stratégies d'humanisation cellulaire des modèles immunodéficients (D'après (De La Rochere et al. 2018)). Trois stratégies d'humanisation cellulaire existent : i) l'injection de PBMC par voie intraveineuse (i.v) ou intrapéritonéale (i.p) chez une souris adulte immunodéficiente (modèle Hu-PBL-scld), ii) l'injection de CSH $CD34^+$ provenant de sang mobilisé par G-CSF, de sang de cordon ombilical, de moelle osseuse ou de foie fœtal par voie i.v, i.p ou intrafémorale (i.f) chez une souris immunodéficiente nouvellement-née ou adulte, après conditionnement par irradiation sublétales (modèle Hu-SRC-scld), iii) l'implantation par microchirurgie de tissus fœtaux sous la capsule rénale d'une souris immunodéficiente irradiée et injectée en cellules $CD34^+$ de foie fœtal autologue (modèle BLT).

- Modèle Hu-PBL à partir de PBMC :

Il s'agit du modèle d'humanisation cellulaire le plus simple et économique. Le modèle Hu-PBL est basé sur l'injection de leucocytes de sang périphériques (PBL) déjà différenciés au sein d'une souris immunodéficiente receveuse. L'équipe de Mosier en 1988 a été la première à générer des souris hu-PBL en injectant des PBMC à des souris *CB17-scid* afin d'étudier l'infection par le VIH-1 (Mosier et al. 1988). Les leucocytes matures peuvent être isolés à partir du sang (PBMC), de la rate ou des ganglions lymphatiques, et injectés par voie intra-péritonéale (i.p), intra-veineuse (i.v) ou intra-splénique (i.s) au sein de souris adultes. Le protocole le plus simple consiste toutefois à les isoler à partir du sang et les injecter par voie i.v ; celle-ci permet une reconstitution en cellules hCD45⁺ satisfaisante (M. King et al. 2008).

Ce modèle présente un taux de reconstitution particulièrement précoce (3 à 5 jours après la greffe). Elle est de l'ordre de 50% dans le sang pour une souris NSG, 4 semaines après l'injection d'environ $20 \cdot 10^6$ PBMC humain. A noter qu'environ 80 à 95% sont des cellules CD3⁺CD45RO⁺ montrant ainsi un phénotype mémoire activé (Ali et al. 2012; M. King et al. 2008). Dans le sang, le ratio hCD4/hCD8 est proche de 2, en revanche le pourcentage de cellules myéloïdes humaines est très faible, certainement à cause du manque de cytokines humaines nécessaire à leur survie, leur développement et leur maturation (Rongvaux et al. 2013). A partir de la quatrième semaine qui suit la greffe, il est possible de détecter des cellules hCD45⁺ au sein de certains tissus (rate, foie, ganglions lymphatiques) (K. C. Kim et al. 2016).

La limitation majeure de ce modèle est le développement inexorable d'une GvHD très rapidement après la greffe (4 à 6 semaines). Les cellules hCD45⁺ greffées et en particulier les LT réagissent contre les cellules exprimant le CMH de classe I et de classe II murines (M. A. et al King 2009). Alors que certains travaux mettent en évidence une corrélation entre le taux de reconstitution de LT humains et l'apparition d'une GvHD, d'autres détaillent le rôle des LT CD4⁺ dans l'induction de cette maladie (Sanmamed et al. 2015). En raison de leur réactivité

vis-à-vis de l'hôte et de leur capacité de prolifération, ces résultats expliquent notamment que la sous-population qui persiste chez l'hôte est constituée très largement de LT. Ce modèle présente ainsi une fenêtre expérimentale limitée (< 6 semaines) après la greffe (M. A. et al King 2009). Au sein de la suspension de PBMC injectés, quelques CSH sont présentes mais ne parviennent pas à coloniser la souris receveuse, en raison d'un microenvironnement inapproprié pour leur survie et leur différenciation (Tary-Lehmann, Saxon, and Lehmann 1995). L'injection de CSH a par la suite nettement amélioré la reconstitution immunitaire humaine (Péault et al. 1991).

- Modèle Hu-SRC à partir de cellules souches CD34⁺ :

Ce second modèle, initialement appelé Hu-SRC-*scid* pour cellules humaines repeuplant les souris *scid* (Scid-Repopulating Cell), repose sur l'injection de CSH humaines CD34⁺ au sein de souris immunodéficientes nouvellement nées ou adultes. Le succès de cette stratégie est très variable selon la source de CSH, la voie d'infection, la souche et le sexe de la souris hôte. En amont, il est nécessaire de créer un microenvironnement favorable réduisant le nombre de CSH murines afin de favoriser la prise de greffe des CSH humaines. Pour cela, une irradiation sublétales des souris immunodéficientes receveuses est classiquement réalisée. Des alternatives existent cependant ; l'utilisation d'un agent chimiothérapeutique comme le busulfan (Hayakawa et al. 2009; Kang et al. 2016; Robert-Richard et al. 2006) ou l'anticorps ACK2 (Czechowicz et al. 2007; Gonzalez, Strbo, and Podack 2013) bloquant la fonction du récepteur c-kit conduisant à la déplétion sélective des cellules progénitrices murines et ainsi l'élimination transitoire des CSH murines. Il existe aussi des approches génétiques ; les souris NSG-W41 présentent une mutation pour le gène *c-kit* (Cosgun et al. 2014; McIntosh et al. 2015). La source de CSH CD34⁺ peut provenir de sang de cordon ombilical humain (Brehm et al. 2010), de sang après mobilisation des cellules souches avec du G-CSF (Granulocyte-colony stimulating factor)

(Leonard D. Shultz et al. 2005), de moelle osseuse adulte (Holyoake, Nicolini, and Eaves 1999) ou encore de tissus fœtaux (Lepus et al. 2009). Actuellement, le sang de cordon ombilical humain est la source de CSH CD34⁺ la plus accessible et présente une efficacité importante de prise de greffe. Les cellules CD34⁺ peuvent être injectées par voie intrapéritonéale, intraveineuse, intracardiaque ou intrahépatique chez le nouveau-né (entre 2 à 5 jours de vie) ou par voie intraveineuse, intrafémorale ou intrasplénique chez la souris adulte. A noter que la voie intrahépatique chez le nouveau-né est favorisée puisqu'il représente un site majeur de l'hématopoïèse durant les premiers jours de vie des animaux (M. Ito et al. 2002; Traggiai et al. 2004) et qu'il s'agit d'un protocole facile avec une vue par transparence du foie chez le nouveau-né. Des travaux ont toutefois rapporté que la voie d'injection chez le nouveau-né et l'adulte n'influence pas les résultats sur le taux de reconstitution en cellules hCD45⁺ (Brehm et al. 2010; Werner-klein et al. 2014). Par contre, il est désormais évident que la xénotransplantation chez la souris nouveau-née ou jeune (< 4 semaines) assure une meilleure efficacité de la prise de greffe en comparaison à des souris adultes (6-12 semaines) (Traggiai et al. 2004; Ishikawa et al. 2005; Brehm et al. 2010). Ces observations pourraient s'expliquer par une involution thymique chez l'adulte responsable d'un défaut de développement des LT et/ou par un système immunitaire inné peu actif chez le nouveau-né favorable aux LT humains. Enfin, les souris femelles semblent présenter un taux de reconstitution hCD45⁺ supérieur et plus durable par rapport aux males (McDermott et al. 2010; Notta, Doulatov, and Dick 2010; Labarthe et al. 2020) avec en particulier une proportion de LT naïfs plus élevée alors que les males présentent un phénotype mémoire activé plus important (Volk et al. 2016). Ces résultats reflètent potentiellement l'effet des hormones sexuelles murines sur la reconstitution immunitaire humaine. Ils mettent en avant une qualité des réponses immunitaires différente selon le sexe, comme décrit chez l'homme (Taneja 2018), et soulignent la nécessité d'analyser séparément les souris des deux sexes.

Dans ce modèle, le taux de reconstitution en cellules hCD45⁺ est important et toutes les lignées hématopoïétiques humaines se développent incluant les LT, LB, cellules NK, DC, monocytes, macrophages, granulocytes, érythrocytes et plaquettes, à différents degrés (M. Ito et al. 2002; Traggiai et al. 2004; Ishikawa et al. 2005; Legrand et al. 2011; Strowig et al. 2011). Bien que le système immunitaire humain soit fonctionnel et plus performant que le modèle Hu-PBL, les limites du modèle Hu-SRC restent multiples. Plusieurs travaux basés sur la caractérisation des populations lymphoïdes ont rapporté que la majorité des LT humains sont des cellules mémoires CD45RA⁻CD27⁺ (André et al. 2010; Ali et al. 2012; Nie et al. 2009), la majorité des LB sont immatures (Y. Watanabe et al. 2009; J. Lang et al. 2013) et que les cellules NK sont défaillantes (phénotype hyperactivé avec une sous-expression des récepteurs KIR) (André et al. 2010). De plus, il semble que la fonctionnalité des LT humains en réponse à des antigènes spécifiques soit discutée (Traggiai et al. 2004; Yajima et al. 2009; Y. Watanabe et al. 2009). Le compartiment myéloïde humain est également altéré avec la présence de monocytes immatures (Gille et al. 2012). Enfin, l'éducation des LT humains se fait dans un thymus murin par reconnaissance d'un complexe CMH/peptide restreint aux molécules murines du CMH, ce qui entraîne une sélection thymique sur la base d'une interaction différente de celle proposée en périphérie par les CPA humaines. Cette limitation sera détaillée en partie III.3.a.

- Modèle BLT à partir de cellules souches CD34⁺ et de tissus fœtaux :

Le modèle BLT pour « Bone marrow-Liver-Thymus » nécessite également un conditionnement de l'animal par irradiation sub létale et l'utilisation de CSH CD34⁺, ici associé en amont à la transplantation de fragments de foie et de thymus fœtaux humains au niveau de la capsule sous-rénale de souris NOG ou NSG adultes (Wege et al. 2008; Melkus et al. 2006; Lan et al. 2006). Dans ce contexte, il s'agit de CSH CD34⁺ autologues, provenant du même foie fœtal, injectées par voie intraveineuse. L'article fondateur de McCune (J. M. McCune et al.

1988) a donné les bases conceptuelles et techniques pour une reconstitution stable des cellules hCD45⁺ dans ce modèle (Namikawa et al. 1990; J. McCune et al. 1991). Cette première génération de souris a permis d'étudier certaines problématiques clés relatives à la pathogénèse du VIH-1 et au développement de stratégies thérapeutiques (Joseph M. McCune et al. 1990; Aldrovandi et al. 1993; Stanley et al. 1993). Ce modèle présente une reconstitution à long terme et multi-lignées du système hématopoïétique humain (LT, LB, cellules NK, DC, monocytes, macrophages, granulocytes, érythrocytes et plaquettes) retrouvée dans les organes lymphoïdes et de nombreux tissus : thymus humain et murin, moelle osseuse, rate, ganglions lymphatiques, foie, poumon, intestin, appareil reproducteur féminin (Melkus et al. 2006; Brainard et al. 2009; Kitchen et al. 2012; Sun et al. 2007; Deruaz and Luster 2013; P W Denton et al. 2012). Les réponses T spécifiques de l'antigène sont plus performantes par rapport aux autres modèles (Dudek et al. 2012). Rapidement, le modèle BLT est devenu le modèle HIS phare pour notamment étudier la transmission du VIH-1 par les muqueuses. Dans ce modèle, les LT peuvent être éduquées au sein d'un tissu thymique humain autologue.

Ce modèle plus performant reste toutefois moins accessible du fait d'un protocole lourd et coûteux qui nécessite une expertise en microchirurgie et un accès aux tissus fœtaux humains. Ces derniers sont difficiles à obtenir en raison des restrictions sur les procédures d'avortement et des considérations éthiques, variables selon les pays. De plus, ce modèle reste sujet au développement d'une GvHD environ 6 mois après la greffe ce qui peut limiter l'utilité du modèle pour des études impliquant des pathologies chroniques (Rongvaux et al. 2013). La modification génétique IL2R γ^{null} limite également dans ce modèle le développement de tissus lymphoïdes secondaires (Nochi et al. 2013). Bien qu'elles présentent un nombre important de LB humains, l'incapacité des souris BLT comme les autres modèles, à développer des niveaux élevés d'anticorps IgG reste une limitation importante. Plusieurs études ont démontré que cette population est majoritairement composée de LB immatures (pro/prématures, immatures et

transitoires) et d'un nombre réduit de cellules mémoires qui restent peu fonctionnelles (Biswas et al. 2011; Martinez-Torres et al. 2014; Villaudy et al. 2014).

Ainsi, les stratégies d'humanisation du système immunitaire restent imparfaites. Les populations immunitaires humaines se développent de manières variables en raison de la réactivité au sein de la souris receveuse, un environnement dépourvu de cytokines humaines, entraînant probablement une activation non spécifique et un dysfonctionnement des réponses immunitaires.

3. Vers de nouveaux avancements en souris humanisées

a. Développements progressifs et continus des modèles humanisés

Les trois modèles conventionnels NSG, NOG, BRG ont donné des bases déterminantes pour le développement de modèles dérivés plus performants à partir des années 2010 (**Table 3**). La plupart des limites citées sont le résultat du manque de réactivité croisée entre les facteurs murins et les cellules humaines transplantées. Des axes d'améliorations ont été possibles grâce à l'expression ou l'injection de cytokines et/ou de facteurs de croissance humains, la manipulation génétique des molécules de CMH de classe I ou II, ou des deux en combinaison.

- Développement du compartiment myéloïde :

Une des limitations importantes des modèles HIS est la persistance d'un compartiment myéloïde chimérique murin/humain entraînant nécessairement des conséquences fonctionnelles sur la réponse adaptative. Plusieurs équipes ont tenté de générer des modèles favorisant le développement de ce compartiment. Par exemple, le modèle de souris NSG-W41 muté pour le

gène *c-kit*, ne nécessitant pas d'irradiation préalable, présente un meilleur développement myéloïde. En effet, la mutation du gène *c-kit* réduit le maintien et la différenciation des CSH murines permettant ainsi une compétition plus favorable de la niche pour les CSH humaines (Cosgun et al. 2014; McIntosh et al. 2015).

Les DC humaines sont sous-représentées alors même qu'elles jouent un rôle essentiel dans la coordination entre la réponse immunitaire innée et adaptative. En particulier, la signalisation Flt3 (Fms-like tyrosine kinase 3) aussi appelée Flk2 (fetal liver kinase-2) est décrite dans le développement des cDC et pDC chez l'homme et la souris. Des résultats encourageants ont mis en évidence un nombre de monocytes/macrophages et de DC humains augmentés et une maturation améliorée (Yan Li et al. 2016) à la suite d'injections hydrodynamiques de plasmides codant pour l'hIL-4, hGM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor), et hFLT3L ou hM-CSF (macrophage colony-stimulating factor) (Q. Chen, Khoury, and Chen 2009; Guimond et al. 2010). La mutation du gène *flk2* a permis de concevoir un modèle robuste appelé BRGSF (Balb/c Rag2^{KO} IL2rgc^{KO} Sirpα^{NOD} Flk2^{KO}) dans lequel la forme murine de Flt3 est invalidée, et qui supporte une densité de monocytes et de DC humains plus importante par rapport aux souches BRG et BRGS initiales et, a de plus permis l'étude des ILC (innate lymphoid cells) humaines (Lopez-Lastra et al. 2017).

Une autre approche est basée sur la conception de souris transgéniques pour le hSCF (stem cell factor), hGM-CSF, l'hIL-3, la hTPO (thrombopoïétine) ou le Sirpα humain dans différentes souches de souris immunodéficientes. Notons par exemple la souris NSG-SGM3, transgénique pour les gènes codants le hSCF, le hGM-CSF et l'hIL-3 (Wunderlich et al. 2010; Billerbeck et al. 2011), les souris NOG IL-3/GM-Tg et hIL-3/GM-CSF KI, transgéniques pour le hGM-CSF et l'hIL3 de façon ubiquitaire, respectivement dans le fond NOG (R. Ito et al. 2013) et BRG (Willinger et al. 2011). Le modèle NOG IL-3/GM-Tg présente en plus un nombre de basophiles et mastocytes matures nettement augmenté et représente d'ailleurs le

premier modèle HIS permettant l'étude des réponses allergiques. Un autre modèle récent appelé souris MISTRG permet une meilleure prise de greffe, même sans irradiation préalable, un meilleur développement des cellules myéloïdes avec une différenciation augmentée des monocytes, macrophages et DC, et une densité plus importante en cellules NK. Ce sont les conséquences d'un environnement cytokinique plus favorable. Ces souris ont été générées à partir d'une souris BRG exprimant la hTPO qui a ensuite été modifiée pour exprimer le Sirpα humain, l'hIL-3 et le hM-CSF aboutissant aux souris MISTRG (M-CSF, IL-3, Sirpα, TPO, Rag2^{-/-}, IL-2rγc^{-/-}) (Rongvaux et al. 2011; 2014). En revanche, ces souris développent une anémie qui peut être fatale du fait d'une phagocytose des macrophages humains envers les érythrocytes murins et d'une érythropoïèse humaine peu efficace en parallèle. Leur durée de vie est réduite et la greffe semble diminuer trois à quatre mois après la transplantation.

- Développement du compartiment lymphoïde :

La thymopoïèse humaine ressemble à celle observée au sein des souris NSG, NOG et BRG. Pour rappel, les LT CD4⁺ reconnaissent le CMH de classe II alors que les LT CD8⁺ reconnaissent le CMH de classe I. Chez l'homme, les molécules du CMH-I sont codées par les gènes *hla-a*, *hla-b* et *hla-c* tandis que les molécules du CMH-II sont codées par les gènes *hla-dp*, *hla-dq* et *hla-dr*. Bien que la transplantation de CSH chez les souris hôtes soit le processus le plus simple, une limitation importante de ces modèles concerne la restriction au CMH. Dans les modèles HIS, l'éducation des cellules humaines se fait dans un thymus murin par reconnaissance d'épitopes présentés par les molécules de classe I et II murines. Ce biais de reconnaissance pourrait entraîner un dysfonctionnement des réponses T humaines. Pour contourner ce biais, différentes approches se sont basées sur la manipulation génétique du CMH. Les souris NSG-β2m^{-/-} ont été les premières développées sur cette stratégie (Christianson et al. 1997; M. A. et al King 2009). Plus récemment, les souris NOG-dKO (NOG- Iab^{-/-}, B2m⁻

^{-/-} double knockout) déficientes en CMH de classe I et II ont montré peu de signes de GvHD après l'administration de PBMC humains, et des réponses T et B spécifiques de l'antigène (Yaguchi et al. 2018). La discordance entre les CMH murins et humains, en plus d'induire une GvHD, semble entraîner un dysfonctionnement des réponses T. De façon intéressante, l'injection de CSH au sein de souris NSG-HLA-A2^{HHH} a permis le développement de LT fonctionnels restreints au HLA (Leonard D. Shultz et al. 2010). Les thymocytes humains reçoivent ainsi une éducation thymique en présence de cellules murines exprimant le transgène HLA-A2 humain. Dans ce contexte, des études ont rapporté une activité cytotoxique T CD8⁺ spécifique à la suite d'une infection au virus Epstein-Barr (EBV) (Strowig et al. 2009; Leonard D. Shultz et al. 2010). Cette même stratégie dans le fond BALB/c a permis le développement des souris BRGS-A2 et BRGSF-A2 (Masse-Ranson et al. 2019; Labarthe et al. 2020). De plus, la transplantation de CSH appariées dans des souris NSG transgéniques pour la molécule HLA-DR4 de classe II permet une forte reconstitution en LT et LB. Plus particulièrement, ces souris sont capables de produire toutes les classes d'immunoglobulines spécifiques lors d'une vaccination, soulignant le rôle essentiel des molécules de classe II dans le développement de LT fonctionnels capables de garantir la commutation de classe (Danner et al. 2011; Suzuki et al. 2012). De plus, le développement des LT CD4⁺ et CD8⁺ semble accéléré chez les souris BRGS-A2/DR2 et le ratio LT/LB dans les organes lymphoïdes secondaires est plus représentatif des données humaines. La présence des molécules humaines HLA de classe I et II participe à une homéostasie plus stable et une fonctionnalité des LT et LB spécifiques plus performante par rapport au modèle BRGS (Masse-Ranson et al. 2019). Enfin, un modèle récent appelé HUMAMICE (HLA-2^{+/+} DR1^{+/+} H-2-β2m^{-/-} Iaβ^{-/-} Rag2^{-/-} IL2Ryc^{-/-} perf^{-/-}) combine à la fois une déficience en CMH classe I et II murin associée à une expression transgénique de HLA de classe I et II (Y. Zeng et al. 2017). L'injection de PBMC HLA appariés permet la mise en place d'un système immunitaire notamment capable de produire des anticorps. De plus, ces souris ne

présentent aucune activité cytolytique résiduelle murine due à la délétion de la perforine. A noter que la génération de souris HUMAMICE porteur du SIRP α humain ou de fond NOD pourrait être encore une amélioration de ce modèle avec une prise de greffe plus optimale. Malgré ces progrès, l'éducation thymique dans le modèle HIS est toujours largement discutée aujourd'hui. La sélection thymique implique des types cellulaires différents au cours des phases de sélection négative et positive : les cellules épithéliales thymiques jouent un rôle crucial dans ces étapes. C'est cette observation qui a conduit à développer des modèles de type BLT. Néanmoins, les résultats récents montrent d'une part que les thymocytes humains présentent un comportement similaire dans les environnements thymiques de la souris et de l'homme (Halkias et al. 2015) et que d'autre part, les cellules dérivées des CSH participent à la sélection thymique (Yang Li et al. 2019), y compris les thymocytes (E. Y. Choi et al. 1997; Melichar et al. 2015) et les LB (Frommer and Waisman 2010). Ces observations suggèrent que l'expression de transgènes humains de classe I ou de classe II sur les cellules épithéliales thymiques ne serait peut-être pas strictement indispensable. En conclusion, un chimérisme sur la restriction du CMH, dont les conséquences restent à évaluer, peut exister. La présentation antigénique peut être assurée dans le thymus et la périphérie via : i) le HLA humain transgénique exprimé par les cellules murines, ii) le HLA humain du donneur, pouvant être discordant avec le HLA humain transgénique, et iii) le CMH endogène de la souris pour les animaux encore compétents pour l'expression des CMH de classe I et II murins.

Enfin, de nombreux travaux ont permis d'explorer et d'optimiser les réponses NK. Tout d'abord, les développements réalisés pour améliorer l'humanisation du compartiment myéloïde, et plus particulièrement des DC, a entraîné de nombreux effets positifs au sein du compartiment lymphoïde. C'est le cas des souris BRGSF qui voient leurs nombres de cellules NK et T humaines augmenter et des souris NSG-SGM3 qui présentent une proportion de LT

régulateurs CD4⁺ FoxP3⁺ plus importante. Par la suite, d'autres approches ont consisté à injecter de l'hIL-2 et/ou l'hIL-15 qui, de façon intéressante, a augmenté le nombre de cellules NK (Pilipow et al. 2015). L'étape suivante a été le développement de la souris NOG-IL2 Tg qui exprime l'hIL-2 favorisant les cellules NK humaines (Katano et al. 2015). Une autre stratégie peut être l'injection d'IL-15/IL-15R α qui améliore encore la différenciation des cellules NK (Guimond et al. 2010; Huntington et al. 2009). En outre, les souris MISTRG, caractérisées par une meilleure reconstitution en cellules myéloïdes humaines, produisent, de fait, une plus grande quantité d'hIL-15 ce qui est favorable à la reconstitution en cellules NK (Katano et al. 2015). Ces travaux ont ensuite donné lieu à la génération d'une souris appelée SRG-15 de façon à éviter l'anémie sévère des souris MISTRG. La souris SRG-15 est générée à partir d'une souris BRG exprimant le SIRP α humain et l'hIL-15, et présente une amélioration fonctionnelle des cellules NK mais également des LT CD8⁺ et des ILC dans les tissus (Herndler-Brandstetter et al. 2017). Enfin, un modèle alternatif appelé NOG-IL-15 Tg a été généré et permet une reconstitution de cellules NK à long terme, 3 mois contre 2 semaines chez les souris NOG initiales (Katano et al. 2017).

- Développement des érythrocytes et des plaquettes humaines :

L'érythropoïèse et la thrombopoïèse sont possibles à partir d'une CSH qui se différencie respectivement en érythroblastes grâce à l'érythropoïétine (EPO) ou en mégacaryocyte grâce à la thrombopoïétine (TPO). Ces deux mécanismes sont sous-optimaux dans les modèles HIS. De façon intéressante, il a été rapporté que les souris NSG-W41 montrent un développement des érythrocytes et plaquettes humaines plus important par rapport aux souris NSG (Rahmig et al. 2016). Nous pouvons également citer les travaux de Chen et al, qui mettent en évidence une augmentation significative de la fraction d'érythrocytes après injection de plasmides codants pour l'hIL-3 et l'hEPO au sein de souris NSG HIS (Q. Chen, Khoury, and Chen 2009).

- Optimisation des stratégies d'humanisation :

Une critique importante des modèles HIS repose sur la capacité à générer de grandes cohortes d'animaux homogènes et présentant un chimérisme robuste à long terme. À cet égard, les modèles HIS nécessitant des greffes de tissus fœtaux combinées à l'injection de CSH restent techniquement difficiles. Le modèle Neo-Thy offre une alternative intéressante à la greffe de thymus fœtaux en proposant la transplantation de fragments de thymus humain non fœtaux associés à des CSH de sang de cordon ombilical (Brown et al. 2018). Ce modèle permet de produire un large nombre d'animaux : l'accès aux thymus humains non fœtaux, obtenus lors d'une chirurgie cardiaque néonatale, permet de greffer plus de 40 souris avec le même tissu, et la source de CSH peut ne pas être autologue. Bien que le thymus murin soit encore fonctionnel, ce modèle offre un environnement thymique humain et peut constituer un outil intéressant, notamment pour les études sur la tolérance centrale et périphérique.

- GvHD :

Une autre limitation communément décrite pour le modèle BLT est le développement progressif d'une GvHD. Une alternative a été la génération de souris TKO-BLT (C57BL/6 Rag2^{-/-} IL2Rγc^{-/-} CD47^{-/-}) (Lavender et al. 2013) capable d'induire une tolérance aux CSH humaines transplantées sans signe de GvHD jusqu'à 45 semaines post-transplantation. Il s'agit d'un progrès notable pour le modèle, permettant désormais l'étude de pathologies chroniques et de traitements associés. A noter que ces souris développent des tissus lymphoïdes tels que des ganglions lymphatiques mésentériques, des follicules spléniques et des GALT, fortement reconstitués en cellules hCD45⁺ et sont capables de mettre en place des réponses T et B spécifiques du VIH-1 (Lavender et al. 2018).

- Absence de structures ganglionnaires :

Au contraire, les autres modèles NOG, NSG, BRG et dérivés n'ont pas/peu de ganglions lymphatiques. Les bénéfices d'une déficience de l'IL2R γ ^{-/-} entraîne en contrepartie le manque de structures ganglionnaires ce qui limite les interactions cellulaires qui sont à la base de l'orchestration de la réponse immunitaire. Cette limitation majeure a été récemment abordée en imposant la génération de ganglions lymphatiques par l'expression ectopique de la cytokine TSLP (Thymic stromal lymphopoietin) (Yan Li et al. 2018). Les souris BRGST résultantes ont développé des ganglions lymphatiques compartimentés en zones LT et LB, un thymus murin de plus grande taille, des LB matures et des Tfh productrices d'IL-21, ainsi que des réponses T et B spécifiques plus performantes par rapport aux souris BRGS. Ces résultats constituent un axe d'amélioration encourageant.

- Flore intestinale différente :

Une autre interrogation concernant les souris HIS repose sur la flore intestinale. En effet, le microbiote joue un rôle fondamental sur le système immunitaire de l'hôte (Belkaid and Hand 2014) et sur l'efficacité des immunothérapies (Routy et al. 2018). D'une façon générale, le microbiote intestinal de l'homme et de la souris est dominé par deux grandes familles. Toutefois, en explorant les classifications taxonomiques, 85% des genres bactériens trouvés dans le microbiote intestinal des souris ne sont pas présents chez l'homme (Nguyen et al. 2015). Ces disparités importantes peuvent être causées par les différences intrinsèques entre ces deux mammifères mais aussi à divers facteurs tels que le régime alimentaire et l'exposition aux agents pathogènes. Les souris HIS n'échappent pas à ces différences ; il est alors légitime de s'interroger sur les relations symbiotiques entre le système immunitaire chimérique et la flore intestinale murine des modèles HIS. Très peu de données sont disponibles sur cet aspect, toutefois certaines tentatives pour établir une flore spécifique à l'homme chez les animaux HIS

commencent à émerger pour augmenter encore la fidélité des modèles et faciliter les études translationnelles basées sur ces stratégies thérapeutiques (Daharsh et al. 2019).

Ainsi, le choix d'un modèle de souris HIS reste une étape difficile du fait des limites intrinsèques de chaque modèle. Les modèles HIS sont néanmoins en constante évolution pour corriger les défauts majeurs encore identifiés. Étape par étape, les verrous sont levés et les modèles les plus récents proposent des améliorations significatives.

Modèles	Améliorations	Impacts	Références
NSG-W41 (NSG)	c-Kit ^m	↗ compartiment myéloïde ↗ érythropoïèse et thrombopoïèse ∅ irradiation sublétales	(Rahmig et al. 2016; Cosgun et al. 2014)
NSG-SGM3 (NSG)	SCF ^h , GM-CSF ^h , IL-3 ^h	↗ différenciation des macrophages et DC ↗ granulopoïèse (neutrophiles) Faible réponse anticorps	(Billerbeck et al. 2011; P. H. Miller et al. 2013)
NOG IL-3/GM-Tg (NOG)	GM-CSF ^h , IL-3 ^h	↗ différenciation des macrophages et DC	(R. Ito et al. 2013)
hIL-3 hGM-CSF KI (BRG)	GM-CSF ^h , IL-3 ^h	↗ différenciation des macrophages et DC Présence de macrophages alvéolaires humains	(Willinger et al. 2011)
MISTRG (BRG)	GM-CSF ^h , IL-3 ^h , M-CSF ^h , TPO ^h , Sirpα ^{NOD}	↗ différenciation des macrophages et DC ↗ nombre de NK Anémie sévère Faible réponse anticorps	(Rongvaux et al. 2017)
NSG β2m^{-/-} (NSG)	β2m ^{-/-m}	↘ GvHD	(M. A. et al King 2009)
NOG-dKO (NOG)	I-ab ^{-/-m} , B2m ^{-/-m}	↘ GvHD ↗ réponse T et B spécifique	(Yaguchi et al. 2018)
NSG HLA-A2 (NSG)	HLA-A2 ^{HHD}	↗ développement LT restreint au HLA ↗ réponse T cytotoxique restreint au HLA Peu de cellules myéloïdes Faible réponse anticorps	(Leonard D. Shultz et al. 2010)
BRGSF-A2 (BRG)	FLT3 ^m , HLA-A2 ^{HHD}	↗ nombre DC et monocytes Permet l'étude des ILC ↗ accumulation, développement et fonctionnalité des LT	(Yan Li et al. 2016; Lopez-Lastra et al. 2017; Labarthe et al. 2020)
NSG HLA-DR (NOG)	HLA-DR4 ^h I-ab ^{-/-m}	↗ réponse B via commutation de classe isotypique	(Suzuki et al. 2012)
BRGS-A2/DR2	HLA-A2 ^{HHD} , HLA-DR2 ^h	↗ accumulation, développement et fonctionnalité des LT ↗ réponse T et B spécifiques	(Masse-Ranson et al. 2019)
HUMAMICE (C57BL/6)	HLA-2 ^{+/+h} DR1 ^{+/+h} H-2-β2m ^{-/-m} Iaβ ^{-/-m} Rag2 ^{-/-m} IL2Rγc ^{-/-m} perf ^{-/-m}	↘ GvHD ↗ réponse T et B spécifique	(Y. Zeng et al. 2017)
NOG-IL2 tg (NOG)	IL-2 ^h	↗ nombre, maturation et fonctionnalité des NK	(Katano et al. 2015)

SRG-15 (BRG)	IL-15 ^h , Sirpα ^h	↗ nombre de NK circulants et résidant dans les tissus	(Herndler-Brandstetter et al. 2017)
IL-15 NOG (NOG)	IL-15 ^h	↗ nombre de NK circulants et résidant dans les tissus ↗ ADCC	(Katano et al. 2017)
Neo-Thy (NSG)	Transplantation thymus humain non fœtal	↗ taille d'une cohorte souris HIS issue d'un même thymus humain Source CSH CD34 ⁺ autologue ou non ↗ éducation thymique humaine	(Brown et al. 2018)
TKO-BLT (C57BL/6)	Rag2 ^{-/-m} , CD47 ^{-/-m} , IL2Rγc ^{-/-m}	∅ GvHD (<45 semaines) Développement ganglions lymphatiques, follicules spléniques, GALT Système du complément intact ↗ réponse T et B spécifiques Difficultés pratiques et éthiques	(Lavender et al. 2013)
BRGST (BRG)	TSLP ^h	Développement de ganglions lymphatiques ↗ taille thymus ↗ réponse T et B ↗ développement T folliculaires auxiliaires	(Yan Li et al. 2018)
DRAGA (NRG)	HLA-A2 ^h , HLA-DR4 ^h	↗ nombre et fonctionnalité LT et LB ↗ nombre Tregs ↗ réponse T et B spécifiques ↗ commutation de classe isotypique	(Majji et al. 2016)
FRG (C57BL/6 ou NSG)	FAH ^{-/-m}	Système de xéno-repopulation hépatique utile pour étudier des maladies du foie et tester la toxicité de médicaments	(Azuma et al. 2007; Flannery et al. 2018)

Table 3: Les nouvelles générations de souris HIS. (Adaptée de (Leonard D. Shultz, Ishikawa, and Greiner 2007)). Les trois modèles conventionnels NSG, NOG et BRG ont permis le développement d'une multitude de nouveaux modèles HIS par l'expression ou l'injection de cytokines et facteurs de croissance humains ou la manipulation génétique du CMH de classe I et II. M : murin, h : human

b. Les modèles HIS dans le développement de thérapies contre le VIH-1

La section précédente témoigne des progrès importants qui ont été réalisés sur ces modèles en un laps de temps relativement court. Historiquement utilisé pour l'étude de l'infection par le VIH-1, la cancérologie constitue maintenant un champ d'application majeur des modèles HIS. La disponibilité de ces modèles a transformé le paysage des études *in vivo* dans l'étude des maladies infectieuses, des cancers ou encore des maladies auto-immunes. Nous nous concentrerons ici sur le contexte de l'infection au VIH-1.

La thérapie ART constitue un succès majeur de la prise en charge des patients infectés par le VIH-1 en permettant le contrôle du virus, sans l'éradiquer. La persistance du virus dans

des sanctuaires tissulaires et les dysfonctionnements de la réponse immunitaire restent les principaux obstacles à la guérison et ciblent les efforts déployés par la communauté. Ainsi, les approches visant à l'élimination du VIH-1 incluent des stratégies d'administration ciblée des traitements ART, l'élimination des compartiments de cellules infectées ou l'élimination de l'ADN proviral intégré au génome, et le maintien d'une réponse immunitaire efficace. De nouvelles perspectives de recherche ont été ouvertes afin d'explorer en souris HIS l'impact de thérapies par ARNsh, TCR transgéniques ou immunothérapies, des stratégies qui reposent sur un paradigme historique visant à cibler les cellules infectées ou/et un nouveau paradigme visant à cibler les cellules effectrices.

Les premières études en souris HIS visaient à conférer une protection à long terme aux LT et macrophages et reposaient sur l'introduction d'un transgène codant pour une protéine mutante de Rev (RevM10) au sein des CSH transduites au sein d'un modèle BLT. La protéine RevM10 inhibe la réplication du VIH-1 dans les lignées de LT *in vitro* en inhibant la fonction Rev du virus, et peut *in vivo* rendre les LT et macrophages dérivés réfractaires à l'infection (Bonyhadi et al. 1997). D'autres études ont mis en évidence que les CSH transduites avec un vecteur lentiviral codant pour un ARNsh spécifique du virus (shNef) permettaient une hématopoïèse aboutissant au développement de LT CD4⁺ mémoires réfractaires à l'infection par le VIH-1 (ter Brake et al. 2009). Par la suite, des travaux importants ont été réalisés pour reproduire le cas de Timothy Brown, dit le « patient berlinois ». Il s'agit du premier patient guéri de l'infection par le VIH-1 après avoir reçu un traitement myéloablatif, pour le traitement d'une leucémie, suivie d'une greffe de moelle osseuse allogénique avec les CSH d'un donneur présentant une mutation pour CCR5 (Allers et al. 2011; Hutter et al. 2009). Bien que ce résultat soit d'une grande importance, cette stratégie n'est pas transposable à l'ensemble des patients infectés par le VIH-1 en raison de la rareté de la mutation CCR5Δ32 (< 1 % de la population

caucasienne) et du traitement myéloablatif très toxique. Toutefois, le développement de stratégies thérapeutiques qui impliquent un knockdown ou knockout du corécepteur d'entrée CCR5 a suscité un vif intérêt et de nouvelles perspectives. Holt et al. ont montré une diminution significative de la charge virale chez la souris NSG greffée à partir de CSH CD34⁺ dont l'expression CCR5 est réduite à l'aide de la technologie des nucléases à doigts de zinc. Cette approche a permis de limiter la déplétion des LT CD4⁺ et de diminuer la charge virale (Holt et al. 2010). Myburgh et al ont transduit des CSH avec un miARN afin de diminuer l'expression de CCR5, qu'ils ont ensuite transplanté au sein de souris NSG. Ces souris ont montré une résistance à l'infection par une souche de VIH-1 à tropisme R5 (Myburgh et al. 2015), excepté chez une souris où un rebond viral a été détecté, probablement en raison de l'émergence d'une souche mutée X4. Ces travaux récapitulent les résultats cliniques d'un patient séropositif greffé avec des CSH CCR5^{-/-} qui avait par la suite développé une infection par une souche X4, nécessitant alors la reprise du traitement ART (Kordelas, Verheyen, and Esser 2014). Enfin, d'autres travaux ont mis l'accent sur un vecteur lentiviral codant pour un ARNsh spécifique à CCR5 et un ARNsh spécifique du VIH-1, qui après transduction et greffe chez des souris NSG a permis une résistance à la fois aux souches X4 et R5 (Berges and Rowan 2011; Ringpis et al. 2012). Enfin en 2019, une équipe a montré de façon historique que l'éradication du virus était possible. Ils ont associé un traitement ART à libération lente et à longue durée d'action (LASER ART) à la technologie CRISPR-Cas9 (Dash et al. 2019). Les avantages du traitement LASER ART sont les suivants : entrée rapide à travers les membranes cellulaires des LT CD4⁺ et des macrophages en raison de la lipophilie du médicament, entrée accélérée des ARV dans les sites réservoirs, concentrations plasmatiques stables observées sur plusieurs mois. Pour l'élimination de l'ADN proviral, ils se sont basés sur des outils moléculaires pour permettre d'éliminer définitivement le génome viral et empêcher la réactivation (Rafal Kaminski et al. 2016; R. Kaminski et al. 2016; Yin et al. 2017; Bella et al. 2018) : la technologie CRISPR-Cas9, qui

excise spécifiquement et efficacement des fragments d'ADN proviraux intégrés du VIH-1 au génome de l'hôte. Cette stratégie a également réduit les risques d'émergence de mutants (White, Hu, and Khalili 2016).

Une autre stratégie, basée sur la compréhension des défauts de la réponse immunitaire, permet d'explorer de nouvelles pistes pour améliorer la réponse antivirale. Des efforts ont été faits pour concevoir le développement de LB capables de produire des anticorps neutralisants. L'utilisation du génie génétique peut contourner la capacité limitée des patients à produire de manière endogène des anticorps spécifiques du VIH-1. Joseph et al. ont montré que des CSH transduites via un lentivirus codant pour l'anticorps 2G12, un anticorps neutralisant, peuvent se différencier en LB matures produisant l'anticorps (Joseph et al. 2010). Par cette approche, ils ont mis en évidence une diminution drastique de la charge virale et du nombre de cellules infectées, indiquant un bénéfice thérapeutique de l'anticorps. La réponse des LT CD8⁺ cytotoxiques (CTL) spécifiques du VIH-1 joue un rôle essentiel dans le contrôle de la réplication virale. L'augmentation de cette réponse devrait renforcer son contrôle et améliorer l'évolution clinique de la maladie. Bien que l'infection par le cytomégalo virus ou le virus EBV chez les patients immunodéprimés puisse être traitée par le transfert adoptif de LT CD8⁺ spécifiques, le transfert adoptif de CTL spécifiques du VIH-1 a eu des effets minimes sur la réplication du virus, probablement à cause du dysfonctionnement intrinsèque des CTL spécifiques du VIH-1 provenant des personnes infectées. Plusieurs équipes ont émis l'hypothèse que cette limitation pouvait être contournée en utilisant des CTL autologues spécifiques du VIH-1 via un TCR transgénique, une approche utilisée avec succès dans la thérapie de cancers. Pour cela, ils ont utilisé l'épitope SL9 et ont démontré que les LT CD8⁺ redirigés ont considérablement réduit le nombre de cellules infectées dans la rate (Joseph et al. 2008). D'autres travaux ont transduit des CSH humaines sur cette stratégie et montrent une réduction de la charge virale, une persistance des LT CD4⁺ et une expansion des LT CD8⁺

spécifiques SL9 (Kitchen et al. 2012). Ces études illustrent la flexibilité des modèles HIS pour tester l'efficacité potentielle *in vivo* d'une stratégie de thérapie génique.

Indépendamment de ces stratégies « HIV cure » visant à éliminer le virus, un autre axe de recherche consiste à restaurer les défauts immunitaires qui s'installent au cours de l'infection chronique. Dans ce cadre, la transposition de certaines stratégies thérapeutiques mises en place en oncologie est étudiée. En particulier, l'utilisation d'immunomodulateurs, tel que les anticorps α PD1 ou α PD-L1, représente depuis quelques années un nouveau champ d'investigation. Plusieurs études en souris HIS ont démontré que les blocages α PD1 et α PD-L1 conduisent à une réduction significative de la charge virale parallèlement à une augmentation des LT CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques (Seung et al. 2013; B. E. Palmer et al. 2013). Les travaux de Seung et al. ont montré une réponse différente au blocage α PD1 selon le niveau d'expression de PD1 à la surface des LT hCD8⁺ avant l'initiation du traitement. Le blocage α PD1 n'a pas affecté l'expression d'autres ICP coexprimés avec PD1 tel que CD244, CD160 et LAG3 et ne semble pas affecter les réponses humorales spécifiques (Seung et al. 2013). Palmer et al. ont démontré que le blocage α PD-L1 augmentait à la fois les proportions de LT naïfs et mémoires centrales, et les réponses cytokiniques de type Th1 (IFN γ , TNF α et IL-12) mais pas de type Th2 (IL-10, IL-13, IL-5) pendant le traitement (B. E. Palmer et al. 2013). Ce sont des indicateurs importants pour la reconstitution immunitaire (Hua et al. 2012) et le contrôle de la réplication du virus (Clerici et al. 1996). Enfin, ils ont déterminé l'impact de l'interruption du traitement α PD-L1 sur les LT CD4⁺ ; plus de 60 jours après le blocage, la proportion de LT CD4⁺ est restée relativement élevée malgré un rebond de la charge virale.

D'autres immunothérapies basées sur la modulation de la signalisation IFN-I ont été envisagées afin de renforcer la réponse anti-virale en phase aiguë ou de réduire l'inflammation chronique à bas bruit en phase chronique. Tout d'abord, il a été montré *in vitro* que chaque

sous-type d'IFN-I a une affinité différente aux récepteurs IFNAR (Jaks et al. 2007). Ainsi, les IFN α 8, α 6, α 14 et α 17 ont réduit la capacité d'infection des cellules mieux que l'IFN α 2 et α 1. Cet effet a été corrélé à l'affinité de l'IFNAR2 et la capacité à induire les ISG permettant de restreindre le VIH-1 tels que Mx2 et BST2. Lavender et al. ont confirmé *in vivo* l'impact nettement plus important de l'IFN α 14 que l'IFN α 2 pour réduire la réplication virale dans un modèle de souris TKO-BLT. Cela a été associé à l'induction de BST2 et Mx2 et à une fréquence plus élevée de cellules NK exprimant TRAIL. Il est intéressant de noter que les souris présentaient une charge virale réduite mais aussi une inflammation limitée mesurée par quantification d'IP-10 (Lavender et al. 2016). L'IFN α 14 semble particulièrement intéressant pour ouvrir de nouvelles perspectives de thérapies anti-virales durant la phase aiguë de l'infection. Pour réduire l'inflammation en phase chronique de l'infection, cibler la voie IFN-I semble être une stratégie prometteuse et a été évaluée en modèles HIS. Zhen et al. ont administré un anticorps α IFNAR2 chez une souris NSG-BLT infectée, et ont observé une diminution de l'expression des ISG, parallèlement à une réduction de l'épuisement des LT CD8⁺ (PD1, TIM3) et des marqueurs d'activation (CD38). De plus, le blocage du récepteur IFNAR a réduit efficacement la charge virale en phase chronique, et l'association avec le traitement ART a permis une suppression virale plus rapide et des réservoirs viraux réduits (Zhen et al. 2017). Cheng et al ont utilisé un anticorps α IFNAR1 en association aux ARV en phase chronique de l'infection chez des souris NRG-BLT. Ils montrent une préservation du nombre de LT CD4⁺, une restauration de la fonctionnalité des LT CD8⁺ et une réduction des réservoirs inductibles après interruption du traitement (Cheng et al. 2017).

En résumé, les modèles HIS sont des outils précieux pour différentes pathologies. Ils constituent un modèle de choix pour l'évaluation de stratégies thérapeutiques ciblant certains dysfonctionnements immunitaires associés à l'infection par le VIH-1.

L'évaluation de thérapies combinées dans ces modèles pourrait apporter des bénéfices majeurs pour valider le choix des molécules immunomodulatrices les plus pertinentes et le schéma thérapeutique d'association.

IV. Objectifs des travaux de thèse

Aujourd'hui, grâce au succès des thérapies antirétrovirales, l'infection par le VIH-1 n'est plus une maladie mortelle mais une maladie chronique. En revanche, deux problématiques majeures restent à considérer : la persistance du virus au sein de réservoirs cellulaires et anatomiques et les défauts de la réponse immunitaire associés à une inflammation à bas bruit et un épuisement des réponses immunitaires. Ces aspects de la maladie sont désormais responsables de la majorité des comorbidités associées au VIH-1 (cancers, pathologies cardiovasculaires, hépatiques, etc.). Si l'éradication complète du virus semble encore être un objectif difficilement accessible, limiter la taille des réservoirs viraux et restaurer les défauts de la réponse immunitaires sont des objectifs thérapeutiques actuellement considérés. Ces dernières années, les immunothérapies ont permis des progrès thérapeutiques spectaculaires dans le cadre de cancers ou de maladies auto-immunes, mais leur utilisation dans l'infection chronique au VIH-1 reste encore peu explorée. Agir sur l'inflammation à bas bruit et l'épuisement des réponses T semblent représenter deux approches thérapeutiques prometteuses. Les immunothérapies sont notamment envisagées en combinant ces dernières avec les traitements ART. Néanmoins l'évaluation de l'efficacité de ces immunothérapies, de leur fenêtre thérapeutique et de leurs effets indésirables dans un contexte d'infection chronique au VIH-1 nécessite un modèle robuste.

La souris HIS constitue un axe en plein essor et permet d'obtenir un modèle préclinique robuste et facilement accessible, tout en permettant des liens étroits entre recherche fondamentale et applications cliniques. Le modèle BALB/c Rag2^{KO} IL-2R γ c^{KO} SIRP α ^{NOD} Fik2^{KO} HLA-A2^{HHD} (BRGSF-A2) nous a semblé être un modèle candidat intéressant. Il est particulièrement permissif à l'établissement d'une xénogreffe hématopoïétique humaine fonctionnelle et ces animaux présentent en effet une invalidation complète du développement lymphocytaire T, B et NK murin, couplé à une tolérance des phagocytes murins vis-à-vis des cellules humaines du fait d'une interaction optimale entre la molécule de surface ubiquitaire CD47 humaine et le récepteur d'inhibition de phagocytose murine SIRP α ^{NOD}. Ces souris présentent également un défaut de génération de cellules myéloïdes murines, notamment des DC et montrent par conséquent, un ratio de DC en faveur des cellules humaines. Enfin, l'expression des molécules HLA de classe I a permis d'améliorer le développement, l'accumulation et la fonction des LT humains dans ce modèle.

Les objectifs de mes travaux de thèse étaient de développer un modèle HIS d'infection contrôlée au VIH-1 afin de l'intégrer aux outils *in vivo* mis en place au sein de l'infrastructure de recherche IDMIT aux finalités précliniques. En particulier, ce programme de recherche portait sur l'évaluation de stratégies immunomodulatrices de la voie PD1/PD-L1. Le projet intégrait trois axes :

1) La caractérisation et validation du modèle BRGSF-A2 en contexte non infectieux

La validation d'un modèle HIS consiste généralement à caractériser le ratio CD4/CD8 et le profil de différenciation naïve/mémoire/effecteurs des LT. En tant que régulateurs essentiels d'une réponse immunitaire efficace, les mécanismes de sénescence et d'épuisement des LT sont également à considérer. A noter aussi que le profil d'épuisement des LT humains

varie considérablement en fonction du modèle de souris HIS et du contexte physiopathologique. Bien que les souris HIS soient de puissants outils *in vivo*, une meilleure caractérisation phénotypique des LT ainsi que de leur profil d'épuisement et de sénescence, trop peu décrit jusqu'à présent, nous a semblé essentielle. Nous posons l'hypothèse d'une hétérogénéité d'expression des molécules de sénescence et d'épuisement en fonction de la sous-population T étudiée et de leur localisation. Nous avons ainsi étudié les LT humains de la souris BRGSF-A2 HIS dans le sang, les organes lymphoïdes (rate et moelle osseuse) et non lymphoïde (tissu adipeux), avec une attention particulière sur PD1 et TIGIT comme marqueurs d'épuisement et CD57 et KLRG1 comme marqueurs de sénescence. Le tissu adipeux sous-cutané a été choisi comme site non lymphoïde puisqu'il est relativement facile d'accès en milieu clinique, reconnu comme site immunologiquement actif, et constitue un centre d'intérêt de l'équipe. Des échantillons de sang des souris HIS ont été comparés à des échantillons de sang humain provenant de donneurs sains afin de valider ou d'identifier les spécificités du modèle HIS. Ces travaux ont validé le développement physiologique du compartiment T humain à long terme dans le modèle BRGSF-A2 HIS et son utilisation comme outil préclinique. Ce travail a été publié (Labarthe et al. 2020) et a fait l'objet d'un éditorial.

2) La mise en place d'une infection expérimentale au VIH-1 et d'un traitement ART efficace dans ce modèle

Plusieurs études préliminaires nous ont permis de définir la souche virale et sa dose d'infection, et la combinaison d'ARV. Afin de se rapprocher au plus près de la situation humaine, nous avons choisi d'utiliser la combinaison d'ARV actuellement recommandée en clinique : le dolutégravir (DTG), le ténofovir (TDF) et l'emtricitabine (FTC). Nous avons collaboré avec la plateforme de pharmacocinétique et pharmacodynamie du centre, et bénéficié de leur expertise pour définir une posologie et une voie d'administration spécifiquement

adaptée au modèle HIS. Nous avons validé la combinaison des ARV sur les critères suivants : (i) un contrôle de la charge virale plasmatique, (ii) une restauration du nombre de LT CD4⁺ dans un délai rapide, (iii) une concentration des trois ARV comprise parmi les concentrations de références utilisées chez l'homme. Cette approche nous a aussi permis d'étudier la diffusion des ARV dans les différents tissus et notamment dans les tissus réservoirs. Ces données sont importantes pour évaluer si une activité synergique du traitement ART et des immunothérapies est possible dans l'ensemble des tissus réservoirs ou si chacune de ces molécules présente des profils de diffusion différents. Ces travaux ont conduit à la préparation d'un deuxième article.

3) L'évaluation du bénéfice thérapeutique de l'association du traitement ART combiné à différentes immunothérapies

La troisième partie de mon projet de thèse a porté sur l'étude du bénéfice thérapeutique des associations ARV/ α PD1 puis ARV/ α JAK durant l'infection VIH-1. L'objectif était de définir la meilleure stratégie thérapeutique associant ARV/immunothérapie en ciblant plus spécifiquement l'impact de ces associations sur les réponses T. Chacune de ces stratégies thérapeutiques visent respectivement à agir sur l'épuisement des réponses T ou l'inflammation résiduelle (et secondairement l'activation immunitaire) en phase chronique de l'infection VIH-1. Nous avons testé une stratégie d'association ART/ α PD1 en phase tardive de l'infection chronique puisque le développement de l'épuisement est un mécanisme progressif. Les objectifs étaient doubles : évaluer, sous ART, l'impact de ces stratégies sur la levée de l'épuisement des réponses T, et évaluer l'impact sur l'induction d'un contrôle post-arrêt. L'étude de l'association ART/ α JAK visait à évaluer l'impact de la voie IFN-I sur les réponses T dans le contexte de l'infection chronique. Un sous-objectif visait à évaluer une hypothèse liée aux travaux de Benci et al. Dans le contexte tumoral, la signalisation prolongée des IFN-I et II modulaient la voie PD-1/PD-L1 en augmentant l'expression des ISG tels que PD-L1 sur les

cellules tumorales. L'inhibition de la voie IFN-I permettait de lever le mécanisme de résistance adaptative aux anti-ICP (Benci et al. 2016). Par analogie, nous posons l'hypothèse qu'une exposition prolongée aux IFN-I pourrait participer à l'induction de l'épuisement des réponses T en phase chronique de l'infection VIH-1 et que l'inhibition de la voie IFN-I au stade précoce de la phase chronique pourrait permettre de contrôler à la fois l'inflammation résiduelle et l'épuisement des réponses T. Pour aborder ce point, nous avons choisi une stratégie inhibant la signalisation IFN par des inhibiteurs des JAK1/2 (baricitinib).

Résultats

Article 1 : Exhaustion and senescence marker profiles on human T cell in BRGSF-A2-humanized mice resemble those in human samples

Article publié dans Journal of Leukocyte Biology, qui a également fait l'objet d'un éditorial


L'objectif de cette première étude reposait sur **la caractérisation et la validation du modèle humanisé BRGSF-A2 comme modèle préclinique** dans la perspective d'évaluer différentes immunothérapies dans un contexte d'infection expérimentale au VIH-1.

Nous avons mis en évidence des similitudes importantes entre la souris BRGSF-A2 HIS et l'homme. Nous avons étudié les LT de la souris BRGSF-A2 HIS dans le sang, les organes lymphoïdes (rate et moelle osseuse (MO)) et non lymphoïde (tissu adipeux (TA)), avec une attention particulière pour les molécules PD1 et TIGIT comme marqueurs d'épuisement, et CD57 et KLRG1 comme marqueurs de senescence. Nos données montrent des proportions de cellules hématopoïétiques humaines élevées dans la rate, la MO et le TA avec une prise de greffe humaine stable à long terme (supérieure à 55 semaines). Nous avons mis en évidence que les souris BRGSF-A2 HIS présentent une proportion de LT humains semblables à ceux observés chez l'homme dans ces différents sites. Les LT naïfs représentent le principal compartiment des LT dans le sang et la rate, tandis que les cellules mémoires prédominent dans la MO et le TA, comme décrit chez l'homme. Dans le sang, les profils d'expression de PD1 et de CD57 sont similaires dans le modèle HIS et chez le donneur sain. D'autre part, nous avons observé que les expressions de ces molécules d'épuisement et de senescence dépendaient de la sous-population de LT considérée, du stade de différenciation mais aussi des tissus étudiés.

Ces travaux confirment le développement physiologique du compartiment T humain dans le modèle BRGSF-A2 HIS. Nos données renforcent le potentiel prometteur de ce modèle dans l'étude de pathologies chroniques et l'évaluation de stratégies thérapeutiques associées grâce à une persistance à long terme de la greffe de cellules humaines.

HIGHLIGHTED ARTICLE

Frontline Science: Exhaustion and senescence marker profiles on human T cells in BRGSF-A2 humanized mice resemble those in human samples

Laura Labarthe^{1,2} | Soledad Henriquez¹ | Olivier Lambotte^{1,3} | James P. Di Santo^{4,5} | Roger Le Grand¹ | Françoise Pflumio⁶ | Marie-Laure Arcangeli⁶ | Nicolas Legrand² | Christine Bourgeois¹ 

¹IDMIT Department, CEA—Université Paris Sud 11—INSERM U1184, Immunology of Viral Infections and Autoimmune Diseases, IBFJ, F-92265 Paris, France

²genOway Paris, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

³Assistance Publique—Hôpitaux de Paris, Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique, Groupe Hospitalier Universitaire Paris Sud, Hôpital Bicêtre, F-94276 Paris, France

⁴Innate Immunity Unit, Institut Pasteur, F-75015 Paris, France

⁵INSERM U1223, F-75015 Paris, France

⁶IRCM, CEA—Université Paris 7—Université Paris Sud 11, INSERM U1274, Paris, France

Correspondence

Christine Bourgeois, INSERM U1184, Faculté de Médecine Du Kremlin-Bicêtre, 63 avenue Gabriel Péri, F-94276 Le Kremlin-Bicêtre, France.
Email: christine.bourgeois@u-psud.fr

Abstract

This work sought to confirm the human-like expression of exhaustion and senescence markers in a mouse model with a humanized immune system (HIS): the Balb/c Rag2^{KO} IL2rgc^{KO} Sirpa^{NOD} Flk2^{KO} HLA-A2^{HHD} (BRGSF-A2) mouse reconstituted with human CD34⁺ cord blood cells. With regard to senescence markers, the percentage of CD57⁺ T cells was higher in the bone marrow (BM) than in the spleen or blood. The same was true for KLRG1⁺ hCD8⁺ T cells. With regard to exhaustion markers, the percentage of programmed death 1 (PD-1⁺) T cells was higher in the BM than in the spleen or blood; the same was true for TIGIT⁺ hCD4⁺ cells. These tissue-specific differences were related to both higher proportions of memory T cells in BM and intrinsic differences in expression within the memory fraction. In blood samples from HIS mice and healthy human donors (HDs), we found that the percentage of KLRG1⁺ cells among hCD8⁺ T cells was lower in HIS compared to HDs. The opposite was true for CD4⁺ T cells. Unexpectedly, a high frequency of KLRG1⁺ cells was observed among naive T cells in HIS mice. CD57 expression on T cells was similar in blood samples from HIS mice and HDs. Likewise, PD-1 expression was similar in the two systems, although a relatively low proportion of HIS hCD4⁺ T cells expressed TIGIT. The BRGSF-A2 HIS mouse's exhaustion and senescence profile was tissue specific and relatively human like; hence, this mouse might be a valuable tool for determining the preclinical efficacy of immunotherapies.

KEYWORDS

immunoregulation, PD-1, PD-L1, bone marrow, adipose tissue

1 | INTRODUCTION

Humanized mouse models (i.e., mice harboring cellular and molecular components of the human immune system [HIS]) have contributed to a better understanding of the specificity of human

immune responses to pathogens and malignant tumors. Humanized mice now constitute a translational bridge between fundamental research and clinical applications.^{1–5} The most straightforward strategy for generating a HIS mouse involves infusing a suspension of purified human hematopoietic stem and progenitor cells into newborn or adult immunodeficient mouse recipients.^{2,5–7} The state-of-the-art immunodeficient mouse strains include γ -deficient recipients with a nonobese diabetic NOD genetic background (such as NOD/Shi-*scid* IL2r γ ^{null} [NOG] and NOD-*scid* IL-2R γ ^{-/-} [NSG] mice) or a BALB/c genetic background (such as Balb/c Rag2^{tm1Fwa} IL2rg^{tm1Cgn} Sirpa^{NOD} [BRGS] mice).^{8–10} All these strains share features—the absence of murine T, B, and NK cells, and phagocytes that tolerate human xenografts—that render them particularly permissive

Abbreviations: BM, bone marrow; BRG, Balb/c Rag KO gamma-chain KO (mouse strain); BRGS, BRG Sirpa^{NOD} (mouse strain); BRGSF, BRGS Flk2^{tm1lr1} (mouse strain); BRGSF-A2, BRGSF HLA class I transgene (mouse strain); cDC, conventional DC; DC, dendritic cell; Flk2, fetal liver kinase-2; Flt3, FMS-like tyrosine kinase 3; HD, healthy donor; HIS, humanized immune system; HSC, hematopoietic stem cells; KLRG1, killer-cell lectin-like receptor G1; NOD, nonobese diabetic (mouse strain); NOG, backcross of NOD/Shi-*scid* to C57BL/6J-IL-2R γ ^{null} mouse (mouse strain); NSG, NOD *scid* gamma (mouse strain); PD-1, programmed death 1; PD-L1, programmed death-ligand 1; pCD, plasmacytoid DC; SCAT, subcutaneous adipose tissue; SVF, stromal vascular fraction.

Received: 30 October 2018 | Revised: 17 July 2019 | Accepted: 25 July 2019

to the hematopoietic humanization process. The resulting HIS mice exhibit a large variety of human hematopoietic cell lineages, including T, B, and NK cells, dendritic cells (DCs), monocytes, macrophages, and platelets.^{8,10-13}

The continual, incremental development of HIS mouse models has optimized the mimicking of human immune cell properties. The initial BRG model^{11,14} was less tolerant of human hematopoietic engraftment than the NSG and NOG mice.¹² This restriction was based on regulation of the murine macrophages' phagocytic activity by mutation of gene coding for signal regulatory protein (*Sirpa*), which modulates the CD47/SIRP α signaling axis.¹⁵ In fact, the phagocytes in BRG mice congenic for the NOD allele of *Sirpa* (BRGS mice) or transgenic for human *SIRPA* are highly tolerant of human cells.^{10,13} The BRGS strain has a high capacity for human hematopoietic engraftment, resulting in an hCD45⁺ compartment (with B, T, and myeloid cells) that lasts for over a year. Furthermore, compatible CD47/SIRP α interactions lead to (i) the selective accumulation of resting, naive T cells (T_N), and (ii) a marked reduction of the frequency of activated, inflammation-associated hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells in secondary lymphoid organs.¹⁰ In parallel, BRG mice in which fetal liver kinase-2 (Flk2)/ FMS-like tyrosine kinase 3 (Flt3) expression has been inactivated (BRGF mice) offer a means of enhancing human DC homeostasis¹⁶; Balb/c Rag2^{tm1Fwa} IL2rg^{tm1Cgn} *Sirpa*^{NOD} Flk2^{tm1rl} (BRGSF) HIS mice show the robust, multilineage reconstitution of human hematopoietic cells, with T, B, and NK cells and conventional DCs (cDCs).¹⁷ Finally, we have developed Balb/c Rag2^{tm1Fwa} IL2rg^{tm1Cgn} *Sirpa*^{NOD} Flk2^{tm1rl} HLA-A2^{HHH} (BRGSF-A2) mice, which express HLA class I molecules. This expression is known to improve the development, accumulation, and function of human T cells in the NSG-A2 HIS mouse.^{18,19}

With regard to the T cell compartment, the validation of an HIS model usually involves characterizing the well-studied hCD4/hCD8 ratio and naive/memory T cell differentiation.²⁰ As crucial regulators of an effective immune response, T cell senescence and exhaustion occur following exposure to a high antigen load,²¹ chronic infections,²²⁻²⁷ or tumors.²⁸ Senescence is associated with DNA damage, growth arrest, impaired proliferation, telomere erosion, and the expression of CD57²⁹ and KLRG-1.³⁰ Exhaustion is characterized by the progressive loss of T cell function and thus cytokine production.³¹ In the context of tumor growth, the well-characterized programmed death 1 (PD-1)/ programmed death-ligand 1 (PD-L1) axis inhibits an immune response; the relevance of this immunosuppressive pathway has been emphasized by the clinical effectiveness of PD-1 and PD-L1 immune checkpoint inhibitors in the treatment of a range of solid tumors.³²⁻³⁴ Furthermore, blocking the PD-1/PD-L1 pathway might be effective in clinical contexts other than cancer. High frequency of PD-1 expressing cells has also been reported on HIV-specific hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells in chronically HIV-infected patients.²³ It has been demonstrated that in vivo blockade of PD-1 during chronic SIV infection is safe and results in (i) the rapid expansion and restoration of SIV-specific CD8⁺ T cells, and (ii) the enhancement of B cell responses.²² Importantly, PD-1 blockade prolongs the survival of SIV-infected macaques.²² These results suggest that a combination of immunotherapy and antiretroviral drug treatment

might be beneficial in the context of HIV. More generally, these findings open the way to the use of immune checkpoints in other models of chronic infection (e.g., Zika, hepatitis B, chikungunya, and *Plasmodium* infections).

Although HIS mice are powerful research tools, it is essential to first define their exhaustion and senescence profiles. For example, the expression profile for PD-1 on human T cells varies markedly as a function of the HIS model, the pathophysiological context, and the tissue site.³⁵⁻³⁸ Hence, the primary objective of the present study was to evaluate the senescence and exhaustion phenotypes of T cells in the BRGSF-A2 HIS mouse and thus validate the model's use for evaluating novel immunotherapies. We looked at the HIS mouse's T cell compartment in the blood, lymphoid sites (spleen and bone marrow [BM]), and a nonlymphoid site (adipose tissue), with a particular focus on PD-1 and TIGIT as exhaustion markers and CD57 and killer-cell lectin-like receptor G1 (KLRG1) as senescence markers. Murine blood samples were compared with human blood samples obtained from healthy donors (HDs). Subcutaneous adipose tissue (SCAT) was chosen as a nonlymphoid site because it is (i) relatively easy to access in a clinical setting, and (ii) increasingly recognized as an immunologically active site.^{39,40}

In the present study, we found that BRGSF-A2 HIS mice exhibit a highly humanized expression profile in spleen, BM, and AT, although there were some quantitative differences from one tissue to another. Human T cell chimerism was preserved in 55-week-old BRGSF-A2 HIS mice. We also found that the frequencies of cell expressing exhaustion and senescence markers depended on the T cell subset considered, the tissue, and the naive/memory differentiation stage—as previously described in human samples. A comparison with human blood samples did not reveal overt signs of exhaustion or senescence: frequencies of PD-1-expressing cells on hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells were similar in samples collected from HIS mice and those from HDs. Taken as a whole, our results demonstrate that the BRGSF-A2 HIS mouse is a promising preclinical model of the mechanisms regulating the expression of various immune checkpoint inhibitors and senescence markers. The BRGSF-A2 HIS mouse might therefore be a valuable tool for determining the preclinical efficacy of anti-immune-checkpoint Abs.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Generation of HIS mice using a BRGSF-A2 recipient strain

The BRGSF mice were generated by crossing previously described parental strains.^{10,16,41,42} To generate BRGSF-A2 mice and achieve HLA-restricted human T-cell development in vivo, an HLA class I transgene (encoding the most prevalent HLA-A genotypes, covalently bound to human β 2-microglobulin [β 2m] and murine H-2Db MHC haplotype) was inserted.⁴³ The HIS mice were generated from newborn pups (2 to 5 days of age) after preconditioning by sublethal (3 Gy) total body irradiation. On the following day, $\sim 1.2 \times 10^5$ CD34⁺ human hematopoietic stem cells (HSCs) isolated from human umbilical cord blood samples (ABCellBio, Paris, France) were transplanted into the

liver. Both HLA-A2+ and HLA-A2- donors have been used because T cell humanization was not affected by the different donors' HLA status (Supplementary Fig. S1). The level of human hematopoietic chimerism was tested 12 weeks after transplantation and expressed as the proportion of human leukocytes (hCD45⁺, i.e., the human leukocyte count divided by the total murine and human leukocyte count). The animals were included in the study when they had achieved a satisfactory level of humanization (>30% of hCD45⁺ cells). The HIS mice were always handled under laminar flow conditions in a biosafety level 2 animal facility. Experiments performed on humanized mice were approved by the local animal care and use committee (Ethics Committee, CEA Life Science Division [CETEA-CEA DSV IdF CEEA 044], Paris, France) and authorized by the French Ministry of Education and Research (reference: APAFIS #9405 & #9382).

2.2 | Human samples

Blood samples from HDs were collected by the French national blood authority (*Etablissement Français du Sang*) at Saint-Louis Hospital (Paris, France). The HDs ($n = 10$) were between 35 and 65 years of age. Cord blood samples were purchased from ABCellBio. Each HD gave his/her written informed consent to research use of the blood samples, and the research was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Experiments on human blood samples were approved by the local independent review board (*Comité de Protection des Personnes Ile-de-France VII*, Paris, France; reference: 05–22).

2.3 | Cell preparation

Samples from HIS mice were processed as follows: PBMCs were isolated from EDTA-anticoagulated blood, splenocytes were isolated by mechanical dissociation, and BM cells were collected from 1 or both femurs by flushing. Splenocytes and BM cell suspensions were incubated in ammonium-chloride-potassium (ACK) buffer (150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, and 100 mM EDTA). Splenocytes and BM cells were counted using a Scepter 2.0 cell counter (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Blood cells were counted directly on a FACS cell analyzer, using counting beads (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA). When SCAT samples were collected, they were weighed and processed as described previously.⁴⁴ Briefly, the samples were weighed, washed twice in PBS 1X supplemented with 5% FBS, cut into 2–3 mm pieces, and then digested in a collagenase bath (C2139, Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) at a collagenase concentration of 0.33 mg/ml in RPMI medium (Life Technologies, Carlsbad, CA) with 5% FBS at 37°C for 30 min, with constant shaking. Next, the tissue was mechanically dissociated by suction/discharge with a 10 ml syringe. The suspensions were then filtered through a 70-micron cell strainer. After an initial low-speed centrifugation (300 × g , 10 min) to isolate adipocytes in the upper phase, the lower phase (containing the stromal vascular fraction [SVF]) was centrifuged (500 × g , 10 min). The resulting pellet (containing the SVF cells) was resuspended in PBS with 5% FBS. The resuspended cells were then counted under the microscope in Kova counting chambers (Kova International, Garden Grove, CA), using Trypan blue to exclude dead cells.

To note, two different strategies were used for blood studies depending on the time point. Human hematopoietic chimerism assay (performed 12 weeks after transplantation) was performed after Ficoll separation of the leukocytes in the blood samples. In contrast, immunolabeling for FACS at the time of sacrifice was performed on fresh whole blood samples, as human blood samples were handled.

2.4 | Flow cytometry

The FACS staining protocol was similar for humanized mouse and human samples. Cell suspensions were incubated for 15 min at 4°C with cold PBS containing 0.5% BSA, 2 mM EDTA, and murine and/or human FcR blocking reagent (Biolegend, San Diego, CA). After a washing step, cells were stained with monoclonal Abs by incubation for 15 min at 4°C and then washed in cold PBS 1X. Cell viability was assessed using Live/Dead Fixable dye (eBioscience Thermo Fischer Scientific). The cells were fixed in commercial fixative solution (CellFIX, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Abs against the following markers were used for the control of humanization (week 12–14) on blood samples: mCD45 (30-F11), hCD45 (5B1), hCD3 (SK7), hCD4 (OKT4), hCD8 (SK1), hCD19 (HIB19), hCD11c (Bu15), and HLA-DR (G46-6). The lymphoid cells' differentiation profile and levels of exhaustion/senescence were assessed with a mix combining Abs against mCD45, hCD45, hCD3, hCD8, hCD4, hCD45RO (UCH4), hCD27 (L128), hCCR7 (G043H7), hCD28 (CD28.2), hPD-1 (EH12.2H7), hTIGIT (MBSA43), hCD57 (NK-1), and hKLRG1 (MAFA REA261). Further characterization of myeloid cells in BRGF-A2 HIS mice was performed using a mix combining Abs against mCD45, hCD45, hCD3, hCD19, hCD20 (2H7), hCD33 (WM53), hCD16 (3G8), hCD14 (M5E2), hCD11c (Bu15), hCD123 (9F5), hCD303 (201A), HLA-DR (G46-6), and hPD-L1 (29E2A3). All Abs were purchased from BD Biosciences and Biolegend, with the exception of anti-KLRG1 (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany) and anti-TIGIT (eBioscience). The same Abs were used for humanized mice and human samples, except that mCD45 and hCD45 Abs were used only to probe humanized mouse samples. In HIS mice, the hCD4⁺ T cell subsets were defined as follows: naïve T cells (T_N) = CD27⁺CD45RO⁻CCR7⁺CD28⁺, central memory T cells (T_{CM}) = CD27⁺CD45RO⁺, effector memory T cells (T_{EM}) = CD27⁻CD45RO⁺, and effector T cells (T_E) = CD27⁻CD45RO⁻. The hCD8⁺ T cell subsets were defined as follows: T_N = CD27⁺CD45RO⁻CCR7⁺CD28⁺, memory T cells were pooled and included terminally differentiated memory cells re-expressing CD45RA (T_{EMRA}) = CD27⁺CD45RO⁻CCR7⁻CD28⁻, T_{CM}+T_{EM} = CD27⁺CD45RO⁺. Likewise, effector T cells included T_E = CD27⁻CD45RO⁺, and terminal effector T cells (T_{TE}) = CD27⁻CD45RO⁻. The FACS data were acquired on an LSR Fortessa cell analyzer (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (version 10.1, Treestar, Ashland, OR).

2.5 | Statistical analysis

Data are presented as the median in the scatter plot and as the median and interquartile range (IQR) in column bar graphs and summarized as

median [IQR] in the text. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism software (version 8, GraphPad Software, La Jolla, CA). Different statistical tests were performed depending on the comparison required (a nonparametric Mann–Whitney test for comparison of two set of data (such as CD4 vs. CD8 comparison) and a Kruskal–Wallis test associated to Dunn’s test for the comparison of multiple sets of data (such as the comparison among tissues). The threshold for statistical significance was set to $P < 0.05$.

3 | RESULTS

3.1 | BRGSF-A2 HIS mice exhibit a high level of leukocyte chimerism in blood and lymphoid tissues

We generated HIS mice by engrafting newborn BRGSF-A2 recipients with hCD34⁺ hematopoietic stem cells isolated from human umbilical cord blood, as described in the Materials and Methods section (Fig. 1A). After sufficient humanization had been confirming at 12 weeks of age, we analyzed human cell engraftment in the blood (PBMCs), spleen (splenocytes), and BM in 16- to 19-week-old male and female BRGSF-A2 HIS mice (Fig. 1B). Female HIS mice exhibited a higher level of human chimerism than males for PBMCs (median [IQR] = 40.2% [24.2–48.2] of hCD45⁺ cells in females vs. 8.8% [5.5–31.9] in males, $P = 0.0164$), splenocytes (85.1% [81.3–90.5] vs. 78.9% [65.6–82.5], respectively; $P = 0.025$) and BM cells (69.1% [61.9–75.8] vs. 23.0% [11.8–46.1], respectively; $P = 0.0066$). It is noteworthy that the degree of human cell reconstitution varied from one tissue source to another, with a significantly higher proportion of hCD45⁺ cells among splenocytes than among BM cells ($P = 0.0415$ for females; $P = 0.0374$ for males) and among PBMCs ($P < 0.0001$ for both sexes). Absolute hCD45⁺ cell counts in the BM preparation were also significantly higher in females than in males (7.0×10^6 [5.1 – 8.0×10^6] vs. 0.8×10^6 [0.4 – 3.2×10^6], respectively; $P < 0.0001$). A similar but nonsignificant difference was observed for splenocytes (15.0×10^6 [10.4×10^6 – 20.0×10^6] vs. 2.9×10^6 [1.1×10^6 – 20.0×10^6], $P = 0.1490$) and PBMCs.

Taken as a whole, these data show that female BRGSF-A2 HIS mice exhibit a high level of human hematopoietic chimerism in blood and lymphoid tissues. On the basis of these observations, we decided to use only female HIS mice in the rest of the study.

3.2 | A human-like distribution of naive and memory T cell subsets in the blood, spleen, and BM in female BRGSF-A2 HIS mice

We next assessed the human T cell compartment and differentiation profile in female BRGSF-A2 HIS mice. The proportion of hCD3⁺ T cells was 11.3% [5.7–14.2] for PBMCs, 5.8% [2.5–7.8] for splenocytes, and 0.7% [0.15–1.7] for BM cells. The absolute hCD3⁺ count was highest in the splenocyte preparation (6.1×10^5 cells [2.9 – 14.0×10^5]), followed by the BM (2.8×10^4 cells [1.1 – 24×10^4], for 1 femur) and PBMCs (1.2×10^4 cells/ml [0.2 – 1.9×10^4]; Fig. 2A). The hCD4/hCD8 ratio (Fig. 2B) was 3.3 [1.1–4.0] in PBMCs, 2.3 [0.7–2.8] in splenocytes,

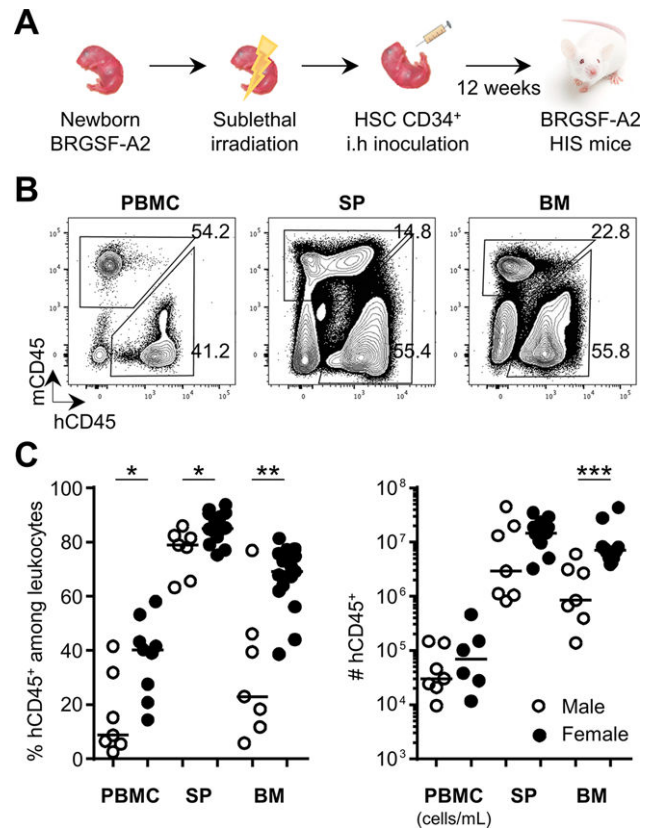


FIGURE 1 In the BRGSF-A2 HIS mouse, blood and lymphoid tissues display a strongly humanized expression profile. (A) A schematic representation of how the HIS mouse is generated. Newborn BRGSF-A2 mice were sublethally irradiated and injected intrahepatically with CD34⁺ human hematopoietic stem cells obtained from cord blood. (B) Representative dot plots showing the relative proportion of mCD45 and hCD45 cells among PBMCs, splenocytes, and BM cells from 16- to 19-week-old BRGSF-A2 HIS mice. The graph showing the number of hCD45⁺ cells collected in blood (expressed in cells per milliliter) and in splenocytes and BM (from 1 femur). The data came from 4 independent experiments, including 15 mice generated from 4 different donors. The median is indicated. Statistically significant differences between male and female animals (as determined in a nonparametric Mann–Whitney test) are indicated as follows: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P > 0.001$

and 1.8 [0.6–3.2] in BM; these values are within the range previously reported for HDs^{45–47} and not different from the HD groups (2.0 [1.6–2.8]). When comparing the quality of humanization obtained from A2⁺ and A2[−] donors in the blood of HIS mice (Supplementary Fig. S1A), we observed higher percentage (and number) of hCD45⁺ cells among total CD45⁺ cells when using A2⁺ donor cells. Surprisingly, the higher hCD45⁺ cell reconstitution was driven by a higher number of hCD19⁺ but not hCD3⁺, hCD4⁺, or hCD8⁺ numbers.

We next evaluated the naïve/memory differentiation profile of hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells in female BRGSF-A2 HIS mice and in human blood samples obtained from HDs. The identification strategy in HDs was based on combinations of hCD45RO, hCD27, hCCR7, and hCD28 expression by hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells.^{48–50} Due to the relatively low cell count for each T cell subset in BRGSF-A2 HIS mice,

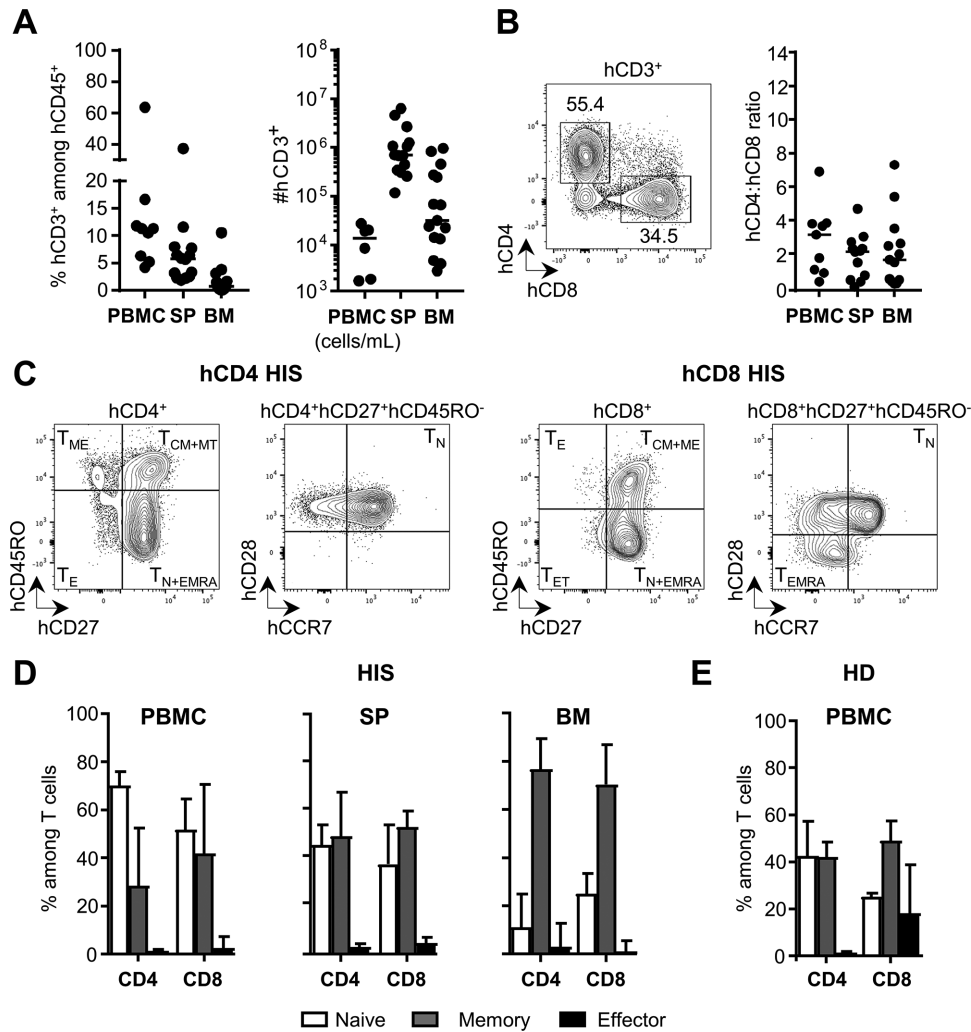


FIGURE 2 Similar distributions of naive and memory T cell subsets in blood, spleen, and BM samples in BRGSF-A2 HIS mice and HDs. (A) Frequency and total number of CD3⁺ hCD45⁺ cells measured among PBMCs, splenocytes, and BM cells from 16- to 19-week-old BRGSF-A2 HIS mice. Counts in blood are expressed in cells per milliliter. Each dot represents 1 HIS mouse, and the median value is shown. (B) The hCD4:hCD8 ratio in blood and tissues from BRGSF-A2 HIS mice. A representative dot plot analysis shows hCD4 and hCD8 expression on splenic hCD45⁺hCD3⁺ cells. (C) Representative contour plots showing the gating strategy used to identify T_N, T_{CM}, T_{EM}, and T_E hCD4 T cells (right) and hCD8 T cells (left) in human splenic T cells collected from 16- to 19-week-old BRGSF-A2 HIS mice (n = 15), as a function of CD45RO and CD27 expression (for hCD4 and hCD8 T cells), and CD28 and CCR7 expression (for CD27-CD45RO⁺ cells). T_N (CD27⁺CD45RO⁻CCR7⁺CD28⁺), T_{CM} (CD27⁺CD45RO⁺), T_{EM} (CD27⁻CD45RO⁺), and effector (T_E: CD27⁻CD45RO⁻) hCD4⁺ T cells were identified separately. For hCD8⁺ T cells, subsets were defined as follows: T_N (CD27⁺CD45RO⁻CCR7⁺CD28⁺), T_M cells (T_{EMRA}: CD27⁺CD45RO⁻CCR7⁻CD28⁻; T_{CM+EM}: CD27⁺CD45RO⁺) and effector T cells (T_E: CD27⁻CD45RO⁺, T_{ET}: CD27⁻CD45RO⁻) hCD8⁺. (D and E) The frequency of T_N (open symbols), memory T cells (grey symbols), and effector T cells (black symbols) in the blood and lymphoid tissues of female BRGSF-A2 HIS mice (D) and in the blood of HDs (E). Median and the median and IQR are indicated respectively on scatter plot and column bar graph. Data for HIS mice are composite data from 4 independent experiments, including 15 mice generated from 4 donors. Ten HDs were studied

we mainly discriminated among T_N, memory T cells (T_M; comprising central memory T cells [T_{CM}] and effector memory T cells [T_{EM}]), and effector T cells (T_E; Figs. 2C and D). Examples of the gating strategy for hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells isolated from female BRGSF-A2 HIS mice are shown in Fig. 2C. The T cell subset collected from blood was essentially constituted of naive hCD4⁺ T cells (70.1% [45.1–76.0] T_N vs. 28.4% [22.2–52.6] T_M cells and 1.5% [1.1–2.1] T_E hCD4⁺ T cells). A similar trend was observed for hCD8⁺ T cells. When comparing blood samples from HIS mice generated with A2⁺ and A2⁻ donors, we did not detect any major difference in the phenotype of both hCD4⁺

and hCD8⁺ T cells regarding naive/memory differentiation, with the exception of the proportion of effector hCD4⁺ T cell that was slightly higher in the context of HLA-A2⁺ donors compared to HLA-A2⁻ donors (Supplementary Fig. S1B). In the spleen, a high proportion of human T_N was also observed. Finally, we noticed a radical difference in the proportions of naive/memory/effector T cells in the BM, where the memory compartment was predominant (memory hCD4⁺ T cells: 76.6% [58.1–89.5]; memory hCD8⁺ T cells: 70.3% [65.1–74.1]). When sufficient numbers of human T cells were recovered, we were able to distinguish among the T_{CM}, T_{EM}, and T_E hCD4⁺ T cell subsets

(Supplementary Fig. S2). At all sites studied, most of the memory hCD4⁺ T cells were T_{CM}. The low memory hCD8⁺ T cell count prevented a subset analysis for this T cell compartment. The proportion of hCD4⁺ T_N was higher in the blood of BRGSF-A2 HIS mice (70.1% [45.1–76.0]) compared to HDs (42.7% [34.5–57.3]; Fig. 2E and Supplementary Fig. S2); consequently, the proportion of T_{CM} hCD4⁺ T cells was lower in samples from HIS mice than in samples from HDs (Figs. 2D and E). We also found that the relative proportions of hCD4⁺ T_E were lower in blood samples from HIS mice than in HDs (Supplementary Fig. S2).

In summary, these observations demonstrate that T cells in the blood of BRGSF-A2 HIS mice have a strongly humanized profile. As seen in humans, the distribution of naive/memory T cell subsets in the HIS mouse is also tissue specific.^{45,51}

3.3 | Low proportion of CD57-expressing cells and high proportion of KLRG1-expressing cells among T cells in BRGSF-A2 HIS mice (as observed in HDs) but high proportion of KLRG1-expressing cells among naïve T cells in HIS mice

We next studied the basal expression pattern of the senescence markers CD57 and KLRG1 in human T cells from BRGSF-A2 mice (Figs. 3 and 4). The frequencies of CD57-expressing T cells depended on the tissue site (Figs. 3A and B); the proportion of CD57-expressing hCD4⁺ T cells was significantly higher in a BM cell preparation than in splenocytes and PBMCs. A similar trend was also observed for hCD8⁺ T cells, although only the difference between BM cells and splenocytes was statistically significant. When considering blood samples from HDs, the proportion of CD57-expressing cells was significantly higher for hCD8⁺ T cells than for hCD4⁺ T cells. This difference was not observed in BRGSF-A2 HIS mice. The proportion of CD57-expressing hCD4⁺ T cells was low in samples from HIS mice and in samples from HDs (Fig. 3B and Supplementary Fig. S3); although there was a statistically significant mouse vs. HD difference, the low proportions observed did not prompt us to investigate further. The proportions of CD57-expressing cells hCD8⁺ T cells were similar in samples from HDs and from BRGSF-A2 HIS mice. Because the frequency of CD57-expressing cells has been shown to be virtually absent on T_N, low on T_M cells, and relatively high on T_E in human blood samples,⁵² we determined CD57 expression in these subsets (Fig. 3C). As expected, CD57 expression was not detected on T_N from any of the tissues in HIS mice—except for a low percentage of hCD8⁺ T cells from the BM. CD57-expressing memory T cells were detected in all tissues studied in HIS mice. The percentages of CD57-expressing hCD4⁺ and hCD8⁺ memory T cells were significantly higher among BM cells than among splenocytes (and higher than among PBMCs for hCD4⁺ T cells). It is noteworthy that we did not observe significant proportion of CD57-expressing cells among the T_E cell subsets collected in the spleen (and in BM for T_E hCD4⁺ T cells). Finally, the blood samples from HDs and HIS mice did not differ significantly with regard to the percentage of CD57⁺ T cells (Fig. 3C and Supplementary Fig. S3). It would have been interesting to compare the proportion of CD57-expressing T_E cells in the blood

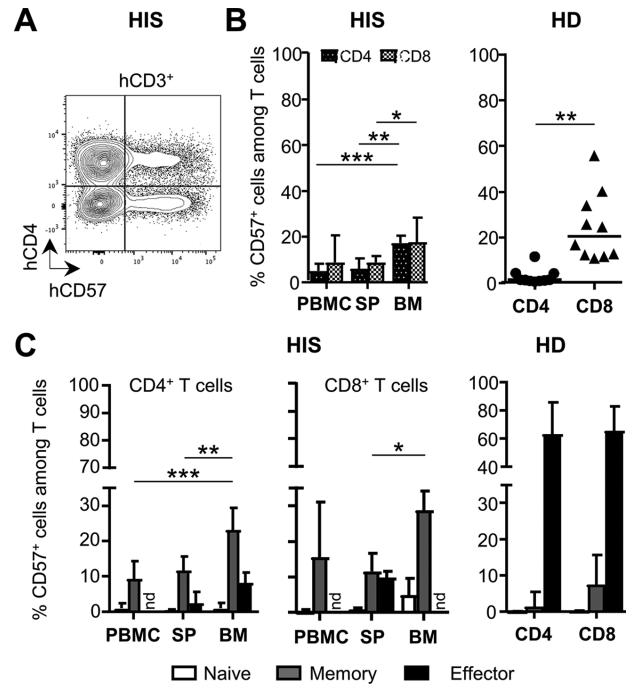


FIGURE 3 A low frequency of CD57-expressing cells by human T cells in BRGSF-A2 HIS mice and HDs. (A and B) Frequency of CD57-expressing hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells collected from the blood, splenocytes, and BM of 16- to 19-week-old BRGSF-A2 HIS mice and in blood from HDs. (A) Representative dot plot showing CD57 and hCD4⁺ expression on total hCD3⁺ cells in HIS mouse splenocytes. (B) Graphs showing the frequency of total hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells expressing CD57 in blood, splenocytes, and BM from HIS mice (histograms) and in blood from HDs (the scatter plot). The median are indicated. (C) Frequency of CD57-expressing naive, memory, and effector hCD4⁺ and hCD8⁺ T cell subsets in blood, splenocyte, and BM preparations from HIS mice and in blood from HDs. Median and the median and IQR are indicated on scatter plot and column bar graph, respectively. Data for HIS mice are composite data from 4 independent experiments, including 15 mice generated from 4 donors. Ten HDs were studied. Statistically significant differences (as determined in a nonparametric Mann–Whitney test [for CD4 and CD8 comparison] and a Kruskal–Wallis test [for the comparison among tissues]) are indicated as follows: **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* > 0.001

for HDs vs. HIS mice, because high proportions of CD57-expressing hCD4⁺ and hCD8⁺ T_E cells were observed in the donor blood samples (63.3% [38.0–85.7] and 65.5% [49.5–82.3], respectively). However, the proportion of T_E cells in the HIS mice was too low for a valid comparison. Taken as a whole, our results show that the proportion of CD57-expressing cells on human T cells in the BRGSF-A2 HIS mouse was site dependent. Furthermore, the frequency of CD57-expressing cells among total (and memory) hCD8⁺ T cells in the blood was much the same in HIS mice and HDs.

We also determined the proportion of KLRG1-expressing hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells (Fig. 4A). In BRGSF-A2 HIS mice, the percentage of KLRG1-expressing T cells was consistently high and depended (at least in part) on the tissue; we found that the percentage of KLRG1-expressing hCD8⁺ T cells (but not hCD4⁺ T cells) was higher in the BM than in the blood (Figs. 4A and B). When comparing murine and

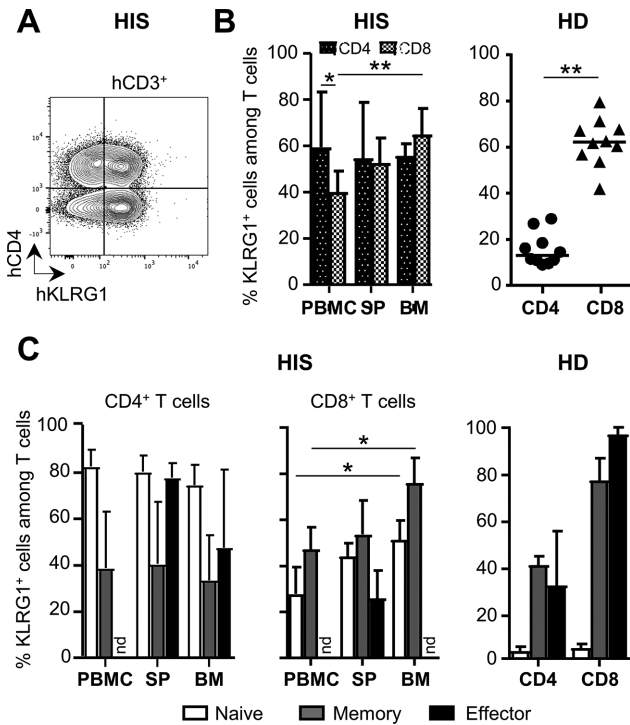


FIGURE 4 A high frequency of KLRG1-expressing cells by T cells from BRGSF-A2 HIS mice, due to a high frequency of KLRG1-expressing cells by naive hCD4 T cells. (A and B) Frequency of KLRG1-expressing hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells collected from the blood, splenocytes, and BM of 16- to 19-week-old BRGSF-A2 HIS mice and in blood from HDs. (A) A representative dot plot showing KLRG1 and hCD4 expression on total hCD3⁺ cells in HIS mouse splenocytes. (B) Frequency of total hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells expressing KLRG1 in blood, splenocytes, and BM from HIS mice (histograms) and in blood from HDs (the scatter plot). The median values are indicated. (C) Frequency of KLRG1-expressing cells among naive, memory, and effector hCD4⁺ and hCD8⁺ T cell subsets in the blood, splenocytes, and BM from HIS mice and in blood from HDs. Median and the median and IQR are indicated on scatter plot and column bar graph, respectively. Data for HIS mice are composite data from 4 independent experiments, including 15 mice generated from 4 donors. Ten HDs were studied. Statistically significant differences (as determined in a nonparametric Mann-Whitney test [for CD4 and CD8 comparison] and a Kruskal-Wallis test [for the comparison among tissues]) are indicated as follows: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

human blood samples, we observed that the proportion of KLRG1-expressing hCD4⁺ T cells was higher in HIS mice than in HDs (59.3% [44.4–83.2] vs. 13.1% [10.6–20.6], respectively; $P < 0.0001$), whereas proportion of KLRG1-expressing hCD8⁺ T cells was higher in HDs than in the HIS mice (39.9% [33.5–49.2] and 62.1% [55.9–68.4], respectively; $P = 0.0006$; (Fig. 4B and Supplementary Fig. S3). Given that KLRG1 expression depends on the T cell differentiation status, we determined KLRG1 expression in T_N, T_M, and T_E T cells. We found that the percentages of KLRG1-expressing naive hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells (82.6% [61.6–89.9] and 27.8% [22.1–39.5], respectively) in the blood of BRGSF-A2 HIS mice were significantly higher than those observed in blood from HDs (3.3% [2.5–5.0] and 4.6% [4.0–6.3]; $P < 0.0001$ and $P = 0.0002$, respectively; (Fig. 4C and Supplementary Fig. S3).

We found similar proportions of KLRG1-expressing memory hCD4⁺ in blood from BRGSF-A2 HIS mice and from HDs. Furthermore, the percentage of KLRG1-expressing memory hCD8⁺ T cells was lower in blood from BRGSF-A2 HIS mice than in blood from HDs (Supplementary Fig. S3). These two observations suggest that the KLRG1 phenotype differs specifically (relative to humans) for the T_N compartment in BRGSF-A2 HIS mice. As mentioned above, the very low effector T cell counts in the blood of HIS mice prevented us from comparing KLRG1 expression in this subset vs. HDs. To confirm that the high expression of KLRG1 on naive hCD4⁺ T cells did not prevent proper activation, we studied the cytokine production profile of the hCD4⁺ T cell compartment following short in vitro stimulation. Human CD4⁺ T cells in the BRGSF-A2 HIS mice exhibited significant proportions of cells producing γ -IFN. Limited percentage of hCD4⁺ T cells containing IL-4 and IL-17 was detected (Supplementary Sup S4).

Taken as a whole, our results in BRGSF-A2 HIS mice confirmed the situation in humans; the proportion of CD57- and KLRG1-expressing cells are not equivalent. The blood of HIS mice contained a low percentage of CD57-expressing cells and a high percentage of KLRG1-expressing cells—as is observed in human blood. Moreover, the senescence phenotype also depended on the tissue site, due to both changes in the proportion of cells naturally expressing higher levels of these markers (T_M cells), and inherent tissue-specific differences: the percentage of KLRG1-expressing memory hCD8⁺ T cells was higher among BM cells than among PBMCs and splenocytes.

3.4 | The frequency of PD-1 expressing cells among T cells was similar in BRGSF-A2 HIS mice and HDs, whereas the frequency of TIGIT-expressing cells was less frequent on the mice's hCD4⁺ T cells

We next determined the exhaustion profile of T cells in the BRGSF-A2 HIS mouse model by focusing on PD-1 and TIGIT expression (Figs. 5A and B). The frequency of T cells expressing PD-1 was significantly higher among BM cells than among splenocytes and PBMCs (87.5% [62.6–94.8] and 80.6% [57.5–91.1] for BM hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells, respectively, vs. 51.2% [42.3–68.2] and 51.5% [39.2–59.1] for splenocytes and 28.1% [18.4–50.4] and 41.7% [27.8–66.4] for PBMCs). The frequencies observed in the blood of BRGSF-A2 mice were essentially those observed in HD (Fig. 5B and Supplementary Fig. S3), although a significant difference in the percentages of PD-1⁺ hCD4⁺ vs. PD-1⁺ CD8⁺ T cells was observed in human blood samples but not in BRGSF-A2 mice. Because the high proportion of PD-1 expressing cells in BM could essentially reflect a high frequency of T_M cells in this tissue,^{51,53} we next evaluated PD-1 expression as a function of the T cell differentiation status.⁵⁴ As expected, the frequency of PD-1 expressing cells among the HIS mouse's T_M hCD4⁺ and hCD8⁺ cells (and effector hCD4⁺ and hCD8⁺ cells, when available) was higher than among T_N in all the tissues studied (Fig. 5C). The percentage of PD-1-expressing memory T cells (98.2% [96.1–99.2] for hCD4⁺ T cells and 92.7% [81.3–94.9] for hCD8⁺ T cells) was higher among BM cells than among splenocytes or PBMCs. In the spleen, we observed a significant difference in the percentage of PD-1-expressing cells between

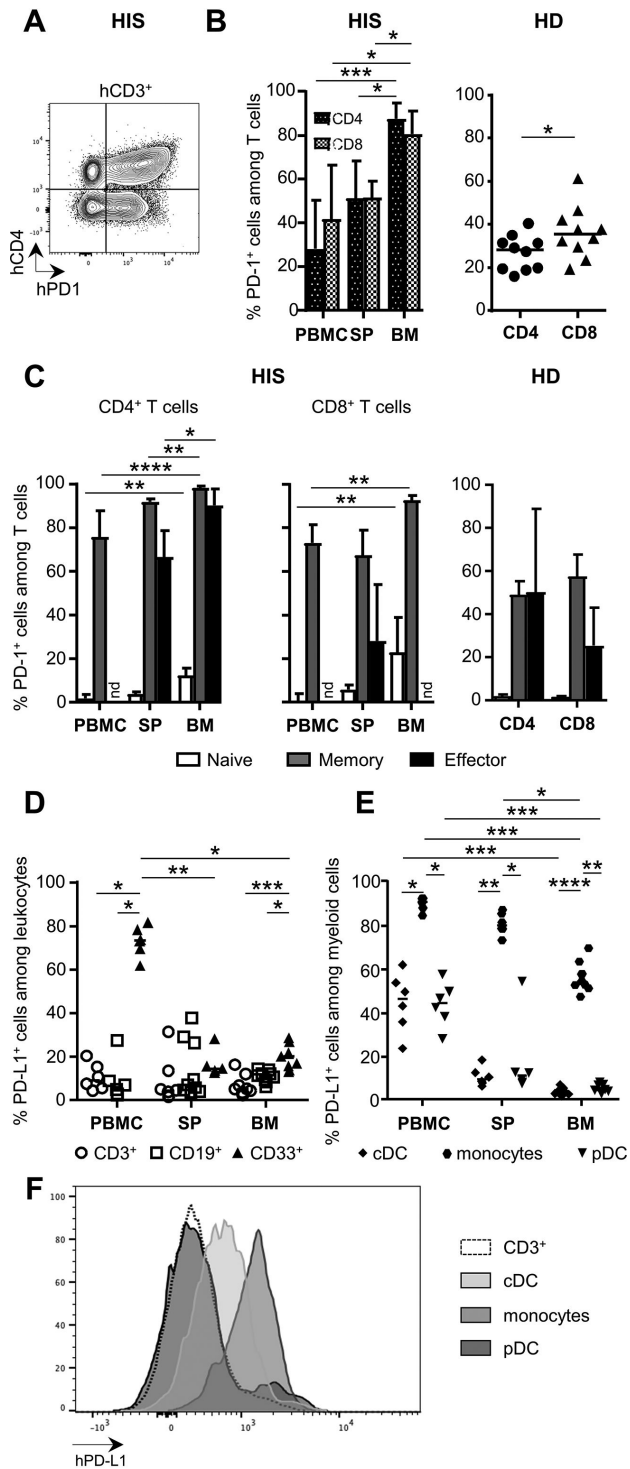


FIGURE 5 An intermediate frequency of PD-1-expressing cells in Brgsf-A2 HIS mice, in agreement with data on blood from HDs. (A and B) The frequency of PD-1-expressing cells among hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells collected from the blood, splenocytes, and BM of 16- to 19-week-old Brgsf-A2 HIS mice and in blood from HDs. (A) Representative dot plot showing PD-1 and hCD4 expression on total hCD3⁺ cells in HIS mouse splenocytes. (B) Graphs showing the frequency of total hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells expressing PD-1 in blood, splenocyte, and BM preparations from HIS mice (histograms) and in blood from HDs (scatter plot). The median values are indicated. (C) Frequency of PD-1-expressing naive, memory, and effector hCD4⁺ (continued on the next column)

memory hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells (Fig. 5C) that was also detected when comparing MFI. We observed a lower proportion of memory hCD4⁺ T cells expressing PD-1 in blood from HDs than in blood from HIS mice ($P < 0.0001$). However, there was no such difference for memory hCD8⁺ T cells ($P = 0.1220$). Although a high proportion of effector T cells is expected to express PD-1, a comparison was not possible for the latter because the effector T cell count was prohibitively low (Fig. 5C).

Given that PD-1's exhaustion activity is correlated with its interactions with its ligands, we next assessed the availability of PD-L1 in the various tissues collected from the Brgsf-A2 HIS mice (Fig. 5D). The percentage of PD-L1-expressing myeloid (hCD33⁺) cells depended on the tissue considered: 73.4% [67.7–79.2] among PBMCs, 14.4% [13.5–18.8] among splenocytes, and 20.2% [14.9–24.4] among BM cells. The percentage of PD-L1-expressing cells was significantly higher for myeloid cells than for hCD3⁺ and hCD19⁺ cells in blood and the BM, but not in the spleen. We then further characterized PD-L1 expression by cDCs (hCD11c⁺), monocytes (hCD14⁺hCD16^{+/-}), and plasmacytoid DCs (pDCs; hCD303⁺hCD123⁺) in particular (Fig. 5E). In all tissues, we observed a higher frequency of PD-L1-expressing cells among monocytes than among cDCs and pDCs. PD-L1 expression on the various myeloid subsets also differed from one tissue to another: the frequency of PD-L1-expressing monocytes was lower among BM cells (53.9% [51.6–60.2]) than among splenocytes (79.6% [76.7–85.4]) and PBMCs (90.3% [86.7–91.9]). The frequency of PD-L1⁺ cDCs and pDCs was also significantly lower among BM cells than among PBMCs. Finally, we observed various levels of PD-L1 expression (according to the mean fluorescence intensity) among the splenocytes: pDCs did not express PD-L1 except for a small fraction, whereas cDCs had low homogeneous levels of PD-L1 expression and monocytes expressed high levels (Fig. 5F). In conclusion, the Brgsf-A2 HIS model displays a tissue-specific pattern of PD-1/PD-L1 expression, with high percentage of PD-1 expressing cells among T cells in the BM and high percentage of PD-L1 expressing cells among hCD33⁺ cells in the blood.

Finally, we evaluated the impact of anti-PD1 administration in Brgsf-A2 HIS mice in the absence of infectious or tumoral challenges. The aim was to study the stability of the human compartment and

and hCD8⁺ T cell subsets in in blood, splenocyte, and BM preparations from HIS mice and in blood from HDs. Median and the median and IQR are indicated on scatter plot and column bar graph, respectively. (D and E) Percentage of PD-L1 expressing cells in blood, splenocyte, and BM preparations from Brgsf-A2 HIS mice. Graphs showing the frequency of PD-L1-expressing cells among hCD3, hCD19, and hCD33 cells (D) or among hCD14⁺hCD16^{+/-} monocytes, hCD11c⁺ cDC and CD123⁺CD133⁺ pDC cells (E), together with histograms of PD-L1 expression by these subsets (F). Data for HIS mice are composite data from 4 independent experiments (A and B) on 15 mice generated from 4 donors or from a single experiment on 9 mice generated with 2 donors (D, E, and F). Statistically significant differences (as determined in a nonparametric Mann-Whitney test [for CD4 and CD8 comparison] and a Kruskal-Wallis test [for the comparison among tissues and among myeloid subsets]) are indicated as follows: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, and **** $P < 0.0001$

notably the human T cell compartment in the HIS model. After 4 injections of nivolumab within 10 days, we analyzed the characteristics of the human T cell compartment at day 3 and 11 following the last injection. We observed that PD-1 expression was not detected on T cells both at day 3 and day 11, presumably reflecting the masking of PD-1 by the nivolumab as previously described^{55,56} (Supplementary Fig. 5A) and confirming the long-term persistence of the Ab. Importantly, the numbers of hCD45⁺ cells, hCD3⁺ cells, and hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells were not modified by the anti-PD-1 treatment (Supplementary Fig. 5B). The numbers of naïve and memory hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells were not affected, although a trend toward a reduction in the numbers of both effector hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells was observed (Supplementary Fig. 5C). When assessing T cell subset percentages, modest changes within the CD8⁺ T cell compartment were detected, affecting transiently the memory T cell subsets: the percentage of memory T cells was lower at d3 post-treatment compared to nontreated animals and restored at d11. Altogether, we thus demonstrate that the human chimerism and the profile of the human T cell compartment were not drastically affected by the injection of anti-PD-1 in this steady-state context, although the ligation of the nivolumab on T cells was observed and persistent.

We next assessed TIGIT expression (Fig. 6A). In the blood and spleen of BRGSF-A2 HIS mice, the frequency of TIGIT-expressing cells was higher among hCD8⁺ T cells than among hCD4⁺ T cells (Fig. 6B). TIGIT-expressing cells were detected in all tissues analyzed, with a significantly higher frequency of TIGIT-expressing hCD4⁺ T cells in the BM preparation (46.5% [35.8–54.8]) than among splenocytes (14.6% [10.4–24.8]) and PBMCs 9.7% [7.4–16.7]. In both the HIS mice and HDs, the proportion of TIGIT-expressing cells was higher for hCD8⁺ T cells than for hCD4⁺ T cells (Fig. 6B and Supplementary Fig. S3). However, the percentage of TIGIT-expressing hCD4⁺ T cells was higher in HDs (22.9% [17.6–29.0]) than in BRGSF-A2 HIS mice. As expected, the TIGIT-expressing cells were predominantly found within the T_M and T_E cell subsets (Fig. 6C). The high frequency of TIGIT-expressing T_M cells in HIS mouse recapitulates the profile observed in the blood samples from HDs. The frequency of TIGIT-expressing memory hCD4⁺ T cells was higher among the mice's BM cells than among their splenocytes and PBMCs. There were no significant inter-tissue differences in the proportion of TIGIT-expressing cells by memory hCD8⁺ T cells. It is noteworthy that significant proportion of TIGIT-expressing cells was observed on the naïve hCD8⁺ T cell fraction in the mice's BM cells but not among their PBMCs and splenocytes. Finally, given that highly exhausted cells may express several immune checkpoints at the same time, we analyzed the frequency of cells expressing both TIGIT and PD-1 in BRGSF-A2 HIS mice (Fig. 6D). For the PBMCs and splenocytes, the frequency of cells co-expressing PD-1 and TIGIT was higher among hCD8⁺ T cells than among hCD4⁺ T cells. When considering hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells, the frequency of cells co-expressing PD-1 and TIGIT was higher in the BM (45.4% [35.4–54.4] and 59.5% [34.7–75.3], respectively) than among splenocytes (12.3% [9.4–23.3] and 27.7% [13.0–38.1], respectively) and PBMCs (7.4% [4.9–12.4] and 24.7% [14.4–47.3], respectively). With regard to human data, there was also an hCD4⁺ vs. hCD8⁺ difference in the frequency of

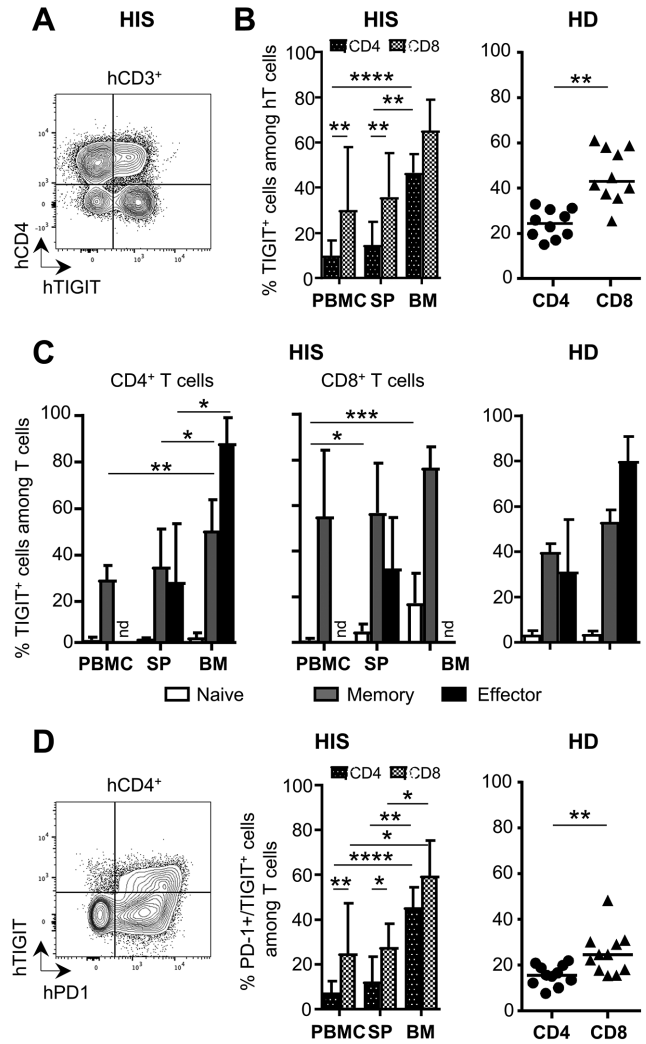


FIGURE 6 An intermediate frequency of TIGIT-expressing cells in BRGSF-A2 HIS mice, in agreement with the data on blood from HDs. (A and B) Frequency of TIGIT-expressing hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells collected from the blood, splenocytes, and BM of 16- to 19-week-old BRGSF-A2 HIS mice and in blood from HDs. (A) A representative dot plot showing TIGIT and hCD4 expression on splenic hCD3⁺ cells in HIS mouse splenocytes. (B) Graphs showing the frequency of total hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells expressing TIGIT in blood, splenocyte, and BM preparations from HIS mice (histograms) and in blood from HDs (scatter plot). (C) Frequency of TIGIT-expressing naïve, memory, and effector hCD4⁺ and hCD8⁺ T cell subsets in blood, splenocyte, and BM preparations from HIS mice and in blood from HDs. (D) A representative dot plot showing PD-1 and TIGIT expression on splenic hCD4⁺ T cells, and a graph showing the frequency of cells co-expressing PD-1 and TIGIT among hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells from BRGSF-A2 HIS mice and in blood from HDs. Median and the median and IQR are indicated on scatter plot and column bar graph, respectively. Data in HIS mice are composite data from 4 independent experiments, including 15 mice generated from 4 donors. Statistically significant differences (as determined in a nonparametric Mann-Whitney test [for CD4 and CD8 comparison] and a Kruskal-Wallis test [for the comparison among tissues]) are indicated as follows: **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, and *****p* < 0.0001

co-expressing cells (15.5% [12.1–19.9] and 24.6% [17.7–30.2], respectively). As observed for the proportion of TIGIT-expressing cells, the percentage of PD-1⁺TIGIT⁺ hCD4⁺ T cells was higher in HDs than in BRGSF-A2 HIS mice (Fig. 6D and Supplementary Fig. S3).

In conclusion, the results for PD-1 and TIGIT expression were not identical; the frequency of PD-1 expressing cells was similar in T cells from HDs and those from the HIS mice, whereas the percentage of TIGIT-expressing hCD4⁺ T cells was higher in HDs than in BRGSF-A2 HIS mice.

3.5 | The human T cell chimerism was preserved in 55-week-old BRGSF-A2 HIS mice

Given the use of BRGSF-A2 HIS mice as a preclinical model may require long-term follow-up for the development of the pathological context required and the assessment of the therapy's efficacy, we next assessed the long-term persistence of the human cell engraftment. We analyzed human cell engraftment in the PBMCs, SP and BM of female BRGSF-A2 HIS mice at 3 different ages: adult (16 to 19 weeks), intermediate (31 to 39) and aged (51 to 55-week-old) animals (Fig. 7). The absolute hCD45⁺ cell counts in the blood (expressed as cells/ml) was significantly lower in the aged animals compared to the adult. In SP and BM, the decrease in hCD45⁺ cell counts was already detected in intermediate compared to adult animals. Such decrease was maintained in old animals. Importantly, the absolute hCD3⁺, hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells counts were preserved in spleen and BM of intermediate and aged animals whereas a slight decrease was observed in the blood of aged compared to adult animals (Fig. 7A). In Fig. Sup S6, both numbers and percentages of hCD45⁺ and hCD3⁺ are represented. Whereas hCD45 percentages and numbers provided a very similar information, some discrepancies were observed when considering hCD3 percentages and numbers: hCD3 percentage varied with age whereas hCD3 numbers were essentially preserved. The increase in T cell percentages indirectly reflected the preferential decrease in non-T cell fraction, most probably B cells. We next evaluated the naïve/memory/effector differentiation profile of hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells in splenocytes from BRGSF-A2 at the 3 different ages (Fig. 7B). The absolute numbers of naïve, memory and effector hCD4⁺ T cells were similar at all ages. A gradual decrease was observed when considering the absolute number of naïve hCD8⁺ T cells which was significantly lower in intermediate and aged animals compared to the adults. We next determined the exhaustion and senescence profiles of T cells. As shown in Fig. 7C, the frequencies of effector hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells expressing PD-1 were significantly higher in aged animals compared to the adults. The percentage of PD-1 expressing cells was also increased among memory hCD8⁺ T cell compared to adults. The proportions of memory/effector hCD8⁺ T cells expressing CD57 was also increased in intermediate and aged animals compared to the adult mice.

In conclusion, the analysis of human reconstitution kinetic in humanized mice showed a stable T cell compartment, although physiological signs of ageing were also detected (such as lower absolute numbers of naïve T cells, increase in the proportion of cells expressing exhaustion, and senescence markers).

3.6 | In BRGSF-A2 HIS mice, SCAT tissue displays a highly humanized immune profile

Finally, we looked at whether a nonlymphoid site (SCAT) achieved humanization; SCAT has been described as a site at which PD-1⁺ memory T cells accumulate.⁴⁰ We first analyzed the level of human cell engraftment: significant proportions of hCD45⁺ cells were recovered in SCAT (55.6% [44.6–68.2]; Fig. 8A, left). We next looked at the human T cell compartment and its differentiation profile in the murine SCAT. When considering hCD3⁺ cells, the hCD4:hCD8 ratio was 9.4 [6.8–13.5] and thus attested to the predominant accumulation of hCD4⁺ T cells in SCAT (Fig. 8A, right). We next determined the hCD4⁺ T cells' differentiation profile as a function of CD45RO and CD27 expression (Fig. 8B, left). In agreement with the reported features of human SCAT,⁴⁰ hCD4⁺ T cells collected from the HIS mouse's SCAT were mainly CD45RO⁺ (53.5% [33.8–87.3]). We also evaluated the frequency of PD-1-expressing cells among hCD4⁺ T cells collected from the BRGSF-A2 HIS mice's SCAT (Fig. 8B, right); there was a high frequency of PD-1-expressing CD45RO⁺ hCD4⁺ T cells (56.5% [50–80]) in the SCAT.

Overall, we found a high proportion of hCD45⁺ T cells in the murine SCAT. The phenotype of human T cells recovered from adipose tissue in the BRGSF-A2 HIS mouse resembles that described in human SCAT samples.

4 | DISCUSSION

Immunotherapies targeting immune checkpoints have delivered major therapeutic progress, notably in patients with late-stage cancer where the treatment's risk–benefit balance is considered to be acceptable. The use of similar therapeutic strategies in less severe clinical contexts (such as chronic viral infections or less aggressive tumors) requires better knowledge of the drugs' impact. Furthermore, the therapeutic benefits of anti-immune checkpoint strategies might be accentuated by combining the latter with conventional cancer drugs,⁵⁷ vaccination/antiretroviral agents, or other types of immunotherapy. Humanized mice may represent an important tool to evaluate these various therapeutic strategies.

The choice of an HIS model is still a crucial step before considering preclinical studies due to the different strategies available (tissue graft and/or HSCs graft) and the constant improvement of these models. A first criterion for a preclinical assay is the capacity to generate large cohorts of animals that are homogeneous for humanization and exhibiting robust and long-term chimerism. In that respect, HIS models requiring tissue transplants combined to HSC injection remain technically challenging. The BLT HIS model (NOD/SCID mice co-transplanted with human fetal liver and thymus tissues along with autologous CD34⁺ HSC)⁵⁸ is an interesting but technically difficult model to set up for studies with high number of animals due to the limited access to this combination of tissue. A limitation commonly described for this model is the progressive development of graft-versus-host disease.^{59,60} The Neo-Thy HIS model⁶¹ offers an interesting alternative to produce sufficient numbers of animals by transplanting nonfetal human thymus

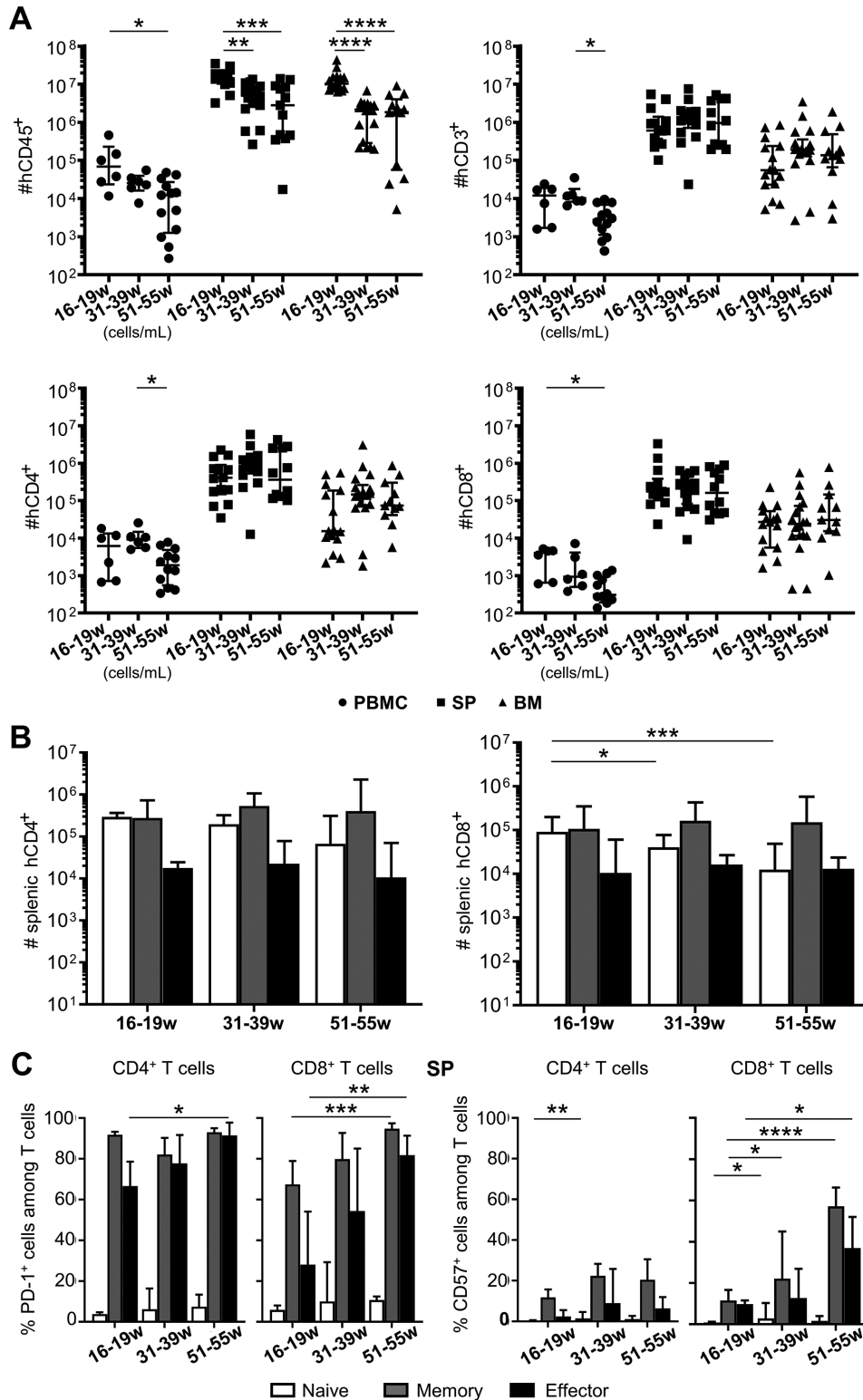


FIGURE 7 Robust human T cell compartment in the blood and lymphoid tissues in 16- to 55-week-old BRGSF-A2 HIS mice. (A) Total number of hCD45⁺, hCD3⁺, hCD4⁺, and hCD8⁺ cells measured among PBMCs, splenocytes, and BM cells (1 femur) from 16- to 19-week old ($n = 15$), 31- to 39-week old ($n = 18$), and 51- to 55-week old ($n = 13$) female BRGSF-A2 HIS mice. Counts in blood are expressed in cells per milliliter. Each dot represents 1 HIS mouse, and the median values and IQR are shown. (B) Total number of T_N (open symbols), memory T cells (gray symbols), and effector T cells (black symbols) hCD4⁺ T cells (right) and hCD8⁺ T cells (left) in human splenic T cells collected from BRGSF-A2 HIS mice. (C) Frequency of PD-1 and CD57-expressing naive, memory, and effector hCD4⁺ and hCD8⁺ T cell subsets in splenocyte preparations from HIS mice. Median and the median and IQR are indicated on scatter plot and column bar graph, respectively. Data for HIS mice are composite data from 9 independent experiments, including 46 mice generated from 22 donors. Statistically significant differences (as determined in a nonparametric Kruskal-Wallis test) are indicated as follows: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, and **** $P < 0.0001$

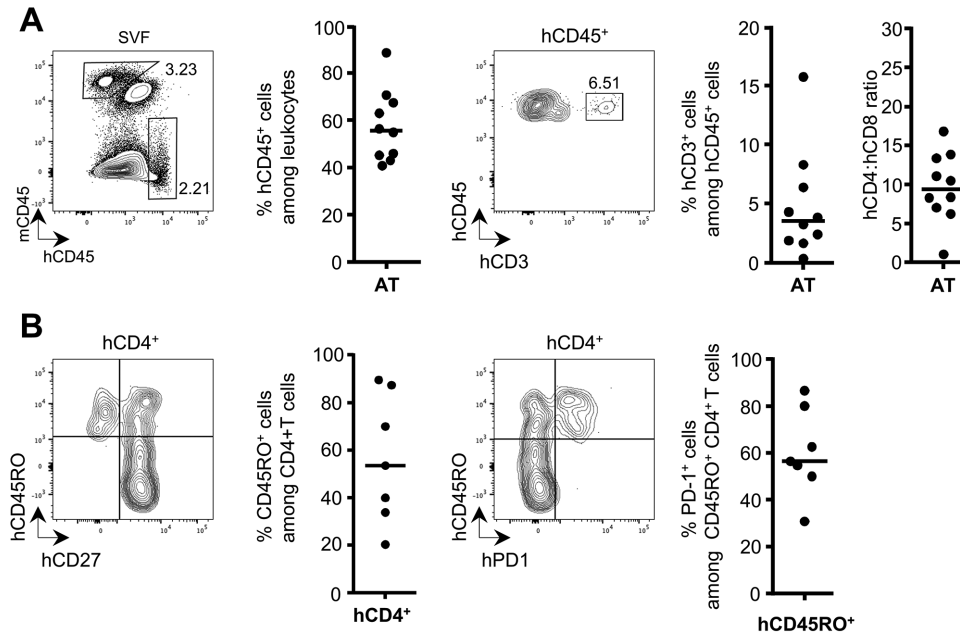


FIGURE 8 Enrichment in hCD4 T cells with a memory phenotype, and a high proportion of PD-1-expressing cells in the SCAT of BRGSF-A2 HIS mice. Human T cells in the SVF isolated from abdominal SCAT in 16-week-old female BRGSF-A2 HIS mice ($n = 9$). (A) Representative dot plots showing the expression of mCD45 and hCD45 on SVF cells (left dot plot) and hCD3⁺ hCD45 SVF cells (right dot plot). The graph shows the proportion of hCD45⁺ SVF cells, the frequency of hCD3⁺ hCD45 SVF cells, and the hCD4:hCD8 ratio. (B) Dot plots showing expression of hCD45RO and hCD27 (left dot plot) or hPD-1 (right dot plot) by hCD4⁺ T cells from the SVF. Each dot represents 1 HIS mouse. Median values are indicated. Data in HIS mice are composite data from 2 independent experiments, including 12 mice generated from 3 donors

fragments paired with umbilical cord blood HSCs. The access to higher quantity of nonfetal human thymuses (obtained during neonatal cardiac surgery) allows grafting of more than 40 mice with the same tissue, but the HSC source may not be autologous. Because this model provides a human thymic environment (although the murine thymus is still functional), it may deliver an interesting tool, notably for studies focusing on central and peripheral tolerance.

An alternative strategy for the humanization of the immune system relies on the sole transplantation of hematopoietic stem cells. The two main models (NOG/NSG or BRGS/BRGSF/BRGSF-A2) include γ c-deficient recipients and lack lymph node structure, a limitation that was recently addressed by enforcing perinatal lymph node generation through mouse TSLP ectopic expression.⁶² Although HSC transplantation in hosts is a simpler process, an important limitation of this model is the MHC restriction developing in the murine thymus of these animals. To circumvent the limitation of human cells being educated in the murine thymus by mouse class II and I molecules, the introduction of human class I (as used in the BRGSF-A2 model) or human class I/class II⁶³ transgenes has been performed. However, recent observations demonstrate that human thymocytes show similar behavior in mouse and human thymic environments⁶⁴ and that HSC-derived cells participate to thymic selection,⁶⁵ including thymocytes^{66,67} and B cells.⁶⁸ These observations suggest that human Class I or Class II transgene expression on the thymic epithelial cells may not be strictly required. Overall presentation by transgenic human HLA-A2, donor human HLA, and mouse endogenous MHC may occur in the thymus and the periphery because the animals are still competent for mouse MHC class I and class II expression. Despite these variable sources of cells ensur-

ing thymic selection and peripheral contacts, the high proportion of naïve hCD4⁺ and hCD8⁺ T cell and their long-term survival detected in the BRGSF-A2 HIS mice were important insights on the efficacy of the thymic selection and peripheral survival.

When comparing the quality of humanization obtained from A2⁺ and A2⁻ donors (Supplementary Fig. S1), we observed higher percentage (and number) of hCD45⁺ cells among total CD45⁺ cells in the blood when using A2⁺ donor cells. Surprisingly, a higher number of hCD19⁺ but not hCD3⁺, hCD4⁺, or hCD8⁺ numbers drove the higher hCD45⁺ cell reconstitution. Furthermore, no difference in naïve/memory differentiation, exhaustion, and senescence profile was observed among hCD8⁺ T cell, confirming the limited impact at steady state of matched or mismatched donors. The significantly higher number of hCD19⁺ cell numbers when using HLA-A2⁺ donors has also been recently described when comparing BRGS-A2DR2 vs. BRGS HIS animals,⁶³ but the mechanism responsible for this observation remains unclear. However, one may expect major advantages of using matched HLA when considering the monitoring of various hCD8⁺ T responses and in context of tumoral and/or infectious challenges rather than in steady-state conditions.

A second criterion, that was the focus of the current work, is to observe equivalent cell phenotypes in terms of senescence and exhaustion compared to clinical contexts. This question is especially relevant for the study of the efficacy of anti-immune checkpoint strategies. Of course, this comparison may inherently be biased to some extent because of differences in antigen stimulation, ageing, exposure to pollutants, etc. The environmental differences surrounding HIS mice may drastically alter the exhaustion and senescence

profile. We therefore decided to perform an in-depth, tissue-specific analysis of human markers among PBMCs, splenocytes, BM cells, and SCAT cells sampled from the BRGSF-A2 HIS mouse. In parallel, we compared T cell profiles in blood samples collected from the HIS mice and from humans (HDs).

BRGSF-A2 HIS mice accommodate the development and marked accumulation of human hematopoietic cells among PBMC, splenocyte (where up to 80% of CD45⁺ cells are human), BM, and SCAT preparations, although the exact levels vary from one tissue to another. We also evaluated the hCD4:hCD8 ratio, which reflects the quality of the immune reconstitution in the HIS model but also immune senescence in a clinical setting. The hCD4:hCD8 ratios observed in murine tissues were very similar to those described in the human.⁴⁵ We also characterized the relative proportion of T_N and T_M cells, which indicates both the quality of reconstitution and serves as a standard marker of ageing. In the mice's blood, the T cell population was essentially constituted of naïve hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells. As described in humans,^{40,51} the proportion of T_N depended on the tissue; T_N represented the major T cell compartment in PBMCs and splenocytes, whereas T_M cells predominated among BM and SCAT cells. The frequency of T_N was higher in HIS mice than in HDs. The larger T_N compartment in BRGSF-A2 HIS mice presumably reflects (i) the mice's strict housing conditions (i.e., with much less environmental stimulation than in HDs), and (ii) the potential age bias (i.e., comparing of 20-week-old humanized mice to adult HDs). Very few effector T cells were detected in BRGSF-A2 HIS mice, which strengthens the hypothesis of limited environmental stimulation and thus limited activation of the T cell compartment in the HIS mouse.

We found that the expression patterns of four selected cell surface markers (CD57, PD-1, KLRG1, and TIGIT) varied according to the tissue source and the naïve/memory/effector distribution in HIS mice. There were also difference in the proportion of expressing cells when considering blood samples from HIS mice and from HDs. Our analysis of the CD57 and KLRG1 senescence markers generated opposing results. A low frequency of CD57 expression was observed for hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells in all tissues from BRGSF-A2 HIS mice; the frequency was significantly higher in the BM than in the spleen and/or blood. In contrast, high frequencies of KLRG1-expressing cells were seen in all tissues—particularly in BM hCD8⁺ T cells, relative to PBMCs. This discrepancy between CD57 and KLRG1 expression observed here was also found in literature studies of human blood samples.⁶⁹ A more specific analysis of the effector T cell subsets would have been useful for refining the senescence profile. However, effector T cell counts are very low in the BRGSF-A2 HIS model. We were therefore unable to directly compare the effector T cell subsets in blood samples from the HIS mice and HDs. The frequency of CD57-expressing T_N and T_M cells was negligible in the BRGSF-A2 HIS model and in blood samples from HDs—confirming the human-like development of the T cell compartment in these mice. A different picture emerged for KLRG1; the proportion of KLRG1-expressing T_N cells in the blood was higher for BRGSF-A2 HIS mice than for HDs. In contrast, we found lower proportions of KLRG1-expressing memory hCD8⁺ T cells in blood from the BRGSF-A2 HIS mouse than in donor blood,

and did not see an interspecies difference for memory hCD4⁺ T cells—suggesting that the BRGSF-A2 HIS mouse's T_N compartment has a distinctive phenotype. Although human T_N barely express KLRG1, Marcolino et al.⁷⁰ demonstrated that a substantial proportion of human cord blood T_N do express this marker. Naïve KLRG1⁺ T cells proliferate normally, thus revealing an unexpected heterogeneous human T cell population in newborns. We evaluated whether the humanization in neonates may introduce a bias by generating immune cells in an immature and inflammatory environment and/or whether it was due to the intrinsic properties of the BRGSF-A2 model. We compared two HIS mouse production standards, namely, NSG-HIS mice generated with young adults vs. BRGSF-A2 HIS mice generated in neonates. High percentage of KLRG1 expressing cells was observed in both BRGSF-A2 and NSG naïve hCD4⁺ T cell compartment (data not shown). The high proportion of KLRG1-expressing T_N in the BRGSF-A2 HIS mouse might be associated with the use of hematopoietic stem and progenitor cells from human umbilical cord blood in neonates for the humanization process; it might reflect immaturity, rather than senescence. Alternately, the lack of human MHC class II by the mouse thymic epithelium may favor such specific phenotype of naïve hCD4⁺ T cells. Unfortunately, no data are available in thymic tissue/HSC transplantation models to address this hypothesis. Importantly, KLRG1 expression on naïve hCD4⁺ T cells did not appear to preclude the normal differentiation of T_N into memory and effector T cells and it was also observed (albeit at a lesser extent) on hCD8⁺ T cells. Taken as a whole, our results indicate that T cells in BRGSF-A2 HIS mice exhibit a limited senescence profile (as assessed by CD57) on hCD8⁺ T cells, although KLRG1 expression was unexpectedly observed for naïve T cells.

Regarding the expression of exhaustion markers, we found high proportions of PD-1-expressing T cells among PBMCs, splenocytes, and SCAT cells in HIS mice. In the BM, PD-1 expression was nearly constitutive, and the frequency of expressing cells differed significantly from that observed in PBMCs and splenocytes. Higher percentages of TIGIT-expressing hCD4⁺ T cells were observed in the BM, relative to splenocytes and/or PBMCs. These differences in frequency were partly due to the tissue-specific distribution of naïve, memory, and effector T cells. Furthermore, these markers were more frequently expressed by memory T cell subsets recovered from the BM than by the corresponding cells from blood and the spleen. When comparing T cell profiles in the blood of HIS mice and HDs, the frequencies of PD-1-expressing T cells were generally similar.⁴⁰ Simultaneously, the frequency of TIGIT-expressing hCD4⁺ T cells was lower in BRGSF-A2 HIS mice than in HDs; a similar trend was observed for hCD8⁺ T cells. We found that memory hCD4⁺ T cells (but not memory CD8⁺ T cells) in BRGSF-A2 HIS mice had a mixed phenotype, with a relatively high proportion of PD-1-expressing cells and a relatively low proportion of TIGIT-expressing cells. This difference presumably reflects variation in memory T cell differentiation in the two models but also confirmed that PD-1 and TIGIT are not necessarily regulated in the same way. Overall, we showed that the exhaustion process in BRGSF-A2 mice is quite similar to that that observed in human CD8⁺ T cells and (albeit to a lesser extent) memory CD4⁺ T cells.

We next compared PD-1 expression on T cells with PD-L1 expression on myeloid cells. PD-L1 expression differed as a function of the myeloid subset and the tissue considered. Our analysis prompted several conclusions: (i) the analysis of the frequencies of PD-L1 expressing cells in the blood may not directly reflect the ligand's physiological frequencies in lymphoid tissues; (ii) the cell-specific expression of PD-L1 also raises the question of whether the capacity to induce exhaustion depends on the myeloid populations interacting with the PD-1⁺ T cells; and (iii) the constitutive expression of PD-1 in some tissues (such as the BM and, to a lesser extent, SCAT) suggests that anti-PD-1 therapies may have local toxicity. However, T cells residing in the BM exhibited a high frequency of PD-1 and TIGIT co-expression, indicating that these cells are highly (and potentially irreversibly^{71,72}) exhausted. The high frequency of PD-1-expressing cells in SCAT from the BRGSF-A2 HIS mouse (as observed in human samples) also provides a valuable tool for studying the impact of anti-PD-1 therapies on adipose tissue; the latter is currently attracting renewed interest with regard to its metabolic and immune functions.^{44,73,74} Finally, we confirm the long-lasting human chimerism, T cell compartment being preserved in aged animals, although physiological changes associated with ageing were observed (decreased proportion of T_N CD8⁺ T cells; increased proportion of PD-1 expressing cells among effector T cells). The decrease in the number of total hCD45⁺ that it is mainly due to gradual human B cell loss is commonly described in HIS mice.⁷⁵ Additionally, we confirmed that administration of anti-PD1 treatment did not interfere with human chimerism and, as expected in the absence of overt stimulation, did not induce major changes in T cell differentiation and senescence phenotype.

In conclusion, the development of suitable small-animal models (like the BRGSF-A2 HIS mouse) that recapitulate human senescence and exhaustion profiles in vivo should facilitate the analysis of the mechanisms regulating the expression of immune checkpoints and senescence markers and the impact of these pathways on immune response to tumors, chronic infections, and viral latency.⁵⁵ It has already been shown that manipulating multiple inhibitory pathways is feasible, with the combined targeting of the TIM-3 and PD-1 pathways in mice⁷⁶ and the PD-1 and CTLA-4 pathways in patients with advanced melanoma.⁷⁷ From basic scientific perspective, both exhaustion and senescence are controlled by active signaling processes that might be interdependent.^{78,79} One can hypothesize that the exhaustion processes can prevent the development of senescence and may thus constitute a regulatory mechanism rather than a dysfunction. The BRGSF-A2 HIS model may constitute a highly relevant model for addressing these aspects. In general, the BRGSF-A2 HIS mouse appears to be both a promising preclinical tool for assessing the efficacy of immunotherapies (such as anti-immune checkpoint Abs) and a valuable experimental model for fundamental studies.

AUTHORSHIP

L.L. and S.H. performed the experiments and the subsequent analyses; L.L., O.L., R.L.G., N.L., and C.B. designed the experiments; N.L., J.D.S., F.P., and M.L.A. provided the access to the HIS mouse model;

L.L., N.L. and C.B. analyzed the data; L.L., N.L., and C.B. wrote the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the animal staff for expert handling of the animals, and Francis Relouzat for the irradiation process. Laura Labarthe was funded by the *Association Nationale de la Recherche et de la Technologie* (ANRT, the French National Research and Technology Transfer Association). The work comparing data from human blood donors and the HIS mice was funded by the *Agence Nationale de Recherche sur le Sida* (ANRS, the French National AIDS Research Agency; reference: 16114) and supported by Gilead incorporation.

DISCLOSURE

L.L. and N.L. are employees of GenOway.

ORCID

Christine Bourgeois  <https://orcid.org/0000-0003-1146-6087>

REFERENCES

1. Akkina R. New generation humanized mice for virus research: comparative aspects and future prospects. *Virology*. 2013;435:14-28.
2. Rongvaux A, Takizawa H, Strowig T, et al. Human hemato-lymphoid system mice: current use and future potential for medicine. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:635-674.
3. Manz MG, Di Santo JP. Renaissance for mouse models of human hematopoiesis and immunobiology. *Nat Immunol*. 2009;10:1039-1042.
4. Leung C, Chijioko O, Gujer C, et al. Infectious diseases in humanized mice. *Eur J Immunol*. 2013;43:2246-2254.
5. Shultz LD, Brehm MA, Garcia-Martinez JV, Greiner DL. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nat Rev Immunol*. 2012;12:786-798.
6. Legrand N, Weijer K, Spits H. Experimental models to study development and function of the human immune system in vivo. *J Immunol*. 2006;176:2053-2058.
7. Ito R, Takahashi T, Katano I, Ito M. Current advances in humanized mouse models. *Cell Mol Immunol*. 2012;9:208-214.
8. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, et al. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*. 2002;100:3175-3182.
9. Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol*. 2005;174:6477-6489.
10. Legrand N, Huntington ND, Nagasawa M, et al. Functional CD47/signal regulatory protein alpha (SIRP(alpha)) interaction is required for optimal human T- and natural killer- (NK) cell homeostasis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:13224-13229.
11. Traggiai E, Chicha L, Mazzucchelli L, et al. Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science*. 2004;304:104-107.
12. Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, et al. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor chain^{null} mice. *Blood*. 2005;106:1565-1573.
13. Strowig T, Rongvaux A, Rathinam C, et al. Transgenic expression of human signal regulatory protein alpha in Rag2-/-gamma(c)-/- mice improves engraftment of human hematopoietic cells in humanized mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:13218-13223.

14. Gimeno R, Weijer K, Voordouw A, et al. Monitoring the effect of gene silencing by RNA interference in human CD34+ cells injected into newborn RAG2-/- gammaC-/- mice: functional inactivation of p53 in developing T cells. *Blood*. 2004;104:3886-3893.
15. Takenaka K, Prasolava TK, Wang JCY, et al. Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. *Nat Immunol*. 2007;8:1313-1323.
16. Li Y, Mention J-J, Court N, et al. A novel Flt3-deficient HIS mouse model with selective enhancement of human DC development. *Eur J Immunol*. 2016;46:1291-1299.
17. Lopez-Lastra S, Masse-Ranson G, Fiquet O, et al. A functional DC cross talk promotes human ILC homeostasis in humanized mice. *Blood Adv*. 2017;1:601-614.
18. Billerbeck E, Barry WT, Mu K, Dorner M, Rice CM, Ploss A. Development of human CD4+FoxP3+ regulatory T cells in human stem cell factor-, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-, and interleukin-3-expressing NOD-SCID IL2R null humanized mice. *Blood*. 2011;117:3076-3086.
19. Shultz LD, Saito Y, Najima Y, et al. Generation of functional human T-cell subsets with HLA-restricted immune responses in HLA class I expressing NOD/SCID/IL2r gamma(null) humanized mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:13022-13027.
20. Legrand N, Spits H. Human T-cell biology in a mouse environment. In: Poluektova L, Garcia J, Koyanagi Y, Manz M, Tager A, eds. *Humanized Mice for HIV Research*. New York, NY: Springer; 2014:109-125.
21. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, et al. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med*. 1998;188:2205-2213.
22. Velu V, Titanji K, Zhu B, et al. Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature*. 2009;458:206-210.
23. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*. 2006;443:350-354.
24. Das A, Hoare M, Davies N, et al. Functional skewing of the global CD8 T cell population in chronic hepatitis B virus infection. *J Exp Med*. 2008;205:2111-2124.
25. Urbani S, Amadei B, Tola D, et al. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J Virol*. 2006;80:11398-11403.
26. Nakamoto N, Cho H, Shaked A, et al. Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. *PLoS Pathog*. 2009;5:e1000313.
27. Islam SA, Hay CM, Hartman KE, et al. Persistence of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T-lymphocyte clones in a subject with rapid disease progression. *J Virol*. 2001;75:4907-4911.
28. Lee PP, Yee C, Savage PA, et al. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat Med*. 1999;5:677-685.
29. Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood*. 2003;101:2711-2720.
30. Henson SM, Akbar AN. KLRG1—more than a marker for T cell senescence. *Age*. 2009;31:285-291.
31. Oxenius A, Zinkernagel RM, Hengartner H. Comparison of activation versus induction of unresponsiveness of virus-specific CD4+ and CD8+ T cells upon acute versus persistent viral infection. *Immunity*. 1998;9:449-457.
32. Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune checkpoint blockade in cancer therapy. *J Clin Oncol*. 2015;33:1974-1982.
33. Zitvogel L, Kroemer G. Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2012;1:1223-1225.
34. Swaika A, Hammond WA, Joseph RW. Current state of anti-PD-L1 and anti-PD-1 agents in cancer therapy. *Mol Immunol*. 2015;67:4-17.
35. Heuts F, Gavier-Widen D, Carow B, Juarez J, Wigzell H, Rottenberg ME. CD4+ cell-dependent granuloma formation in humanized mice infected with mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110:6482-6487.
36. Seung E, Dudek TE, Allen TM, Freeman GJ, Luster AD, Tager AM. PD-1 blockade in chronically HIV-1-infected humanized mice suppresses viral loads. *PLoS One*. 2013;8:e77780.
37. Ma S-D, Xu X, Jones R, et al. PD-1/CTLA-4 blockade inhibits Epstein-Barr virus-induced lymphoma growth in a cord blood humanized-mouse model. *PLoS Pathog*. 2016;12:e1005642.
38. Ashizawa T, Iizuka A, Nonomura C, et al. Antitumor effect of programmed death-1 (PD-1) blockade in humanized the NOG-MHC double knockout mouse. *Clin Cancer Res*. 2017;23:149-158.
39. Han S-J, Glatman Zaretsky A, Andrade-Oliveira V, et al. White adipose tissue is a reservoir for memory T cells and promotes protective memory responses to infection. *Immunity*. 2017;47:1154-1168.
40. Damouche A, Pourcher G, Pourcher V, et al. High proportion of PD-1-expressing CD4+ T cells in adipose tissue constitutes an immunomodulatory microenvironment that may support HIV persistence. *Eur J Immunol*. 2017;47:2113-2123.
41. Santo Di, P J, Müller W, Guy-Grand D, Fischer A, Rajewsky K. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:377-381.
42. Mackarehshchian K, Hardin JD, Moore KA, Boast S, Goff SP, Lemischka IR. Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity*. 1995;3:147-161.
43. Pascolo S, Bervas N, Ure JM, Smith AG, Lemonnier FA, Péronau B. HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice. *J Exp Med*. 1997;185:2043-2051.
44. Damouche A, Lazure T, Avettand-Fènoël V, et al. Adipose tissue is a neglected viral reservoir and an inflammatory site during chronic HIV and SIV infection. *PLoS Pathog*. 2015;11:e1005153.
45. Sathaliyawala T, Kubota M, Yudanin N, et al. Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity*. 2013;38:187-197.
46. Clark P, Normansell DE, Innes DJ, Hess CE. Lymphocyte subsets in normal bone marrow. *Blood*. 1986;67:1600-1606.
47. Bofill M, Janossy G, Lee CA, et al. Laboratory control values for CD4 and CD8 T lymphocytes. Implications for HIV-1 diagnosis. *Clin Exp Immunol*. 1992;88:243-252.
48. Appay V, van Lier RAW, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A*. 2008;73:975-983.
49. Larbi A, Fulop T. From “truly naïve” to “exhausted senescent” T cells: when markers predict functionality. *Cytometry A*. 2014;85:25-35.
50. Saule P, Trauet J, Dutriez V, Lekeux V, Dessaint J-P, Labalette M. Accumulation of memory T cells from childhood to old age: central and effector memory cells in CD4(+) versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8(+) compartment. *Mech Ageing Dev*. 2006;127:274-281.
51. Di Rosa F, Pabst R. The bone marrow: a nest for migratory memory T cells. *Trends Immunol*. 2005;26:360-366.
52. Strioga M, Pasukoniene V, Characiejus D. CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. *Immunology*. 2011;134:17-32.
53. Di Rosa F, Watts TH. Editorial: bone marrow T cells at the center stage in immunological memory. *Front Immunol*. 2016;7:596.
54. Lepone LM, Donahue RN, Grenga I, et al. Analyses of 123 peripheral human immune cell subsets: defining differences with age and between healthy donors and cancer patients not detected in analysis of standard immune cell types. *J Circ Biomarkers*. 2016;5:5.

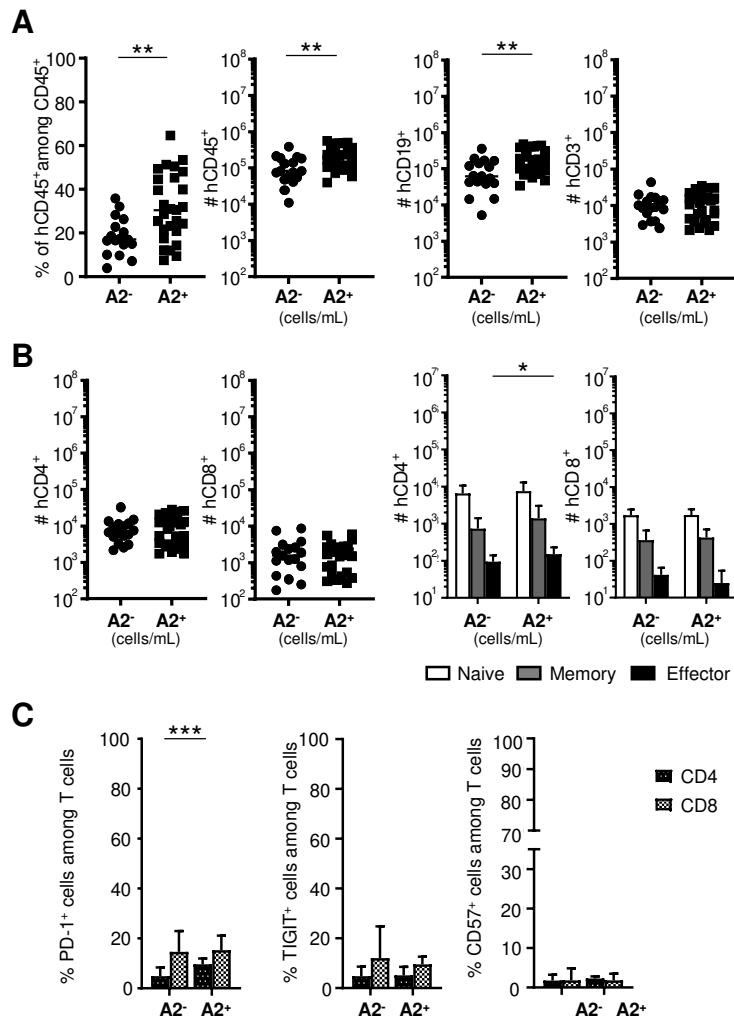
55. Wang M, Yao L-C, Cheng M, et al. Humanized mice in studying efficacy and mechanisms of PD-1-targeted cancer immunotherapy. *FASEB J*. 2018;32:1537-1549.
56. Capasso A, Lang J, Pitts TM, et al. Characterization of immune responses to anti-PD-1 mono and combination immunotherapy in hematopoietic humanized mice implanted with tumor xenografts. *J Immunother Cancer*. 2019;7:37.
57. Yan Y, Kumar AB, Finnes H, et al. Combining immune checkpoint inhibitors with conventional cancer therapy. *Front Immunol*. 2018;9:1739.
58. Lan P, Tonomura N, Shimizu A, Wang S, Yang YG. Reconstitution of a functional human immune system in immunodeficient mice through combined human fetal thymus/liver and CD34+ cell transplantation. *Blood*. 2006;108:487-492.
59. Karpel ME, Boutwell CL, Allen TM. BLT humanized mice as a small animal model of HIV infection. *Curr Opin Virol*. 2015;13:75-80.
60. Greenblatt MB, Vbrancac V, Tivey T, et al. Graft versus host disease in the bone marrow, liver and thymus humanized mouse model. *PLoS One*. 2012;7:e44664.
61. Brown ME, Zhou Y, McIntosh BE, et al. A humanized mouse model generated using surplus neonatal tissue. *Stem Cell Reports*. 2018;10:1175-1183.
62. Li Y, Masse-Ranson G, Garcia Z, et al. A human immune system mouse model with robust lymph node development. *Nat Methods*. 2018;15:623-630.
63. Masse-Ranson G, Dusséaux M, Fiquet O, et al. Accelerated thymopoiesis and improved T-cell responses in HLA-A2/-DR2 transgenic BRGS-based human immune system mice. *Eur J Immunol*. 2019;49:954-965.
64. Halkias J, Yen B, Taylor KT, et al. Conserved and divergent aspects of human T-cell development and migration in humanized mice. *Immunol Cell Biol*. 2015;93:716-726.
65. Li Y, Teteloshvili N, Tan S, et al. Humanized mice reveal new insights into the thymic selection of human autoreactive CD8+ T cells. *Front Immunol*. 2019;10:63.
66. Choi EY, Park WS, Jung KC, et al. Thymocytes positively select thymocytes in human system. *Hum Immunol*. 1997;54:15-20.
67. Melichar HJ, Ross JO, Taylor KT, Robey EA. Stable interactions and sustained TCR signaling characterize thymocyte-thymocyte interactions that support negative selection. *J Immunol*. 2015;194:1057-1061.
68. Frommer F, Waisman A. B cells participate in thymic negative selection of murine auto-reactive CD4+ T cells. *PLoS One*. 2010;5:e15372.
69. Ibegbu CC, Xu Y-X, Harris W, Maggio D, Miller JD, Kourtis AP. Expression of killer cell lectin-like receptor G1 on antigen-specific human CD8+ T lymphocytes during active, latent, and resolved infection and its relation with CD57. *J Immunol*. 2005;174:6088-6094.
70. Marcolino I, Przybylski GK, Koschella M, et al. Frequent expression of the natural killer cell receptor KLRG1 in human cord blood T cells: correlation with replicative history. *Eur J Immunol*. 2004;34:2672-2680.
71. Pauken KE, Wherry EJ. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends Immunol*. 2015;36:265-276.
72. Jenkins RW, Barbie DA, Flaherty KT. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Br J Cancer*. 2018;118:9-16.
73. Smith AG, Sheridan PA, Tseng RJ, Sheridan JF, Beck MA. Selective impairment in dendritic cell function and altered antigen-specific CD8+ T-cell responses in diet-induced obese mice infected with influenza virus. *Immunology*. 2009;126:268-279.
74. Desruisseaux MS, Nagajothi METrujillo, Tanowitz HB, Scherer PE. Adipocyte, adipose tissue, and infectious disease. *Infect Immun*. 2007;75:1066-1078.
75. Lang J, Kelly M, Freed BM, et al. Studies of lymphocyte reconstitution in a humanized mouse model reveal a requirement of T cells for human B cell maturation. *J Immunol*. 2013;190:2090-2101.
76. Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK, Anderson AC. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med*. 2010;207:2187-2194.
77. Fourcade J, Sun Z, Benallaoua M, et al. Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. *J Exp Med*. 2010;207:2175-2186.
78. Akbar AN, Beverley PCL, Salmon M. Will telomere erosion lead to a loss of T-cell memory. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:737-743.
79. Akbar AN, Henson SM. Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:289-295.

SUPPORTING INFORMATION

Additional information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Labarthe L, Henriquez S, Lambotte O, et al. Exhaustion and senescence marker profiles on human T cells in BRGSF-A2 humanized mice resemble those in human samples. *J Leukoc Biol*. 2019;1-16. <https://doi.org/10.1002/JLB.5HI1018-410RR>

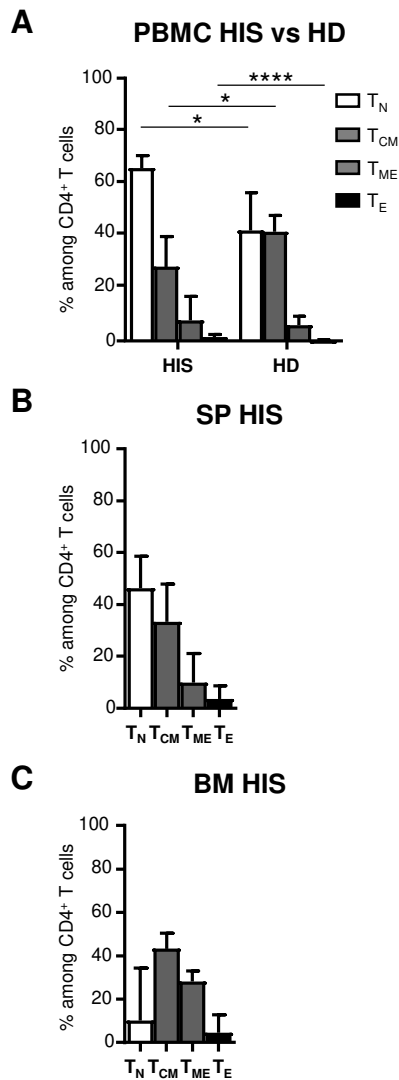
Figure S1



Supplemental figure S1. Impact of the HLA-A2 status of the donor on the T cell compartment in BRGSF-A2 HIS mice

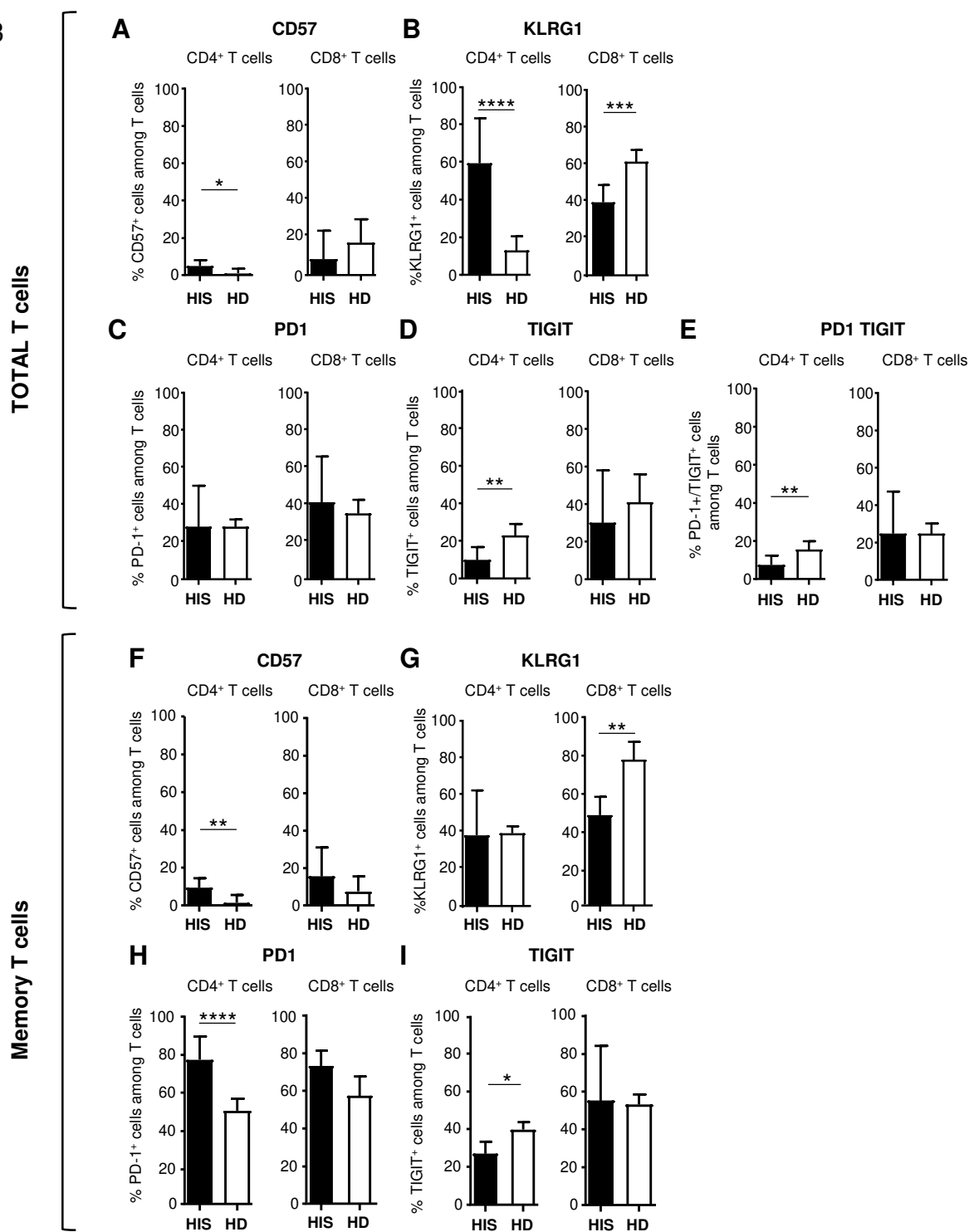
(A) Frequency and total number of hCD45⁺, hCD19⁺, hCD3⁺ cells measured among PBMCs from 24- to 28-week-old BRGSF-A2 HIS HLA-A2 (n=17) or non-HLA-A2 matching (n=27) mice. Counts in blood are expressed in cells per mL. Each dot represents one HIS mouse, and the median value is shown. (B) T cell compartment. Total number (left) and the proportions of T cell subsets (right): T_N (open symbols), memory T cells (grey symbols) and effector T cells (black symbols) of hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells in PBMCs from HIS mice. Median (left) and median and IQR are indicated (C) Frequency of PD-1, TIGIT and CD57-expressing hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells collected from PBMCs HIS mice. The median and IQR are indicated. Data for BRGSF-A2 HIS mice are composite data from 17 non-HLA A2 matching mice generated from two donors and 27 HLA-A2 matching mice generated from three donors. Statistically significant differences (as determined in a non-parametric Mann-Whitney test) are indicated as follows: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure S2



Supplemental Figure S2. Characterization of T_{CM} and T_{EM} hCD4 fractions in the blood, spleen and BM of BRGSF-A2 HIS mice and in blood from HDs. Frequencies of T_N, T_{CM}, T_{EM} and T_E hCD4⁺ cells in blood (A), spleen (B) and BM (C) preparations from 16- to 19-week-old BRGSF-A2 HIS mice (n=15) and in blood from HDs (A). Note that the gating strategy is based on the expression of CD45RO, CCR7, CD27, and CD28, as follows: T_N (open symbols): CD27⁺CD45RO⁻CCR7⁺CD28⁺, memory (grey symbol) T_{CM}: CD27⁺CD45RO⁺, T_{EM}: CD27⁻CD45RO⁺ and T_E (black symbols): CD27⁻CD45RO⁻). Graphs showing the relative distribution of hCD4⁺ T cells as a function of their differentiation status. The median values and IQR are indicated. Data for HIS mice are composite data from four independent experiments, including 15 mice generated from four donors. Ten HDs were studied. The legends for your supplemental data cannot be included in the main article text but must be included with the figures themselves.

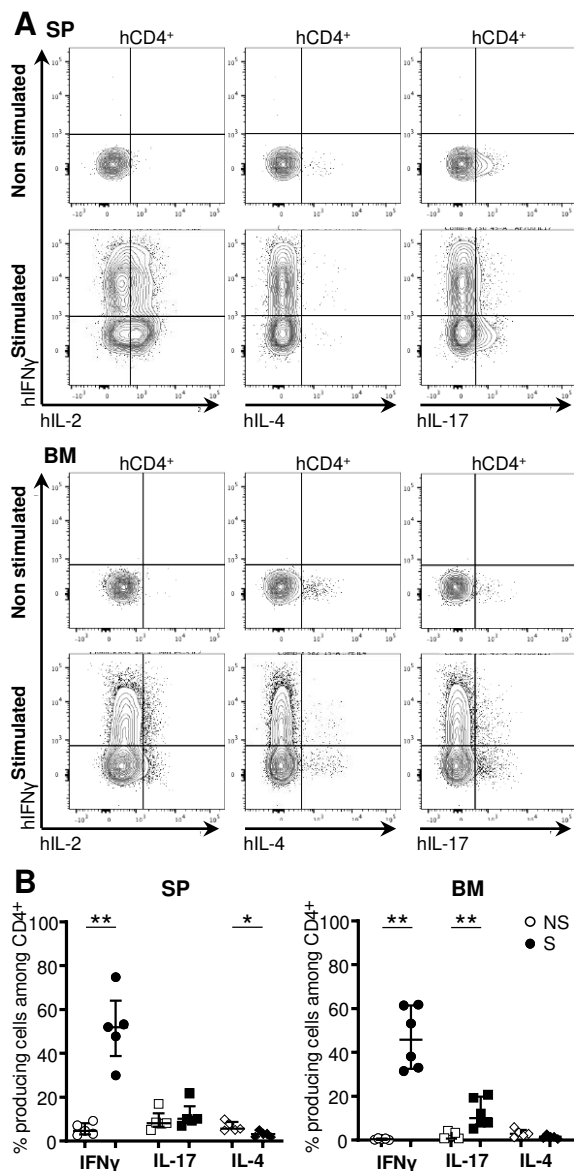
Figure S3



Supplemental Figure S3. Direct comparison of the senescence (CD57, KLRG1) and exhaustion (PD-1, TIGIT) profiles in human T cells in blood from BRGSF-A2 HIS mice and from HDs

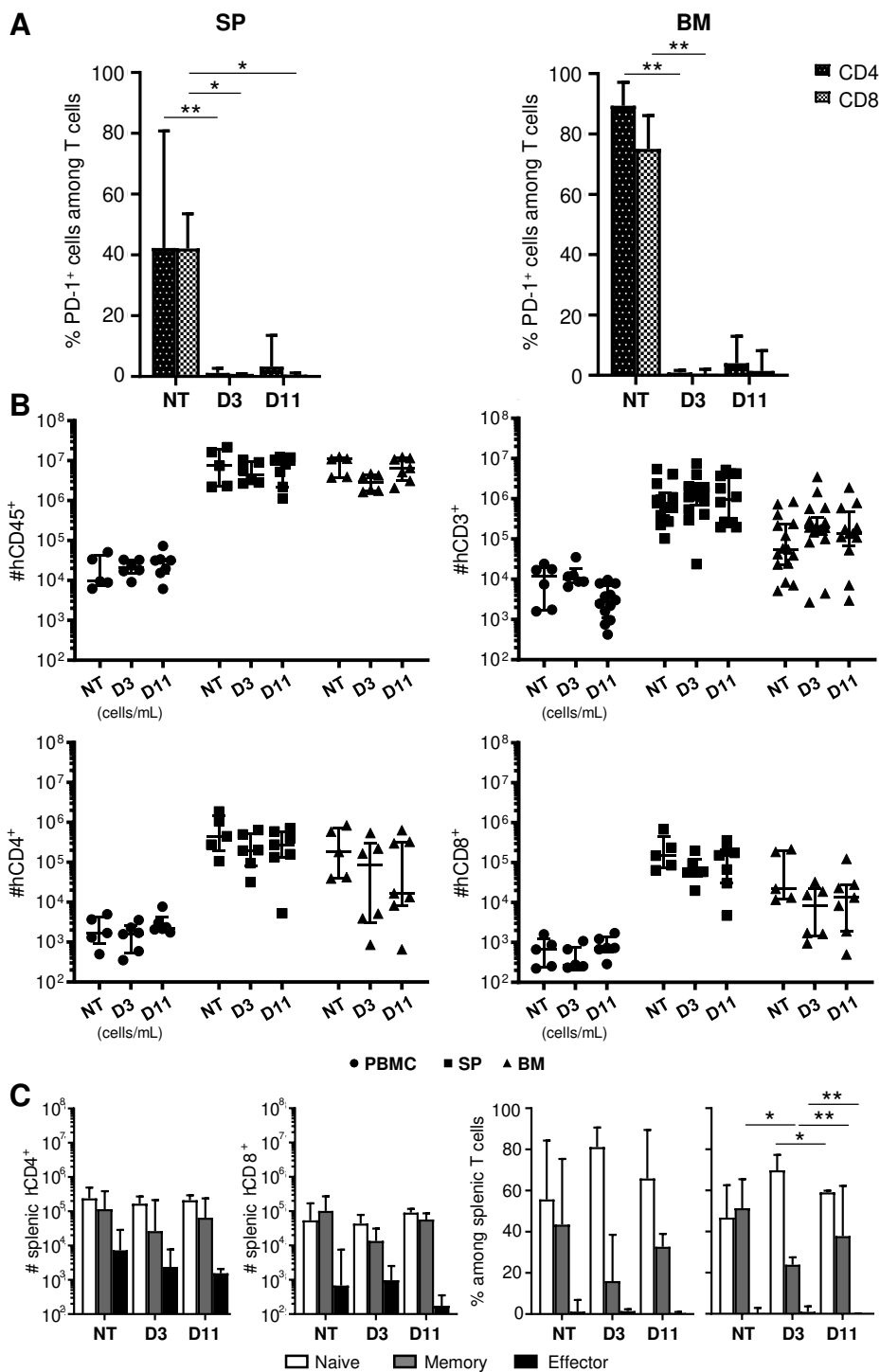
To simplify the comparison of HIS and HD data, data provided elsewhere in the manuscript (Figures 3 to 6) were pooled. This figure shows the frequency of cells expressing CD57 (A, F), KLRG1 (B, G), PD-1 (C, H), TIGIT (D, I), and co-expressing PD-1 and TIGIT (E) among total (A-E) or memory (F-I) hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells in the blood of 16- to 19-week-old BRGSF-A2 HIS mice and in blood from HDs. The median (IQR) values are indicated. Data in HIS mice are composite data from four independent experiments, including 15 mice generated from four donors. Ten HDs were studied. Statistically significant differences (as determined in a non-parametric Mann-Whitney test) are indicated as follows: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Figure S4



Supplemental figure S4. Effective cytokine production of hCD4⁺ T cells in lymphoid tissues from BRGSF-A2 HIS mice after in vitro stimulation

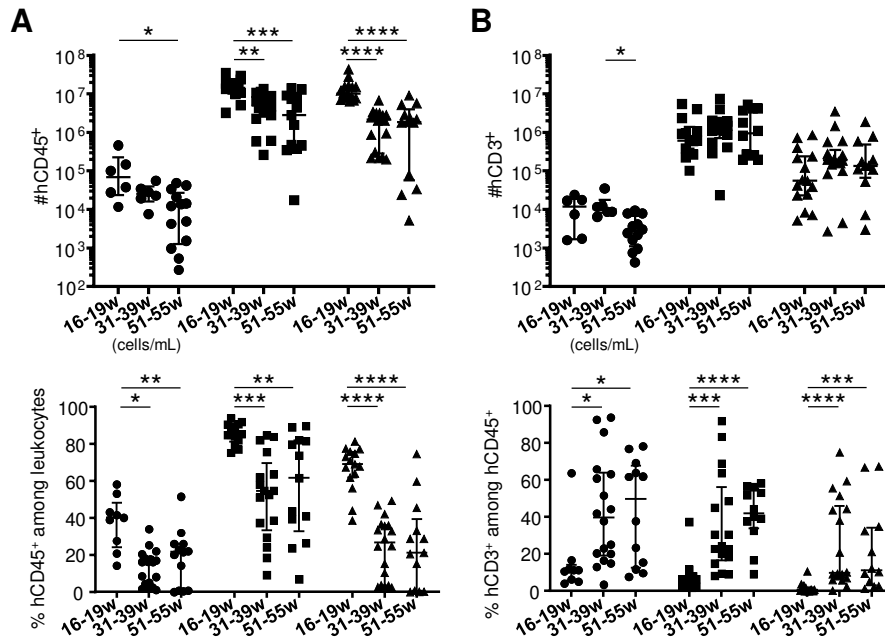
Cytokine content in hCD4 T cells was evaluated following 16 hours in vitro stimulation with PMA (100 ng/ml), Ionomycin (500 ng/ml) in the presence of Brefeldin A (1 μ g/ml). (A, B) IFN γ , IL-2, IL-4 and IL-17 intracellular content by hCD4⁺, following 16 hours in vitro stimulation collected from splenocytes and BM cells (1 femur) of 45-to-53-week-old BRGSF-A2 HIS mice. (A) Representative contour plots showing the gating strategy used to identify cytokines producing hCD4⁺ in spleen and BM. (B) Graphs showing the frequency of T cells containing cytokines among splenocytes and BM cells of HIS mice. NS (open symbols): non stimulated ; S (black symbols) : stimulated. The median and IQR are indicated. Data for HIS mice are composite data from one experiment, including 6 mice generated from three donors. Statistically significant differences (as determined in a non-parametric Mann-Whitney test) are indicated as follows: *p<0.05, **p<0.01.



Supplemental figure S5. Impact of anti-PD-1 administration on human cell engraftment and T cell differentiation profiles and phenotypes in the BRGSF-A2 HIS mice at steady state

18- to 21- week old BRGSF-A2 HIS mice were treated with anti-PD1 treatment (4 ip injections in 10 days, at the dose of 200 μ g/ injection) (n=7) or PBS injections (n=7). The impact of the in vivo PD-1 blockade was studied in PBMCs, splenocytes and BM cells at day 3 (n=7) or day 11 (n=8) after the last injection. (A) Proportion of cells on which PD-1 expression was detected among hCD4⁺ and hCD8⁺ in SP and BM. (B) Total number of hCD45⁺, hCD3⁺, hCD4⁺ and hCD8⁺ cells measured among PBMCs, splenocytes and BM cells. Counts in blood are expressed in cells per mL. Each dot represents one HIS mouse, and the median and IQR are shown. (C) Total number (left) and frequency (right) of T_N (open symbols), T_M cells (grey symbols) and T_E cells (black symbols) hCD4 T cells and hCD8 T cells in splenocytes from HIS mice. The median and IQR are indicated. Data for BRGSF-A2 HIS mice are composite data from one experiment, including 22 mice generated from two donors. Statistically significant differences (as determined in a non-parametric Kruskal-Wallis test) are indicated as follows: *p<0.05, **p<0.01.

Figure S6



Supplemental figure S6. Human engraftment and stable T cell compartment in the blood and lymphoid tissues in 16-to-55-week-old BRGSF-A2 HIS mice

Total number and frequency of hCD45⁺ (A) and hCD3⁺ (B) cells measured among PBMCs, splenocytes and BM cells (1 femur) from 16 to 19 (n=15), 31 to 39 (n=18) and 51 to 55 (n=13) week-old female BRGSF-A2 HIS mice. Counts in blood are expressed in cells per mL. Each dot represents one HIS mouse, and the median values and IQR are shown. Data for HIS mice are composite data from nine independent experiments, including 46 mice generated from twenty-two donors. Statistically significant differences (as determined in a non-parametric Kruskal-Wallis test) are indicated as follows: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

EDITORIAL COMMENTARY

Making HIS mice more human-like

Human immune system (HIS) humanized mouse models enable rigorous *in vivo* studies of human immune cell function within the confines of a convenient small animal host. Various iterations of HIS mice have been successfully used in a number of research fields, including transplant immunology, infectious disease pathology, and increasingly, oncology.^{1,2} In recent years, the human cell and tissue sources used for humanization have come under more intense scrutiny, due to ethical considerations surrounding research use of fetal tissue (which is commonly used in “bone marrow, liver, thymus” [“BLT”]/NeoThy-type HIS humanized mouse models) and due to the potential phenotypic and functional differences of tissues at different stages of development represented in these models.^{3,4} An investigator’s choice of a particular immune-deficient host strain, independent of the humanizing cells/tissues, directly influences the character of the resulting chimeric immune cells—a fact that is often overlooked in HIS mouse studies. Certain mouse strains may also work synergistically with engrafted tissues to influence the quality and character of humanization within the animals.

Immune-deficient mouse strains have become more advanced since the first descriptions of nonobese diabetic (NOD)⁵ and severe combined immunodeficiency (SCID)⁶ mice in the early 1980s. Pioneering work with engraftment of human peripheral blood, and fetal hematopoietic cells and tissues into these first-generation strains began to show the overall research potential of mice reconstituted with human immune cells. However, a new era of HIS mouse-based research commenced in the 2000s, with the key development of immune-deficient mice bearing IL2 receptor common gamma chain (IL2R γ) mutations/knockouts. This targeted disruption of a crucial cytokine signaling pathway resulted in complete removal of not only mouse T and B cells, but NK cells as well, enabling robust engraftment of human tissues and longer-term experimentation within the humanized hosts.⁷

Since then, multiple versions of immune-deficient mice with IL2R γ defects have been developed by various groups and are now commercially available on a variety of genetic backgrounds, including the NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG), NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Sug}/ShiJic (NOG), and BALB/c-Rag2^{null} IL2r γ ^{null} BRG-based strains.⁸ Newer iterations of immune-deficient hosts, such as the M-CSF^{h/h} IL-3/GM-CSF^{h/h} hSIRP α^g TPO^{h/h} Rag2^{-/-} Il2rg^{-/-} (MISTRG),⁹ have been created by introducing multiple modifications, including addition of human-specific cytokines and growth factors necessary for more robust development of specific immune cell subsets, for example, dendritic cells and NK cells. The relationship

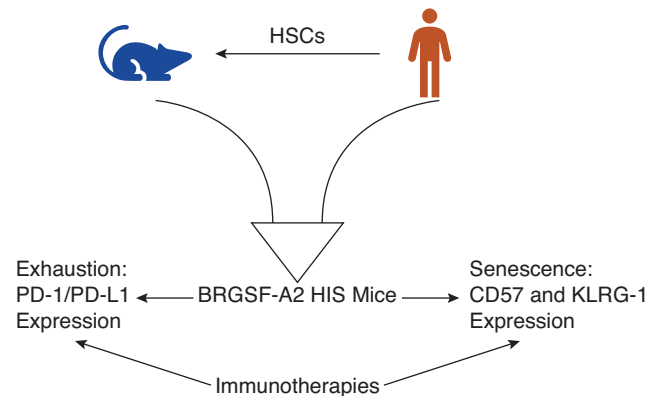


FIGURE 1 Exhaustion and senescence marker profiles on human T cells in BRGSF-A2 humanized mice resemble those in human samples, by Labarthe et al.

between mouse host and humanizing tissues is acutely apparent with BLT/NeoThy type mice, where human thymus tissue is implanted under the mouse kidney capsule, forming a thymic organoid, whereon developing thymocytes are positively and negatively selected on human MHC. An alternative to the surgical implantation of thymus tissue is to engineer human leukocyte antigen (HLA) genes into immune-deficient strains, with the intent of eliminating the requirement for human thymic tissue transplantation, as the humanized mouse thymus and peripheral tissues will enable the T cells to engage with human MHC-restricted peptides during development and as mature cells. Other modifications of immune-deficient strains in these models, such as KIT mutations that allow human hematopoietic engraftment without the need for irradiation and the associated adverse effects,¹⁰ have further ushered in a new era of discovery.

In this issue of the *Journal of Leukocyte Biology*, Paris-Sud University researchers Laura Labarthe, Christine Bourgeois, and colleagues humanize and perform in-depth characterization of a novel immune-deficient mouse strain, Balb/c Rag2^{KO} IL2rg^{KO} Sirp α^{NOD} Flk2^{KO} HLA-A2^{HHD} (“BRGSF-A2”), to evaluate its utility for use in oncology immunotherapy studies.

The authors first generated BRGSF-A2 mice from parental strains by incorporating an HLA-A2 transgene to achieve human MHC restriction following CD34⁺ human cord blood hematopoietic cell humanization (Fig. 1). In the experiments detailed in their publication, human chimerism was confirmed in the resultant HIS mice by flow

cytometric staining for mouse vs human CD45, human CD3, CD4, CD8, CD19, CD11c, and HLA-DR. Importantly, the human immune cells persisted for over 51 wk in the animals. The differentiation status of lymphocytes as well as their senescence and exhaustion profiles were monitored via a wide array of markers including CD45RO, CD27, CCR7, CD28, PD-1, TIGIT, CD57, and KLRG1. Myeloid cell characterization was evaluated with markers, including CD33, CD16, CD14, CD11c, CD123, CD303, and HLA-DR. This extensive flow cytometric study presents a detailed picture of many cell subsets of interest to researchers who actively use and optimize HIS models.

The investigators showed that BRGSF-A2 HIS mouse blood and lymphoid tissues exhibit high levels of human leukocyte chimerism. This chimerism was significantly higher in female BRGSF-A2 mice, in PBMCs, splenocytes, and bone marrow (BM) cell populations when compared with male mice. A second, important finding was that the female BRGSF-A2 mouse blood, spleen, and BM possessed a “human-like” distribution of memory and naive T cell subsets, illustrating the potential utility of these HIS mice for modeling typical patient responses to therapeutic interventions. While encouraging, one noticeable difference between the cell populations in the study mice compared with human healthy controls was that the mice had a higher proportion of CD4+ naive T cells in the blood vs. human donor peripheral blood. As the study team’s mouse strain was only modified to express human MHC class I, and no MHC class II transgenes, it is unknown whether the lack of class II restriction during T cell development and/or in the periphery influenced these results. The other encouraging results in this manuscript warrant making future iterations of these strains, incorporating additional HLA transgenes, for example, HLA-DRB1. Additionally, future studies comparing the BRGSF-A2 strain to other HLA transgenic animals created on different background strains, such as the NSG-A2¹¹ and the NF-A2,¹² will be important for determining the utility of each model in common research contexts.

In the field of oncology, HIS mice show emerging promise for modeling of human T cell exhaustion and senescence, processes which are associated with tumor immune evasion. Such models are especially relevant for evaluation of novel checkpoint inhibition immunotherapies. Labarthe and colleagues advance this area of research by rigorously characterizing HIS humanized BRGSF-A2 mice T cell exhaustion and senescence profiles for the first time. The BRGF-A2 HIS mice expressed CD57 and KLRG1 at rates similar to human donors, with an inconsequential increase in KLRG1 expression on naive T cells. BRGF-A2 HIS mice and human donors held similar frequencies of PD-1 expression on T cells, albeit with lower frequencies of TIGIT expression on HIS CD4+ T cells. These results, along with the authors’ demonstration of nivolumab-induced PD-1 masking in the model, illustrate the utility of this particular mouse strain for future checkpoint inhibitor studies, and advance the field by creating a more accurate and tractable model of in vivo human immunity.

ORCID

Matthew E. Brown  <https://orcid.org/0000-0003-1836-0218>

John A. Simpson

Matthew E. Brown 

University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, USA

Correspondence

Matthew E. Brown, University of Wisconsin-Madison, 600 Highland Avenue, CSC H4/749, Madison, WI 53792, USA.

Email: brownm@surgery.wisc.edu

REFERENCES

- Shultz LD, Brehm MA, Garcia JV, Greiner DL. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(11):786-798.
- Yao LC, Aryee KE, Cheng M, Kaur P, Keck JG, Brehm MA. Creation of PDX-bearing humanized mice to study immuno-oncology. *Methods Mol Biol.* 2019;1953:241-252.
- Mold JE, Venkatasubrahmanyam SK, Burt TD, et al. Fetal and adult hematopoietic stem cells give rise to distinct T cell lineages in humans. *Science.* 2010;330(6011):1695-1699.
- Brown ME, Zhou Y, McIntosh BE, et al. A humanized mouse model generated using surplus neonatal tissue. *Stem Cell Reports.* 2018;10(4):1175-1183.
- Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu.* 1980;29(1):1-13.
- Dorshkind K, Keller GM, Phillips RA et al. Functional status of cells from lymphoid and myeloid tissues in mice with severe combined immunodeficiency disease. *J Immunol.* 1984;132(4):1804-1808.
- Lan P, Tonomura N, Shimizu A, Wang S, Yang YG. Reconstitution of a functional human immune system in immunodeficient mice through combined human fetal thymus/liver and CD34+ cell transplantation. *Blood.* 2006;108(2):487-492.
- Brehm MA, Cuthbert A, Yang C, et al. Parameters for establishing humanized mouse models to study human immunity: analysis of human hematopoietic stem cell engraftment in three immunodeficient strains of mice bearing the IL2rgamma(null) mutation. *Clin Immunol.* 2010;135(1):84-98.
- Rongvaux A, Willinger T, Martinek J, et al. Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model. *Nat Biotechnol.* 2014;32(4):364-372.
- McIntosh BE, Brown ME, Duffin BM, et al. Nonirradiated NOD.B6.SCID IL2rgamma-/- Kit(W41/W41) (NBSGW) mice support multilineage engraftment of human hematopoietic cells. *Stem Cell Reports.* 2015;4(2):171-180.
- Strowig T, Gurer C, Ploss A, et al. Priming of protective T cell responses against virus-induced tumors in mice with human immune system components. *The Journal of experimental medicine.* 2009;206(6):1423-1434.
- Douam F, Ziegler CGK, Hrebikova G, et al. Selective expansion of myeloid and NK cells in humanized mice yields human-like vaccine responses. *Nature Communications.* 2018;9(1):5031.

How to cite this article: Simpson JA, Brown ME. Making HIS mice more human-like. *J Leukoc Biol.* 2019;1-2. <https://doi.org/10.1002/JLB.5CE1019-262R>

Article 2 : Pharmacokinetics and tissue distribution of Tenofovir, Emtricitabine and Dolutegravir in a murine model humanized for the immune system

Article en préparation pour une soumission dans le journal JAC (Journal of antimicrobial chemotherapy)

L'objectif de ce travail était de **définir, pour la trithérapie choisie** (emtricitabine (FTC), fumarate de ténofovir disoproxil (TDF), dolutegravir (DTG)), **un schéma thérapeutique permettant d'obtenir une concentration plasmatique efficace**, c'est-à-dire dans la zone d'efficacité thérapeutique.

Nous avons étudié les paramètres pharmacocinétiques induits suite à une administration *per os* ou par voie intrapéritonéale des trois molécules dans des souris Balb/c, BRGSF-A2 non humanisées ou humanisées pour le système immunitaire. Ces études ont permis de (i) confirmer la nécessité d'une prise journalière des ARV du fait de leur demi-vie courte, (ii) valider la stratégie *per os*, qui si elle est moins précise en termes de doses journalières reçues, est techniquement plus confortable pour les animaux et l'expérimentateur, (iii) définir les concentrations nécessaires pour chacune des drogues. Pour la voie d'administration choisie (la voie *per os*), nous avons étudié la diffusion tissulaire de ces drogues et prodrogues. Nous avons ainsi confirmé la meilleure pénétration tissulaire du TDF par rapport au FTC et au DTG. Dans le modèle BRGSF-A2, nous retrouvons également la forte pénétration des ARV dans l'intestin, et la faible pénétration de ces molécules dans le cerveau.

Cette étude, prise en charge par la plateforme de pharmacocinétique et pharmacodynamie de l'unité, était un prérequis indispensable à l'établissement d'un modèle d'infection contrôlée par le VIH-1.

**Pharmacokinetics and tissue distribution of Tenofovir, Emtricitabine and Dolutegravir
in a model of mice humanized for the immune system**

**Hélène Gouget* and Laura Labarthe*, Thibaut Gelé, Mariam-Sarah Benzemrane,
Pauline Le Clavez, Nicolas Legrand, Olivier Lambotte, Christine Bourgeois, Roger Le
Grand, Aurélie Barrail-Tran**

Corresponding author

Aurélie Barrail-Tran

Department of Clinical Pharmacy

AP-HP. Université Paris-Saclay, Hôpital Bicêtre

78 rue du Général Leclerc

94270 Le Kremlin-Bicêtre, France

Phone +33 1 45 21 29 64

E-mail aurelie.barrail-tran@aphp.fr

Abstract

Background: Antiretroviral treatments (ART) efficiently control HIV infection, but do not achieve viral eradication. Combination of ART and various immunotherapies are currently considered. To do so, preclinical model such as mouse model humanized for the immune system (HIS) may prove useful.

Objectives: Study the Pharmacokinetics and tissue distribution of Tenofovir, Emtricitabine and Dolutegravir in a mouse strain, used as host in humanisation protocols: the BRGSF-A2 strain.

Methods: TNF, FTC and DTG concentrations were simultaneously measured by a LC-MS/MS method in plasma and tissue samples (including lungs, kidneys, liver, spleen, pancreas, brain, thymus, lymph nodes, caecum, colon, small intestine and adipose tissue). A non-compartmental analysis was performed to estimate the pharmacokinetic parameters.

Results: Concentrations of the three drugs were in the same range of order using the intraperitoneal or oral route of administration. The trough concentrations for the 3 drugs were close to those observed in patients at therapeutic doses. Comparing the tissue penetration factor TDF was found to diffuse largely in the digestive tract, the kidney, the liver and the pancreas, less in adipose tissue and lung, and not in brain. FTC showed intermediate tissue penetration factor. DTG was poorly distributed to tissues.

Conclusions: ARV pharmacokinetics and tissue distribution in the BRGSF-A2 mouse model were equivalent to human data. We observed drug specificity (higher penetration of TDF compared to FTC or DTG), and tissue specificity (higher penetration in colon, intestine, kidney, liver versus low penetration in brain (and to a lesser extent lung and adipose tissue)).

Introduction

Control of human immunodeficiency virus (HIV) infection can be achieved with optimum antiretroviral therapy (Molina et al., 2015), but does not provide a disease cure. HIV can continue to replicate and replenish the viral reservoir despite potent antiretroviral therapy and plasma HIV-RNA below the limit of quantification (Lorenzo-Redondo et al., 2016). Thus, achieving optimal tissue distribution and cellular pharmacokinetics of antiretroviral drugs would be a prerequisite to the elimination of the viral reservoir and ultimately a step towards a cure for HIV infection.

Studies to map the distribution of antiretrovirals require access to tissues, fluids and cells. In Human, some of these virological reservoirs are hardly or not accessible. Thus, the use of animal models allows a first approach. However, there is no ideal model that reproduces all aspects of HIV infection in a given animal species. Non-human primates are among those most used because of the origin of HIV and the phylogenetic proximity of the simian immunodeficiency virus (SIV) (Worobey et al., 2010). Given the rarity and high cost of these animals, alternative models have been developed. Mouse models humanized for the immune system (HIS) have contributed to a better understanding of the specificity of human immune responses to pathogens. Humanized mice now constitute a translational bridge between fundamental research and clinical applications (Akkina, 2013; Shultz et al., 2012). Developing HIS models enabling to study either the natural course of HIV infection, or controlled HIV infection by antiretrovirals is an important step to evaluate the potential benefit of ARV and immunotherapies, or to dissect the mechanism required for the induction of post-ART control.

The Balb/c Rag2^{KO} IL2rgc^{KO} Sirp α ^{NOD} Flk2^{KO} HLA-A2^{HHD} (BRGSF-A2) mouse reconstituted with human CD34⁺ cord blood cells have been validated as a promising preclinical model of the mechanisms regulating the expression of various immune checkpoint inhibitors and senescence markers (Labarthe et al., 2020). Considering these results, the aim

of this study was to determine doses to reach exposure close to that observed in patients at therapeutic dose, pharmacokinetics parameters and most importantly, tissue disposition for three antiretrovirals in this murine model. Tenofovir (TNF) disoproxil fumarate (TDF), emtricitabine (FTC) and dolutegravir (DTG) were selected as part of the preferred first-line treatment option worldwide (Department of Health and Human Services, 2019; European AIDS Clinical Society, 2019; Saag et al., 2018; World Health Organization, 2019).

Methods

Animals

Two different strains of mice were used: wild type Balb/c and the Balb/c Rag2^{tm1Fwa} IL2rg^{tm1Cgn} Sirpa^{NOD} Flk2^{tm1Irl} HLA-A2^{HHD} (BRGSF-A2), a strain with a Balb/c background bearing multiple mutations generated to allow high human xenograft acceptance (DiSanto et al., 1995; Labarthe et al., 2020; Legrand et al., 2011; Li et al., 2016; Mackarehtschian et al., 1995). Only female animals (that are more prone to human xenograft) were used in this study. Animals from 8 to 18 weeks of age were considered because 18 weeks is the standard time to generate the humanized immune system in the mouse. Animals were weighed before and following ART treatment. Experiments performed on BRGSF-A2 mice and as control on Balb/c animals were approved by the local animal care and use committee (Ethics Committee, CEA Life Science Division (CETEA-CEA DSV IdF CEEA 044), Paris, France) and authorized by the French Ministry of Education and Research (reference: APAFIS #9405 & #9382).

Antiretroviral drugs formulation

The combinatorial antiretroviral therapy (cART) consisted of a three-drug regimen with TDF, FTC and DTG. Two different routes of administration were compared, intraperitoneal and oral. Solution for intraperitoneal (IP) route was prepared by dissolving TDF, FTC and DTG in sterile water using Kleptose HPB parenteral grade (Roquette Pharma, France) as previously described (Del Prete et al., 2016) in order to enhance the solubility and the stability of the molecules. Treatment for oral route was prepared as the IP formulation and then dissolved in a sweetened water gel suspension, MediDrop sucralose (ClearH2O, Westbrook, ME, USA).

MediDrop sucralose is an oral formulation that is advertised to assist in the delivery of medications via water bottles.

Antiretroviral drug plasma pharmacokinetic studies

A single IP injection of TDF (5.1 mg/kg), FTC (40.0 mg/kg) and DTG (2.5 mg/kg) was administered to 5 Balb/c mice, 5 BRGSF-A2 mice and 5 human immune system (HIS)-BRGSF-A2 mice. An oral formulation of TDF (47.7 mg/kg), FTC (188.0 mg/kg) and DTG (12.6 mg/kg) was administered during 24 hours via water bottles to 23 Balb/c mice. Blood samples (200 μ L) were collected from the anterior facial vein at 1, 2, 4, 6 and 24 hours after the injection or after the end of oral treatment. For the IP injection study, one mouse of each group was sampled at each time. For the oral administration, four mice were sampled at T = 0 h and T = 4 h and 5 mice was sampled at the other time points. Blood samples were centrifuged at 4000xg during 10 minutes at + 4°C and plasma samples were collected and stored at – 80°C until analysis.

Antiretroviral drug tissue pharmacokinetic studies

An oral formulation which combined TDF (47.7 mg/kg), FTC (188.0 mg/kg) and DTG (12.6 mg/kg) was administered during 7 days to 25 Balb/c mice via water bottles. Five mice were euthanized at each time point, at 0, 2, 4, 6 and 24 hours after the end of the treatment. Blood samples were collected at the first time point and tissues including lungs, kidneys, liver, spleen, pancreas, brain, thymus, lymph nodes, caecum, colon, small intestine and adipose tissue were collected at each time point. Blood samples were centrifuged at 4000xg during 10 minutes at + 4°C and plasma samples were collected and stored at – 80°C until analysis. Due to the high proportion found in the feces, especially for DTG (96.7%) (Moss et al., 2015), tissue samples of the gastrointestinal tract (caecum, colon and small intestine) were rinsed

with Hank's Balanced Salt Solution (HBBS) and 2 % of fetal bovine serum. Tissues were snap-frozen and stored at -80°C until analysis. A tissue penetration factor (TPF) was used to estimate and compare antiretroviral drug penetration. TPF is the ratio of the tissue concentration to the plasma concentration after the tissue concentrations were converted to nanograms per milliliter (to convert volume to mass, tissue density was assumed to be 1.06 g/mL) (Asmuth et al., 2017).

Drug assays

TDF, FTC and DTG concentrations from plasma samples were measured simultaneously by a LC-MS/MS method as previously described (Gouget et al., 2020). After thawing, tissues were diluted in acetonitrile:water (70:30), homogenized with a tissue homogenizer (Minilys®, Bertin Technologies, France) and analyzed by the same method adapted to tissue.

Pharmacokinetic analysis

A non-compartmental analysis using Phoenix WinNonlin 8.1 (Certara, Princeton, NJ, USA) was performed to estimate the pharmacokinetic parameters. Maximal concentration (C_{max}), trough concentration at steady state (C_t), last measurable concentration (C_{last}) for single-dose pharmacokinetics and the time required to reach C_{max} (T_{max}) are the observed parameters. The half-life ($t_{1/2}$) was estimated on the log-linear terminal part of the phase of decrease in concentrations according to the formula $t_{1/2} = 0.693/\lambda_z$ where λ_z is the slope of decrease of the concentrations. The areas under the curve (AUC) were estimated by the linear up log down trapezoidal method until the last time point ($\text{AUC}_{0 \rightarrow t}$) and up to infinity by extrapolation ($\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$) using the formula $\text{AUC}_{0 \rightarrow t} + (C_t/\lambda_z)$. The mean residence time (MRT) was determined as AUMC/AUC , where AUMC is the area under the moment curve from the time of dosing to the last measurable concentration.

Results

Antiretroviral drug plasma pharmacokinetics

Pharmacokinetics parameters and concentrations versus time plots are shown in Table 1 and Figure 1, respectively. Concentrations of the three drugs were in the same range of order in the 3 types of mice and whatever the routes of administration: intraperitoneal or oral. By oral route using antiretroviral treatment via water bottles, 24 hours after the last intake, mean \pm standard deviation tenofovir, emtricitabine and dolutegravir concentrations were 25 ± 0 ng/mL, 62 ± 68 ng/mL and 995 ± 509 ng/mL, respectively.

Antiretroviral drugs tissue pharmacokinetics and distribution

All pharmacokinetics parameters in tissue are shown in Table 2. Tenofovir, emtricitabine and dolutegravir concentrations versus time for all tissues are presented in Figure 2. The tissue penetration factors are shown in Figure 3. They ranged from 6.4 to 17459%, 6.5% to 385% and 0.9 to 23.4% for tenofovir, emtricitabine and dolutegravir, respectively. Tenofovir was found to diffuse largely in some tissues as the digestive tract (colon, small intestine, and caecum), the kidney, the liver and the pancreas. Except for adipose tissue, lung and brain, emtricitabine has a good penetration in studied tissues with a TPF up to 100%. Dolutegravir is poorly distributed to tissues. The three drugs have a weak penetration factor in the brain, it could be explaining by the blood-brain-barrier.

Discussion

In recent years, acquired immune deficiency syndrome (AIDS) research has become more focused on studies of human immunodeficiency virus (HIV) eradication or functional cure. Mice model have the main advantage to allow for a number of experimental interventions that cannot be conducted in humans. Here in these studies, we attempted to develop a suitable mice model to evaluate antiretroviral drug diffusion. The murine model Balb/c Rag2^{tm1Fwa} IL2rg^{tm1Cgn} Sirpa^{NOD} Flk2^{tm1rl} HLA-A2^{HHD} (BRGSF-A2) was firstly validated in terms of antiretroviral formulation, dose and route of administration by characterizing the pharmacokinetics of tenofovir disoproxil fumarate, emtricitabine and dolutegravir and comparing the pharmacokinetic parameters according to the route of administration (intraperitoneal *versus* oral). As the BRGSF-A2 model was similar to a less expensive murine model Balb/c, thereafter we used it to determine antiretroviral tissue distribution. However, because humanisation required irradiation that may affect tissue permeability and penetration, we also performed analyses in mice humanized for the immune system to confirm the results obtained in the Balbc/C and non-humanized BRGSF-A2 mice.

Firstly, we compare three different murine models to determine if we observe the same pharmacokinetic profiles and parameters of dolutegravir, emtricitabine and tenofovir after IP administration. Secondly, we used two different ways of administration for the same mouse model. As no previous intraperitoneal or oral pharmacokinetics mice study with our doses was currently reported, we compare the observed concentrations to those observed at therapeutic doses in patients.

Concerning the tenofovir, for all three models and for the two ways of administration, the main pharmacokinetic parameters are in the same range of magnitude. Compare to Human parameters, in our study, the maximal concentrations are higher (median = 2064 ng/mL versus mean = 240 ng/mL in Human (Barditch-Crovo et al., 2001)) and the elimination half-life is

smaller (median = 5.7 h versus mean = 11.9 h (Barditch-Crovo et al., 2001)). However, the total drug exposure represented by the AUC is in the same range of magnitude in both species (median = 6012 ng.h/mL versus mean = 3020 ng.h/mL (Barditch-Crovo et al., 2001)).

Concerning the emtricitabine, the main pharmacokinetic parameters are also in the same range of magnitude for all three models. Compare to Human parameters, maximal concentrations are also higher (median: 73,899 ng/mL versus 1,820 ng/mL (Blum et al., 2007)). Conversely, trough concentrations are slightly lower (median: 16 ng/mL versus 61 ng/mL (Blum et al., 2007)). These two differences could be partly explained by the difference in half-lives (median: 3.0 h versus 10.1 h (Blum et al., 2007)).

Concerning the dolutegravir, the main pharmacokinetics parameters are also in the same range of magnitude for all three models with greater inter-species variability. Compare to Human parameters, we observed quite the same pharmacokinetics behaviour as emtricitabine with higher maximal concentrations (median: 62,072 ng/mL versus 4,560 ng/mL (Min et al., 2010)) but trough concentrations in the same order of magnitude (median: 2,913 ng/mL versus 1,060 ng/mL (Min et al., 2010)). This also could be explain by the difference in half-lives (median: 7.2 h versus 14.2 h (Min et al., 2010)). However, antiretrovirals can be classified as time-dependent drugs, and, therefore trough concentrations should be above expected levels, namely PA-IC90 (64 ng/mL) (Podany et al., 2020).

The intraperitoneal route has the advantage of knowing with great precision the quantity of antiretrovirals injected. However, it requires handling the mice every day that may cause stress and an increase in complications (peritonitis, intra-intestinal injection). Sterility and pH are also important and constraining parameters of the intraperitoneal route. On the other hand, the oral route has the advantage of requiring no manipulation, nor any physicochemical adjustment. The main inconvenient is the lack of precision in the amount ingested. The use of the oral route reduced the maximal concentrations without modifying the AUC, namely the exposure and without reducing trough concentrations. All main parameters

for all three antiretrovirals were consistent and in the same range of magnitude whatever the way of administration. The trough concentrations for the 3 drugs were close to those observed in patients at therapeutic doses. Therefore, the oral route and the antiretroviral doses were validated and were used for tissue distribution studies in Balb/c mice. Few studies had described antiretroviral tissue distributions. Mostly, studies are focused on some tissues, namely lymphoid tissues (Dyavar et al., 2019) or specific tissues like brain (Nicol et al., 2019) or genital tract and rectal tissue (Greener et al., 2013). To our knowledge, we describe in this study the distribution of three major antiretrovirals in all tissues for the first time.

Concerning the tenofovir, trough concentrations and/or tissue penetration factor are quite consistent with already published data in Humans. Very close concentrations were observed in lymph nodes (126 ng/g versus around 100 ng/g (Burgunder et al., 2019)). In the small intestine, some studies focused on more precise and specific parts of this organ, namely on duodenum or ileum. Due to our small model, concentrations are representative of the entire organ and are quite in the same order of magnitude (5,047 (range: 2,864-6635) ng/g versus 9,802 (range: 2,655-17,281) ng/g in ileum (Thompson et al., 2019) or versus 46,100 ng/g in duodenum (Asmuth et al., 2017)). Comparing the tissue penetration factor, data are even closer (13,161% (range:410%-31,333%) versus 8,700% (range: 3,500%-29,700%) (Thompson et al., 2019)). For similar reason, our study focuses on colon rather than the rectum, which is too small in murine model. Nevertheless, concentrations are also in the same order of magnitude (6,994 (range: 3,936-9,518) ng/g versus 1,700 (range: 400-6,700) ng/g (Asmuth et al., 2017) or 1,736 (range: 1,385-3,145) ng/g (Thompson et al., 2019) or 1,877 ng/g (Patterson et al., 2011)). In addition, the tissue penetration factor has a close human value (17,459% (range: 9,062%-28,608%) versus 4,100% (range: 600%-5,200%) (Thompson et al., 2019)). Conversely, in the brain, Nicol M. and colleagues reported higher tenofovir concentrations (range: 161-2,644 ng/g versus 5 (range: 4-7) ng/g (Nicol et al., 2019)). This higher tenofovir brain concentration may be explained by much higher tenofovir plasma and

tenofovir cerebrospinal fluid concentrations in this study compare to other already published data (Ma et al., 2019). Thus, tissue penetration factors are closer and in the same order of magnitude (6% (range: 3%-11%) in our study versus 36% (range: 14%-124%)).

Concerning the emtricitabine, we also have similar trough concentrations compare to already human published data. In lymph nodes, close concentrations are observed (175 ng/g versus around 10 ng/g (Burgunder et al., 2019)). Closer concentrations are observed in colon compare to rectum human studies (258 (range: 82-419) ng/g versus 1,000 (range: 300-4,600) ng/g (Asmuth et al., 2017) or 600 (range: 146-1,306) ng/g (Thompson et al., 2019) or 124 ng/g (Patterson et al., 2011)). In addition, the tissue penetration factor has a close human value (385% (range: 200%-644%) versus 300% (range: 100%-900%) (Thompson et al., 2019)). At last, small intestine trough concentrations are in the same order of magnitude (421 (range: <LOQ-1,116) ng/g versus 1,200 (range: 400-2,300) ng/g (Asmuth et al., 2017) or 1,019 (range: 389-2,762) ng/g (Thompson et al., 2019)). Thus, tissue penetration factors are also close (295% (range: 90%-632%) versus 700% (range: 200%-1200%) (Thompson et al., 2019)).

Concerning the dolutegravir, very few human data let us compare our model. Nevertheless, Greener B. and colleagues reported dolutegravir pharmacokinetics parameters in colorectal tissue (Greener et al., 2013). Half-life is close to our murine model concentrations (6.8 h versus 8.4 h). Maximal and trough concentrations are also close (C_{max} : 996 ng/g versus 418 ng/g; C_t : 104 ng/g versus 139 ng/g). Greener B. and colleagues also reported colorectal exposition via the AUC_{0-t} and our murine model has a close exposition to dolutegravir compare to Humans (11,525 ng.h/g versus 7,596 ng.h/g).

By globally observing the distribution of the three antiretrovirals in all the tissues studied, we could first classify these three antiretrovirals according to their diffusion capacity. Tenofovir is the one that diffuses the most in all tissues, then emtricitabine and finally dolutegravir for which all tissue concentrations are below plasma concentrations. These differences can be

explained by the physico-chemical and pharmacokinetic differences of these antiretrovirals. For example, tenofovir and emtricitabine have lower molecular weights and are less bound to plasma proteins (Custodio et al., 2016; FDA Approved Drug Products, 2003). On the contrary, dolutegravir is highly bound to plasma protein binding (99%) and substrate of efflux transporters (ABCB1, ABCG2) (Reese et al., 2013). It could explain that less than 25% of plasma dolutegravir is able to penetrate whatever the tissue explored.

There was also an important difference between the different tissues. Nevertheless, there was a certain consistency between all these tissues, namely that the three antiretrovirals studied had a better diffusion in quite the same tissues. The most perfused tissues and metabolism sites (colon, intestine, kidney, liver) were the tissues where diffusion was the most important for the three antiretrovirals. It was only in the lungs among the highly perfused tissues that the diffusion was not as good or even low since it was the only tissue with the brain for which the tissue penetration factor is lower than 100% for all three antiretrovirals. Tissue concentrations have to be compared with 90% inhibitory concentrations (IC₉₀) of the drugs (Flynn et al., 2011; Podany et al., 2020; Thompson et al., 2019). For dolutegravir, only colon and lung concentrations are above PA-IC₉₀ (64 ng/mL). For emtricitabine and tenofovir, all tissue concentrations, brain excluded for emtricitabine, are above the IC₉₀ (51 ng/mL and 2.98 ng/mL, respectively). With regard to these results, we could hypothesize that the BRGSF-A2 model could be adequate for studying mice chronically infected with HIV and treated by oral antiretrovirals concerning viral reservoirs, pharmacological sanctuaries and proof of concept of cure strategies.

In conclusion, after having validated the consistency of our immuno-humanized murine model at plasma level, we report here the first exhaustive tissue distribution study in a murine model of three antiretrovirals among the most widely used. This study shows the important diffusion difference between antiretrovirals and between tissues. On the one hand, some tissues, namely the brain or adipose tissue, known to be virological reservoirs, are

particularly impermeable to antiretrovirals. On the other hand, some other tissues, namely the small intestine or the colon, for which the diffusion seems better and optimal, are also known to be reservoirs. The persistence of viral replication in certain tissues seems, as already supposed and described, is not only linked to the presence of pharmacological sanctuaries but also to immunological parameters. Towards an HIV cure, further studies are needed to determine the antiretroviral concentrations in the HIV target cells and to improve the understanding of this persistence of viral replication.

References

- Akkina, R. (2013). New generation humanized mice for virus research: Comparative aspects and future prospects. *Virology*, *435*(1), 14–28. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.10.007>
- Asmuth, D. M., Thompson, C. G., Chun, T.-W., Ma, Z.-M., Mann, S., Sainz, T., Serrano-Villar, S., Uday, N. S., Garcia, J. C., Troia-Cancio, P., Pollard, R. B., Miller, C. J., Landay, A., & Kashuba, A. D. (2017). Tissue Pharmacologic and Virologic Determinants of Duodenal and Rectal Gastrointestinal-Associated Lymphoid Tissue Immune Reconstitution in HIV-Infected Patients Initiating Antiretroviral Therapy. *The Journal of Infectious Diseases*, *216*(7), 813–818. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix418>
- Barditch-Crovo, P., Deeks, S. G., Collier, A., Safrin, S., Coakley, D. F., Miller, M., Kearney, B. P., Coleman, R. L., Lamy, P. D., Kahn, J. O., McGowan, I., & Lietman, P. S. (2001). Phase i/ii trial of the pharmacokinetics, safety, and antiretroviral activity of tenofovir disoproxil fumarate in human immunodeficiency virus-infected adults. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(10), 2733–2739. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.10.2733-2739.2001>
- Blum, M. R., Chittick, G. E., Begley, J. A., & Zong, J. (2007). Steady-state pharmacokinetics of emtricitabine and tenofovir disoproxil fumarate administered alone and in combination in healthy volunteers. *Journal of Clinical Pharmacology*, *47*(6), 751–759. <https://doi.org/10.1177/0091270007300951>
- Burgunder, E., Fallon, J. K., White, N., Schauer, A. P., Sykes, C., Remling-Mulder, L., Kovarova, M., Adamson, L., Luciw, P., Garcia, J. V., Akkina, R., Smith, P. C., & Kashuba, A. D. M. (2019). Antiretroviral Drug Concentrations in Lymph Nodes: A Cross-Species Comparison of the Effect of Drug Transporter Expression, Viral Infection, and Sex in Humanized Mice, Nonhuman Primates, and Humans. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *370*(3), 360–368. <https://doi.org/10.1124/jpet.119.259150>

- Chun, T. W., Davey, R. T., Engel, D., Lane, H. C., & Fauci, A. S. (1999). Re-emergence of HIV after stopping therapy. *Nature*, *401*(6756), 874–875. <https://doi.org/10.1038/44755>
- Custodio, J. M., Fordyce, M., Garner, W., Vimal, M., Ling, K. H. J., Kearney, B. P., & Ramanathan, S. (2016). Pharmacokinetics and Safety of Tenofovir Alafenamide in HIV-Uninfected Subjects with Severe Renal Impairment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *60*(9), 5135–5140. <https://doi.org/10.1128/AAC.00005-16>
- Del Prete, G. Q., Smedley, J., Macallister, R., Jones, G. S., Li, B., Hattersley, J., Zheng, J., Piatak, M., Keele, B. F., Hesselgesser, J., Geleziunas, R., & Lifson, J. D. (2016). Short Communication: Comparative Evaluation of Coformulated Injectable Combination Antiretroviral Therapy Regimens in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Rhesus Macaques. *AIDS Research and Human Retroviruses*, *32*(2), 163–168. <https://doi.org/10.1089/AID.2015.0130>
- Department of Health and Human Services. (2019). *Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents with HIV.* <http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>
- DiSanto, J. P., Müller, W., Guy-Grand, D., Fischer, A., & Rajewsky, K. (1995). Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(2), 377–381. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.2.377>
- Dyavar, S. R., Gautam, N., Podany, A. T., Winchester, L. C., Weinhold, J. A., Mykris, T. M., Campbell, K. M., Alnouti, Y., & Fletcher, C. V. (2019). Assessing the lymphoid tissue bioavailability of antiretrovirals in human primary lymphoid endothelial cells and in mice. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *74*(10), 2974–2978. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz273>

- European AIDS Clinical Society. (2019). *European Guidelines for the treatment of HIV-positive adults in Europe*. https://www.eacsociety.org/files/2019_guidelines-10.0_final.pdf
- FDA Approved Drug Products. (2003). *EMTRIVA® (emtricitabine) capsule, for oral use*.
- Flynn, P. M., Mirochnick, M., Shapiro, D. E., Bardeguéz, A., Rodman, J., Robbins, B., Huang, S., Fiscus, S. A., Van Rompay, K. K. A., Rooney, J. F., Kearney, B., Mofenson, L. M., Watts, D. H., Jean-Philippe, P., Heckman, B., Thorpe, E., Cotter, A., & Purswani, M. (2011). Pharmacokinetics and Safety of Single-Dose Tenofovir Disoproxil Fumarate and Emtricitabine in HIV-1-Infected Pregnant Women and Their Infants ∇ . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(12), 5914–5922. <https://doi.org/10.1128/AAC.00544-11>
- Gouget, H., Noé, G., Barrail-Tran, A., & Furlan, V. (2020). UPLC–MS/MS method for the simultaneous quantification of bictegravir and 13 others antiretroviral drugs plus cobicistat and ritonavir boosters in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *181*, 113057. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.113057>
- Greener, B. N., Patterson, K. B., Prince, H. M. A., Sykes, C. S., Adams, J. L., Dumond, J. B., Shaheen, N. J., Madanick, R. D., Dellon, E. S., Cohen, M. S., & Kashuba, A. D. M. (2013). Dolutegravir pharmacokinetics in the genital tract and colorectum of HIV-negative men after single and multiple dosing. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)*, *64*(1), 39–44. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e31829ed7a4>
- Labarthe, L., Henriquez, S., Lambotte, O., Di Santo, J. P., Le Grand, R., Pflumio, F., Arcangeli, M.-L., Legrand, N., & Bourgeois, C. (2020). Frontline Science: Exhaustion and senescence marker profiles on human T cells in BRGSF-A2 humanized mice resemble those in human samples. *Journal of Leukocyte Biology*, *107*(1), 27–42. <https://doi.org/10.1002/JLB.5HI1018-410RR>
- Legrand, N., Huntington, N. D., Nagasawa, M., Bakker, A. Q., Schotte, R., Strick-Marchand, H., de Geus, S. J., Pouw, S. M., Böhne, M., Voordouw, A., Weijer, K., Di Santo, J. P., &

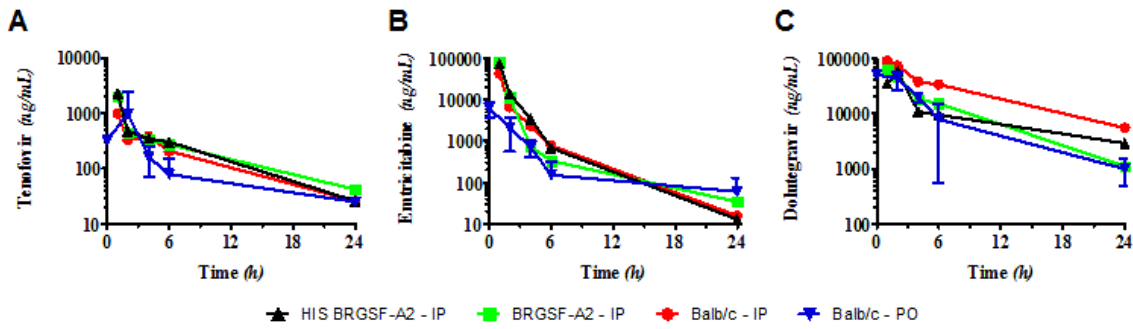
- Spits, H. (2011). Functional CD47/signal regulatory protein alpha (SIRP(alpha)) interaction is required for optimal human T- and natural killer- (NK) cell homeostasis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(32), 13224–13229. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101398108>
- Li, Y., Mention, J.-J., Court, N., Masse-Ranson, G., Toubert, A., Spits, H., Legrand, N., Corcuff, E., Strick-Marchand, H., & Di Santo, J. P. (2016). A novel Flt3-deficient HIS mouse model with selective enhancement of human DC development. *European Journal of Immunology*, 46(5), 1291–1299. <https://doi.org/10.1002/eji.201546132>
- Lorenzo-Redondo, R., Fryer, H. R., Bedford, T., Kim, E.-Y., Archer, J., Kosakovsky Pond, S. L., Chung, Y.-S., Penugonda, S., Chipman, J. G., Fletcher, C. V., Schacker, T. W., Malim, M. H., Rambaut, A., Haase, A. T., McLean, A. R., & Wolinsky, S. M. (2016). Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature*, 530(7588), 51–56. <https://doi.org/10.1038/nature16933>
- Ma, Q., Ocque, A. J., Morse, G. D., Sanders, C., Burgi, A., Little, S. J., & Letendre, S. L. (2019). Switching to Tenofovir Alafenamide in Elvitegravir-Based Regimens: Pharmacokinetics and Antiviral Activity in Cerebrospinal Fluid. *Clinical Infectious Diseases*, ciz926. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz926>
- Mackarehtschian, K., Hardin, J. D., Moore, K. A., Boast, S., Goff, S. P., & Lemischka, I. R. (1995). Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity*, 3(1), 147–161. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90167-1](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90167-1)
- Min, S., Song, I., Borland, J., Chen, S., Lou, Y., Fujiwara, T., & Piscitelli, S. C. (2010). Pharmacokinetics and Safety of S/GSK1349572, a Next-Generation HIV Integrase Inhibitor, in Healthy Volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(1), 254–258. <https://doi.org/10.1128/AAC.00842-09>

- Molina, J.-M., Clotet, B., van Lunzen, J., Lazzarin, A., Cavassini, M., Henry, K., Kulagin, V., Givens, N., de Oliveira, C. F., Brennan, C., & FLAMINGO study team. (2015). Once-daily dolutegravir versus darunavir plus ritonavir for treatment-naive adults with HIV-1 infection (FLAMINGO): 96 week results from a randomised, open-label, phase 3b study. *The Lancet. HIV*, 2(4), e127-136. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(15\)00027-2](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(15)00027-2)
- Moss, L., Wagner, D., Kanaoka, E., Olson, K., Yueh, Y. L., & Bowers, G. D. (2015). The comparative disposition and metabolism of dolutegravir, a potent HIV-1 integrase inhibitor, in mice, rats, and monkeys. *Xenobiotica*, 45(1), 60–70. <https://doi.org/10.3109/00498254.2014.942409>
- Nicol, M. R., Pastick, K. A., Taylor, J., Namuju, O. C., Rhein, J., Williams, D. A., Meya, D. B., Boulware, D. R., & Lukande, R. (2019). Cerebrospinal Fluid and Brain Tissue Penetration of Tenofovir, Lamivudine, and Efavirenz in Postmortem Tissues with Cryptococcal Meningitis. *Clinical and Translational Science*, 12(5), 445–449. <https://doi.org/10.1111/cts.12661>
- Patterson, K. B., Prince, H. A., Kraft, E., Jenkins, A. J., Shaheen, N. J., Rooney, J. F., Cohen, M. S., & Kashuba, A. D. M. (2011). Penetration of tenofovir and emtricitabine in mucosal tissues: Implications for prevention of HIV-1 transmission. *Science Translational Medicine*, 3(112), 112re4. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003174>
- Podany, A. T., Scarsi, K. K., Pham, M. M., & Fletcher, C. V. (2020). Comparative Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of HIV-1 Integrase Strand Transfer Inhibitors: An Updated Review. *Clinical Pharmacokinetics*. <https://doi.org/10.1007/s40262-020-00898-8>
- Reese, M. J., Savina, P. M., Generaux, G. T., Tracey, H., Humphreys, J. E., Kanaoka, E., Webster, L. O., Harmon, K. A., Clarke, J. D., & Polli, J. W. (2013). In Vitro Investigations into the Roles of Drug Transporters and Metabolizing Enzymes in the Disposition and Drug

- Interactions of Dolutegravir, a HIV Integrase Inhibitor. *Drug Metabolism and Disposition*, 41(2), 353–361. <https://doi.org/10.1124/dmd.112.048918>
- Saag, M. S., Benson, C. A., Gandhi, R. T., Hoy, J. F., Landovitz, R. J., Mugavero, M. J., Sax, P. E., Smith, D. M., Thompson, M. A., Buchbinder, S. P., del Rio, C., Eron, J. J., Fätkenheuer, G., Günthard, H. F., Molina, J.-M., Jacobsen, D. M., & Volberding, P. A. (2018). Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults: 2018 Recommendations of the International Antiviral Society–USA Panel. *JAMA*, 320(4), 379. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.8431>
- Shultz, L. D., Brehm, M. A., Garcia-Martinez, J. V., & Greiner, D. L. (2012). Humanized mice for immune system investigation: Progress, promise and challenges. *Nature Reviews. Immunology*, 12(11), 786–798. <https://doi.org/10.1038/nri3311>
- Thompson, C. G., Rosen, E. P., Prince, H. M. A., White, N., Sykes, C., de la Cruz, G., Mathews, M., Deleage, C., Estes, J. D., Charlins, P., Mulder, L. R., Kovarova, M., Adamson, L., Arora, S., Dellon, E. S., Peery, A. F., Shaheen, N. J., Gay, C., Muddiman, D. C., ... Kashuba, A. D. M. (2019). Heterogeneous antiretroviral drug distribution and HIV/SHIV detection in the gut of three species. *Science Translational Medicine*, 11(499), eaap8758. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aap8758>
- World Health Organization. (2019). *WHO recommends dolutegravir as preferred HIV treatment option in all populations*. <https://www.who.int/news-room/detail/22-07-2019-who-recommends-dolutegravir-as-preferred-hiv-treatment-option-in-all-populations>
- Worobey, M., Telfer, P., Souquière, S., Hunter, M., Coleman, C. A., Metzger, M. J., Reed, P., Makuwa, M., Hearn, G., Honarvar, S., Roques, P., Apetrei, C., Kazanji, M., & Marx, P. A. (2010). Island Biogeography Reveals the Deep History of SIV. *Science*, 329(5998), 1487–1487. <https://doi.org/10.1126/science.1193550>

Figures

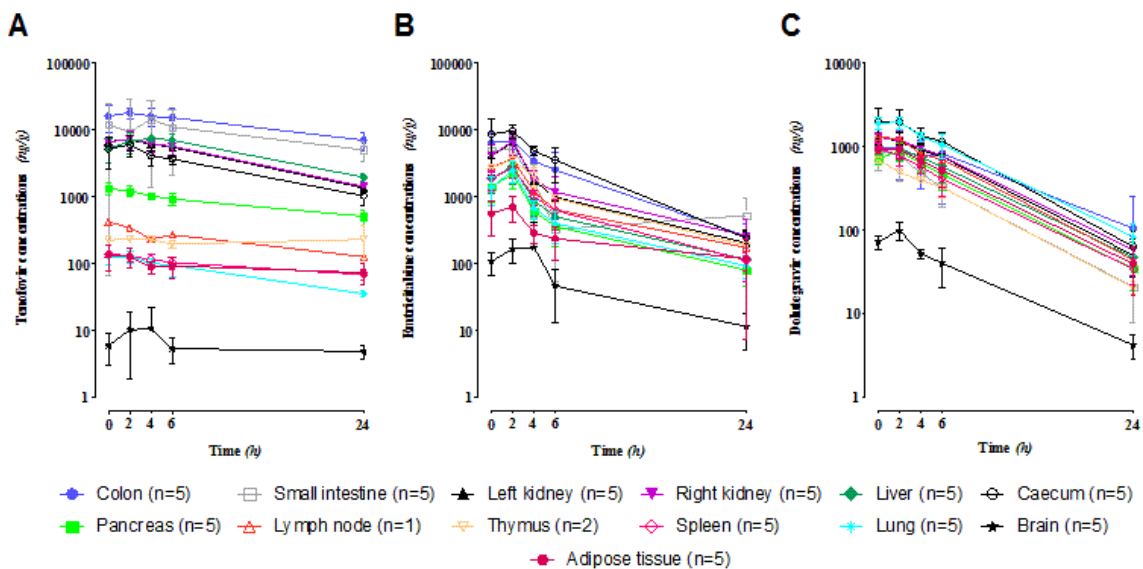
Figure 1: Plasma concentrations versus time of tenofovir (A), emtricitabine (B) and dolutegravir (C)



PO: oral route. Results are shown as the mean \pm standard deviation of at least 5 mice

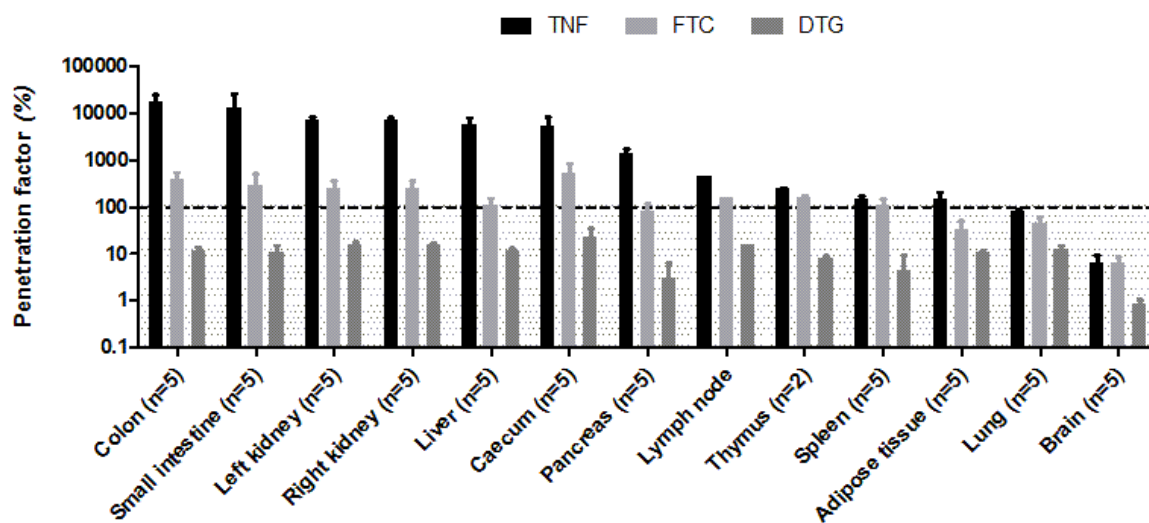
IP: intraperitoneal route. One mouse per time

Figure 2: Tissue concentrations versus time of tenofovir (A), emtricitabine (B) and dolutegravir (C) at steady state after oral administration



Results are shown as the mean \pm standard deviation of 5 mice per tissue, except lymph node and thymus.

Figure 3: Penetration factor of tenofovir, emtricitabine and dolutegravir in various tissues



Results are shown as the mean \pm standard deviation of 5 mice per tissue, except lymph node and thymus.

Tables

Table 1: Pharmacokinetic parameters of tenofovir, emtricitabine and dolutegravir after intraperitoneal and oral administration

Route of administration	Mouse model	C _{max} (ng/mL)	C _{last} (ng/mL)	t _{1/2} (h)	MRT (h)	AUC _{0→last} (ng.h/mL)	AUC _{0→∞} (ng.h/mL)
Tenofovir							
IP	Balb/c	995	26	5.7	6.5	4,008	4,224
IP	BRGSF-A2	2,064	42	8.1	7.4	6,103	6,593
IP	HIS BRGSF-A2	2,323	26	5.4	5.7	5,810	6,012
Oral Mean ± SD	Balb/c	987 ± 1,504	25 ± 0	8.5	15.0	6,734	7,039
Emtricitabine							
IP	Balb/c	42,566	16	3.0	2.2	56,690	56,758
IP	BRGSF-A2	81,277	35	5.9	1.8	84,510	84,808
IP	HIS BRGSF-A2	73,899	13	2.8	2.0	91,960	92,012
Oral Mean ± SD	Balb/c	6,190 ± 2,304	62 ± 68	7.4	13.4	86,289	86,945
Dolutegravir							
IP	Balb/c	89,445	5,530	7.2	7.4	592,091	649,201
IP	BRGSF-A2	62,072	1,121	5.9	6.7	292,872	302,381
IP	HIS BRGSF-A2	57,457	2,913	10.8	7.2	239,590	284,979
Oral Mean ± SD	Balb/c	50,658 ± 7,411	995 ± 509	5.1	14.1	824,601	831,910

IP: intraperitoneal route, one mouse sampled per time

Oral: 4 or 5 mice sampled per time

C_{max}: maximal concentration trough

C_{last}: 24 hours concentration

t_{1/2}: half life

AUC_{0→t}: area under the curve until the last time point

AUC_{0→∞}: area under the curve up to infinity

MRT: mean residence time

Table 2: Tissue pharmacokinetic parameters of tenofovir, emtricitabine and dolutegravir at steady state after oral administration

	C_{max} (ng/g) Mean (SD)	C_t (ng/g) Mean (SD)	$t_{1/2}$ (h)	MRT (h)	$AUC_{0 \rightarrow t}$ (ng.h/g)
Tenofovir					
Colon	18,055 (3,333)	6,994 (2,257)	16.5	10.1	289,579
Small intestine	14,367 (12,962)	5,047 (1,687)	14.2	10.2	207,733
Left kidney	7,142 (2,225)	1,353 (205)	9.0	8.7	92,203
Right kidney	7,376 (2,174)	1,426 (143)	9.2	8.8	94,796
Liver	7,523 (823)	1,947 (282)	9.7	9.5	112,012
Caecum	5,965 (2,084)	1,025 (273)	9.9	8.6	66,107
Pancreas	1,332 (241)	507 (125)	20.0	10.2	19,224
Lymph node	418	126	17.3	10.0	5,212
Thymus	234 (22)	230 (152)	/	12.4	5,151
Spleen	140 (15)	68 (12)	28.3	10.6	2,249
Adipose tissue	134 (56)	73 (24)	63.9	11.0	2,134
Lung	128 (26)	35 (35)	13.1	9.5	1,750
Brain	11 (12)	5 (1)	2.0	3.0	52
Emtricitabine					
Colon	6,881 (1,885)	258 (130)	5.4	6.0	46,953
Small intestine	5,156 (3,151)	421 (425)	19.0	5.8	24,649
Left kidney	6,544 (2,409)	203 (95)	7.0	5.4	29,456
Right kidney	6,761 (2,641)	261 (207)	7.6	5.8	32,244
Liver	2,909 (1,404)	115 (55)	7.4	5.8	14,206
Caecum	9,617 (2,077)	238 (88)	4.6	5.6	62,282
Pancreas	2,216 (890)	79 (35)	7.3	5.7	10,386
Lymph node	3,689	175	8.0	5.9	19,057
Thymus	3,536 (931)	186 (0.3)	6.4	6.2	22,967
Spleen	2,679 (747)	111 (36)	6.7	6.0	14,908
Adipose tissue	703 (283)	118 (111)	16.7	8.6	5,762
Lung	2,491 (884)	92 (33)	7.5	5.8	11,447
Brain	173 (250)	11 (6)	8.9	6.5	1,246
Dolutegravir					
Colon	996 (150)	104 (146)	6.8	7.9	11,525
Small intestine	891 (384)	21 (13)	4.7	5.8	5,803
Left kidney	1,344 (150)	50 (28)	4.7	6.4	10,826
Right kidney	1,298 (159)	57 (29)	4.9	6.6	11,331
Liver	954 (146)	47 (25)	5.0	6.6	8,608
Caecum	1,973 (762)	63 (35)	4.4	6.1	16,416
Pancreas	878 (226)	34 (16)	4.8	6.4	7,201
Lymph node	1,313	44	4.6	6.2	10,320
Thymus	691 (65)	20 (3)	4.6	6.2	4,743
Spleen	958 (124)	34 (12)	4.9	6.2	6,755
Adipose tissue	925 (65)	39 (22)	4.9	6.4	7,950
Lung	1,949 (319)	83 (35)	5.0	6.4	16,330
Brain	99 (23)	4 (1)	5.5	6.4	694

C_{max} : maximal concentration trough

C_t : trough concentration

$t_{1/2}$: half life

$AUC_{0 \rightarrow t}$: area under the curve until the last time point

$AUC_{0 \rightarrow \infty}$: area under the curve up to infinity

MRT: mean residence time

Article 3 : Combination of immunotherapies and ART during chronic HIV infection: Blocking type I interferon signaling reduces PD-L1 expression on T cells in BRGSF-A2 humanized mice

Article en cours de reviewing dans le journal PLOS Pathogens

L'objectif était **l'évaluation du bénéfice thérapeutique d'immunothérapies ciblant la voie PD1/PD-L1** dans un contexte d'infection par le VIH contrôlée par les ARV. Nous avons évalué l'impact de stratégies visant à agir directement sur l'épuisement des réponses T (α PD1) ou plus indirectement, via l'inflammation résiduelle en phase chronique de l'infection (α JAK).

Nous avons étudié les caractéristiques virologiques, immunologiques et pharmacologiques de l'infection par le VIH induite dans le modèle BRGSF-A2, en présence ou non du traitement ART. Peu de modulation de la proportion de LT PD1⁺ au sein des cellules mémoires a été observé en contexte d'infection seule, contrôlée ou après interruption du traitement. Une combinaison ART/ α PD1, mise en place avant l'interruption de traitement n'a pas permis de freiner la remontée de la charge virale et montre peu d'impact sur la qualité de la réponse T. Nous avons étudié l'expression d'un des ligands de PD1 : PDL1. Nous avons observé une modification des proportions de LT PD-L1⁺ en phase aiguë et au cours du traitement ART. L'ajout du traitement α JAK a accentué la diminution de la proportion de LT PD-L1⁺ dans le sang et la rate déjà observée sous traitement ART. La combinaison ART/ α JAK pourrait conférer un bénéfice thérapeutique supplémentaire aux ARV en ciblant plus spécifiquement les fractions LT PD-L1⁺.

Cibler la voie IFN-I pourrait permettre de moduler à la fois l'inflammation et l'épuisement et constituerait un nouveau levier pour améliorer la qualité des réponses dans le contexte de l'infection VIH-1 contrôlée.

Combination of immunotherapy and ART during chronic HIV infection: blocking type I interferon signaling reduces PD-L1 expression on T cells in BRGSF-A2 humanized mice

Running title: Combined immunotherapy and ART in HIV-infected humanized mice

Laura Labarthe^{1,2}, Hélène Gouget¹, Salomé Dupont², Laetitia Bossevoit¹, Marine Fillion^{3,6}, Guillemette Masse-Ranson^{4,5}, Anaëlle Olivo¹, Nicolas Legrand², Bruno Vaslin¹, Benoit Favier¹, Nicolas Tchitchek^{1,#a}, Delphine Desjardins¹, Nathalie Dereuddre-Bosquet¹, Véronique Avettand Fenoel^{3,6}, James P. Di Santo^{4,5}, Roger Le Grand¹, Aurélie Barrail-Tran^{1,7}, Olivier Lambotte^{1,8}, Nicolas Noel^{1,8¶} and Christine Bourgeois^{1¶*}

1: Université Paris-Saclay, Inserm, CEA, Center for Immunology of Viral, Auto-immune, Hematological and Bacterial diseases (IMVA-HB/IDMIT), Fontenay-aux-Roses & Le Kremlin-Bicêtre, France

2: GenOway, Lyon, France

3: Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, Paris, France; INSERM, U1016, Institut Cochin, Paris, France; CNRS, UMR8104, Paris, France

4: Innate Immunity Unit, Institut Pasteur, Paris, France

5: INSERM U1223, Paris, France

6: Hôpital Universitaire Necker – Enfants Malades, Unité de Virologie - Service de Microbiologie clinique, Paris, France

7: Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Department of Clinical Pharmacy, Université Paris-Saclay, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France

8: Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Universitaire Paris Saclay, Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France.

#^a Current address : Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; INSERM, UMR959 Immunology-Immunopathology-Immunotherapy" (i3 unit), Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France

* Corresponding author: christine.bourgeois@universite-paris-saclay.fr

[¶] These authors contributed equally to this work

Keywords: immunotherapy, HIV-1 infection, humanized immune system mouse model, PD1/PD-L1, antiretroviral treatment

Abbreviations

ART	Antiretroviral treatment
AT	Adipose tissue
BLT	Bone marrow, liver, thymus [mouse strain]
BM	Bone marrow
BRGSF-A2	BRGSF HLA class I transgene [mouse strain]
cDC	Conventional dendritic cell
DTG	Dolutegravir
Flk2	Fetal liver kinase-2
Flt3	Fms-like tyrosine kinase 3
FTC	Emtricitabine
HIS	Humanized immune system
HIV	Human immunodeficiency virus
HLA	Human leukocyte antigen
ICI	Immune checkpoint inhibitor
INR	Immunologic nonresponder
IR	Immunologic responder
ISG	Interferon Stimulated genes
LCMV	Lymphocytic choriomeningitis virus
PD1	Programmed cell death 1
pDC	Plasmacytoid dendritic cell
PD-L1	Programmed cell death-ligand 1
SIV	Simian immunodeficiency virus
TDF	Tenofovir disoproxil fumarate
TCID50	Median tissue culture infective dose

TIGIT

T cell immunoreceptor with immunoglobulin and immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif domains

Abstract (300 words)

Even though antiretroviral therapy (ART) effectively controls HIV replication, long-term viral persistence is associated with various immune defects such as low-grade chronic inflammation and T cell exhaustion. By using the Balb/c Rag2^{KO} IL2ryc^{KO} Sirpα^{NOD} Flk2^{KO} HLA-A2^{HHD} (BRGSF-A2) humanized immune system (HIS) mouse model, we evaluated the benefit of immunotherapies targeting the PD1/PD-L1 pathway in the context of ART-controlled HIV infection. We first characterized the virologic, immunologic and pharmacologic features of ART-controlled HIV infection in this model and confirmed the validity of this model for HIV studies. Spontaneous viral control following ART discontinuation was not observed in this model. We next designed two strategies for modulating the PD1/PD-L1 axis: direct targeting of PD1 (via PD1 blockade), and indirect targeting of the IFN-I pathway via the inhibition of Janus kinases (JAKs) 1 and 2. With regard to viral parameters, we did not observe any major effects of PD1 blockade in ART-naïve HIV-infected BRGSF-A2 mice or when PD1 blockade was applied just before the discontinuation of ART. The ART/anti-PD1 combination failed to control viral load rebound after the discontinuation of ART and did not have a major impact on the T cell response. We therefore studied the modulation of PD-L1 in various contexts of HIV infection and observed changes in the proportion of PD-L1⁺ T cells in the acute phase of HIV infection and during ART. The combination of JAK inhibitors and ART resulted in a lower proportion of PD-L1⁺ T cells in the blood and spleen. Importantly, the injection of JAK inhibitors was well-tolerated as no viral rebound was observed. Our results suggest that JAK inhibition may be relevant in chronic HIV infection by modulating both inflammation and T cell exhaustion. Using JAKi during an ART-controlled chronic HIV infection may be a valuable alternative to anti-PD1 strategies.

Author summary (150-200 words)

Despite the success of antiretroviral treatment (ART), chronic infection with HIV-1 is associated with various immune defects (e.g. low-grade inflammation and T cell exhaustion). Immunotherapy can potentially restore some of the defects associated with HIV persistence. In recent years, immunotherapeutics have constituted a major breakthrough in the treatment of cancer, and their effectiveness in chronic viral infections has subsequently been explored. Two main approaches have been considered: an enhancement of effector T cell responses and a reduction in inflammation. By focusing on the PD1/PD-L1 axis, we evaluated the potential benefits of combining an anti-PD1 agent or a JAK inhibitor (JAKi) with ART in mice with a humanized immune system. We first confirmed that this preclinical model mimicked key parameters of HIV infection and the response to ART in humans. We then found that in our experimental setting, anti-PD1/ART only marginally improved T cell responses and viral control. Interestingly, the combination of JAKi and ART modulated PD-L1 expression on T cells and thus highlighted an alternative pathway for modulating immune dysfunction. Treatment with a JAKi may be particularly relevant because it modulates both inflammation and exhaustion; hence, this approach may usefully accentuate immune responses during a controlled chronic HIV infection.

Introduction

Antiretroviral therapy (ART) can control an HIV infection but does not eradicate the virus. The resulting chronic HIV infection is associated with immune dysfunctions, such as low-grade chronic inflammation (1), immunosenescence, and T cell exhaustion (2). Patients with a chronic HIV-1 infection have a greater risk of comorbidities (3) associated with aging (4) and ART-related toxicities (5). The expression of PD1 (a standard marker of exhaustion) has been largely documented in the context of HIV infection. The PD1 pathway contributes to two main harmful effects in the context of HIV infection: it favors viral latency in exhausted CD4⁺ T cells (6) and impacts the efficiency of CD8⁺ T cell responses directed against HIV (2,7,8). Given the positive outcomes observed in cancers treated with anti-PD1 and anti-PD-ligand(L)1 agents, the combination of ART and immune checkpoint inhibitors (ICIs) has been considered in the context of HIV infection (9,10). However, targeting the main immune regulatory pathways may induce exacerbated harmful immune responses. One must therefore take account of the ICI dose, the frequency of administration, and the phase of infection during which the ICI is administered. In animal studies, for example, it has been shown that anti-PD1 treatment during an acute infection with lymphocytic choriomeningitis virus docile strain or hepatitis virus B is harmful, with a shift from an effective CD8 T cell response towards an exacerbation of tissue damage (11–13). Furthermore, anti-PD1 strategies may contribute to autoimmune disorders (14). The potential benefit of ICI strategies has been investigated in various animal models of chronic HIV infection setting. In the macaque, *in vivo* PD1 blockade during a chronic infection with simian immunodeficiency virus (SIV) resulted in the rapid recovery and expansion of polyfunctional SIV-specific CD8⁺ T cells, and prolonged survival (15–17). Reductions in interferon (IFN) signaling and intestinal permeability have also been reported (17). In humanized bone marrow, liver, thymus (BLT) mice chronically infected with HIV, PD1 blockade resulted in a significant reduction in the viral load and a significant increase in the hCD8⁺ T cell count (18). It has also been shown that a combination of PD1 blockade with ART results in faster suppression of the

viral load (19–21). Hence, immunotherapy during a chronic HIV infection might even maintain viral control after ART has been discontinued. In this latter setting, a mild but significant impact of treatment with anti-PD1 agents was observed, which makes it difficult to evaluate the potential clinical benefit of these strategies. Accordingly, the use of PD1 inhibitors in HIV-1 infected patients is currently limited to those with advanced or metastatic cancer (22–26). In the latter setting, PD1 blockade has a modest impact on viral control.

T cell exhaustion should also be considered with regard to immune checkpoint expression, and the efficacy of PD1 blockade may depend (at least in part) on the expression of PD-L1. Although there are several literature reports of upregulation of both PD1 and PD-L1 in acute HIV infections and a decrease in PD1 expression upon the initiation of ART, levels of PD-L1 appear to be only slightly affected in chronic HIV infections (27,28). High expression levels of PD-L1 may also contribute to the development of progressive T cell exhaustion during chronic infection. Interestingly, PD-L1 expression is strongly dependent on IFN-II pathways; indeed, *PDL1* is now considered to be an interferon-stimulated gene (ISG) (29,30). As has been described for anti-PD1 treatments, targeting the IFN pathways can have harmful effects on the latter's crucial antiviral activity - especially during the primary infection (31–33). Studies in chronically HIV-infected patients (34–36) and in an SIV-infected model (37,38) indicate that the expression of IFN-I, IFN-II and ISGs are correlated with higher viral load levels, enhanced hyperimmune activation, and faster disease progression. Furthermore, blocking IFN-I signaling in persistent lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) infections in mice can reduce immune activation, diminish immune suppression, restore lymphoid architecture, and accelerate clearance of the virus (39–41). Inhibition of the various IFN pathways during chronic HIV infection may be beneficial by affecting both residual inflammation and (indirectly) T cell exhaustion (42–45).

To evaluate the potential benefit of targeting the PD1/PD-L1 pathway, we used the BALB/c Rag2^{KO} IL-2R γ c^{KO} SIRP α ^{NOD} Flk2^{KO} HLA-A2^{HHD} (BRGSF-A2) HIS mouse and developed a model of ART-controlled HIV infection. The BRGSF-A2 model shows (i) a high capacity for human

hematopoietic cell engraftment, (ii) improved development, accumulation and function of human T cells via the expression of HLA class I molecules, (iii) long-term persistence of human cells (making it suitable for chronic infection analyses), and (iv) relatively human-like T cell exhaustion and senescence profiles (46–49). We studied the expression of PD1 at various stages of HIV infection and treatment in BRGSF-A2 mice: acute infection, chronic infection, ART-exposed chronic infection, and ART discontinuation. We next studied the impact of PD1 blockade in two of these settings: chronic infection and ART discontinuation. Given that PD1 blockade had only a slight impact on virologic and immunologic parameters (presumably due to limited modulation of PD1 on memory T cells) in these two settings, we then studied the expression of PD-L1. We observed a sizeable proportion of PD-L1⁺ lymphoid cells (rather than myeloid cells), which varied from one stage of infection to another. Lastly, we studied the impact of JAKi on PD-L1 expression. Interestingly, we found that the combination of ART with a JAKi preferentially impacted T cells in the peripheral blood and the spleen by reducing the proportion of PD-L1⁺ CD8 T cells (described previously as being immunosuppressive) (50–52). Our present results provide initial insights into the impact of JAKi on exhaustion processes during chronic HIV infection. Interestingly, treatment with a JAKi was associated with potential benefits (in terms of the immune phenotype) and did not have obvious harmful effects (e.g. viral rebound).

Material and methods

Generation of BRGSF-A2 humanized mice

The BRGSF-A2 mice were generated by crossing described previously parental strains (46,48,53,54) and by inserting the HLA class I transgene (encoding the most prevalent HLA-A genotypes, covalently bound to human β 2-microglobulin [β 2m] and murine H-2Db MHC haplotype) (55). The HIS mice were generated from newborn pups (2 to 5 days of age) after preconditioning with sublethal (3 Gy) total body irradiation. On the following day, $\sim 1.2 \times 10^5$ CD34⁺ human hematopoietic stem cells isolated from umbilical cord blood samples (ABCellBio, Evry, France) were transplanted into the liver of female animals (which accept human xenografts more readily than males). Both HLA-A2⁺ and HLA-A2⁻ donors were used. The level of human hematopoietic chimerism was tested 12 weeks after transplantation and expressed as the proportion of human leukocytes (i.e. as a percentage of total leukocytes). The animals were included in the study if they achieved a satisfactory level of humanization (>30% of hCD45⁺ cells) in the blood at weeks 12-14. The HIS mice were handled under laminar flow conditions in a biosafety level 2 animal facility. Experiments performed on humanized mice were approved by the local animal care and use committee (CEA Life Science Division Ethics Committee [CETEA-CEA DSV IdF CEEA 044], Paris, France) and authorized by the French Ministry of Education and Research (reference: APAFIS #9405 & #9382).

Virus production and HIV-1 infection

Viral stocks of the R5-tropic HIV-1 molecular clone NL(AD8) were produced by the transfection of human embryonic kidney (HEK) 293T cells with a DNA plasmid for full-length infectious molecular clones using TransIT®-293 Transfection Reagent (Mirus Bio Corporation, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. The transfection supernatant was harvested 72 hours later, filtered through a 0.2 μ m filter, and stored in aliquots at -80°C. Titers of stocks were subsequently determined on CD4⁺ T cells selected from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The median tissue

culture infective dose (TCID₅₀) was determined using the Alliance HIV-1 p24 antigen ELISA kit (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). BRGSF-A2 HIS mice were infected by intraperitoneal (i.p.) injection of 4×10^5 TCID₅₀ of NL(AD8) HIV-1 strain 22 to 34 weeks after humanization (median: 30 weeks) as described previously (56). Every two weeks after infection, plasma was sampled from the anterior facial vein and assayed for the absolute hCD4⁺ T cells count, as described below. At sacrifice, all of the mice were still infected; the median [interquartile range (IQR)] plasma HIV-1 viral RNA (vRNA) load in infected mice was 2.1×10^5 [$8.9 \times 10^4 - 1.2 \times 10^6$] copies/mL. Mice were monitored daily for signs of suffering, such as weight loss, hunchback posture, and anemia.

Oral administration of ART

Mice with a demonstrable viral infection (as assessed by hCD4⁺ cell depletion in the blood) underwent orally administered ART for 3 or 8 weeks. The ART included tenofovir disoproxil fumarate (TDF; 50 mg/kg; Gilead Sciences, Foster City, CA), emtricitabine (FTC; 200 mg/kg; Gilead Sciences) and dolutegravir (DTG; 12.5 mg/kg; Shanghai Medicilon, Inc, Shanghai, China). The drugs were dissolved in sterile water using a beta-cyclodextrin excipient (Kleptose, hydroxypropyl β cyclodextrin parenteral grade, Roquette, Lestrem, France), as described previously (57), and then dissolved in a sweetened water gel suspension (MediDrop sucralose, ClearH₂O, Westbrook, ME, USA) to optimize delivery in the animals' drinking water. The ART regimen was scaled down to the equivalent mouse dosage (using K_m values of 37 and 3 for humans and mice, respectively (58)) and was further adapted after the performance of pharmacokinetic studies (Gouget et al., unpublished data).

Immunotherapy with an anti-PD1 agent and a JAKi

Infected BRGSF-A2 mice were injected i.p. with either 10 mg/kg nivolumab (an anti-PD1 human IgG4 antibody; Bristol Myers Squibb, New York, NY, USA) or vehicle (PBS 1X) on days (D) 0, 3, 7 and 10. The dose level and regimen were based on *in vivo* administration protocols previously

described in SIV-infected macaques (15) and BLT humanized mice (18). Other HIS mice were injected i.p. with either the selective JAK1 and JAK2 inhibitor baricitinib (5 mg/kg, LY3009104, INCB028050, Selleckchem, Munich, Germany) or vehicle (2% DMSO, 30% PEG 300, 5% Tween 80 + double-distilled H₂O) every day for a week. For mice that were treated with ART + anti-PD1 or ART + JAKi, the immunotherapies were administered during the last 10 or 7 days of ART, respectively.

Cell preparations

Mice were euthanized by cervical dislocation after anesthesia, and PBMCs, spleen and bone marrow (BM) samples were collected. The samples were processed as follows: PBMCs were isolated from EDTA-anticoagulated blood, splenocytes were isolated by mechanical dissociation, and BM cells were collected from one femur per animal by flushing. The PBMC and spleen cell suspensions were incubated in ammonium-chloride-potassium buffer (150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 100 mM EDTA). Splenocytes and BM cells were counted using a Scepter 2.0 cell counter (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). The PBMCs were counted directly on a FACS cell analyzer, using counting beads (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). When blood samples were collected to perform the human hematopoietic chimerism assay (12 weeks after transplantation), the leukocytes were prepared by Ficoll separation.

Flow cytometry

Cell viability was assessed using Live/Dead Fixable dye (eBioscience, Thermo Fisher Scientific). Cell suspensions were incubated for 15 minutes at +4°C with cold PBS containing 0.5% bovine serum albumin, 2 mM EDTA, and murine and human FcR blocking reagent (Biolegend, San Diego, CA), and then stained with monoclonal antibodies by incubation for 15 min at +4°C. As required, cells were fixed and permeabilized according to the manufacturer's instructions (Fix and Perm kits from BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). After a saturation step (incubation with Fc block reagent, 5%

fetal bovine serum and 5% mouse serum for 15 minutes), intracellular staining with an anti-Ki67 FITC (B56) antibody was performed for 1 hour at +4°C. Between each step, the cells were washed once with PBS. The cells were fixed in commercial fixation reagent (CellFIX, BD Biosciences). Antibodies against the following markers were used: mCD45 (30-F11), hCD45 (HI30 or 5B1), hCD3 (SK7), hCD4 (OKT4 or SK3), hCD8 (SK1), hCD19 (HIB19), hCD20 (2H7), hCD33 (HIM3-4), and HLA-DR (G46-6). The lymphoid cells' differentiation profile and levels of exhaustion/senescence were assessed with antibodies against hCD56 (HCD56), hCD45RO (UCH4), hCD27 (L128), hCCR7 (G043H7), hCD28 (CD28.2), hPD1 (EH12.2H7), hPD-L1 (29E2A3) hTIGIT (MBSA43), and hCD57 (NK-1). Further characterization of myeloid cells and PD-L1 expression in BRGSF-A2 HIS mice was performed using antibodies against hCD15 (W6D3), hCD16 (3G8), hCD14 (M5E2), hCD11c (Bu15), hCD123 (9F5), hCD303 (201A), and hPD-L1 (29E2A3). All antibodies were purchased from BD Biosciences, Biolegend or eBioscience, except for anti-hCD45 (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany). The hCD4⁺ and hCD8⁺ memory T cell subsets were defined based on four markers (CD45RO, CCR7, CD27, CD28) for analyses performed during longitudinal blood monitoring and euthanasia for experiments addressing PD1 expression, as described previously (49). Briefly, memory hCD8⁺ T cells were pooled and included terminally differentiated memory cells re-expressing CD45RA (T_{EMRA}) (CD27⁺CD45RO⁻CCR7⁻CD28⁻), central and effector memory T cells (CD27⁺CD45RO⁺). The hCD4⁺ memory T cell subsets included central memory T cells (CD27⁺CD45RO⁺) and effector memory T cells (CD27⁻CD45RO⁺). Only three markers (CD45RO, CD27 and CCR7) were used (due to technical limitation on the numbers of parameters available regarding the FACS setting) on longitudinal analyses, and experiments addressing PD-L1 expression. The FACS data were acquired on an LSR Fortessa cell analyzer (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (version 10.1, Treestar, Ashland, OR).

Drug assays

Blood samples were centrifuged at 500 x g for 10 minutes at +4°C. Plasma samples were collected and stored at -80°C until analysis. The concentrations of TDF, FTC and DTG in plasma samples were measured by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, as described previously (59). The lower limit of quantification (LQ) was 10 ng/mL.

Quantification of HIV-1 RNA in plasma

Blood plasma was isolated from EDTA-anticoagulated blood by centrifugation at 500 x g for 10 minutes and stored at -80°C until analysis. RNA was prepared from 30 µL of cell-free plasma (after blood sampling) or 100 µl of cell-free plasma (after sacrifice), using the QiAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The vRNA was assayed in a quantitative reverse transcription PCR assay, using the Generic HIV Charge Virale kit (Biocentric, Bandol, France). The lower LQ was adjusted for the small volume of plasma available in HIS mice. For viral load monitoring during treatment of the animals, vRNA was extracted using a QiAamp (60).

Quantification of HIV-1 DNA in nonlymphoid tissues

DNA was extracted from frozen tissues, as described previously (61,62). Nonlymphoid tissues such as adipose tissue (AT), gut, lung and liver samples were collected, weighed and stored at -80°C until analysis. DNA was extracted using a QiAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen), and the total amount of HIV DNA was quantified in a real-time PCR with the Generic HIV DNA CELL kit (Biocentric, France) and the 8E5 line as the standard. Primers for human albumin were used to normalize the viral load against the number of human cells.

Statistical analysis

Due to the heterogeneous nature of the humanization process, HIS animals were distributed across the various groups (ART-exposed vs. ART-naïve animals, and ART-exposed animals receiving an

anti-PD1 agent and/or a JAKi) on the basis of the absolute blood hCD4⁺ T cell count at baseline, using R software (63). Quantitative variables were described as the median [interquartile range (IQR)]. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism software (version 7, GraphPad Software, La Jolla, CA). The statistical tests were selected according to the comparison required: a nonparametric Mann-Whitney test for the comparison of two datasets at a given time point, a Wilcoxon matched-pair signed rank test for the comparison of different time points for the same animal, and the Kruskal-Wallis test (followed by Dunn's post test) for the comparison of multiple datasets. In figures, the following representations are used to indicate the p-values: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, and **** p<0.0001.

Results

The BRGSF-A2 HIS model is susceptible to infection by HIV: PD1 expression in T cell compartment is not significantly modulated in the early stages of infection.

Humanized BRGSF-A2 mice were generated as described previously (49). All mice included in the study met the criteria for adequate human immune reconstitution in the blood (as outlined above in the Materials and Methods section) at 12 weeks of age. The BRGSF-A2 HIS mice were infected by i.p. injection of 4×10^5 TCID₅₀ HIV-1 NL(AD8) virus. We first characterized the standard parameters for HIV infection by measuring the plasma viral load and blood hCD4⁺ T cell count every two weeks. The plasma viral load rose rapidly, peaked around day (D)15 post-infection (p.i.) (median [IQR] peak value: 4.1×10^6 vRNA copies/mL [$7.9 \times 10^5 - 6.1 \times 10^6$]) and then decreased slowly (to 1.5×10^5 vRNA copies/mL [$6.0 \times 10^4 - 2.4 \times 10^6$] on D82) (**Fig. 1A**). We also collected nonlymphoid tissues (AT, gut, lungs and liver) for viral DNA analysis at early time points (D7 and D21 p.i.). We detected viral DNA (vDNA) in the lungs of all the mice (median [IQR]: 1.3×10^5 vDNA copies/million hCD45⁺ [$7.0 \times 10^4 - 1.0 \times 10^6$]). The AT, gut and liver were less consistently infected: vDNA was not detected in 3 of the 8 animals on D7. The greatest discrepancy between tissues was observed on D21: the number of vDNA-positive samples was 5 out of 7 for the AT, 6 out of 7 for the gut, and just 1 out of 7 for the liver (**S.1A Fig**). Accordingly, the percentage of blood hCD4⁺ T cells (relative to baseline) fell drastically (57.9% [44.3-92.6] on D10 p.i.; $p < 0.0001$) in all three independent experiments and remained very low from 3 weeks p.i. (12.8% [10.7-18.0]) to 12 weeks p.i. (**Fig. 1A**). Furthermore, we evaluated the impact of HIV infection on the lymphoid and myeloid compartments in PBMCs, spleen and BM at 1, 2 or 3 weeks p.i. We did not observe significant differences in the absolute hCD45⁺ cell count between the various groups (Ctrl, D7, D14, D21). The absolute hCD4⁺ cell count on D14 in PBMCs and D21 in the spleen ($p = 0.0125$ and 0.0101 , respectively) was lower than those observed in uninfected animals - demonstrating the impact of HIV infection. A similar trend was observed on D21 in the BM ($p = 0.0570$). We did not observe any

changes in the proportion of memory hCD4⁺ T cells in the various tissues, although the D21 values in the spleen were heterogeneous (i.e. they varied markedly from one animal to another). No changes in absolute hCD8⁺ T cell counts and in the proportion of memory hCD8⁺ T cells were observed in any of the tissues (**Fig. 1B**). Overall, we detected a significant decrease in the hCD4/hCD8 ratio on D14 in the spleen in infected animals (1.4 [1.0-2.2] vs. 4.8 [2.5-6.5] in noninfected mice; $p = 0.0243$) and on D21 in the BM (0.9 [0.3-2.2] vs. 6.7 [2.9-12.0], respectively; $p = 0.0009$). The high variability in the BM counts on D7 and (to a lesser extent) on D14 prevented us from drawing firm conclusions at earlier time points in this tissue (**S.1B Fig**). The analysis of HLA-DR expression on T cells did not reveal any differences between HIV-infected and noninfected mice, although the baseline proportion of HLA-DR⁺ cells was higher in the BM than in the spleen (**S.1C Fig**). In the myeloid compartment, a significant difference between HIV-infected and noninfected mice in the absolute hCD33⁺ cell count in the BM ($p = 0.0119$) was observed on D7. A similar trend was observed for PBMCs ($p = 0.0692$), although not in the spleen. When considering myeloid subsets, no major impact on absolute cell counts was seen for human monocytes. In infected mice, the absolute conventional DC (cDC) counts on D7 in the BM and on D7 and D21 in PBMCs and the spleen were significantly lower than in uninfected animals. The impact of infection appeared to have lasted for longer in the spleen. No changes in the plasmacytoid DC (pDC) count were observed in PBMCs and the spleen, although the data were heterogeneous. In the BM, we observed marked heterogeneity on D7, together with a significantly greater absolute count on D14 in infected mice than in uninfected mice (**Fig. 1C**). We next determined the direct impact of HIV infection on PD1 expression on T cells. Levels of PD1 and hCD4 expression on hCD3⁺ splenocytes on D21 p.i. are shown in the dot plot in **Fig. 1D**. The proportion of hCD4⁺ T cells expressing PD1 in the spleen and BM did not differ in infected mice vs. noninfected mice, although the D21 data in the spleen were heterogeneous. We also focused on the memory fraction that preferentially expresses PD1; there were no differences in hCD8⁺ T cells and its memory fraction during the acute phase of infection (**Fig. 1D**).

In conclusion, these data show that the BRGSF-A2 model is susceptible to HIV infection and is able to support viremia for up to 12 weeks p.i. The hCD4⁺ cells were rapidly depleted in PBMCs and in the tissues. Importantly, PD1 expression in T cell compartment was not greatly modulated at this early stage of infection.

Effective, orally administered ART allows both viral load control and hCD4⁺ recovery but does not modify PD1 expression in the T cell compartment in the chronic phase of infection

We developed a model of ART-controlled HIV infection via the daily oral administration of TDF, FTC, and DTG. The optimal concentrations of these drugs for oral administration in this HIS mouse model had been determined previously (Gouget et al., unpublished data). The ART was initiated 3 weeks p.i., i.e. when hCD4⁺ T cell depletion was clearly evident but not profound (**Fig. 2A**). In contrast to untreated, HIV-infected control mice, effective viral suppression in the blood of ART-exposed mice was observed within 16 days of treatment (median [IQR] load: 4.5×10^3 vRNA copies/mL [1.0×10^3 - 1.4×10^4], $p < 0.0001$), and vRNA could not be detected after 7 weeks (D75 p.i.). We also evaluated the impact of ART on nonlymphoid tissues after 3 weeks of treatment; there was significantly less vDNA in the AT and lungs for all ART-exposed mice (relative to untreated infected animals). It is noteworthy that the absolute vDNA load in the lungs was lower in the ART-exposed group than in the untreated, infected group but remained high (2.5×10^4 [7.7×10^3 - 7.0×10^4 vs. 9.6×10^4 [8.3×10^3 - 3.4×10^5] vDNA copies/million hCD45⁺, respectively), $p = 0.0289$). Due to the low proportion of mice in which vDNA was detected in the gut and liver (even in the absence of treatment), the impact of ART on these sites could not be quantified (**S.2A Fig**).

This virologic response to ART was associated with recovery of hCD4⁺ T cell counts. In the blood, a normal percentage of hCD4⁺ T cells was rapidly restored (89.7% [33.6-109.8] of the baseline value after 2 weeks of ART; $p = 0.2292$), and this recovery was sustained (161.4% [85.6-311.8] of the baseline value; $p < 0.0001$, after 7 weeks of ART). hCD4⁺ cell recovery was detected at even earlier time points (between 11 and 14 days after ART initiation), as shown in three other independent

experiments (**S.2B Fig**). However, the immunologic response was more heterogeneous than the virologic response. Out of the 20 animals, there were 12 immunologic responders (IRs) after 16 days of ART and 17 after 7 weeks (**Fig. 2A**). These results are consistent with the dichotomy between virologic and immunologic parameters observed in ART-exposed patients (64,65). We used the longitudinal data on blood parameters collected before ART initiation to determine which factors might explain these discrepancies. Firstly, we found that immunologic nonresponders (INRs) did not differ from IRs in terms of the plasma viral load or the absolute hCD4⁺ T cell count. However, the INR and IR differed with regard to the proportion of memory hCD4⁺ T cells at the time of ART initiation (**S.2C Fig**). We also evaluated the plasma DTG, FTC and TDF concentrations in a different group of ART-exposed BRGSF-A2 HIS mice. All ART-exposed animals had concentrations within the clinical therapeutic range for DTG and FTC ([DTG]: C_{min} = 830 ng/mL, C_{max} = 1970 ng/ml; [FTC]: C_{min} = 90 ng/mL, C_{max} = 1800 ng/mL). The plasma TDF concentration was in the therapeutic range for most animals, although the drug was not detected in 2 animals after 2 weeks of treatment (**Fig. 2B**). We next studied the immune parameters associated with ART in the spleen and BM, three weeks after ART (D42 p.i.). We observed an increase in the absolute hCD4⁺ cell count in the BM ($p = 0.0012$) but not in the spleen (**Fig. 2C**). The proportions of memory hCD4⁺ T cells and PD1-expressing memory hCD4⁺ T cells in the spleen and BM did not change (**Fig. 2C**). Similarly, the absolute hCD8⁺ T cell count, the proportion of memory hCD8⁺ T cells and the proportion of PD1-expressing memory hCD8⁺ T cells did not change. Overall, the hCD4/hCD8 ratio in the BM was significantly higher in ART-exposed animals than in untreated HIV-infected animals (1.2 [0.8-2.1] vs. 4.7 [1.8-10.8], respectively; $p = 0.0093$). A similar trend was seen for the spleen (**S.2D Fig**). Taken as a whole, these data demonstrated that the oral ART regimen designed for the present study was effective in BRGSF-A2 HIS mice but did not reduce the proportion of memory T cells expressing PD1 during a chronic HIV infection.

Since a proportion of HIV-infected patients show viral control even after the discontinuation of ART (66), we withdrew ART in the mice after 8 weeks. As shown in **Fig. 3A**, a viral rebound was

observed in 9 of the 12 of the treated mice 11 days after the discontinuation of ART. On D34 after the discontinuation of ART, the viral loads were similar to those observed before ART initiation and to those in untreated mice. Accordingly, absolute hCD4⁺ and hCD8⁺ T cell counts among splenocytes and BM cells fell progressively, although the differences vs. control (uninfected) animals were not statistically significant (**Fig. 3B**). A similar trend was observed for the percentages of memory cells in the hCD4⁺ and hCD8⁺ T cell subsets. It is noteworthy that at these late time-points, the proportion of memory hCD4⁺ T cells in the spleen varied greatly from one mouse to another in the untreated HIV-infected group: some mice exhibited high proportions, and other exhibited low proportions. These two extreme profiles were associated with the blood viral load: mice with a low proportion of memory CD4 T cells had a low viral load in the blood - presumably due to severe depletion of potentially infected cells (data not shown). We also analyzed PD1 expression by memory hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells in the spleen and BM; there were no differences between the four groups of mice (**Fig. 3B**). These data highlighted a slight time delay between the virologic effects and immunologic effects of ART withdrawal. Overall, oral ART was effective in BRGSF-A2 HIS mice. The discontinuation of ART led to a rapid increase in the viral load. However, ART did not reduce the proportion of PD1-expressing memory T cells.

The combination of PD1 blockade with ART does not provide lasting, effective post-ART control in BRGSF-A2 HIS mice.

We evaluated the impact of PD1 blockade in two contexts: (a) during the early stages of chronic infection and in the absence of ART (as a control for the impact of an anti-PD1 antibody), and (b) at a later stage in an ART-controlled chronic infection, prior to the discontinuation of ART. We first checked that the BRGSF-A2 HIS mouse model responded to PD1 blockade, as described previously in the macaque SIV model and the BLT humanized mouse HIV model (15–18,67). Infected mice were given four injections of the anti-PD1 nivolumab or vehicle (sham) over 10 days. The animals were euthanized 11 days (on D43 p.i.) or 34 days (on D66 p.i.) after the last anti-PD1 or

sham injection. As illustrated by the representative dot plots in **Fig. 4A**, the number of hCD3⁺ cells stained by the anti-PD1 Ab used for revelation in the spleen on D43 p.i. was much lower in anti-PD1 treated mice than in untreated mice - presumably due to steric hindrance by the therapeutic anti-PD1. The same results were observed for BM preparations (data not shown). No significant difference in viral load was observed, although there was trend towards a small reduction in the plasma viral load on D43 p.i. among treated mice vs. the same animals before initiation of PD1 blockade (**Fig. 4B**). Importantly, we observed a strikingly lower proportion of splenic hCD4⁺ and hCD8⁺ memory T cells on D43 p.i. in treated mice than in untreated HIV-infected mice (respectively 7.7% (5.7-27.0) vs. 63.5% (49.0-89.5) for hCD4⁺ cells, and 23.8% (16.9-54.7) vs. 86.7% (86.0-95.3) for hCD8⁺ cells; $p = 0.0357$ for both). This difference was not found on D66 p.i. In the BM, we did not observe any impact of PD1 blockade on memory hCD4⁺ and hCD8⁺ T cell counts (**Fig. 4C**). This experimental setting confirmed that the anti-PD1 strategy modulated both the viral load and immune parameters; it was a prerequisite for testing immunotherapy at a later stage in ART-controlled chronic infection.

To determine whether PD1 blockade just before the discontinuation of ART could improve viral control afterwards, we administered nivolumab to mice during the last week of an 8-week course of ART. Mice were subdivided into three groups: HIV-infected mice, mice exposed to ART for 8 weeks, and ART-exposed mice given four nivolumab injections in the last 10 days of the ART. The endpoints for the analyses were D11 and D34 after treatment withdrawal. The viral rebound was similar in ART- and ART/anti-PD1-exposed mice (**Fig. 5A**). In this experimental setting, we did not detect any benefit (in terms of viral control) of initiating PD1 blockade prior to the discontinuation of ART. Accordingly, we did not observe any difference between ART and ART/anti-PD1 mice in the absolute hCD4⁺ T cell counts among PBMCs on D11 and D34 post-discontinuation (data not shown). With regard to the T cell parameters in the spleen (**Fig. 5B**), we did not see significant intergroup differences in the proportion of hCD4⁺ and hCD8⁺ memory T cells or in the proportion of memory T cells expressing T cell immunoreceptor with immunoglobulin and immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif domains (TIGIT), a surrogate marker of T cell exhaustion) or the

senescence marker CD57. However, the proportion of Ki67-expressing cells (reflecting their proliferative potential) was higher on D34 in the ART/anti-PD1 group than in the ART group (45.2% [35.9-53.9] vs. 29.2% [24.7-36.0], respectively, for memory hCD4⁺; $p = 0.0317$; and 77.3% [55.2-88.8] vs. 33.5% [27.1-52.2], respectively, for memory hCD8⁺; $p = 0.0635$ (**Fig. 5C**)). In the BM (**S.3A Fig**), we noticed smaller differences between ART/anti-PD1 and ART groups with regard to the memory T cell fractions on D34 (96.7% [94.7-97.9] vs. 84.8% [66.3-89.1], respectively, for memory hCD4⁺ cells; $p = 0.0087$; and 89.3% [89.0-96.3] vs. 51.1% [45.2-84.9], respectively, for memory hCD8⁺ cells; $p = 0.0079$). There were no significant intergroup differences in memory T cell exhaustion, senescence and proliferation profiles in the BM (**S.3B Fig**).

In summary, we did not detect any obvious benefit of an ART/anti-PD1 combination for viral control following the discontinuation of ART. Moreover, in our experimental setting, the immune parameters were slightly improved by the combination of PD1 blockade and ART in the later stages of chronic infection.

PD-L1 expression is modulated differently in myeloid vs. lymphoid cells during acute infection, whereas ART impacts both compartments to a similar degree.

Given that the efficacy of PD1 blockade might depend on the expression of PD-L1, we next characterized this variable in the myeloid and lymphoid compartments during HIV infection. Firstly, we analyzed PD-L1 expression on myeloid cells 1, 2, or 3-weeks p.i.; there were significant changes in the hCD33⁺ cell count in PBMCs, the spleen and the BM during the acute phase of infection. When considering the myeloid subsets, there were no significant difference between human monocytes, cDCs, and pDCs. Due to the relatively low cell counts for each subset in BRGSF-A2 mice, we were able to study PD-L1 expression by cDCs and pDCs in the spleen and the BM but not in the blood (**Fig. 6A, top**). Next, we analyzed PD-L1 expression on lymphoid cells. Representative histograms showed that PD-L1 was expressed on lymphoid cells. The proportion of PD-L1 expressing T cells was high, although the spleen and BM profiles differed. In the spleen, we observed a lower proportion

of splenic hCD4⁺ cells expressing PD-L1 on D7 p.i.; when compared with noninfected mice (1.6% [1.0-3.8] vs. 8.0% [6.0-16.4], respectively, $p = 0.0207$). This difference was no longer detected on D14 and D21 p.i. A similar result was observed for PD-L1-expressing hCD8⁺ T cells, with a longer-lasting decrease relative to noninfected mice (0.5% [0.4-0.6] at D7, 1.8% [0.3-1.9] at D14 and 3.3% [1.7-7.0] at D21 vs 5.8% [4.1-14.6] in noninfected animals, $p = 0.0027$ for D7 and 0.0079 for D14 p.i.). In the BM, we observed that the proportion of PD-L1-expressing hCD4⁺ T cells on D21 was higher in infected mice than in noninfected mice (23.8% [20.4-43.6] vs. 8.6% [5.0-15.4], respectively; $p = 0.0470$). This difference was not observed for hCD8⁺ T cells. An analysis of memory fractions confirmed that the impact on the proportion of PD-L1-expressing cells was not driven by these populations.

In the chronic phase of infection (D42 p.i.), changes in the proportion of PD-L1 expressing cells were observed in both myeloid and lymphoid fractions. On myeloid cells, the proportion of PD-L1-expressing hCD33⁺ cells was lower in PBMCs and spleen, but not in the BM of ART-exposed compared to untreated HIV-infected mice (2.6% [0.9-4.0] vs. 7.3% [4.5-11.8], respectively, $p=0.0173$, in PBMCs; 4.3% [1.7-6.8] vs. 7.5% [5.7-18.6] respectively, $p=0.0480$, in the spleen). Accordingly, the proportion of PD-L1⁺ monocytes among the PBMCs was lower in ART-exposed mice than in untreated HIV-infected mice (2.6% [1.1-4.3] vs. 8.4% [6.7-15.2], respectively; $p = 0.0238$) (**Fig. 6B**). Concerning the T cell compartment, the proportion of PD-L1⁺ hCD4⁺ T cells in the spleen was lower in ART-exposed mice than in untreated HIV-infected mice (2.8% [1.5-5.0] vs. 9.6% [7.1-21.4], respectively; $p = 0.0051$), and the same trend was observed in the BM (4.4% [1.5-11.8] vs. 6.6% [5.5-20.0], respectively; $p = 0.0880$). We also observed a lower proportion of PD-L1⁺ hCD8⁺ T cells in ART-exposed mice than in untreated HIV-infected mice for the spleen ((2.0% [1.1-3.6] vs. 5.9% [4.1-10.8], respectively; $p = 0.0480$) but not for the BM. When focusing on memory T cells, the proportion of splenic memory hCD8⁺ T cells expressing PD-L1 was lower in ART-exposed mice than in HIV-infected mice (1.7% [0.7-3.2] vs. 5.6% [3.7-9.0], respectively; $p = 0.0101$). A

similar trend was observed for the splenic memory hCD4⁺ T cell population ($p = 0.1490$). No significant difference was observed for memory T cells in the BM (**Fig. 6B**).

Overall, we observed that PD-L1 expression was regulated during HIV infection, although the impact depended on the stage of infection. In early-stage infection, we observed the significant modulation of PD-L1 expression on lymphoid cells but not on myeloid cells. In contrast, ART reduced PD-L1 expression on both lymphoid cells and myeloid cells.

The combination of ART with a JAKi reduced the proportion of PD-L1⁺ monocytes among PBMCs and the proportion of PD-L1⁺ T cells among PBMCs and splenocytes.

Strategies that limit chronic inflammation may be beneficial in patients with a chronic HIV infection. Given that IFN-I and II modulate PD-L1 expression (29,30), we next looked at whether JAKi treatment could modulate PD-L1 expression in chronically infected BRGSF-A2 HIS mice. The experimental protocol was as follows: the mice were infected, exposed to ART from D21 p.i. onwards, treated i.p. daily with a JAKi or vehicle from D35 p.i. onwards, and euthanized on D42 p.i. (**Fig. 7A**). The groups of ART/JAKi- and ART-exposed mice had similar plasma viral loads (**S.4A Fig**) and absolute counts of hCD33⁺ cells, human monocytes and hCD3⁺ cells in PBMCs, spleen and BM (**Fig. 7B**). These are two important prerequisites for considering the clinical use of baricitinib in HIV infection: the plasma viral load must still be suppressed and the absolute immune cell counts must remain stable. With regard to the T cell compartment, the proportions of memory hCD4⁺ T cells in the spleen and BM were broadly similar in ART/JAKi- and ART-exposed mice, although the hCD4⁺ T cell count in the spleen was slightly higher in the JAKi-treated animals (74.8% [62.6-88.8]) vs. 60.4% [42.8-72.7]), respectively; $p = 0.0580$) (**Fig. 7C**). We did not observe a significant difference in the proportion of memory hCD8⁺ T cells in lymphoid tissues. JAKi treatment did not appear to influence the proportion of PD1⁺ memory hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells in the spleen or BM (**Fig. 7C**). Furthermore, HLA-DR expression on hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells was not modified - suggesting that the activation profile was similar in the two groups of mice (**S.4B Fig**). Lastly, we

assessed the impact of JAKi treatment on PD-L1 expression on myeloid and lymphoid cells; there were no significant differences in the proportions of PD-L1-expressing hCD33⁺ cells among PBMCs, splenocytes and BM cells (**Fig. 7D**). It is noteworthy that the proportion of PD-L1-expressing myeloid cells varied greatly from one mouse to another. There was a non-significant trend towards a lower human monocyte count among PBMCs in the ART/JAKi group vs. the ART group (2.2% [1.2-3.7] vs. 13.7% [13.5-16.4], $p = 0.0571$). As seen for myeloid cells, high heterogeneity among monocytes also prevented us from drawing firm conclusions with regard to the spleen and the BM. In the lymphoid compartment, we observed a significant lower number of circulating hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells expressing PD-L1 in the ART/JAKi group than in the ART group (2.3% [1.2-4.5] vs. 6.5% [4.0-8.4], respectively, for hCD4⁺; $p = 0.0159$; 4.2% [2.3-6.7] vs. 9.6% [8.3-11.9], respectively, for hCD8⁺; $p = 0.0061$). Furthermore, there were non-significant trends towards lower PD-L1-expressing hCD4⁺ and hCD8⁺ T cell counts in the spleen in ART/JAKi mice compared to ART mice (1.3% [0.7-4.6] vs. 3.1% [2.0-9.9], respectively, for hCD4⁺; 2.5% [0.6-8.8] vs. 4.2% [2.9-18.7], respectively, for hCD8⁺; $p = 0.0693$ for hCD4⁺ and 0.0749 for hCD8⁺).

In conclusion, we demonstrated that treatment with a JAKi did not significantly influence viral control in ART-exposed BRGSF-A2 HIS mice. However, JAKi impacted the lymphoid compartment in ART-exposed HIS mice by reducing the proportion of PD-L1⁺ T cells among PBMCs and splenocytes.

Discussion

We developed a model of ART-controlled HIV infection in the BRGSF-A2 HIS mouse. This model mimicked some key parameters of HIV infection in humans: the viral load, CD4⁺ cell depletion, and the response to ART. Using the R5 tropic NL(AD8) strain of HIV (in attempt to avoid severe infection and excessive hCD4⁺ cell depletion) (68), we observed a rapid increase in the viral load associated with hCD4⁺ cell depletion. The time course of infection was similar to that seen in humans. the peak viral load (10^5 to 10^6 copies/mL) is observed 2 weeks p.i. in the HIS mice (69–73) and in humans (74–76). In the BRGSF-A2 model, however, the viremia reaches a plateau, rather than the peak seen during SIV infections in the macaque and HIV infections in humans. The time course of hCD4⁺ cell depletion was similar to that observed in other HIS models infected with the R5 tropic virus; the trough typically occurs at 3 to 6 weeks p.i. (73,77,78) but varies according to the infection route. The rapid, sustained decay in the hCD4⁺ cell count and the persistence of a high plasma viral load during the chronic phase of infection suggest that the HIV infection in the BRGSF-A2 HIS model is severe and progresses rapidly. The administration of a combination of TDF, FTC, and DTG early in the chronic phase of infection induced a strong treatment response, with a significant reduction in viral load and a progressive recovery in the hCD4⁺ T cell count after 2 weeks. Our decision to administer ART in the drinking water was based on pharmacokinetic studies in which the mice were found to rapidly metabolize TDF, FTC, and DTG (79) (Gouget et al, unpublished data); hence, a daily regimen was essential. Several studies have described the effects of ART with different drug combinations in HIS mice (80–84). However, pharmacokinetic studies are rare (81,85), and administration in the drinking water was used in only a few studies (56,86). Although administration in the drinking water was technically challenging (requiring proper solubilization and stability of the three drugs) and was more variable (in terms of daily uptake per mouse) than i.p. injection, it facilitated long-term treatment and avoided the need to handle and inject the mice on a daily basis. The plasma levels of each drugs were within the therapeutic range in most of the BRGSF-A2 HIS

mice, although the TDF level was below the LQ for some animals. Interestingly, and as observed in clinical settings, the HIS mice showed variable immune responses to ART at early time points: although some of the animals showed a limited hCD4⁺ cell recovery, all controlled the virus. We observed that prior to ART, a small proportion of memory hCD4⁺ T cells was associated with a limited hCD4⁺ T cell recovery - suggesting that the peripheral compartment is preferentially involved in the initial stages of immune recovery. The HIS model exhibits a constant but relatively low level of thymic egress and may thus be of value for further evaluating the discrepancy between viral responses and immune responses during ART. Initiation of an 8-week course of ART early in the chronic phase (3 weeks p.i., at a time when reservoirs are already constituted) did not enable viral control after treatment discontinuation; this contrasts with what has been described in a small fraction of ART-exposed patients capable of controlling the virus following ART discontinuation (66). We consistently observed viral rebound, which thus preclude any analysis of factors that might contribute to post-treatment control. Hence, the viral response to ART discontinuation in the BRGSF-A2 model of HIV infection was very similar to that observed in most patients.

The present study's primary objective was to evaluate the modulation of PD1/PD-L1 expression in various settings: (i) during the natural course of HIV infection (during early and chronic phases), (ii) during ART-controlled HIV infection, and (iii) following the discontinuation of ART. We demonstrated previously that the BRGSF-A2 HIS model has much the same T cell senescence and exhaustion profiles as in humans (49): the preferential expression of PD1 among memory T cells and a higher proportion of PD1-expressing cells in the BM are observed in both the HIS mouse and human models. Nevertheless, the proportion of PD1⁺ memory cells was remarkably high - presumably due to the animals' age; the mice evaluated here were slightly older than those in our previous studies. Indeed, the proportion of PD1-expressing cells is known to be significantly higher in older animals (49). Importantly, age does not appear to impact the efficacy of anti-PD1 agents (87). Interestingly, we observed very small changes in the proportions of PD1-expressing cells at the surface of memory cells. These observations may appear to contradict previous descriptions of PD1

as a marker of HIV infection (7,88,89). As described previously (88,90), the increase in the proportion of PD1 cells predominantly reflects an increase in the T cell subsets preferentially expressing PD1 (i.e. the memory T cell compartment) in the context of chronic infection. Due to low cell counts and technical limitations, we were not able to determine the proportion of PD1-expressing HIV-specific hCD8⁺ T cells. Indeed, PD1 is upregulated on HIV-specific CD8⁺ T cells during HIV infection (2,8). However, our objective was to evaluate the potential impact of an *in vivo* anti-PD1 regimen that would affect both HIV-specific and nonspecific responses. The potential of PD1 blockade has been considered in various settings: untreated, viremic infection (15–17,67), ART-controlled infection (19–21,91), and the discontinuation of ART (19–21). Although transient falls in the viral load were transiently observed, none of these protocols was associated with a stronger immune response and thus long-term improvements in virologic and immunologic parameters. We tested another strategy in which anti-PD1 was initiated just before the discontinuation of ART; anti-PD1-treated mice with an uncontrolled HIV infection were used as controls. Although the anti-PD1 agent had a strong impact on PD1⁺ T cell populations (as assessed by a lower proportion of memory cells in the spleen 11 days after anti-PD1 treatment), no major change in the viral rebound was observed in this setting and the immune parameters were essentially unaffected. Given that PD1 expression can be potentially compromised by binding of the anti-PD1 agent to surface PD1, we used TIGIT (92) as a surrogate marker of exhaustion. No major changes were detected. Nevertheless, a slight but significant increase in the proportion of Ki67-expressing hCD4⁺ T cells (with a trend for hCD8⁺ T cells) confirmed that anti-PD1 treatment had induced moderate changes in the immune compartment. Although various anti-PD1 regimens have shown promise, major improvements have not been achieved. Given that anti-PD1 immunotherapy can also induce serious adverse events (14), the optimal dose, treatment duration and treatment window for efficacy have yet to be defined. As already suggested, combinations of immunotherapeutics that target PD1 and another immune checkpoint may provide a breakthrough improvement (93). However, PD1 expression on memory T cells can also be considered

as a physiologic marker that reflects T cell adaptation rather than a defective immune compartment (21,94).

The limited impact of infection and ART on PD1 expression led us to consider a different approach and thus to study the expression of PD-L1. Interestingly, we observed significant changes in the proportion of PD-L1⁺ lymphoid cells (but not myeloid cells) during early-stage infection. This presumably reflects (i) the time point chosen for the analyses (which may have been too late to observe changes in the myeloid compartment) and (ii) the greatly differing proportions of PD-L1⁺ cells in the various myeloid subsets. HIV infection was associated with a transient reduction in the proportion of PD-L1⁺ T cells in the spleen and a late increase in these proportions in the BM. The proportion of PD-L1⁺ T cells recovered during the chronic phase of HIV infection. Interestingly, ART at this stage impacted PD-L1 expression in both the myeloid and lymphoid compartments, with a low proportion of PD-L1⁺ hCD33⁺ cells, human monocytes, hCD4⁺ T cells and hCD8⁺ T cells. The expression of PD-L1 on lymphoid T cells has been largely neglected to date: however, recent studies (mostly in tumor models) have evidenced the presence of PD-L1⁺ CD8⁺ T cells and have evidenced their pathogenic (immunosuppressive) role (50–52,95,96). It remains to be seen whether this population is relevant in the context of HIV infection. Importantly, PD-L1 is encoded by an ISG, as assessed by IFN's modulation of PD-L1 expression on tumor cells (30) or monocytes in the context in HIV infection (97). We sought to determine whether the combination of IFN signaling blockade (via JAK 1/2 inhibition) with ART modulated PD-L1 expression on T cells. Our experimental set-up was designed to prevent the major adverse events associated with IFN blockade, such as loss of viral control when inhibition is initiated too early. Treatment with a JAKi 2 weeks after ART initiation was not associated with an increase in the viral load. However, JAKi treatment was associated with a reduction in the proportions of PD-L1⁺ hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells among PBMCs and (although not significantly) in the spleen. The JAKi's direct impact on the myeloid compartment was difficult to evaluate because of the high intragroup variability in the proportions of PD-L1⁺ hCD33⁺ cells and monocytes. However, a non-significant trend towards a reduction in the proportion of PD-L1⁺ human

monocytes was observed. Consequently, these results suggest that the JAKi/ART combination may indirectly influence exhaustion by limiting PD-L1 expression. JAKi-based strategies may help to control chronic HIV infection through several mechanisms: (i) reduction of chronic inflammation (44), (ii) modulation of exhaustion (by reducing the proportion of PD-L1-expressing cells), (iii) reduction of immunosuppression (by reducing the proportion of PD-L1-expressing CD8⁺ T cells and/or myeloid cells), and (iv) reduction of the HIV reservoir's life span (98). Although many questions regarding the timing, duration and dose of JAKi treatment have yet to be addressed, our present data open up perspectives for JAKi-based immunotherapy during ART-controlled infection.

Overall, our results show that the BRGSF-A2 HIS model is susceptible to HIV infection and enables the short- and long-term follow-up of the disease required for the reliable assessment of immunotherapies. The use of the HIS mouse had some specific limitations. Although HIS models provide a normal T cell compartment, myeloid reconstitution is partial and chimeric. This chimerism may explain the limited, heterogeneous data obtained here for the myeloid compartment (notably in terms of PD-L1 expression). Secondly, viral persistence in tissue sites (such as gut) appears to be very limited, due to poor colonization by human cells and/or the severity of the HIV infection (with complete depletion of the hCD4⁺ T cell compartment) in these sites. These two limitations may have limited our ability to interpret the inflammatory responses during chronic HIV infection in HIS mice; these responses might be slightly weaker in the mice than in humans. It is noteworthy that IFN signatures are detected in the HIS model, which evidences some degree of inflammation (44,45). For all these reasons, we focused on the T cell compartment. Whereas PD1 blockade has been extensively studied, our present data suggest that the PD1/PD-L1 can also be targeted by JAKi through the IFN signaling pathway. This strategy may have particularly relevance by modulating both inflammation and exhaustion and may help to improve immune responses during ART-controlled chronic HIV infection.

Authorship

LL performed the experiments, analyzed the data and wrote the article; HG, DD and ABT were involved in the pharmacologic studies (formulation of the drug solution and choice of the concentration for oral administration in the drinking water, and LS-MS detection of ART drugs); SD and LB were responsible for sample processing and biobanking; LB, MF and AO performed a second set of experiments on frozen samples (viral detection and immune analyses) under the supervision of NDB and VAF; NT provided expertise in biostatistics; GMR, NL and JDS provided access and expertise on the BRGSF-A2 HIS model; BV, BF, OL, and RLG provided expertise in the field of HIV infection; RLG, OL, NN, and CB designed the experiments, NN and CB supervised the work and helped to draft the manuscript.

Acknowledgments

We thank the staff in our animal facility (and particularly Lucie Jourdan) for expert handling of the animals. We thank Julie Morin and Marco Léonec for sample biobanking following euthanasia and Francois Lanthiez for detection of ISGs in total tissues.

Conflict of Interest Disclosure

L.L, S.D, and N.L. were employees of GenOway at the time when most of the present study was performed.

N.N.: personal fees from MSD and Biogen outside the scope of the present work.

O.L: paid expert testimony and consultancy fees from BMS France, MSD, and Astra Zeneca; consultancy fees from Incyte; expert testimony for Janssen; grants from Gilead.

Legends

Figure 1. Impact of HIV infection on the lymphoid and myeloid compartments in BRGSF-A2 HIS mice at early stages of infection. (A) BRGSF-A2 HIS mice were infected with the HIV-1 NL(AD8) strain; Blood samples were taken until 82 days p.i. The changes over time in the plasma viral load (left) and percentage of hCD4⁺ T cells (relative to the absolute number of hCD4⁺ T cells at baseline) (right) are shown. The dashed line corresponds to the lower LQ for the viral load, and the grey line corresponds to the median hCD4⁺ T cell percentage at baseline. Three independent experiments are shown, with respectively n = 5 (#1), n = 12 (#2), and n = 14 (#3). (B, C, D) Characterization of lymphoid and myeloid cells in the blood, spleen and BM during the early stages of infection. PBMCs, splenocytes and BM cells (1 femur per animal) from noninfected mice (n = 18) or infected mice were collected for 7 (n = 8), 14 (n = 8) or 21 (n = 7) days. The blood counts are expressed in cells per milliliter. (B) Total hCD45⁺, hCD4⁺ and hCD8⁺ counts, and the frequency of memory T cells. (C) Total hCD33⁺, human monocyte, hcDC and hpDC counts. Human myeloid cells were defined as follows: monocytes (hCD33⁺hCD15⁻hCD14⁺hCD16^{+/-}), hcDCs (hCD33⁺hCD15⁻hCD14⁻hCD16⁻hCD11c⁺) and hpDC (hCD3⁻hCD20⁻hCD33^{+/-}hCD123⁺hCD303⁺). (D) A representative dot plot showing PD1 and hCD4 expression on hCD3⁺ cells from splenocytes collected on D21 p.i. from HIV-infected mouse. The frequency of PD1-expressing cells among total and memory T cells was determined. The graphs show the median [IQR]. The HIS mice were generated with more than four different donors. Statistically significant differences in a nonparametric Wilcoxon test (for comparisons of different time points in the same animal) or a Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test (for comparisons of experimental and control groups at the same time point) are indicated as follows: * p<0.05, ** p<0.01, **** p<0.0001

Figure 2. ART reduces the viral load and enables hCD4⁺ cell recovery, with no change in the proportion of PD1-expressing cells at the chronic stage of HIV infection in BRGSF-A2 HIS

mice. (A) A schematic representation of the times of infection and ART. After confirmation of an effective viral infection, we studied untreated mice (n = 30, in red) and ART-exposed HIV-infected mice (n = 28, in green). The median plasma viral load and percentage of hCD4⁺ T cells (relative to the baseline) are shown on left-hand graphs. A scatter plot also shows the viral load and hCD4⁺ T cell percentages (on D43 for the viral load, and on D43 and D75 for the hCD4⁺ T cell percentages). The dashed line corresponds to the lower LQ for viral load, and the grey line corresponds to the median hCD4⁺ T cell percentage at baseline. **(B)** Plasma concentrations (ng/ml) of dolutegravir (DTG), emtricitabine (FTC) and tenofovir (TDF) after 2 weeks of oral ART (D35 p.i.). **(C)** Total T cell count, the frequency of memory T cells, and the frequencies of PD1-expressing memory T cells among hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells collected from the spleen and BM (1 femur per animal) of ART-naïve mice (n = 7, in red) and ART-exposed HIV-infected mice (n = 8, in green) on D42 p.i. (i.e. after 3 weeks of ART). The median and IQR are indicated on the scatter plot and the bar graph. The data were obtained in two independent experiments on mice generated with more than four different donors. Statistically significant differences in a nonparametric Wilcoxon test (for comparisons of different time points in the same animal) or a Mann-Whitney test (for comparisons of HIV and ART groups at the same time point) are indicated as follows: ** p<0.01, *** p<0.001, and **** p<0.0001

Figure 3. Impact of the discontinuation of ART on the plasma viral load and T cell compartment in BRGSF-A2 HIS mice. **(A)** A schematic representation of the times of infection and ART. The groups were noninfected mice (n = 6, grey), ART-naïve mice (n = 14, in red), and HIV-infected mice in which ART was given for 8 weeks and then discontinued. The animals were euthanized 11 days (n = 7, in pale green) or 34 days (n = 7, in dark green) after the discontinuation of ART. The plasma viral load was monitored up until D119 p.i.. The dashed line corresponds to the lower LQ. **(B)** Total numbers and frequencies of memory T cells and PD1-expressing cells among memory hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells. Samples were collected from the spleen and BM (1 femur per animal). The data

(quoted as the median [IQR]) came from a single experiment on 34 mice generated with eight different donors. The groups were compared using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test.

Figure 4. PD1 blockade in chronically HIV-infected BRGSF-A2 mice. (A) A schematic representation of the times of infection and anti-PD1 treatment. HIV-1 infected mice were injected with an anti-PD1 agent (n = 12, blue) or vehicle (n = 12, in red). Four injections were performed over 10 days. Samples were analyzed on D11 (D43 p.i.) or D34 (D66 p.i.) after the last injection. In representative dot plots, the PD1 blockade's efficacy is shown in terms of PD1 and hCD4 expression on splenic hCD3⁺ cells from nontreated or treated mice euthanized on D11 after the last injection. (B) The plasma viral load in anti-PD1-treated and sham injected HIV-infected mice. The dashed line corresponds to the lower LQ. (C) The frequency of memory T cells collected from the spleen and BM on D11 after the last injection for anti-PD1 treated HIV-1 infected mice (n = 6, in turquoise) and untreated HIV-1 infected mice (n = 6, in red)) and on D34 after the last injection for anti-PD1 treated HIV-1 infected mice (n = 5, in blue) and untreated HIV-1 infected mice (n = 6, burgundy)). The data (quoted as the median [IQR]) came from a single experiment on 23 mice generated with eight different donors. Statistically significant differences in a nonparametric Wilcoxon test (for comparisons of different time points in the same animal) or a Mann-Whitney test (for comparisons of different groups at a given time point) are indicated as follows: * p<0.05.

Figure 5. A combination of orally administered ART and PD1 blockade does not improve viral control after the discontinuation of ART in BRGSF-A2 HIS mice. (A) A schematic representation of the times of infection, ART, and anti-PD1 treatment. Three groups of mice were studied: ART-naive mice (n=14, in red), mice exposed to ART only (n=14, in green) and mice exposed to ART-and an anti-PD1 agent (n=14, in blue). Samples were analyzed on D11 (D96 p.i.) or D34 (D119 p.i.) after the last anti-PD1/sham injection. The plasma viral load is shown. The dashed line corresponds to the lower LQ. (B) Frequency of memory T cells and (C) frequencies of TIGIT, CD57, Ki67-

expressing memory T cells collected from the spleen on D11 and D34 following discontinuation of ART with or without anti-PD1-treatment. The data (quoted as the median [IQR]) came from a single experiment on 42 mice generated with eight different donors. Statistically significant differences in a Mann-Whitney test (for comparisons of ART and ART + anti-PD1 groups at a given time point) are indicated as follows: * $p < 0.05$.

Figure 6. Characterization of PD-L1 expression in myeloid and lymphoid cells during acute infection and ART-controlled infection. (A) Frequency of PD-L1-expressing cells among hCD33⁺, human monocytes, hcDCs, and hpDCs, and among T cells and memory T cells in PBMCs, splenocytes and BM cells from noninfected mice (n = 18) or HIV-1 infected mice after 7 (n = 8), 14 (n = 8) and 21 (n = 7) days. Representative histograms show PD-L1 expression on human myeloid cells and T cells (with mCD45 as negative control) on D21 for BM cells collected from the HIV-infected mice. (B) Frequency of PD-L1-expressing hCD33⁺ cells, human monocytes, hCD4⁺ cells, and hCD8⁺ cells, and memory T cells collected from the spleen and BM of HIV-infected mice (n = 7, in red) and ART mice (n = 8, in green) euthanized after 3 weeks of treatment (D42 p.i.). The median and IQR are indicated in the bar graph. The data came from two independent experiments generated with more than four different donors. Statistically significant differences in a Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test (for comparisons of groups with the control) or a Mann-Whitney test (for comparisons of HIV and ART groups at a given time point) are indicated as follows: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 7. When combined with ART, treatment with a JAKi confers an additional benefit by modulating PD-L1 expression. (A) A schematic representation of the times of infection, ART and JAKi treatment. The mice were subdivided into two groups: animals exposed to ART only for 3 weeks (n = 19, green), and animals exposed to ART for 3 weeks and treated with a JAKi for the last week of ART (n = 19, purple). (B) Total numbers of hCD33⁺ cells, human monocytes and hCD3⁺

cells collected from PBMCs, spleen and BM (1 femur per animal) in the two groups. Blood counts are expressed in cells per milliliter. **(C)** Frequencies of memory T cells and PD1-expressing memory T cells collected from the spleen and BM. **(D)** Frequency of PD-L1-expressing hCD33⁺ cells, human monocytes, and hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells from PBMCs, spleen and BM of mice. Median and IQR are indicated. The data (quoted as the median [IQR]) came from a two independent experiments on 38 mice generated with more than four different donors. Statistically significant differences in a Mann-Whitney test (for comparisons of the ART vs. ART + JAKi groups at a given time point) are indicated as follows: * p<0.05, ** p<0.01.

Supporting material

Supplemental Figure S1. Early HIV infection was directly detected in nonlymphoid tissues and altered the hCD4/CD8 ratio but not HLA-DR expression on T cells in lymphoid sites. (A) Viral DNA (vDNA copies/million hCD45⁺ cells) was measured in AT, gut, lung and liver collected from mice infected for 7 days (n = 8) or 21 days (n = 7). (B) The hCD4:hCD8 ratio in the spleen and BM from noninfected mice (n = 18) or mice infected for 7 (n = 8), 14 (n = 8) or 21 (n = 7) days. (C) The frequency of HLA-DR expressing hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells among splenocytes and BM cells from noninfected or infected mice. The median [IQR] is indicated on the bar graph. Data came from a single experiment on mice generated with four different donors. Statistically significant differences in a nonparametric Mann-Whitney test (for comparisons of two time points for the same tissue) or a Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test [for comparisons of groups with the control) are indicated as follows: * p<0.05, ** p<0.01.

Supplemental Figure S2. Effects of oral ART on nonlymphoid tissues, hCD4⁺ recovery in chronic infection, and an association between immune responders and the proportion of hCD4⁺ memory cells. (A) Viral DNA (vDNA copies/million hCD45⁺ cells) was measured in AT, gut, lungs and liver collected from untreated HIV-infected mice (n = 7, in red) and ART-exposed HIV-infected mice (n = 8, in green) euthanized on D42 (equivalent to 3 weeks of treatment for the ART-exposed group). (B) Additional analyses of hCD4⁺ cell recovery after ART initiation. BRGSF-A2 HIS mice were infected with HIV-1 NL(AD8) as described above, and peripheral blood samples were collected at various time points following ART initiation. The percentage of hCD4⁺ T cells in the blood (relative to the baseline) 11 (n = 8), 13 (n = 24) or 14 (n = 17) days after ART initiation was measured. (C) The plasma viral load, the total hCD4⁺ cell count, and the frequency of memory hCD4⁺ T cells among PBMCs on D26 (i.e. before initiation of ART) in immunologic responders (IR, defined according to hCD4⁺ cell recovery on D43 p.i.; n = 13) and immunologic nonresponders (INR) (n =

8). Blood counts are expressed in cells per milliliter. **(D)** The hCD4:hCD8 ratio in the spleen and BM from untreated and ART-treated HIV-infected mice on D42. The median and IQR are indicated on scatter plot and bar graphs. The data shown are composite data from a single experiment (A, C, D) or from three independent experiments (B) on mice generated with more than four donors. Statistically significant differences in a nonparametric Mann-Whitney test (for comparisons of a single tissue at two time point or two tissues at one time point) or a Wilcoxon test (for comparisons of different time points in the same animal) are indicated as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Supplemental Figure S3. The combination of PD1 blockade with ART has a minor impact on immunologic parameters in the BM. Two groups of mice were studied: HIV-infected mice exposed to ART only (n=14, green) or exposed to ART and an anti-PD1 agent (n=14, blue). Analyses were performed on D11 (D96 p.i.) or D34 (D119 p.i.) after the last anti-PD1/sham injection, as described in Fig. 5. **(A)** Frequency of memory T cells and, **(B)** frequencies of TIGIT, CD57, Ki67-expressing memory T cells collected from BM cells on D11 and D34 from mice exposed to ART and an anti-PD1 agent. The data (quoted as the median [IQR]) came from a single experiment on 28 mice generated with eight different donors. Statistically significant differences in a Mann-Whitney test (for comparisons of the ART and ART + anti-PD1 groups at a given time point) are indicated as follows: ** $p < 0.01$.

Supplemental Figure S4. When combined with ART, treatment with a JAKi does not alter viral load control and does not induce HLA-DR expression on T cells. Mice exposed to ART for 3 weeks received a JAKi for the last week of ART (n = 19, purple) or not (n = 19, green). Samples were analyzed on D42 p.i., as described in Fig. 7. **(A)** The plasma viral load. **(B)** The frequency of HLA-DR expressing hCD4⁺ and hCD8⁺ T cells among PBMCs, splenocytes and BM cells in the ART and ART + JAKi groups. The data (quoted as the median [IQR]) came from two independent experiments

on 38 mice generated with more than four different donors. A Mann-Whitney test was used to compare the ART and ART+JAKi groups at a given time point.

References

1. Deeks SG, Tracy R, Douek DC. Systemic Effects of Inflammation on Health during Chronic HIV Infection. Vol. 39, Immunity. Immunity; 2013. p. 633–45.
2. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*. 2006 Sep 21;443(7109):350–4.
3. Maciel RA, Klück HM, Durand M, Sprinz E. Comorbidity is more common and occurs earlier in persons living with HIV than in HIV-uninfected matched controls, aged 50 years and older: A cross-sectional study. *Int J Infect Dis*. 2018 May 1;70:30–5.
4. Althoff KN, Smit M, Reiss P, Justice AC. HIV and ageing: Improving quantity and quality of life. *Curr Opin HIV AIDS*. 2016 Sep 1;11(5):527–36.
5. Chawla A, Wang C, Patton C, Murray M, Puneekar Y, de Ruiter A, et al. A Review of Long-Term Toxicity of Antiretroviral Treatment Regimens and Implications for an Aging Population. Vol. 7, Infectious Diseases and Therapy. Springer Healthcare; 2018. p. 183–95.
6. Fromentin R, Bakeman W, Lawani MB, Khoury G, Hartogensis W, DaFonseca S, et al. CD4+ T Cells Expressing PD-1, TIGIT and LAG-3 Contribute to HIV Persistence during ART. *PLoS Pathog*. 2016 Jul 1;12(7).
7. Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM, Price DA, Gostick E, Adams WC, et al. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med*. 2006;203(10):2281–92.
8. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med*. 2006;12(10):1198–202.
9. Schönrich G, Raftery MJ. The PD-1/PD-L1 axis and virus infections: A delicate balance. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9(JUN).
10. Paiardini M, Dhodapkar K, Harper J, Deeks SG, Ahmed R. Editorial: HIV and Cancer

Immunotherapy: Similar Challenges and Converging Approaches. *Front Immunol.* 2020 Mar 31;11.

11. Frebel H, Nindl V, Schuepbach RA, Braunschweiler T, Richter K, Vogel J, et al. Programmed death 1 protects from fatal circulatory failure during systemic virus infection of mice. *J Exp Med.* 2012 Dec 17;209(13):2485–99.
12. Iwai Y, Terawaki S, Ikegawa M, Okazaki T, Honjo T. PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *J Exp Med.* 2003 Jul 7;198(1):39–50.
13. Schönrich G, Raftery MJ. The PD-1/PD-L1 Axis and Virus Infections: A Delicate Balance. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:207.
14. Haanen J, Ernstoff MS, Wang Y, Menzies AM, Puzanov I, Grivas P, et al. Autoimmune diseases and immune-checkpoint inhibitors for cancer therapy: review of the literature and personalized risk-based prevention strategy. *Ann Oncol.* 2020 Jun 1;31(6):724–44.
15. Velu V, Titanji K, Zhu B, Husain S, Pladevega A, Lai L, et al. Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature.* 2009 Mar 12;458(7235):206–10.
16. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature.* 2006 Feb 9;439(7077):682–7.
17. Shetty RD, Velu V, Titanji K, Bosinger SE, Freeman GJ, Silvestri G, et al. PD-1 blockade during chronic SIV infection reduces hyperimmune activation and microbial translocation in rhesus macaques. *J Clin Invest.* 2012 May 1;122(5):1712–6.
18. Seung E, Dudek TE, Allen TM, Freeman GJ, Luster AD, Tager AM. PD-1 Blockade in Chronically HIV-1-Infected Humanized Mice Suppresses Viral Loads. *PLoS One.* 2013 Oct 21;8(10).
19. Mylvaganam GH, Chea LS, Tharp GK, Hicks S, Velu V, Iyer SS, et al. Combination anti-PD-1 and antiretroviral therapy provides therapeutic benefit against SIV. *JCI insight.* 2018 Sep 20;3(18).

20. Strongin Z, Micci L, Fromentin R, Harper J, McBrien J, Ryan E, et al. Virologic and immunologic features of SIV control post ART interruption in rhesus macaques. *J Virol*. 2020 Apr 29;94(14).
21. Harper J, Gordon S, Chan CN, Wang H, Lindemuth E, Galardi C, et al. CTLA-4 and PD-1 dual blockade induces SIV reactivation without control of rebound after antiretroviral therapy interruption. *Nat Med*. 2020 Apr 1;26(4):519–28.
22. Garff G Le, Samri A, Lambert-Niclot S, Even S, Lavolé A, Cadranel J, et al. Transient HIV-specific T cells increase and inflammation in an HIV-infected patient treated with nivolumab. *Vol. 31, AIDS*. Lippincott Williams and Wilkins; 2017. p. 1048–51.
23. Fromentin R, DaFonseca S, Costiniuk CT, El-Far M, Procopio FA, Hecht FM, et al. PD-1 blockade potentiates HIV latency reversal ex vivo in CD4 + T cells from ART-suppressed individuals. *Nat Commun*. 2019 Dec 1;10(1).
24. Van der Sluis RM, Kumar NA, Pascoe RD, Zerbato JM, Evans VA, Dantanarayana AI, et al. Combination Immune Checkpoint Blockade to Reverse HIV Latency. *J Immunol*. 2020 Mar 1;204(5):1242–54.
25. Guihot A, Bourgarit A, Carcelain G, Autran B. Immune reconstitution after a decade of combined antiretroviral therapies for human immunodeficiency virus. *Vol. 32, Trends in Immunology*. Trends Immunol; 2011. p. 131–7.
26. Uldrick TS, Gonçalves PH, Abdul-Hay M, Claeys AJ, Emu B, Ernstoff MS, et al. Assessment of the Safety of Pembrolizumab in Patients with HIV and Advanced Cancer - A Phase 1 Study. *JAMA Oncol*. 2019 Sep 1;5(9):1332–9.
27. Wang X, Zhang Z, Zhang S, Fu J, Yao J, Jiao Y, et al. B7-H1 up-regulation impairs myeloid DC and correlates with disease progression in chronic HIV-1 infection. *Eur J Immunol*. 2008;38(11):3226–36.
28. Rosignoli G, Lim CH, Bower M, Gotch F, Imami N. Programmed death (PD)-1 molecule and its ligand PD-L1 distribution among memory CD4 and CD8 T cell subsets in human

- immunodeficiency virus-1-infected individuals. *Clin Exp Immunol*. 2009 Jul;157(1):90–7.
29. Boasso A, Hardy AW, Landay AL, Martinson JL, Anderson SA, Dolan MJ, et al. PDL-1 upregulation on monocytes and T cells by HIV via type I interferon: Restricted expression of type I interferon receptor by CCR5-expressing leukocytes. *Clin Immunol*. 2008 Oct;129(1):132–44.
 30. Benci JL, Xu B, Qiu Y, Wu TJ, Dada H, Twyman-Saint Victor C, et al. Tumor Interferon Signaling Regulates a Multigenic Resistance Program to Immune Checkpoint Blockade. *Cell*. 2016 Dec 1;167(6):1540-1554.e12.
 31. Lavender KJ, Gibbert K, Peterson KE, Van Dis E, Francois S, Woods T, et al. Interferon Alpha Subtype-Specific Suppression of HIV-1 Infection In Vivo . *J Virol*. 2016 Jul 1;90(13):6001–13.
 32. Abraham S, Choi JG, Ortega NM, Zhang J, Shankar P, Swamy NM. Gene therapy with plasmids encoding IFN- β or IFN- α 14 confers long-term resistance to HIV-1 in humanized mice. *Oncotarget*. 2016;7(48):78412–20.
 33. Sandler NG, Bosinger SE, Estes JD, Zhu RTR, Tharp GK, Boritz E, et al. Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression. *Nature*. 2014;511(7511):601–5.
 34. Doyle T, Goujon C, Malim MH. HIV-1 and interferons: Who's interfering with whom? Vol. 13, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group; 2015. p. 403–13.
 35. Hardy GAD, Sieg S, Rodriguez B, Anthony D, Asaad R, Jiang W, et al. Interferon- α Is the Primary Plasma Type-I IFN in HIV-1 Infection and Correlates with Immune Activation and Disease Markers. *PLoS One*. 2013 Feb 20;8(2).
 36. Hyrcza MD, Kovacs C, Loutfy M, Halpenny R, Heisler L, Yang S, et al. Distinct Transcriptional Profiles in Ex Vivo CD4+ and CD8+ T Cells Are Established Early in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and Are Characterized by a Chronic Interferon Response as Well as Extensive Transcriptional Changes in CD8+ T Cells. *J Virol*. 2007 Apr

- 1;81(7):3477–86.
37. Jacquelin B, Mayau V, Targat B, Liovat AS, Kunkel D, Petitjean G, et al. Nonpathogenic SIV infection of African green monkeys induces a strong but rapidly controlled type I IFN response. *J Clin Invest*. 2009 Dec 1;119(12):3544–55.
 38. Harris LD, Tabb B, Sodora DL, Paiardini M, Klatt NR, Douek DC, et al. Downregulation of Robust Acute Type I Interferon Responses Distinguishes Nonpathogenic Simian Immunodeficiency Virus (SIV) Infection of Natural Hosts from Pathogenic SIV Infection of Rhesus Macaques. *J Virol*. 2010 Aug 1;84(15):7886–91.
 39. Wilson EB, Yamada DH, Elsaesser H, Herskovitz J, Deng J, Cheng G, et al. Blockade of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection. *Science* (80-). 2013 Apr 12;340(6129):202–7.
 40. Teijaro JR, Ng C, Lee AM, Sullivan BM, Sheehan KCF, Welch M, et al. Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling. *Science* (80-). 2013 Apr 12;340(6129):207–11.
 41. Ng CT, Sullivan BM, Teijaro JR, Lee AM, Welch M, Rice S, et al. Blockade of interferon beta, but not interferon alpha, signaling controls persistent viral infection. *Cell Host Microbe*. 2015 May 13;17(5):653–61.
 42. Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P, et al. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature*. 2011 Apr 28;472(7344):481–5.
 43. Zuniga EI, Hahm B, Oldstone MBA. Type I Interferon During Viral Infections: Multiple Triggers for a Multifunctional Mediator. In: *Interferon: The 50th Anniversary*. Springer Berlin Heidelberg; 2007. p. 337–57.
 44. Zhen A, Rezek V, Youn C, Lam B, Chang N, Rick J, et al. Targeting type I interferon-mediated activation restores immune function in chronic HIV infection. *J Clin Invest*. 2017 Jan 3;127(1):260–8.

45. Cheng L, Ma J, Li J, Li D, Li G, Li F, et al. Blocking type I interferon signaling enhances T cell recovery and reduces HIV-1 reservoirs. *J Clin Invest*. 2017 Jan 3;127(1):269–79.
46. Legrand N, Huntington ND, Nagasawa M, Bakker AQ, Schotte R, Strick-Marchand H, et al. Functional CD47/signal regulatory protein alpha (SIRP α) interaction is required for optimal human T- and natural killer- (NK) cell homeostasis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 9;108(32):13224–9.
47. Lopez-Lastra S, Masse-Ranson G, Fiquet O, Darche S, Serafini N, Li Y, et al. A functional DC cross talk promotes human ILC homeostasis in humanized mice. *Blood Adv*. 2017 Apr 11;1(10):601–14.
48. Li Y, Mention JJ, Court N, Masse-Ranson G, Toubert A, Spits H, et al. A novel Flt3-deficient HIS mouse model with selective enhancement of human DC development. *Eur J Immunol*. 2016 May 1;46(5):1291–9.
49. Labarthe L, Henriquez S, Lambotte O, Di Santo JP, Le Grand R, Pflumio F, et al. Frontline Science: Exhaustion and senescence marker profiles on human T cells in BRG5F-A2 humanized mice resemble those in human samples. *J Leukoc Biol*. 2020 Jan 1;107(1):27–42.
50. Diskin B, Adam S, Cassini MF, Sanchez G, Liria M, Aykut B, et al. PD-L1 engagement on T cells promotes self-tolerance and suppression of neighboring macrophages and effector T cells in cancer. *Nat Immunol*. 2020 Apr 1;21(4):442–54.
51. Brochez L, Meireson A, Chevolet I, Sundahl N, Ost P, Kruse V. Challenging PD-L1 expressing cytotoxic T cells as a predictor for response to immunotherapy in melanoma. *Nat Commun*. 2018 Dec 1;9(1).
52. Valero-Pacheco N, Arriaga-Pizano L, Ferat-Osorio E, Mora-Velandia LM, Pastelin-Palacios R, Villasís-Keever MÁ, et al. PD-L1 expression induced by the 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus impairs the human T cell response. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:989673.
53. Disanto JP, Müller W, Guy-Grand D, Fischer A, Rajewsky K. Lymphoid development in mice

- with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor γ chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jan 17;92(2):377–81.
54. Mackaretschian K, Hardin JD, Moore KA, Boast S, Goff SP, Lemischka IR. Targeted disruption of the *flk2/flt3* gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity*. 1995;3(1):147–61.
55. Pascolo S, Bervas N, Ure JM, Smith AG, Lemonnier FA, Pérarnau B. HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8+ T lymphocytes from $\beta 2$ microglobulin ($\beta 2m$) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db $\beta 2m$ double knockout mice. *J Exp Med*. 1997 Jun 16;185(12):2043–51.
56. Li Y, Masse-Ranson G, Garcia Z, Bruel T, Kök A, Strick-Marchand H, et al. A human immune system mouse model with robust lymph node development. *Nat Methods*. 2018 Aug 1;15(8):623–30.
57. Del Prete GQ, Smedley J, Macallister R, Jones GS, Li B, Hattersley J, et al. Short Communication: Comparative Evaluation of Coformulated Injectable Combination Antiretroviral Therapy Regimens in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Rhesus Macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2016 Feb 1;32(2):163–8.
58. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 2008 Mar;22(3):659–61.
59. Gouget H, Noé G, Barrail-Tran A, Furlan V. UPLC–MS/MS method for the simultaneous quantification of bicitgravir and 13 others antiretroviral drugs plus cobicistat and ritonavir boosters in human plasma. *J Pharm Biomed Anal*. 2020 Mar 20;181.
60. Avettand-Fenoel V, Bayan T, Gardiennet E, Boufassa F, Lopez P, Lecuroux C, et al. Dynamics in HIV-DNA levels over time in HIV controllers. *J Int AIDS Soc*. 2019 Jan 1;22(1).
61. Avettand-Fènoël V, Hocqueloux L, Ghosn J, Cheret A, Frange P, Melard A, et al. Total HIV-1 DNA, a Marker of Viral Reservoir Dynamics with Clinical Implications. *Clin Microbiol Rev*. 2016 Oct;29(4):859–80.

62. Trémeaux P, Lenfant T, Boufassa F, Essat A, Mélard A, Gousset M, et al. Increasing contribution of integrated forms to total HIV DNA in blood during HIV disease progression from primary infection. *EBioMedicine*. 2019 Mar 1;41:455–64.
63. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. 2019;3.
64. Battegay M, Nüesch R, Hirschel B, Kaufmann GR. Immunological recovery and antiretroviral therapy in HIV-1 infection. *Lancet Infect Dis*. 2006 May;6(5):280–7.
65. Kaufmann GR, Furrer H, Ledergerber B, Perrin L, Opravil M, Vernazza P, et al. Characteristics, Determinants, and Clinical Relevance of CD4 T Cell Recovery to <500 Cells/L in HIV Type 1--Infected Individuals Receiving Potent Antiretroviral Therapy. *Clin Infect Dis*. 2005 Aug 1;41(3):361–72.
66. Sáez-Cirión A, Bacchus C, Hocqueloux L, Avettand-Fenoel V, Girault I, Lecuroux C, 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(3).
67. Palmer BE, Neff CP, LeCureux J, Ehler A, DSouza M, Remling-Mulder L, et al. In Vivo Blockade of the PD-1 Receptor Suppresses HIV-1 Viral Loads and Improves CD4 + T Cell Levels in Humanized Mice . *J Immunol*. 2013 Jan 1;190(1):211–9.
68. Ikeda H, Godinho-Santos A, Rato S, Vanwalscappel B, Clavel F, Aihara K, et al. Quantifying the Antiviral Effect of IFN on HIV-1 Replication in Cell Culture. *Sci Rep*. 2015 Jun 29;5.
69. Brainard DM, Seung E, Frahm N, Cariappa A, Bailey CC, Hart WK, et al. Induction of Robust Cellular and Humoral Virus-Specific Adaptive Immune Responses in Human Immunodeficiency Virus-Infected Humanized BLT Mice. *J Virol*. 2009 Jul 15;83(14):7305–21.
70. Watanabe Y, Takahashi T, Okajima A, Shiokawa M, Ishii N, Katano I, et al. The analysis of the functions of human B and T cells in humanized NOD/shi-scid/ γ cnull (NOG) mice (hu-HSC NOG mice). *Int Immunol*. 2009;21(7):843–58.

71. Wahl A, Swanson MD, Nochi T, Olesen R, Denton PW, Chateau M, et al. Human breast milk and antiretrovirals dramatically reduce oral HIV-1 transmission in BLT humanized mice. *PLoS Pathog.* 2012 Jun;8(6).
72. Llewellyn GN, Seclén E, Wietgreffe S, Liu S, Chateau M, Pei H, et al. Humanized Mouse Model of HIV-1 Latency with Enrichment of Latent Virus in PD-1 + and TIGIT + CD4 T Cells . *J Virol.* 2019 Mar 6;93(10).
73. Sato Y, Nagata S, Takiguchi M. Effective elicitation of human effector CD8+ T cells in HLA-B*51:01 transgenic humanized mice after infection with HIV-1. *PLoS One.* 2012 Aug 6;7(8).
74. Kaufmann GR, Cunningham P, Kelleher AD, Zaunders J, Carr A, Vizzard J, et al. Patterns of Viral Dynamics during Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J Infect Dis.* 1998 Dec;178(6):1812–5.
75. Schacker TW, Hughes JP, Shea T, Coombs RW, Corey L. Biological and virologic characteristics of primary HIV infection. *Ann Intern Med.* 1998 Apr 15;128(8):613–20.
76. Sterling TR, Vlahov D, Astemborski J, Hoover DR, Margolick JB, Quinn TC. Initial plasma HIV-1 RNA levels and progression to AIDS in women and men. *N Engl J Med.* 2001 Mar 8;344(10):720–5.
77. Sun Z, Denton PW, Estes JD, Othieno FA, Wei BL, Wege AK, et al. Intrarectal transmission, systemic infection, and CD4+ T cell depletion in humanized mice infected with HIV-1. *J Exp Med.* 2007 Apr 16;204(4):705–14.
78. Nie C, Sato K, Misawa N, Kitayama H, Fujino H, Hiramatsu H, et al. Selective infection of CD4+ effector memory T lymphocytes leads to preferential depletion of memory T lymphocytes in R5 HIV-1-infected humanized NOD/SCID/IL-2R γ null mice. *Virology.* 2009 Nov 10;394(1):64–72.
79. Stripecke R, Münz C, Schuringa JJ, Bissig K, Soper B, Meeham T, et al. Innovations, challenges, and minimal information for standardization of humanized mice. *EMBO Mol Med.* 2020 Jun 24;12(7).

80. Sango K, Joseph A, Patel M, Osiecki K, Dutta M, Goldstein H. Highly active antiretroviral therapy potently suppresses HIV infection in humanized Rag2^{-/-}γc^{-/-} mice. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2010 Jul 1;26(7):735–46.
81. Choudhary SK, Rezk NL, Ince WL, Cheema M, Zhang L, Su L, et al. Suppression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Viremia with Reverse Transcriptase and Integrase Inhibitors, CD4⁺ T-Cell Recovery, and Viral Rebound upon Interruption of Therapy in a New Model for HIV Treatment in the Humanized Rag2^{-/-}γc^{-/-} Mouse. *J Virol*. 2009 Aug 15;83(16):8254–8.
82. Choudhary SK, Archin NM, Cheema M, Dahl NP, Garcia J V., Margolis DM. Latent HIV-1 Infection of Resting CD4⁺ T Cells in the Humanized Rag2^{-/-} c^{-/-} Mouse. *J Virol*. 2012 Jan 1;86(1):114–20.
83. Denton PW, Olesen R, Choudhary SK, Archin NM, Wahl A, Swanson MD, et al. Generation of HIV Latency in Humanized BLT Mice. *J Virol*. 2012 Jan 1;86(1):630–4.
84. Marsden MD, Kovochich M, Suree N, Shimizu S, Mehta R, Cortado R, et al. HIV Latency in the Humanized BLT Mouse. *J Virol*. 2012 Jan 1;86(1):339–47.
85. Nischang M, Suttmuller R, Gers-Huber G, Audigé A, Li D, Rochat MA, et al. Humanized mice recapitulate key features of HIV-1 infection: A novel concept using long-acting anti-retroviral drugs for treating HIV-1. *PLoS One*. 2012 Jun 13;7(6).
86. Satheesan S, Li H, Burnett JC, Takahashi M, Li S, Wu SX, et al. HIV Replication and Latency in a Humanized NSG Mouse Model during Suppressive Oral Combinational Antiretroviral Therapy. *J Virol*. 2018 Jan 17;92(7):e02118-17.
87. Elias R, Giobbie-Hurder A, McCleary NJ, Ott P, Hodi FS, Rahma O. Efficacy of PD-1 & PD-L1 inhibitors in older adults: A meta-analysis. *J Immunother Cancer*. 2018 Apr 4;6(1).
88. Zhang JY, Zhang Z, Wang X, Fu JL, Yao J, Jiao Y, et al. PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8⁺ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood*. 2007 Jun 1;109(11):4671–8.

89. Fenwick C, Joo V, Jacquier P, Noto A, Banga R, Perreau M, et al. T-cell exhaustion in HIV infection. Vol. 292, Immunological Reviews. Blackwell Publishing Ltd; 2019. p. 149–63.
90. Cockerham LR, Jain V, Sinclair E, Glidden D V., Hartogenesis W, Hatano H, et al. Programmed death-1 expression on CD4+ and CD8+ T cells in treated and untreated HIV disease. AIDS. 2014 Jul 31;28(12):1749–58.
91. Bekerman E, Hesselgesser J, Carr B, Nagel M, Hung M, Wang A, et al. PD-1 blockade and TLR7 activation lack therapeutic benefit in chronic simian immunodeficiency virus-infected macaques on antiretroviral therapy. Antimicrob Agents Chemother. 2019;63(11).
92. Chew GM, Fujita T, Webb GM, Burwitz BJ, Wu HL, Reed JS, et al. TIGIT Marks Exhausted T Cells, Correlates with Disease Progression, and Serves as a Target for Immune Restoration in HIV and SIV Infection. PLoS Pathog. 2016;12(1).
93. McGary CS, Deleage C, Harper J, Micci L, Ribeiro SP, Paganini S, et al. CTLA-4+PD-1–Memory CD4+ T Cells Critically Contribute to Viral Persistence in Antiretroviral Therapy-Suppressed, SIV-Infected Rhesus Macaques. Immunity. 2017 Oct 17;47(4):776-788.e5.
94. Speiser DE, Utzschneider DT, Oberle SG, Münz C, Romero P, Zehn D. T cell differentiation in chronic infection and cancer: Functional adaptation or exhaustion? Nat Rev Immunol. 2014 Jan 1;14(11):768–74.
95. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. Nat Immunol. 2001 Mar;2(3):261–8.
96. Park HJ, Park JS, Jeong YH, Son J, Ban YH, Lee B-H, et al. PD-1 Upregulated on Regulatory T Cells during Chronic Virus Infection Enhances the Suppression of CD8 + T Cell Immune Response via the Interaction with PD-L1 Expressed on CD8 + T Cells . J Immunol. 2015 Jun 15;194(12):5801–11.
97. Mehrotra A, D’Angelo JA, Romney-Vanterpool A, Chu T, Bertoletti A, Janssen HLA, et al. IFN- α Suppresses Myeloid Cytokine Production, Impairing IL-12 Production and the Ability to Support T-Cell Proliferation. J Infect Dis. 2020 Jun 16;222(1):148–57.

98. Gavegnano C, Brehm JH, Dupuy FP, Talla A, Ribeiro SP, Kulpa DA, et al. Novel mechanisms to inhibit HIV reservoir seeding using Jak inhibitors. *PLoS Pathog.* 2017 Dec 1;13(12).

Figure 1 :

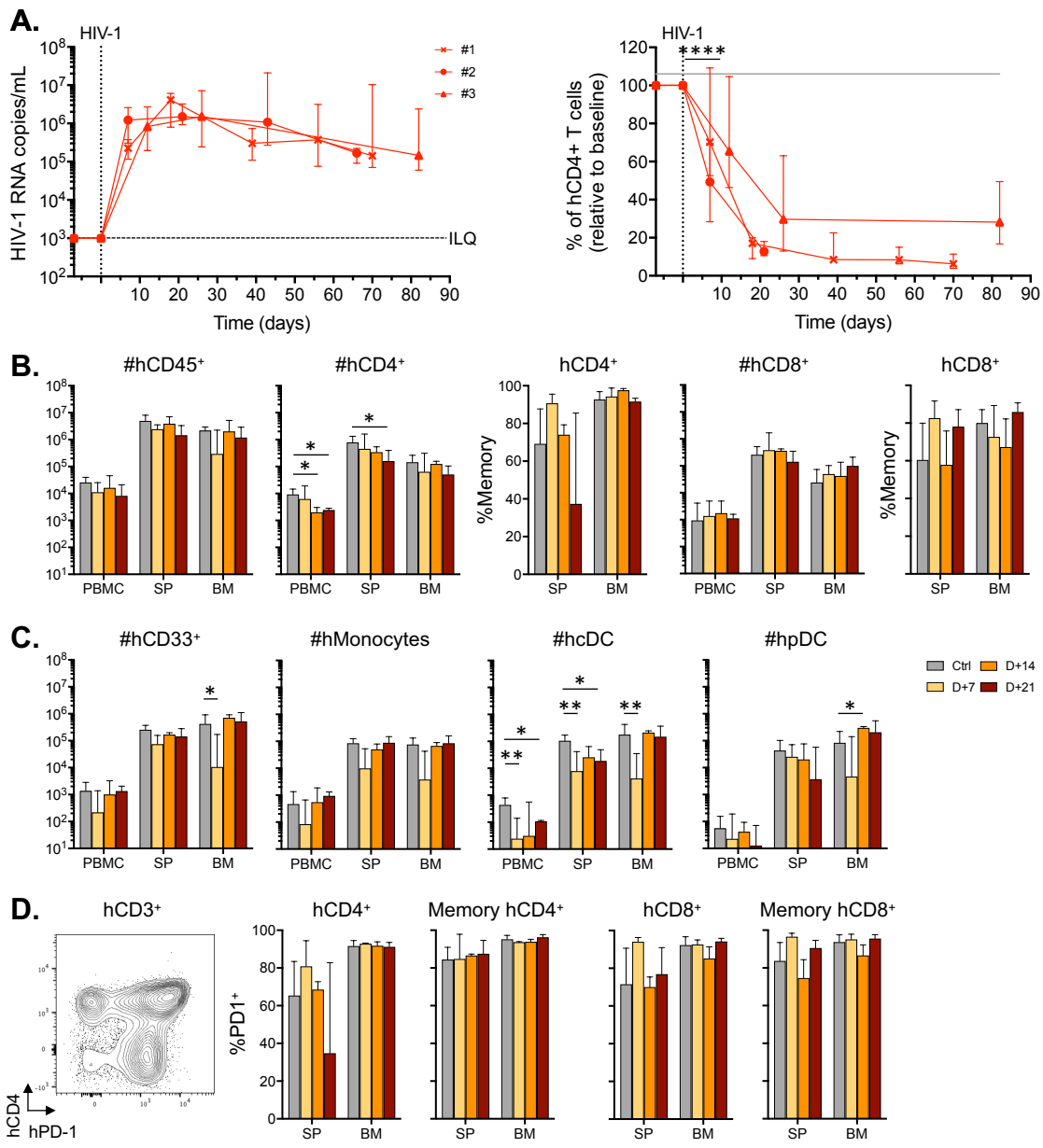
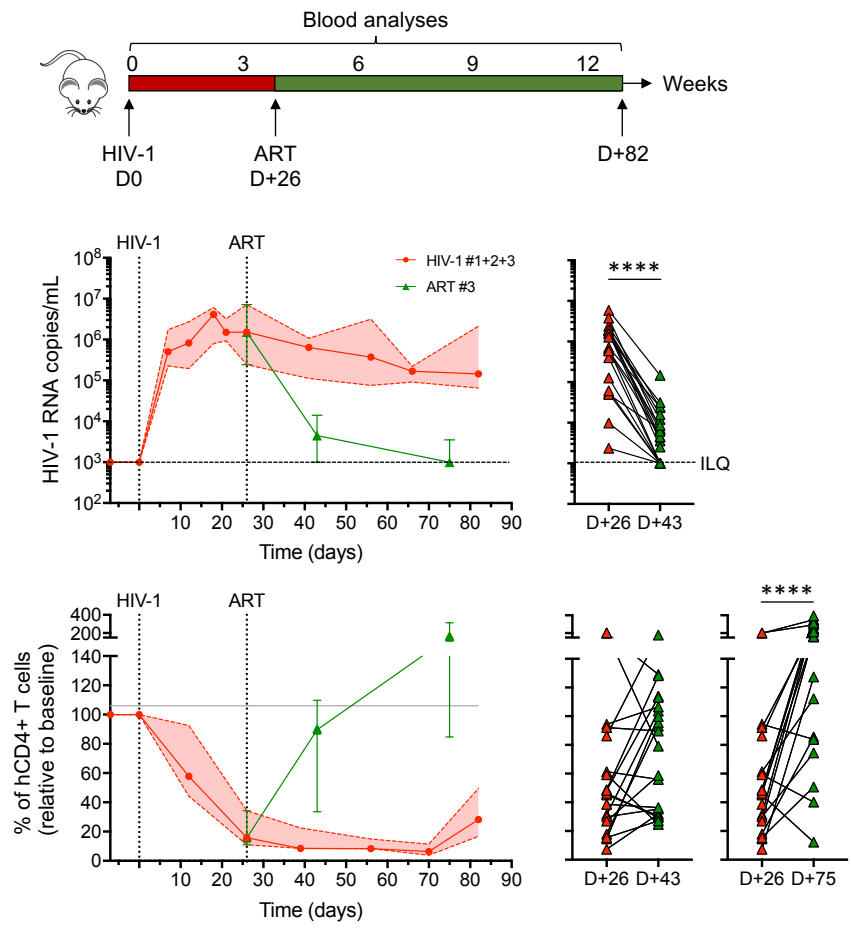
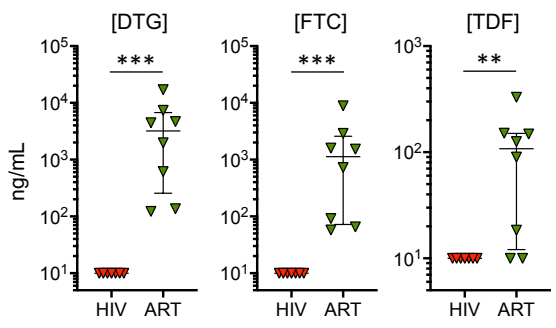


Figure 2 :

A.



B.



C.

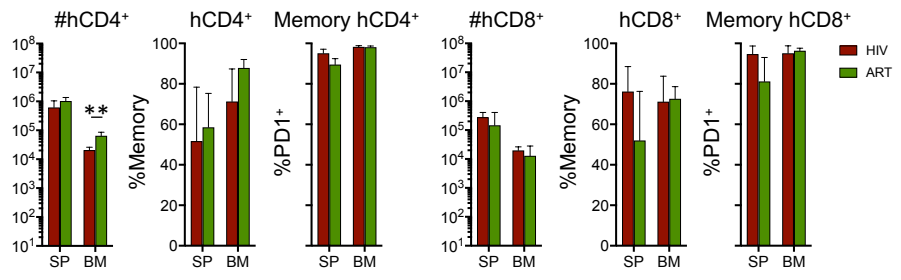
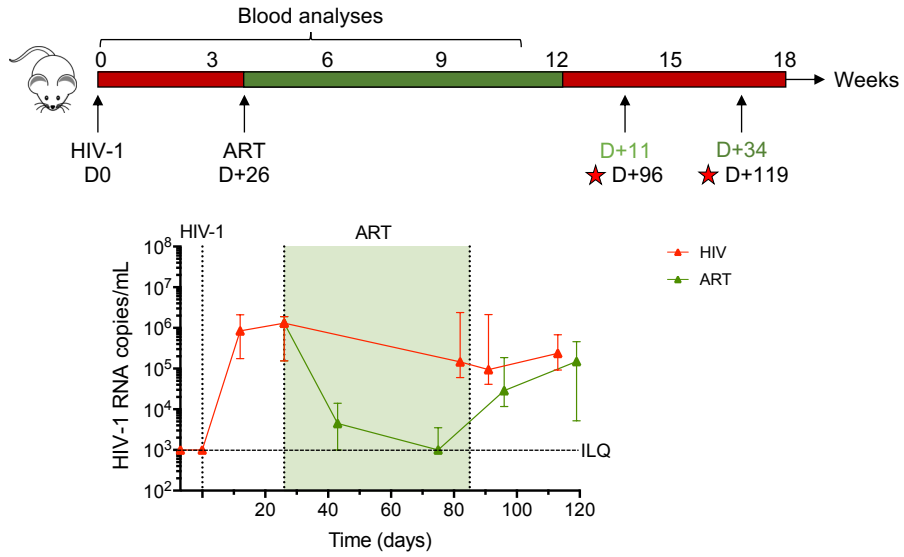


Figure 3 :

A.



B.

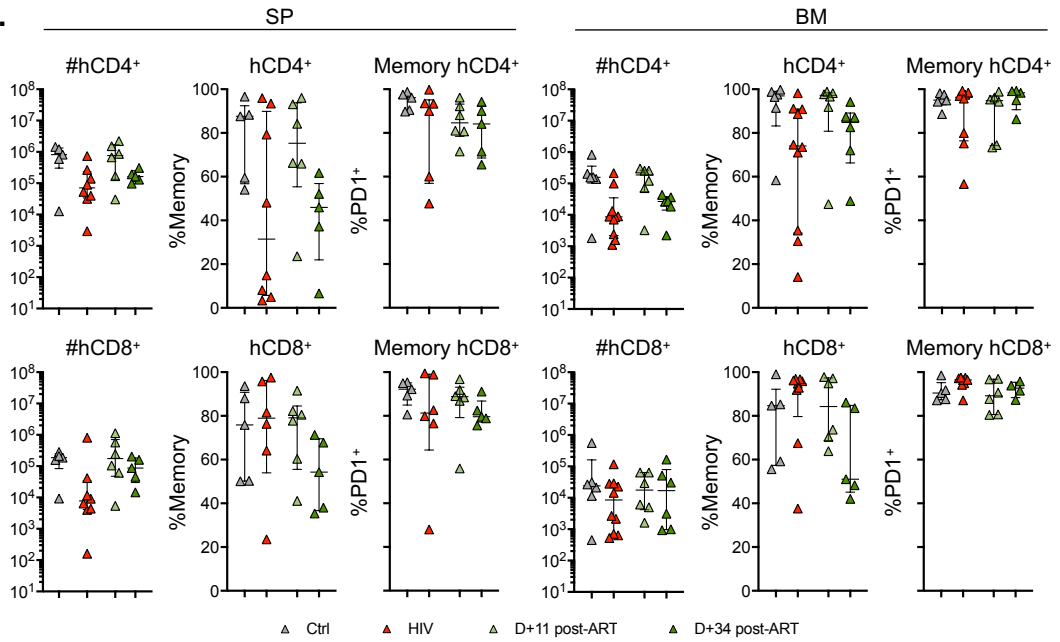


Figure 4 :

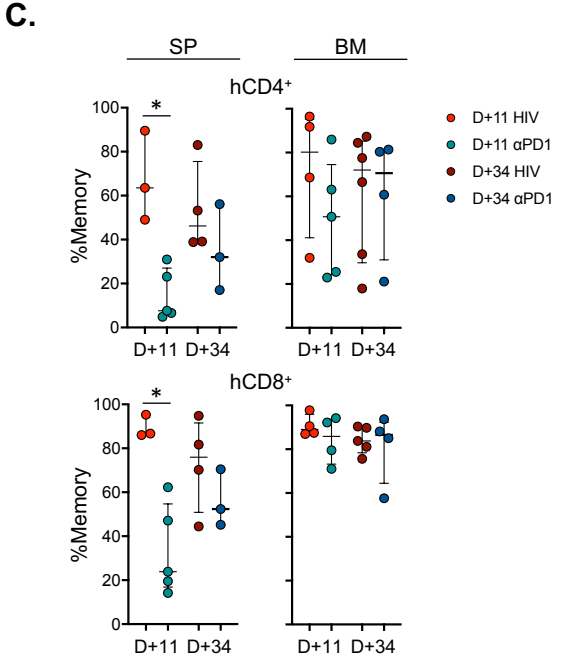
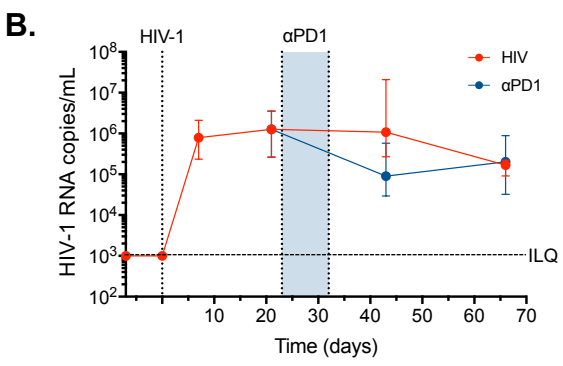
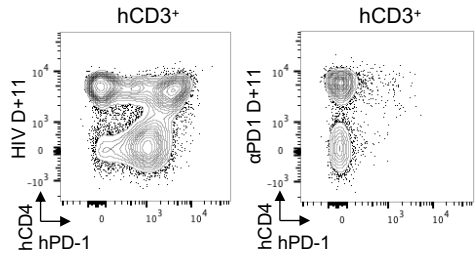
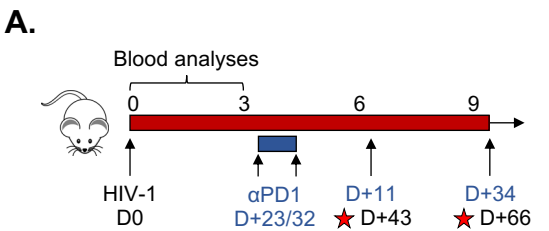


Figure 5 :

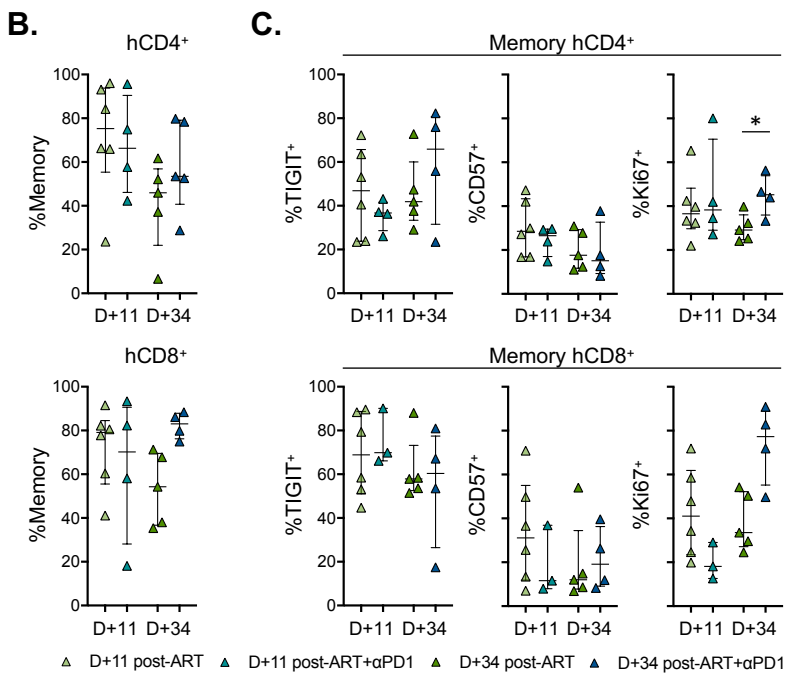
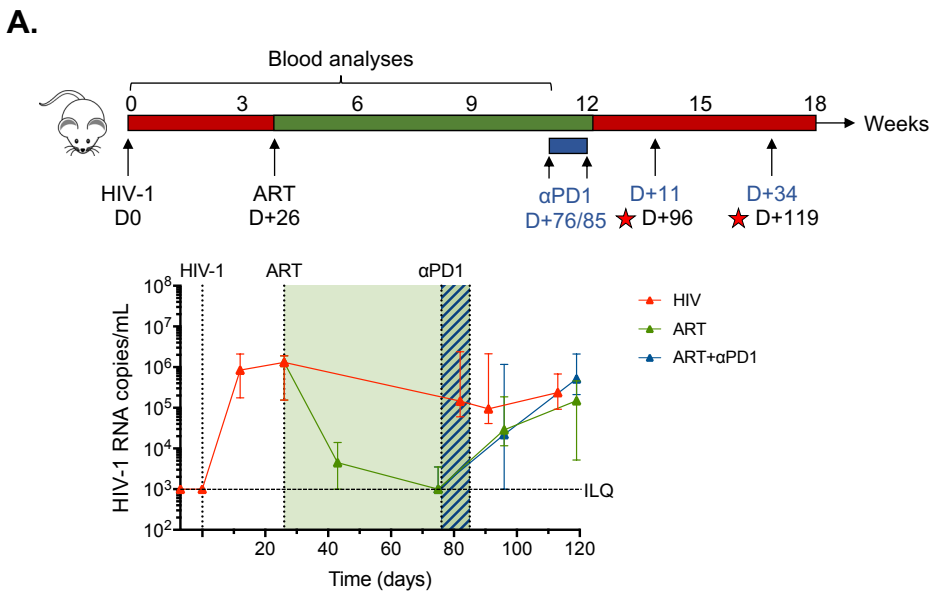


Figure 6 :

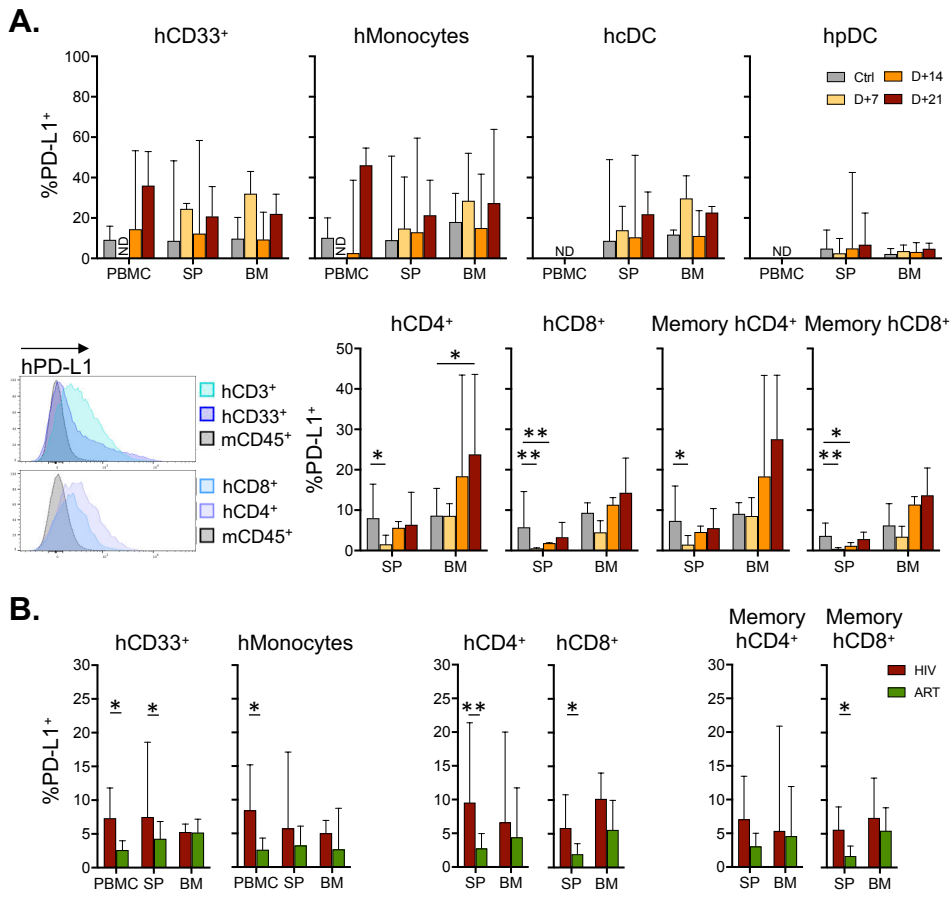


Figure 7 :

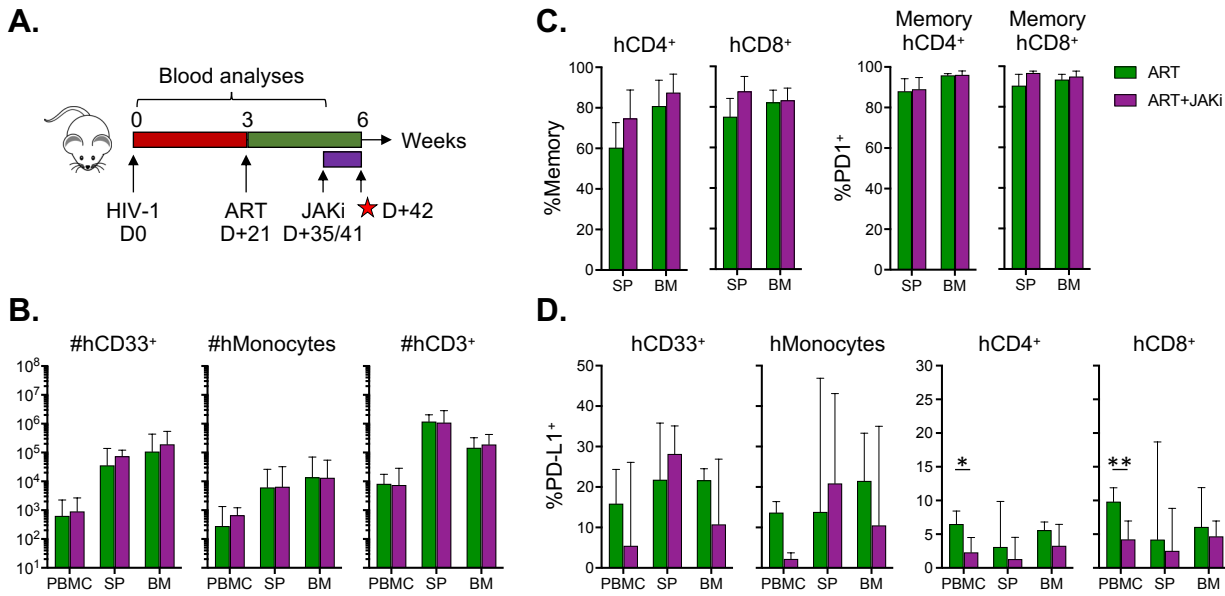


Figure S1 :

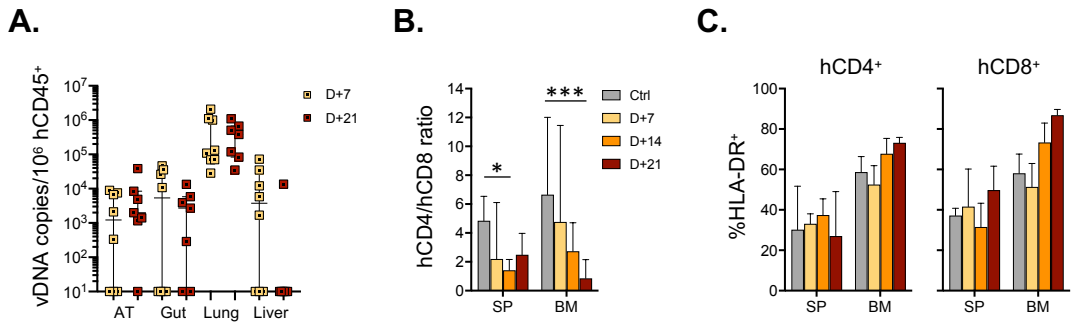


Figure S2 :

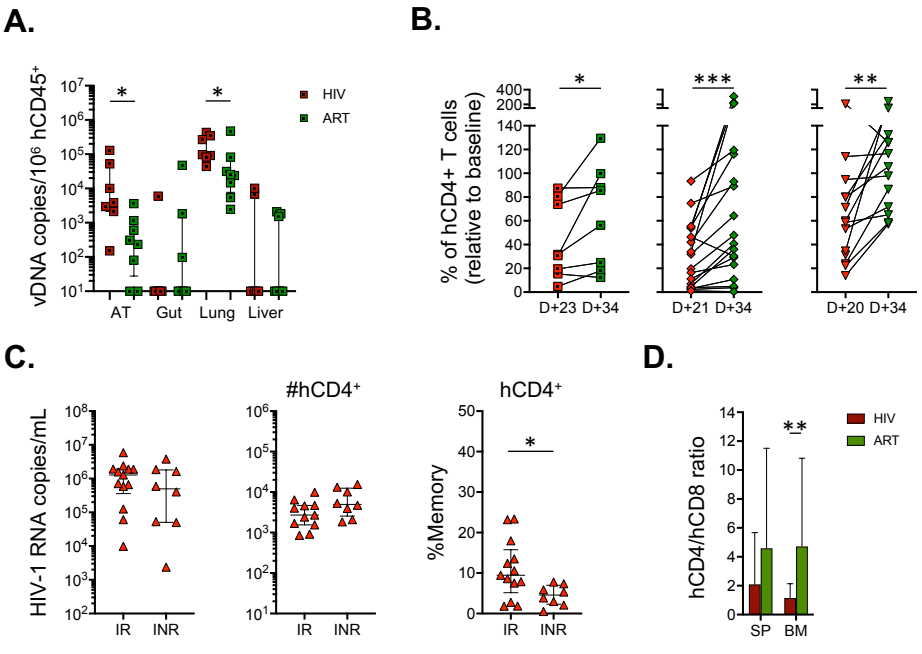


Figure S3 :

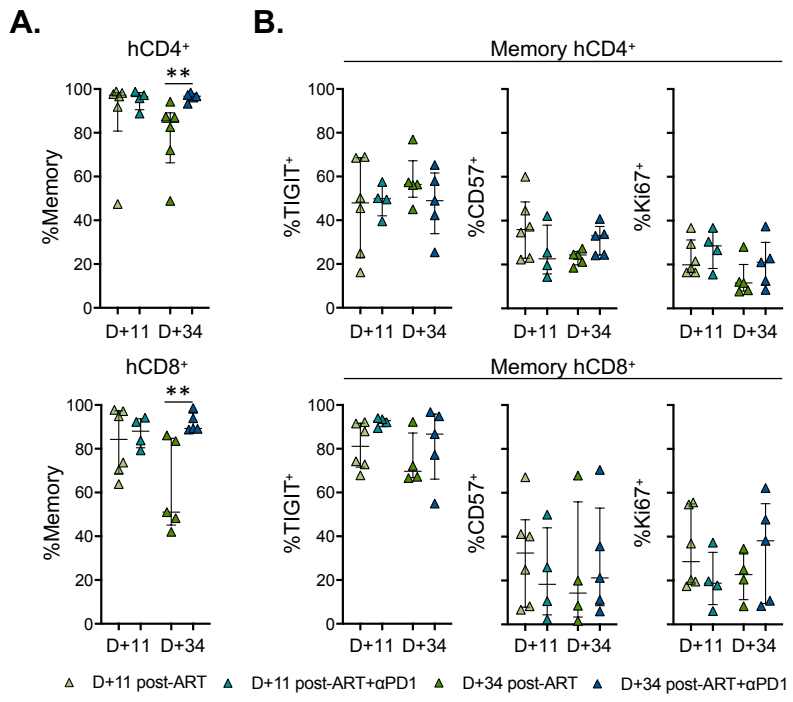
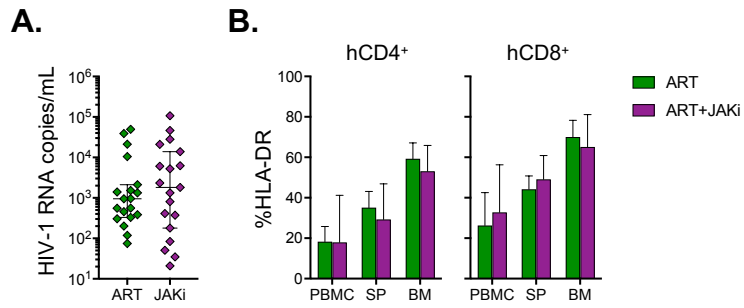


Figure S4 :



Discussion

Environ 40 ans après le début de la pandémie, il n'existe toujours aucun vaccin ou traitement curatif pour le VIH-1. Le contrôle de l'infection nécessite actuellement une trithérapie antirétrovirale à vie, qui a permis d'améliorer considérablement la prise en charge de cette maladie. Toutefois, les patients infectés restent confrontés à un risque accru de comorbidités (Maciel et al. 2018) associées au vieillissement (Hasse et al. 2011), à la toxicité des ARV à long terme (Chawla et al. 2018) et à la persistance virale induisant une inflammation à bas bruit et un épuisement des réponses T (Deeks, Tracy, and Douek 2013; Zicari et al. 2019). Alors que l'éradication complète du virus semble encore être peu accessible et moins prioritaire au vu de la difficulté de la tâche, les stratégies préventives ou vaccinales restent des objectifs importants. Instaurer une rémission durable du VIH-1 après l'interruption du traitement ART est également une étape thérapeutique actuellement considérée. Enfin, un autre axe de recherche consiste à restaurer les défauts immunitaires persistants, tels que l'inflammation chronique à bas bruit, l'épuisement des réponses T et l'atteinte des muqueuses, dans le but de limiter l'incidence des comorbidités. Cette thématique est particulièrement importante au vu du vieillissement progressif de la population de patients infectés traités. L'utilisation d'immunothérapies, qui a déjà permis des progrès spectaculaires dans le traitement de cancers ou de maladies auto-immunes, en association avec les ARV représente une stratégie prometteuse pour agir sur ces deux mécanismes.

L'objectif de mes travaux était de valider un modèle d'infection expérimentale au VIH-1 et d'évaluer le bénéfice thérapeutique de l'association d'un traitement ART efficace combiné à une immunothérapie : le nivolumab (α PD1) puis le baricitinib (α JAK). Un préalable à ce travail d'évaluation de différentes approches ARV/immunothérapies au cours de l'infection reposait sur la caractérisation et la validation du modèle BRGSF-A2 HIS comme modèle préclinique adapté. Nous avons validé la bonne humanisation de ce modèle dans le sang, la rate,

la moelle osseuse (MO) et le tissu adipeux (TA) avec une prise de greffe humaine stable à long terme (supérieure à 55 semaines) ainsi que le développement physiologique du compartiment T humain en termes de profils d'épuisement et de sénescence. La deuxième étude portait sur la mise au point d'une infection expérimentale au VIH-1 contrôlée sous un traitement ART efficace. Le modèle BRGSF-A2 récapitule les principaux aspects de la pathogenèse *in vivo* : pic de la charge virale à 2 semaines et déplétion LT CD4⁺ entre 10 jours et 3 semaines post-infection. En collaboration avec la plateforme de pharmacocinétique et pharmacodynamie, un traitement ART efficace spécifiquement adapté au modèle HIS a été élaboré en précisant la posologie de trois ARV actuellement recommandés en clinique (DTG, TDF, FTC) pour une voie d'administration la moins invasive possible pour l'animal : la voie *per os*. Sous ARV, nous observons une charge virale plasmatique contrôlée et une restauration du nombre de LT CD4⁺ après deux semaines de traitement. Ces deux étapes de mise en place effectuées, nous avons pu évaluer le bénéfice thérapeutique potentiel des associations ART/ α PD1 puis ART/ α JAK durant l'infection chronique au VIH-1 avec un intérêt particulier sur la modulation de la voie PD1/PD-L1. Au global, dans le modèle que nous avons utilisé et dans les schémas thérapeutiques utilisés, nous n'avons pas observé d'impact majeur des traitements α PD1. D'autres schémas thérapeutiques pourraient être envisagés, mais du fait de la faible modulation de l'expression de PD1 par l'infection ou le traitement, nous avons testé une approche différente ciblant plus spécifiquement PD-L1.

I. Pertinence des modèle HIS comme outil préclinique dans l'infection

VIH-1

Quels sont les avantages théoriques d'un modèle HIS ?

La diversité des modèles HIS, les différentes stratégies disponibles et l'amélioration constante de ces modèles rendent le choix difficile avant d'envisager des études précliniques dans un modèle d'infection expérimentale au VIH-1. Cette diversité de modèles est à la fois un atout et démontre la vitalité du domaine pour générer le modèle HIS le plus performant, mais aussi une faiblesse. La multitude de modèles nuit à la possibilité de comparer des séries de données, et démontre les insuffisances constitutives de la plupart des modèles.

Il existe des avantages communs à tous les modèles : ils présentent désormais un système immunitaire intégrant toutes les lignées hématopoïétiques avec une prise de greffe robuste. L'humanisation permet d'intégrer l'hétérogénéité humaine lors de la greffe en utilisant différents lots de donneurs génétiquement distincts tout en maîtrisant les paramètres environnementaux de la souris HIS (flore intestinale, expositions aux pathogènes, historique clinique). Un troisième avantage est l'accès facile à l'ensemble des tissus lors de l'euthanasie des animaux qui permet une caractérisation phénotypique fine. En particulier, l'accès aux muqueuses pourrait permettre d'étudier plus en profondeur les phases précoces de l'infection VIH-1 et la mise en place de la réponse innée comme première ligne de défense de l'organisme, des notions difficiles à approcher chez l'homme lié au délai du diagnostic. Néanmoins, ces modèles présentent un chimérisme important dans les tissus non lymphoïdes, qui pourrait limiter la portée de ces études. Dans un contexte pathologique, la possibilité d'étudier directement l'infection par le VIH-1 fait de la souris HIS un modèle de choix. En effet, les modèles macaques sont uniquement sensibles à l'infection par le SIV ou à un virus chimérique apparenté exprimant l'enveloppe du VIH-1 (Env-SHIV ou SHIV) ou la transcriptase inverse

(RT-SHIV). Le modèle HIS permet aussi d'évaluer l'efficacité de nombreux médicaments sans les résistances retrouvées dans le modèle d'infection SIV (INNTI, certains IP et inhibiteurs d'entrée) (Witvrouw et al. 2004; Parkin and Schapiro 2004; Giuffre et al. 2003). En effet, les protéases du VIH-1 et du SIV présentent des différences au niveau de plusieurs acides aminés des sites actifs (Zhao et al. 1993) conduisant à l'inefficacité de certains IP. Les modèles HIS offrent alors une transposition plus proche des combinaisons d'ARV utilisées en clinique et permettent d'étudier les complications éventuelles difficiles à étudier chez l'homme, comme les interactions médicamenteuses, l'émergence de virus résistants ou la réplication résiduelle au sein de tissus.

Sur le plan technique, nous avons utilisé le modèle BALB/c Rag2^{KO} IL-2R γ c^{KO} SIRP α ^{NOD} Flk2^{KO} HLA-A2^{HHD} (BRGSF-A2) en raison de (i) sa grande capacité de greffe hématopoïétique humaine grâce à une tolérance des phagocytes murins face aux cellules humaines, (ii) une amélioration de l'homéostasie myéloïde humaine due à un défaut de développement des cellules myéloïdes murines, et (iii) une amélioration du développement, de l'accumulation et de la fonction des LT humains par l'expression des molécules HLA de classe I. Un autre critère, important dans l'optique d'essais précliniques, est la capacité à générer de grandes cohortes d'animaux présentant une humanisation élevée et homogène. La génération du modèle BRGSF-A2 repose sur la seule transplantation de CSH CD34⁺ par voie intra-hépatique dès les premiers jours de vie de l'animal, un des protocoles d'humanisation les moins fastidieux permettant de générer facilement d'importantes cohortes d'animaux. Nos données mettent en évidence un développement et une accumulation élevée de cellules hCD45⁺ au sein des PBMC, de la rate, de la MO et du TA d'animaux âgés de 16 à 19 semaines post-humanisation, bien que les proportions varient d'un tissu à l'autre. Un deuxième critère est la capacité à générer un système immunitaire proche de la physiologie humaine. En ce sens, la souris BRGSF-A2 présente plusieurs avantages. Tout d'abord, dans un contexte non infectieux,

nous avons établi une comparaison entre les souris BRGSF-A2 HIS et l'homme (donneur sain). Nous avons évalué le ratio hCD4/hCD8, qui reflète la qualité de la reconstitution immunitaire dans le modèle HIS mais aussi la sénescence immunitaire dans un cadre clinique. Les ratios hCD4/hCD8 observés dans les tissus murins étaient très similaires à ceux décrits chez l'homme (Sathaliyawala et al. 2013). Nous avons ensuite caractérisé la proportion relative des cellules T_N et T_M , qui indique à la fois la qualité de la reconstitution et sert de marqueur standard du vieillissement. Dans le sang des souris HIS, la population de LT était essentiellement constituée de LT hCD4⁺ et hCD8⁺ naïfs. Comme décrit chez l'homme (Damouche et al. 2017; Di Rosa and Watts 2016), la proportion de T_N dépendait du tissu ; la fraction T_N représentait le principal compartiment des LT au sein des PBMC et des splénocytes, tandis que la fraction T_M prédominait parmi les cellules de la MO et du TA. La fréquence de T_N était plus élevée chez les souris HIS que chez les donneurs sains et reflète probablement (i) les conditions d'hébergements strictes des souris, c'est-à-dire avec beaucoup moins de stimulation environnementale que chez les donneurs sains, et (ii) le biais d'âge potentiel, c'est-à-dire la comparaison de souris HIS âgées de 20 semaines avec des donneurs sains adultes. Très peu de cellules T_E ont été détectées chez les souris BRGSF-A2 HIS, ce qui renforce l'hypothèse d'une stimulation environnementale limitée et donc d'une activation réduite du compartiment T. Ces similitudes avec l'homme confortent le potentiel du modèle BRGSF-A2 comme outil préclinique.

Quelles sont les limitations conceptuelles et pratiques des modèles HIS ?

Comme les autres modèles HIS, la souris BRGSF-A2 présentent des limitations conceptuelles qu'il est important de considérer. Tout d'abord, les souris BRGSF-A2 sont déficientes pour l'IL-2R γ c. La mutation γ c impacte les signalisations à l'IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21 entraînant un défaut de développement murin des précurseurs lymphoïdes et des

cellules NK. Alors que cette déficience est nécessaire à l'augmentation substantielle de la thymopoïèse humaine chez la souris HIS (Gimeno et al. 2004; M. Ito et al. 2002; Traggiai et al. 2004), elle entraîne une signalisation à l'IL-7 défectueuse et de fait, une absence de cellules inductrices du tissu lymphoïde pendant la vie fœtale (Chappaz and Finke 2010; Van De Pavert and Mebius 2010). Il en résulte une absence de structures ganglionnaires, pourtant nécessaire à l'orchestration de la réponse immunitaire et la maturation cellulaire. Comment la souris BRGSF-A2 comble-t-elle cette absence de structures ganglionnaires ? Comment cela affecte-t-il les réponses adaptatives dans l'infection expérimentale au VIH-1 ? Il est décrit que l'infection par le VIH-1 entraîne des changements spectaculaires et progressifs de l'architecture des ganglions lymphatiques, particulièrement évidents durant la phase chronique de l'infection qui sont associés à l'activation immunitaire persistante et à l'inflammation tissulaire (Estes 2013). Ces dommages structurels, l'activation immunitaire, les signaux inflammatoires et la modification des gradients de chimiokines jouent un rôle important dans la dynamique des LT. Puisque l'infection se développe dans les modèles HIS, et que des perturbations immunitaires sont induites, il semble que les processus d'activation soient présents dans ce modèle. Il est alors possible que la rate, par phénomène de compensation, exerce une activité immunitaire différente de celle attendue à cause de ces modifications structurelles et cellulaires induites par le virus. L'absence de structures ganglionnaires est une limitation importante qui a récemment été corrigée en imposant la génération de ganglions lymphatiques par l'expression ectopique de la protéine TSLP (Yan Li et al. 2018), une protéine permettant d'assurer le développement de ganglions chez les souris $IL2R\gamma^{KO}$ par une voie de signalisation indépendante de l'IL-7 (Chappaz and Finke 2010). Les travaux de Li et al. en 2018 ont montré que les souris BRGST (souris BRGS transgénique pour TSLP), présentaient des ganglions lymphatiques distribués, un développement robuste de cellules Tfh et une amélioration des réponses T et B spécifiques (Yan Li et al. 2018). Ce nouveau modèle pourrait combler une limite importante des modèles

HIS présentant la mutation γc , et offrir ainsi de nouvelles perspectives pour étudier la migration, la coopération T-B humains, et la réponse humorale dans l'infection par le VIH-1.

Bien que la transplantation de CSH CD34⁺ chez les souris hôtes soit un processus plus simple, une autre limitation du modèle BRGSF-A2 repose sur la restriction au CMH et l'éducation des cellules humaines au sein d'un thymus murin. Une première critique est que cette interaction chimérique (précurseurs T humains/cellules thymiques murines) pourrait induire un biais de sélection. Des études démontrent néanmoins que les thymocytes humains présentent un comportement similaire dans les environnements thymiques de la souris et de l'homme (Halkias et al. 2015). Un deuxième sujet de discussion repose sur le fait que dans la plupart des modèles HIS, les précurseurs humains sont théoriquement sélectionnés dans le thymus sur la base d'interactions avec des complexes CMH murin/peptides endogènes, tandis que les réponses immunitaires déclenchées en périphérie mobiliseront les LT humains lors de contacts avec des CPA présentant les peptides au sein d'un CMH humain et/ou murin selon le chimérisme myéloïde induit. L'interaction entre cellules humaines et cellules épithéliales/endothéliales serait également biaisée. Pour contourner cette limitation, l'introduction d'un transgène humain de classe I (modèle BRGSF-A2) ou de classe I et de classe II (modèle BRGS-A2/DR2) (Masse-Ranson et al. 2019) a été effectuée. De plus, les cellules dérivées des CSH semblent participer à la sélection thymique (Yang Li et al. 2019), y compris les thymocytes (E. Y. Choi et al. 1997; Melichar et al. 2015) et les LB (Frommer and Waisman 2010). Ces dernières observations suggèrent que l'expression de transgènes humains de classe I ou II sur les cellules épithéliales thymiques n'est probablement pas strictement nécessaire. Dans le modèle BRGSF-A2, la présentation de peptides par le CMH peut donc théoriquement impliquer le HLA-A2 humain transgénique présent sur les cellules murines, la combinaison HLA humain du donneur, et le CMH endogène de la souris puisque les animaux sont encore

compétents pour l'expression du CMH de classe I et de classe II de souris. La fréquence relative de ces contacts dans le thymus (épithélium murin) ou dans la périphérie (chimérisme myéloïde, tissu murin) reste à mieux établir. Malgré ces sources variables assurant la sélection thymique et les contacts périphériques, la forte proportion de LT hCD4⁺ et hCD8⁺ naïfs et la survie à long terme (supérieure à 55 semaines) que nous avons détectées semblent être des indicateurs importants sur l'efficacité de la génération de LT fonctionnels, la sélection thymique et la survie périphérique du modèle BRGSF-A2. Le modèle Neo-Thy, transplanté par des fragments de thymus humain non fœtaux associés à des CSH de sang de cordon ombilical (Brown et al. 2018), offre un environnement thymique humain et pourrait en outre constituer un outil intéressant pour les études sur la tolérance centrale et périphérique et apporter des éléments de réponses supplémentaires pour les modèles HIS chimériques. En comparant la qualité de l'humanisation obtenue à partir de donneurs A2⁺ et A2⁻, nous avons observé une proportion et un nombre absolu plus élevés de cellules hCD45⁺ parmi les cellules CD45⁺ totales dans le sang lorsque nous utilisons des cellules de donneurs A2⁺. De manière surprenante, ce meilleur rendement en cellules hCD45⁺ était associé à un nombre plus élevé de hCD19⁺ et non de hCD3⁺, hCD4⁺ ou hCD8⁺. En outre, aucune différence sur la différenciation naïve/mémoire, l'épuisement et le profil de sénescence n'a été observée parmi les LT hCD8⁺, ce qui confirme l'impact limité à l'état basal de donneurs appariés. Le nombre significativement plus élevé de cellules hCD19⁺ chez les donneurs HLA-A2⁺ a également été décrit lors de la comparaison entre les animaux BRGS-A2/DR2 et BRGS HIS (Masse-Ranson et al. 2019), mais le mécanisme responsable de cette observation n'est pas défini. Cependant, on pourrait s'attendre à un avantage de l'utilisation de donneurs appariés lors du suivi des réponses T CD8⁺ dans le contexte tumoral et/ou infectieux, comme précédemment décrit dans le modèle NSG-A2 (Billerbeck et al. 2011; Leonard D. Shultz et al. 2010).

Une limitation fréquemment soulevée lors de l'utilisation de modèles HIS est la cinétique d'établissement du chimérisme humain/murin et sa persistance. Les premiers modèles HIS présentaient un taux de reconstitution faible et peu durable, démontrant que les proportions et nombres absolus des différentes populations cellulaires ainsi que leur phénotype évoluaient avec le temps. D'une part, un minimum de 8 à 12 semaines est nécessaire pour l'établissement de la greffe au sein des souris NOG/NSG ou BRGS/dérivés et d'autre part, à plus long terme, ces greffes peuvent être associées à l'apparition progressive d'une GvHD. Ce phénomène est particulièrement observé pour les modèles présentant la mutation *scid*. Observé après six mois d'humanisation, ce phénomène entrave le développement d'un modèle physiopathologique et l'utilisation de ces animaux sur une période plus étendue compatible à l'évaluation d'une stratégie thérapeutique (Greenblatt et al. 2012; Karpel, Boutwell, and Allen 2015; Hilger et al. 2016). Le modèle BRGSF-A2 a l'avantage de ne pas présenter la mutation *scid*. Nous avons analysé la greffe de cellules hCD45⁺ dans les PBMC, la rate et la MO à trois âges différents : adultes (16 à 19 semaines), intermédiaires (31 à 39) et âgés (51 à 55 semaines). Le nombre absolu de cellules hCD45⁺ dans le sang était significativement plus faible chez les animaux âgés que les adultes. Dans la rate et la MO, la diminution du nombre de cellules hCD45⁺ a déjà été détectée chez les animaux intermédiaires par rapport aux adultes et cette diminution s'est maintenue chez les animaux âgés. De façon importante, les nombres absolus de LT hCD3⁺, hCD4⁺ et hCD8⁺ ont été conservés dans la rate et la MO des animaux intermédiaires et âgés, alors qu'une légère diminution a été observée dans le sang. L'analyse des profils de différenciation naïf/mémoire/effecteur et des profils d'épuisement (PD1) et de sénescence (CD57) a montré un compartiment T stable avec des signes physiologiques du vieillissement, c'est-à-dire une diminution du nombre absolu de LT hCD8⁺ naïfs et une augmentation des profils d'épuisement et de sénescence au sein des sous-populations mémoires et effecteurs des

LT. Il s'agit de données importantes pour l'évaluation d'un modèle HIS, confirmant son potentiel dans l'étude de pathologies chroniques et l'évaluation de stratégies thérapeutiques.

Les cytokines jouent un rôle clé dans le développement des cellules immunitaires et leur maturation, l'induction de réponses immunitaires et les interactions entre cellules, organes ou systèmes. Lorsqu'on envisage des études chez la souris HIS impliquant un chimérisme cellulaire et tissulaire, il est essentiel de considérer qu'une partie des cytokines ne réagira pas entre les espèces et que cette absence de réaction croisée pourrait être asymétrique. C'est le cas de l'IL-6 : dans les modèles HIS, il existe deux sources de cytokines ayant des effets différents, l'IL-6 humaine capable d'activer toutes les cellules humaines et murines et l'IL-6 murine qui ne peut affecter que les cellules murines (Manz 2007). Or, l'IL-6 est produit par une fraction de cellules leucocytaires chimériques (macrophages, granulocytes et LT, LB) et par d'autres cellules non leucocytaires murines (cellules musculaires lisses, chondroblastes, ostéoblastes, fibroblastes). Dans la plupart des cas, une homologie est maintenue entre l'homme et la souris, mais il existe des exceptions. A noter que la spécificité des espèces pourrait aussi être quantitative dans la mesure où une concentration plus élevée d'une cytokine est nécessaire lorsqu'elle provient d'une espèce différente, comme décrit pour l'IL-15 (Eisenman et al. 2002; Manz 2007). L'absence de réactivité croisée a été identifiée comme une lacune chez les modèles HIS (Akkina 2013). Des axes d'améliorations basées sur la surexpression de cytokines humaines par knock-in ont été proposés. Ces stratégies sont particulièrement importantes lorsque la cytokine murine ne peut activer les cellules humaines, comme l'IL-3 et le GM-CSF (Manz 2007) dont l'induction augmente le nombre de macrophages humains fonctionnels chez ces souris (Leonard D. Shultz et al. 2012). Un autre exemple consiste à exprimer de façon transitoire des cytokines humaines (IL-15 et ligand Flt-3/Flk-2) afin d'améliorer le développement des cellules NK humaines (Q. Chen, Khoury, and Chen 2009). Bien que

l'ensemble de ces questions n'ait pas encore été abordé dans le modèle BRGSF-A2, il est probable que l'orchestration de la réponse immunitaire et la maturation des cellules immunitaires soient sous-optimales et peuvent avoir des conséquences sur l'interprétation de résultats dans un contexte pathologique. En dépit de progrès substantiels limités à certaines cytokines, les souris HIS ne possèdent pas un système immunitaire humain pleinement fonctionnel. Même dans le meilleur des cas, le modèle de souris HIS résultant aura toujours un système immunitaire humain au sein de tissus murins. Ignorer ces limitations pourrait induire des erreurs importantes sur la transposition à la situation humaine. Enfin, les problèmes de spécificité des espèces soulignés ici pour les cytokines sont probablement aussi valables pour d'autres protéines.

Une autre lacune fréquemment soulignée est la fragilité de la réponse humorale au sein des modèles HIS. Les LB jouent un rôle polyvalent dans la lutte contre les infections : production d'anticorps spécifiques et neutralisants, production de cytokines et chimiokines régulant les LT, présentation antigénique. Alors que le développement des LB immatures dans la MO est normal, des défauts de maturation apparaissent lors de la différenciation des LB immatures/transitionnelles en LB naïfs et matures (J. Lang et al. 2013; Vuyyuru, Patton, and Manser 2011). Les raisons de ce biais vers l'immaturité peuvent être multiples. Tout d'abord, la modification génétique $IL2R\gamma^{\text{KO}}$ limite le développement des tissus lymphoïdes secondaires dont le rôle est bien décrit dans le développement des LB et la production d'anticorps à affinité. L'architecture lymphoïde anormale voire inexistante et la colocalisation défectueuse T-B au sein des organes lymphoïdes secondaires retarderaient la maturation de ces cellules (J. Lang et al. 2013; S. Watanabe et al. 2007; Ishikawa et al. 2005). En revanche, une augmentation du nombre de LB matures au sein de la rate au cours du temps suggère que les facteurs humains sont présents mais en conditions sous-optimales. En particulier, la fonction de la cytokine murine BAFF, essentielle à la maturation et la commutation isotypique, serait trop peu efficace.

De plus, la dynamique de reconstitution des souris HIS serait une autre raison de cette immaturité ; l'accumulation progressive des LT dans la rate permettrait une augmentation de la proportion de LB matures. Il existerait alors une période entre 16 et 24 semaines post-humanisation, pendant laquelle une fraction importante de LB deviendrait mature (J. Lang et al. 2013; Vuyyuru, Patton, and Manser 2011; B. Choi et al. 2011; Y. Watanabe et al. 2009; Xuefu Wang et al. 2012). Il n'est alors pas surprenant que la production d'anticorps soit médiocre dans les modèles HIS (Legrand, Weijer, and Spits 2006; Q. Chen et al. 2012; Traggiai et al. 2004; J. Lang et al. 2013). Au cours de l'infection VIH-1, des réponses humorales limitées (Kei Sato et al. 2010; Sango et al. 2010) et retardées (entre 6 et 12 semaines contre 2 semaines post-infection chez l'homme) (Brainard et al. 2009) ont été décrites. En raison de l'ensemble de ces limitations, l'exploration de la réponse B dans le modèle BRGSF-A2 nous semble peu adaptée. Des améliorations doivent être apportées pour tendre vers une réponse humorale plus représentative de la situation humaine.

Si le compartiment lymphoïde est 100% humanisé, le compartiment myéloïde reste chimérique, une limite partagée par l'ensemble des modèles HIS. Comme discuté précédemment, le manque de réactivité croisée entre les deux espèces affecte l'orchestration, la maturation et la fonctionnalité des réponses immunitaires humaines. Plusieurs équipes ont tenté de générer des modèles HIS favorisant le développement du compartiment myéloïde humain et/ou réduisant celui du compartiment myéloïde murin. Les modèles NSG-W41 (Cosgun et al. 2014; McIntosh et al. 2015), MISTRG (Rongvaux et al. 2011; 2014) et BRGSF-A2 (Lopez-Lastra et al. 2017) en ciblant respectivement le gène *c-kit*, $M-CSF^h/IL-3^h/TPO^h$ et le gène *Flk2* en sont des exemples. Nos résultats ont montré que les animaux adultes (16-19 semaines) présentaient un compartiment myéloïde murin très faible dans le sang, la rate et la MO. En revanche, la proportion de cellules myéloïdes murines tend à augmenter au cours du temps pour devenir prédominante dans le sang et la MO chez des animaux intermédiaires (31-

39 semaines) ou âgés (51-55 semaines) avec environ 80% de mCD45⁺. Nous avons caractérisé les populations myéloïdes murines de la rate et la MO de souris intermédiaires. Nos résultats ont mis en évidence dans la rate une fraction myéloïde murine constituée pour moitié de polynucléaires neutrophiles (PMN) alors que les populations de DC, monocytes et macrophages sont également réparties parmi les splénocytes murines restantes. La MO est constituée à plus de 85% de PMN au sein des cellules myéloïdes murines. Ce sont des données importantes à considérer lorsqu'on envisage des immunothérapies ciblant principalement le compartiment myéloïde comme attendu pour le baricitinib. En considérant le chimérisme du système immunitaire, nous pouvons nous interroger sur la représentativité des organes lymphoïdes par rapport à l'homme, la capacité des cellules hCD45⁺ à migrer au sein de tissus non lymphoïdes et du taux d'humanisation associé. Nos résultats ont mis en évidence des similitudes importantes du compartiment lymphoïde entre la souris BRGSF-A2 et le donneur sain. L'étude du compartiment myéloïde était plus partielle du fait du nombre limité de cellules qu'il était possible d'explorer en parallèle. Enfin, alors que le microbiote joue un rôle fondamental sur le système immunitaire de l'hôte (Belkaid and Hand 2014), il est légitime de s'interroger sur les relations symbiotiques entre le système immunitaire chimérique et la flore intestinale murine du modèle BRGSF-A2. Quels sont les impacts sur la réponse immunitaire (régulation, inflammation) ? L'irradiation nécessaire à la stratégie d'humanisation entraîne-t-elle des altérations de la flore intestinale susceptibles d'impacter le système immunitaire humain (Knibbe-Hollinger et al. 2015; Song et al. 2017) ? Certaines tentatives pour établir une flore spécifique à l'homme chez les animaux HIS ont été étudiées pour augmenter encore la fidélité des modèles et combler ces limites (Daharsh et al. 2019).

Enfin, il faut ajouter à l'ensemble de ces aspects des limites pratiques. Le modèle BRGSF-A2 est relativement moins cher que les modèles PNH notamment grâce à des coûts

associés à la complexité des structures d'hébergements et de soins moindres. Le coût reste malgré tout important pour un modèle de souris, du fait de l'accès difficile aux cellules CSH CD34⁺. Également, le protocole de production de la souris BRGSF-A2 est long et ne permet pas la même flexibilité que les modèles souris classiques. Il y a un délai incompressible de 12 semaines post-transplantation permettant d'assurer la qualité de l'humanisation à la suite de laquelle une infection VIH-1 semble difficilement envisageable avant 4 semaines supplémentaires. Enfin, une limite technique importante repose sur le matériel cellulaire disponible. Celui-ci est faible pour l'ensemble des tissus considérés (sang, rate, MO, et tissus non lymphoïdes) et limite considérablement les études parallèles.

A ce jour, les progrès substantiels et continus des modèles HIS n'ont pas permis d'aboutir au développement d'un modèle HIS consensus. Alors qu'une progression naturelle a eu lieu entre les années 2000 et 2010, le nombre de modèles explose depuis 10 ans pour aujourd'hui proposer plus de 20 modèles dérivés. Pourtant, en proposant une grande diversité de modèles, la recherche fondamentale et préclinique semble être confrontée à une autre difficulté basée sur la trop faible accumulation de données issues d'un même modèle. En effet, il est relativement difficile de confronter les données entre elles tant les modèles évoluent rapidement, ce qui fragilise leurs apports. Ceci est probablement révélateur de nombreux problèmes sous-jacents aux modèles HIS et semble indiquer que les modèles HIS sont toujours dans une phase de développement et de caractérisation. L'utilisation d'un modèle HIS implique d'adresser la problématique traitée de façon pragmatique sans ignorer les limitations du chimérisme. Quels sont les critères d'un bon modèle de souris HIS pour une problématique donnée ? La réponse sera probablement très différente selon le domaine étudié mais aussi la finalité entre une recherche fondamentale ou préclinique.

II. Caractérisation du modèle BRGSF-A2 : évaluation des profils d'épuisement et de sénescence

Dans la perspective d'évaluer les bénéfices thérapeutiques du nivolumab (α PD1) puis du baricitinib (α JAK) sur la modulation PD1/PD-L1 dans le contexte de l'infection au VIH-1, il nous a semblé essentiel de définir au préalable le profil d'épuisement et de sénescence du modèle BRGSF-A2. En effet, les mécanismes d'épuisement et de sénescence sont des régulateurs essentiels d'une réponse immunitaire efficace. Dans l'infection au VIH-1, les dysfonctionnements des réponses T sont en parties causés par ces deux mécanismes de perte de fonction. Au sein des modèles HIS, le profil d'expression de PD1 à la surface des LT humains est fréquemment décrit, notamment pour l'utilisation de ces modèles dans un contexte tumoral. Pourtant, aucune donnée sur l'expression de marqueurs d'épuisement ou de sénescence n'avait été collectée jusqu'à présent dans le modèle BRGSF-A2. De plus, nous avons constaté que le profil d'épuisement de PD1 à la surface des LT humains variaient considérablement en fonction du modèle HIS utilisé, du site tissulaire et du contexte physiopathologique étudié (Heuts et al. 2013; Seung et al. 2013; Ma et al. 2016; Ashizawa et al. 2017).

Le profil d'épuisement est-il comparable à l'homme ? Quelles sont les spécificités du modèle BRGSF-A2 ?

Nous avons établi une comparaison dans le sang entre la souris BRGSF-A2 HIS et l'homme (donneur sain) et avons étudié les organes lymphoïdes (rate et MO) et non lymphoïde (TA) de la souris BRGSF-A2, avec une attention particulière pour les molécules PD1 et TIGIT comme marqueurs d'épuisement. Nous avons constaté que les profils d'expression de PD1 et TIGIT variaient en fonction du tissu et de la distribution naïve/mémoire/effecteur. Nous avons mis en évidence des proportions élevées de LT PD1⁺ parmi les PBMC, les splénocytes et les

cellules du TA chez la souris BRGSF-A2. Dans la MO, l'expression de PD1 était quasi constitutive et différait sensiblement de celles observées dans le sang et la rate. Des pourcentages plus élevés de LT hCD4⁺ exprimant TIGIT ont été observés dans la MO par rapport aux splénocytes et aux PBMC. Ces différences de fréquences étaient en partie causées par la distribution tissulaire spécifique des LT naïfs, mémoires et effecteurs. En effet, la sous-population mémoire, qui exprime plus fréquemment PD1, était plus représentée au sein de la MO que dans le sang ou la rate. En comparant les profils de LT dans le sang de la souris HIS et de l'homme, les fréquences de LT PD1⁺ étaient similaires entre souris HIS et homme, alors que les fréquences de LT TIGIT⁺ étaient plus faibles au sein des LT hCD4⁺ chez la souris HIS que l'homme (avec une tendance équivalente au sein des LT hCD8⁺). Nous avons constaté que les LT hCD4⁺ mémoires des souris HIS avaient un phénotype mixte avec une proportion relativement élevée de cellules PD1⁺ et une proportion relativement faible de cellules TIGIT⁺, ce qui n'était pas le cas des LT hCD8⁺ mémoires. Cette différence reflète probablement des stades de différenciation des LT mémoires différents entre les deux populations et confirme également que PD1 et TIGIT ne sont pas nécessairement régulés de la même manière. Dans l'ensemble, nous avons montré que le processus d'épuisement chez les souris BRGSF-A2 est assez similaire à celui observé chez les LT CD8⁺ et, dans une moindre mesure, les LT CD4⁺ mémoires humaines. Cette étude comparative du profil d'épuisement n'est pas exhaustive puisqu'elle ne repose que sur l'analyse de deux marqueurs d'épuisement parmi d'autres. En effet, dans la perspective d'une infection expérimentale au VIH-1, d'autres marqueurs d'épuisement, dont les anticorps neutralisants sont en cours de développement clinique, auraient pu être évalués : (i) CTLA4 puisqu'il s'agit d'un autre récepteur inhibiteur majeur dans l'infection VIH-1 avec un mécanisme de régulation distinct de PD1 (D. E. Kaufmann et al. 2007; D. E. Kaufmann and Walker 2009), et (ii) TIM3 et LAG3 puisqu'ils sont associés au rebond viral après l'interruption du traitement ART (Hurst et al. 2015). Les α TIM3 et α LAG3

présentent une toxicité moindre par rapport aux thérapies α PD1 et α CTLA4 et pourraient être plus appropriés dans l'infection VIH-1 (Anderson, Joller, and Kuchroo 2016).

Nous avons ensuite étudié l'expression d'un ligand de PD1, PD-L1, au sein des cellules myéloïdes. L'expression de PD-L1 diffère en fonction des populations myéloïde et du tissu considéré. Nos données ont permis d'obtenir plusieurs informations : (a) les proportions de cellules PD-L1⁺ dans le sang ne reflètent pas directement celles des tissus lymphoïdes, (b) les différences de proportions de cellules exprimant PD-L1 selon les sous-populations soulèvent la question de savoir si la capacité à induire l'épuisement dépend des populations myéloïdes interagissant avec les LT PD1⁺ ; (c) l'expression constitutive de PD1 dans la MO, et dans une moindre mesure le TA, laisse penser que les thérapies α PD1 pourraient avoir une toxicité locale ou tout au moins une activité plus marquée sur ces tissus. De plus, une fraction importante de LT issus de la MO coexprime PD1 et TIGIT, suggérant que ces cellules sont fortement épuisées et seraient potentiellement difficilement réversibles (Pauken and Wherry 2015; Jenkins, Barbie, and Flaherty 2018). La proportion importante de LT PD1⁺ dans le TA de la souris BRGSF-A2 ressemble fortement à celle observée chez l'homme (Damouche et al. 2017). L'accès au TA constitue un avantage précieux pour étudier l'impact des thérapies α PD1 sur ce tissu. Celui-ci suscite actuellement un regain d'intérêt pour ses fonctions métaboliques et immunitaires (Damouche et al. 2015; Smith et al. 2009; Desruisseaux et al. 2007). Enfin, nous avons démontré que l'administration d'un traitement α PD1 n'a pas modifié le chimérisme humain de la souris et n'a pas induit de changements majeurs sur le profil de différenciation des LT.

Le profil de sénescence est-il comparable à l'homme ? Quelles sont les spécificités du modèle BRGSF-A2 ?

La même analyse a été réalisée pour évaluer le profil de sénescence du modèle BRGSF-A2, avec un intérêt pour les molécules CD57 et KLRG1. Nous avons constaté que les profils

d'expression de CD57 et KLRG1 variaient également en fonction du tissu et de la distribution naïve/mémoire/effecteur. L'analyse des marqueurs de sénescence CD57 et KLRG1 a révélé des profils d'expression différents de ces deux molécules. Une faible proportion de LT hCD4⁺ et hCD8⁺ exprimant CD57 a été observée dans tous les tissus de la souris, la fréquence était significativement plus élevée dans la MO que dans la rate et le sang. En revanche, des proportions élevées de cellules KLRG1⁺ ont été observées dans tous les tissus, en particulier au sein des LT hCD8⁺ de la MO. Cette différence d'expression de CD57 et de KLRG1 a également été décrite à partir d'échantillons de sang humain (Ibegbu et al. 2005). Une analyse plus spécifique des sous-populations de LT effecteurs, populations exprimant préférentiellement ces molécules, aurait été utile pour affiner le profil de sénescence. Cependant, le nombre de cellules T_E est très faible dans le modèle BRGSF-A2 et ne nous a pas permis de comparer directement les LT effecteurs issus des échantillons de sang de la souris HIS et de l'homme. Les fractions T_N et T_M CD57⁺ étaient négligeables dans le modèle HIS et l'homme, confirmant le développement physiologique du compartiment T humain des souris BRGSF-A2. L'analyse en sous-populations des proportions de cellules KLRG1⁺ a révélé un profil d'expression différent de celui observé chez l'homme : la proportion de cellules T_N exprimant KLRG1 dans le sang était plus élevée pour la souris BRGSF-A2 que l'homme. En revanche, nous avons trouvé des proportions plus faibles de LT hCD8⁺ exprimant KLRG1 dans le sang de la souris HIS que du donneur sain, et nous n'avons pas constaté de différence au sein des LT hCD4⁺ mémoires. Ces observations suggèrent que le compartiment naïf de la souris BRGSF-A2 a un phénotype distinct. Bien que les T_N n'expriment que très peu KLRG1 chez l'homme, Marcolino et al. ont démontré qu'une proportion de T_N du sang de cordon humain exprime effectivement ce marqueur (Marcolino et al. 2004). Les T_N KLRG1⁺ prolifèrent pourtant normalement, révélant ainsi une population de LT humaines hétérogènes inattendue chez les nouveau-nés. Nous avons évalué si l'humanisation des nouveau-nés pouvait introduire un biais en générant des cellules

immunitaires dans un environnement immature et/ou si cela était dû aux propriétés intrinsèques du modèle BRGSF-A2 en comparant les souris NSG générées à partir de jeunes adultes aux souris BRGSF-A2 générées à partir de nouveau-nés. Un pourcentage élevé de cellules KLRG1⁺ a été observé au sein des LT hCD4⁺ naïfs au sein des deux modèles. La forte proportion de T_N KLRG1⁺ dans le modèle HIS pourrait être associée à l'utilisation de cellules HSC CD34⁺ provenant de sang de cordon ombilical humain pour le processus d'humanisation ; cela pourrait refléter l'immaturité des T_N plutôt que la sénescence. Par ailleurs, l'absence de HLA humain de classe II par l'épithélium thymique de la souris pourrait favoriser ce phénotype spécifique de LT hCD4⁺ naïfs chez la souris BRGSF-A2. Malheureusement, aucune donnée n'est disponible dans les modèles de transplantation de tissus thymiques/HSC pour répondre à cette hypothèse. Il est important de noter que l'expression de KLRG1 à la surface des LT hCD4⁺ naïfs ne semble pas empêcher la différenciation normale des T_N en T_M et T_E et qu'elle a également été observée, à un degré moindre, au sein des LT hCD8⁺. Pris dans leur ensemble, nos résultats indiquent que le compartiment T des souris BRGSF-A2 HIS présentent un profil de sénescence limité, tel qu'évalué par CD57 au sein des LT hCD8⁺, bien que l'expression de KLRG1 ait été inattendue à la surface des T_N.

Le modèle BRGSF-A2 HIS est d'autre part un modèle unique permettant l'analyse des mécanismes régulant l'expression de marqueurs d'épuisement et de sénescence *in vivo*, l'impact de ces voies sur la réponse immunitaire et les éventuelles interactions entre ces deux voies. L'épuisement et la sénescence sont tous deux contrôlés par des processus de signalisation actifs qui pourraient être interdépendants (Akbar and Henson 2011; Akbar, Beverley, and Salmon 2004). Des progrès considérables dans l'identification des mécanismes qui régulent les processus d'épuisement et de sénescence ont été réalisés. Toutefois, ils restent étudiés indépendamment l'un de l'autre et il n'a pas clairement été défini si les cellules épuisées sont aussi sénescentes et inversement. Nous avons émis l'hypothèse que le processus d'épuisement

pourrait empêcher le développement de la sénescence et ainsi constituer un mécanisme de régulation physiologique plutôt qu'un dysfonctionnement immunitaire. Le modèle BRGSF-A2 HIS qui récapitule les profils de sénescence et d'épuisement humains *in vivo* constitue un outil très pertinent pour aborder cet aspect, et ce d'autant plus que l'expression de CD57 est restreinte aux cellules humaines (pas d'expression en modèle macaque ou souris) et peut être abordée finement uniquement dans les modèles HIS.

En conclusion, la caractérisation du modèle BRGSF-A2 nous a permis de valider le développement physiologique du compartiment T humain en mettant en évidence des similitudes importantes avec l'homme. Nous nous sommes focalisés sur les profils de différenciation T naïf/mémoire/effecteur et les profils d'épuisement (PD1, TIGIT) et de sénescence (CD57, KLRG1). Davantage d'études fonctionnelles permettraient d'approfondir la caractérisation du modèle et d'aborder les questions de maturité cellulaire. C'est un point que nous avons approché en étudiant le profil de production cytokinique des LT hCD4⁺ de la rate et la MO, après une courte stimulation *in vitro*. Les LT hCD4⁺ ont montré des proportions significatives de cellules productrices d'IFN γ au sein des deux tissus. Une fraction limitée de LT hCD4⁺ productrices d'IL-4 et d'IL-17 a également été détectée, respectivement dans la rate et la MO. Ces résultats confirment aussi que la forte expression de KLRG1 à la surface des LT CD4 n'empêchait pas l'activation cellulaire. De plus, il a déjà été montré que la manipulation de plusieurs voies inhibitrices est possible, avec le ciblage combiné de PD1 et TIM3 chez la souris (Sakuishi et al. 2010). Le modèle BRGSF-A2 a le potentiel pour s'inscrire parfaitement dans ces perspectives thérapeutiques. De façon générale, la souris BRGSF-A2 HIS semble être un outil préclinique prometteur pour évaluer l'efficacité des immunothérapies à la fois dans le sang circulant ou dans les tissus.

III. Infection expérimentale au VIH-1 et contrôle efficace

Quels sont les paramètres de l'infection expérimentale au VIH-1 dans le modèle BRGSF-A2 ?

Pour valider le potentiel et la valeur expérimentale des souris HIS pour l'étude de l'infection VIH-1 et l'évaluation de nouvelles approches thérapeutiques, le modèle doit récapituler les principaux aspects de la physiopathologie. Il s'agit des premiers travaux effectués sur l'étude de l'infection par le VIH-1 dans le modèle BRGSF-A2. Les animaux ont été infectés par voie i.p à la dose de $4,10^5$ TCID₅₀ par la souche virale NL(AD8). Le virus NL(AD8), de tropisme R5, est un virus chimérique où le gène *env* a été remplacé par celui d'un virus R5. Le tropisme R5 nous a semblé plus représentatif de la situation humaine et présente une cinétique d'infection plus lente qu'un virus à tropisme X4. En effet, la prédominance des virus R5 est observée après la transmission virale et au cours des premiers stades de la maladie chez l'homme (Vicenzi et al. 1999). Les virus X4 provoquent une déplétion drastique pouvant entraîner une mort plus rapide par immunodéficience (Ambrose et al. 2007; J. M. McCune 2001) et apparaissent plus tardivement au cours de la phase chronique de l'infection. Les paramètres standards de l'infection, à savoir la charge virale plasmatique et le nombre de cellules hCD4⁺, ont été étudiés de façon longitudinale en post-infection (p.i).

Nous avons confirmé la susceptibilité du modèle BRGSF-A2 à l'infection par le VIH-1. La dose d'infection choisie nous a permis d'infecter 100% de nos animaux. La virémie a augmenté pour atteindre un pic de charge virale dépassant 4.10^6 copies/ml vers J+15 après l'infection avant de diminuer lentement pour se stabiliser à $1,5.10^5$ copies/ml à 12 semaines p.i. Chez l'homme, l'infection se caractérise par une virémie élevée qui atteint un pic de 10^5 à 10^6 copies/ml environ 2 semaines après l'infection. Une fois que les défenses de l'hôte sont

mobilisées contre le virus, une lente diminution jusqu'à une charge virale de 10^4 à 10^5 copies/ml est détectée (Gilbert R. Kaufmann et al. 1998; T. W. Schacker et al. 1998; Sterling et al. 2001). Les valeurs obtenues au sein du modèle BRGSF-A2, à cette dose d'infection, semblent ainsi être représentatives de la situation humaine. En revanche, le pic de la charge virale semble prolongé dans le modèle BRGSF-A2 et en ce sens, diffère du modèle d'infection SIV chez le macaque et VIH-1 chez l'homme. Cette cinétique virale est pourtant similaire à celle observée dans d'autres modèles HIS infectés par le VIH-1 (Brainard et al. 2009; Baenziger et al. 2006; S. Watanabe et al. 2007). Le pic de la charge virale est observé à 2 semaines p.i selon l'inoculation initiale du virus R5 et se maintient pendant plusieurs semaines avant de décliner, ce qui pourrait indiquer un retard dans le contrôle de la réplication virale (Brainard et al. 2009; Wahl et al. 2012; Llewellyn et al. 2019; K. Sato et al. 2012; Sun et al. 2007). Cette cinétique rappelle l'infection périnatale chez l'homme, pour laquelle la virémie passe de valeurs généralement faibles à la naissance à des valeurs élevées au cours des deux premiers mois de la vie, puis diminue très lentement au cours des 24 mois suivants (Shearer et al. 1997). Ce lent déclin de la charge virale des nourrissons infectés contraste fortement avec le déclin rapide de la charge virale qui se produit chez la plupart des adultes après l'infection et suggère que le système immunitaire néonatal immature est incapable de contenir la réplication virale au même degré que le système adulte mature (Feeney 2004). Le déclin de la charge virale semble tout aussi lent dans notre modèle BRGSF-A2, laissant penser que le système immunitaire humain de ces souris est davantage immature que celui des patients adultes.

Dans le même temps, le pourcentage de LT hCD4⁺ (tel que déterminé grâce au nombre absolu de LT hCD4⁺ rapporté à la baseline) a considérablement diminué à partir de 2 semaines. La déplétion progressive des LT hCD4⁺ après l'inoculation d'un virus à tropisme R5 est classiquement décrite entre 3 à 6 semaines p.i dans les autres modèles HIS mais varie selon la voie d'infection (K. Sato et al. 2012; Sun et al. 2007; Nie et al. 2009). La diminution du nombre

absolu de LT hCD4⁺ était détectée à J+14 dans le sang, à J+21 dans la rate, avec une tendance à J+21 dans la MO. Cette observation est à associer à la diminution du ratio hCD4/hCD8, un indicateur important de l'infection, dans la rate et la MO à J+14 et J+21 respectivement. Aucune modification n'a été observée sur le nombre absolu de LT hCD8⁺ dans le sang, la rate et la MO. L'altération des proportions et une distribution anormale des sous-populations de LT est un paramètre important dans l'infection par le VIH-1. Nous n'avons pas constaté de modifications significatives des proportions mémoires dans les organes lymphoïdes. Pour une caractérisation plus large, nous avons analysé le compartiment myéloïde et avons observé une diminution drastique du nombre de cellules hCD33⁺ dans la moelle après 1 semaine d'infection. En particulier, nous avons montré qu'elle était causée par un déclin des cDC et pDC. L'ensemble de ces modifications semble *in fine* tendre à une légère diminution du nombre absolu de cellules hCD45⁺ dans la moelle. Les compartiments myéloïdes du sang et la rate semblent moins impactés par l'infection sur ces paramètres. Seule une diminution du nombre de cellules hCD33⁺ dans le sang à J+7, causé par une diminution des monocytes (tendance) et cDC, ainsi qu'une diminution du nombre de cDC dans la rate à J+7 et J+21 ont été rapportées. De façon complémentaire, nous avons également évalué l'ADNv au sein de plusieurs tissus non lymphoïdes, à savoir le TA, l'intestin, les poumons et le foie, à J+7 et J+21 p.i. Nos résultats ont révélé la présence du virus dès J+7 pour la majorité des souris dans le TA, l'intestin et le foie avec des valeurs comprises entre 10³ et 10⁴ copies d'ADNv/millions de hCD45⁺ et pour toutes les souris dans les poumons avec des valeurs importantes (10⁵ à 10⁶ copies d'ADNv/millions de hCD45⁺). L'ensemble de nos résultats ont démontré la capacité du modèle BRGSF-A2 à soutenir une infection lente et constante ainsi qu'une virémie soutenue jusqu'à 12 semaines p.i. La phase d'infection aiguë et chronique semble être définie à la troisième semaine p.i dans ces conditions expérimentales.

En conclusion, cette étude fournit une vision d'ensemble des impacts de l'infection VIH-1 non contrôlée sur la charge virale plasmatique, la déplétion CD4, les populations lymphoïdes et myéloïdes, la présence du virus au sein des tissus, pendant la phase aiguë et chronique de l'infection. Pour approfondir l'étude de la phase aiguë en modèle HIS, de nombreuses questions restent toutefois à explorer : comment l'infection VIH-1 est-elle initiée précocement à partir des muqueuses jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires, dans un modèle ne possédant pas de ganglions ? Le modèle BRGSF-A2 rend-il compte d'une déplétion drastique des LT hCD4⁺ dans les muqueuses intestinales, un compartiment probablement faiblement humanisé ? Ces éléments permettraient de mieux caractériser la physiopathologie associée à ce modèle. Le maintien du pic de la charge virale observé dans ce modèle pourrait indiquer un retard dans le contrôle de la réplication virale par les LT hCD8⁺ spécifiques. S'assurer de la qualité de la réponse CD8⁺ spécifique à des temps précoces pourrait permettre de lever cette interrogation. Nous pouvons également nous questionner sur la qualité de la réponse hCD8⁺ spécifique en fonction du tissu considéré et de la présentation autologue et hétérologue au sein de ce modèle chimérique. Enfin, l'infection VIH-1 est à considérer plus largement en apportant des données sur l'inflammation en phase aiguë et chronique.

Comment l'axe PD1/PD-L1 est-il modulé durant les phases aiguë et chronique de l'infection VIH-1 ?

L'analyse de l'axe PD1/PD-L1 durant la phase aiguë nous a permis de montrer une modulation très faible de PD1 à la surface des fractions totales des LT hCD4⁺ et hCD8⁺ ainsi que des fractions mémoires issus des tissus, en contraste avec la notion d'un fort épuisement associé à l'infection par le VIH-1. Ces résultats sont néanmoins en accord avec les travaux de Breton et al. qui ont démontré que si l'expression de PD1 est augmentée de manière significative au sein des LT CD4⁺ et CD8⁺ pendant la phase aiguë de l'infection, celle-ci est

portée par une augmentation de la proportion de cellules mémoires exprimant PD1 (Breton et al. 2013). Étant donné que l'activité d'épuisement de PD1 est corrélée à son interaction avec son ligand, nous avons ensuite évalué l'expression de PD-L1. Aucune différence n'a été observée au sein des sous-populations myéloïdes mais ces résultats sont difficiles à interpréter du fait de la grande hétérogénéité d'expression de PD-L1 observée sur la fraction hCD33⁺. Nous avons émis l'hypothèse que l'hétérogénéité de composition des cellules myéloïdes humaines pourrait expliquer cette variation. L'étude en sous-populations monocytes, pDC, cDC n'a néanmoins pas révélé de différences majeures. Dans le contexte infectieux aigu, c'est la fraction LT qui montrait un degré de modulation d'expression de PD-L1. Une plus faible proportion de LT hCD4⁺ et hCD8⁺ exprimant PD-L1 a été observée de façon transitoire (J+7 et J+14 p.i) dans la rate, cette diminution n'était plus détectée à J+21 p.i. De façon intéressante, nous avons constaté une tendance à une plus forte proportion de LT hCD4⁺ exprimant PD-L1 dans la MO par rapport au niveau basal. Même si aucune différence significative n'a été observée au sein des LT hCD8⁺ dans ce tissu, la cinétique de modulation d'expression de PD-L1 présente des similitudes. L'analyse a également été effectuée au sein des fractions mémoires, confirmant que l'impact de l'infection sur la modulation des proportions de cellules PD-L1⁺ n'était pas dû à des changements de proportions des populations mémoires. Ces résultats soulignent ainsi un impact de l'infection VIH-1 sur l'expression de PD-L1 au sein du compartiment T différent entre la rate et la MO.

Durant la phase chronique, l'expression de PD1 devient très majoritaire au sein des LT hCD4⁺ et hCD8⁺ mémoires de la rate et de la MO. Cette forte expression de PD1 sur les LT hCD4⁺ et hCD8⁺ est associée à leur épuisement fonctionnel pendant la phase chronique de l'infection (Trautmann et al. 2006; Day et al. 2006; Petrovas et al. 2006; D'Souza et al. 2007; J. Y. Zhang et al. 2007). En outre, cette régulation à la hausse impacte l'ensemble des sous-populations de LT (G. Rosignoli et al. 2009; Breton et al. 2013). L'expression de PD1 et

l'engagement continu de PD-L1 pendant l'infection par le VIH-1 pourraient ainsi avoir un impact sur l'homéostasie des LT en compromettant la survie, l'auto-renouvellement homéostatique, la capacité de différenciation, ainsi que les réponses effectrices fonctionnelles (Trautmann et al. 2006; Day et al. 2006; Petrovas et al. 2006; D'Souza et al. 2007; J. Y. Zhang et al. 2007; Breton et al. 2013; Barber et al. 2006; Shankar et al. 2011). Ces observations suggèrent fortement que les interventions thérapeutiques devraient être initiées tôt lors de l'infection aiguë avant que les mécanismes d'épuisement ne soient mis en place.

Quelle stratégie antirétrovirale choisir pour un contrôle efficace de l'infection ?

Plusieurs études en souris HIS ont rapporté les effets des ARV en utilisant différentes combinaisons de médicaments (Sango et al. 2010; Shailesh K. Choudhary et al. 2009; S. K. Choudhary et al. 2012; P. W. Denton et al. 2012; Marsden et al. 2012). Ces travaux ont été très prometteurs sur la base de la réduction de la charge virale et de la restauration du taux CD4 et indiquent que les souris HIS constituent un modèle robuste pour les études précliniques. En revanche, ils ne rapportent pas d'études pharmacocinétiques pour les ARV utilisés, à l'exception des travaux de Choudhary et al. (Shailesh K. Choudhary et al. 2009) et de Nischang et al. (Nischang et al. 2012). Un schéma thérapeutique uniformisé chez les modèles HIS, dont la trithérapie est avérée et supprime efficacement la réplication virale, serait très utile pour fournir une preuve de concept de l'efficacité de nouveaux médicaments et leur impact sur la latence virale. L'importance d'études pharmacocinétiques dans le modèle HIS repose aussi sur la nécessité de transposer de manière appropriée le dosage des ARV d'une espèce animale à une autre en prenant en compte un ensemble de paramètres biologiques. En effet, la dose équivalente chez l'animal ne devrait pas être extrapolée à une posologie chez l'homme par une simple conversion basée sur le poids corporel. Pour une conversion plus appropriée, nous avons fourni des efforts importants pour intégrer différents paramètres directement impliqués dans le

métabolisme médicamenteux comme le métabolisme basal, le volume sanguin, l'utilisation de l'oxygène, la dépense calorique, la proportion de protéines plasmatiques circulantes et la fonction rénale (Reagan-Shaw, Nihal, and Ahmad 2008). Ce sont des paramètres qui présentent une forte corrélation entre les différentes espèces de mammifères. Sur ces éléments, nous avons défini la posologie adaptée pour une voie d'administration peu invasive, mais potentiellement moins homogène en termes de prises journalières : la voie *per os*. Nous avons travaillé sur une combinaison de trois ARV actuellement recommandés en clinique (DTG, FTC et TDF). Chez l'homme, l'association des deux INTI, FTC et TDF, est préférentiellement choisie pour un traitement de premier intention en raison de son efficacité virologique et immunologique (Arribas et al. 2008; Gallant et al. 2006; Sax et al. 2011; Post et al. 2010), sa tolérance ainsi que sa facilité de prise du traitement et la meilleure compliance du patient. La majorité des patients est traitée par un INI comme troisième agent, le RAL (INI de première génération), ou le DTG (INI de seconde génération) de plus en plus utilisés ces dernières années. Nous avons également choisi une formulation par voie *per os* pour faciliter l'administration quotidienne sur de longues périodes sans manipulation des animaux. Les données pharmacocinétiques ont démontré l'importance de la mise en place d'un traitement sans interruption pour maintenir des doses thérapeutiques. D'autres études en souris HIS privilégient une administration par voie parentérale (injections i.p. ou sous-cutanées) pour supprimer rapidement la virémie. Il s'agit d'un protocole invasif pour l'animal, et chronophage pour l'expérimentateur lorsqu'il est réalisé au quotidien sur de longues périodes de traitement. Enfin, en raison des préoccupations de biosécurité il constitue une option peu attrayante chez les souris infectées par le VIH-1. La supplémentation en eau de boisson, l'option que nous avons choisie, permet également de combiner l'administration d'autres thérapies par voie i.p pour une période plus courte. La formulation des ARV en eau de boisson a nécessité des efforts supplémentaires pour adapter la posologie et la solubilité des médicaments au MediDrop® Sucralose, un gel liquide permettant

une suspension uniforme des médicaments caractérisé par une saveur sucrée masquant le goût désagréable des médicaments. Une seule étude en souris HIS a utilisé cette stratégie et a montré un contrôle efficace de l'infection (Satheesan et al. 2018). Enfin, nous nous sommes interrogés sur le moment d'initier le traitement ART et avons choisi de laisser l'infection VIH-1 progresser pendant 3 semaines. Cette période permet à l'infection de s'établir, d'induire une déplétion CD4 marquée, représentative des niveaux de déplétion observés chez les patients mis sous traitement. En termes « cinétique », la courte période de temps sans traitement conduit à considérer ce modèle comme un modèle de traitement au stade précoce de la phase chronique. Il existe néanmoins une discordance sur l'établissement de l'infection dans le modèle HIS qui rend difficile l'établissement de schémas thérapeutiques représentatifs des stratégies humaines.

Quels sont les effets du traitement ART dans l'infection VIH-1 ?

Nous avons recherché l'efficacité du traitement ART dans l'infection VIH-1 via trois niveaux de monitoring en suivant les paramètres pharmacologiques, virologiques et immunologiques, une approche multidisciplinaire rarement présentée. Dans un premier temps, nous avons déterminé la concentration en DTG, FTC et TDF à partir d'échantillons de plasma de souris BRGSF-A2 HIS recevant le traitement ART par la méthode LC-MS/MS. La majorité des animaux traités ont affiché des concentrations parmi les valeurs de références chez l'homme. Collectivement, nos résultats ont confirmé l'utilisation d'une trithérapie avérée avec des profils de concentration proches de la situation humaine. Ce sont des données importantes puisque la plupart des études réalisées en modèles HIS choisissent une transposition peu appropriée de la posologie des ARV d'une espèce animale à une autre par la conversion basée sur le poids corporel. Ces approches peuvent mener à un surdosage et une toxicité ou au contraire à un dosage sous-optimal et la mise en place d'une mono- ou bithérapie plutôt qu'une trithérapie. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux paramètres standards de

l'infection en évaluant l'impact des ARV sur la charge virale plasmatique et le nombre hCD4⁺. Nos résultats montrent que le traitement ART réduit la charge virale plasmatique en 16 jours pour devenir indétectable 7 semaines plus tard. Ainsi, l'initiation de ce traitement oral supprime de manière fiable la virémie aussi efficacement que la voie parentérale plus fréquemment utilisée. En parallèle, il a aussi permis une restauration rapide au sein des PBMC dès 11 jours après l'initiation du traitement ART. Il est intéressant de noter qu'à 16 jours de traitement ART tous les animaux étaient des répondeurs virologiques mais non des répondeurs immunologiques : 8 souris sur 20 présentaient une déplétion en LT hCD4⁺ aggravée. Alors que nous pensions que ces animaux ne répondraient pas aux ARV, nous avons constaté que cet effet était transitoire : 5 des 8 souris ont finalement développé une réponse retardée mais efficace aux ARV 5 semaines plus tard. La restauration immunitaire sous traitement ART se produit généralement en tandem avec le déclin viral, mais ce n'est pas systématiquement le cas. Certains patients qui parviennent à une suppression totale du virus ne voient peu d'amélioration du nombre de LT CD4⁺ (non répondeurs immunologiques, INR), tandis que d'autres connaissent une bonne récupération des LT CD4⁺ malgré une réplication virale continue (non répondeurs virologiques). Jusqu'à 30 % des patients traités avec succès, c'est-à-dire dont la charge virale est inférieure au seuil de détection, n'atteignent pas un nombre normal de cellules CD4⁺ et restent donc exposés à un risque plus élevé d'événements cliniques (Battegay et al. 2006; G. R. Kaufmann et al. 2005). Ces réponses discordantes ont tendance à se produire plus souvent chez les patients ayant déjà reçu un traitement ART au préalable et dont le virus a développé une résistance. Il est décrit que les INR sont associés à un âge avancé, un nombre initial de LT CD4⁺ faible et à une charge virale faible en l'absence de traitement (Moore et al. 2005). En outre, certaines études ont décrit des patients discordants à 6 mois qui deviennent concordants 12 mois après l'initiation du traitement (Gilson et al. 2010). Cette amélioration ultérieure serait la conséquence d'une restauration continue, bien que lente, de la réponse

immunitaire sous ARV. De plus, nos résultats suggèrent qu'il existe une grande hétérogénéité sur la proportion de LT mémoires et/ou sur la proportion de LT exprimant PD1 avant le traitement ART chez les souris BRGSF-A2 infectées. Ces proportions variables pourraient être corrélées à la capacité de restaurer le nombre de LT hCD4⁺ sous ARV et indiqueraient une variabilité des réponses immunitaires chez les souris HIS recevant une infection VIH-1 pourtant comparable. Cette hypothèse est soutenue par une étude de Seung et al. qui montre que la proportion de LT hCD8⁺ exprimant PD1 n'augmente pas uniformément chez les souris BLT chroniquement infectées et qu'elle n'est pas corrélée avec la charge virale (Seung et al. 2013). De plus, les travaux de Grabmeier-Pfistershammer et al. ont montré que PD1 constitue un marqueur spécifiquement associé à l'échec immunologique malgré la suppression virale des patients traités. L'expression de PD1 à la surface des LT CD4⁺ et CD8⁺ était significativement plus élevée chez les INR que les patients ayant une restauration normale des LT CD4⁺ après traitement et l'échec immunologique ne semble pas associé à d'autres marqueurs d'activation (Grabmeier-Pfistershammer et al. 2011). En étudiant les profils immunologiques des animaux avant la mise sous traitement, nous avons observé que les INR présentaient une proportion de cellules T mémoires significativement plus faible que les répondeurs immunologiques (IR). Cette observation est en contradiction avec les données décrites au sujet d'une plus forte expression de PD1 chez les INR. En sachant que les réponses discordantes jouent un rôle important dans la prédiction des résultats cliniques à long terme (Tan et al. 2008; Tuboi et al. 2010), le modèle BRGSF-A2 serait utile pour identifier les facteurs associés à l'échec immunologique.

Pour évaluer l'impact du traitement ART sur la réponse T et la modulation PD1/PD-L1, nous avons euthanasié les animaux après 3 semaines de traitement (J+42 p.i) et analysé la rate et la MO des animaux. Nos résultats ont mis en évidence une restauration robuste du nombre de LT hCD4⁺ et du ratio hCD4/hCD8 dans la MO en comparaison à des animaux non traités.

En sachant que le ratio hCD4/hCD8 est un indicateur important du dysfonctionnement immunitaire chez les patients infectés par le VIH-1 (Lu et al. 2015), ces résultats soulignent un contrôle efficace de l'infection dans les tissus lymphoïdes. De façon surprenante, la proportion de LT mémoires exprimant PD1 a été peu modulée sous traitement ART par rapport aux animaux infectés non traités. Pourtant, le traitement ART entraîne la normalisation de ce paramètre sur les LT totaux (Day et al. 2006; Breton et al. 2013). La régulation à la baisse de l'expression de PD1 chez les patients traités a été proposée comme étant un indicateur sensible de la reconstitution immunitaire chez les patients traités avec succès (Grabmeier-Pfistershammer et al. 2011). La faible régulation de PD1 observée dans le modèle BRGSF-A2 après traitement ART pourrait être la conséquence d'une proportion de LT mémoires exprimant PD1 déjà très élevée dans un contexte non infectieux. Ainsi, la variation possible serait relativement réduite pour ces animaux BRGSF-A2 compte tenu de leur niveau basal à cet âge. La proportion de LT naïfs n'est pas significativement corrigée, suggérant un degré d'activation important et persistant dans ces animaux. De façon intéressante, nous avons mis en évidence une diminution des proportions de cellules exprimant PD-L1 dans les fractions myéloïde et lymphoïde. Au sein du compartiment myéloïde, la proportion de cellules hCD33⁺ exprimant PD-L1 était plus faible chez les animaux traités dans le sang et la rate. En conséquence, nous avons identifié une proportion de monocytes PD-L1⁺ plus faible dans le sang. Concernant le compartiment T, nous avons mis en évidence une diminution de la proportion de LT hCD4⁺ et hCD8⁺ dans la rate, avec une tendance similaire dans la MO, pour les animaux sous ARV. Au sein des fractions mémoires, une plus faible proportion de LT hCD8⁺ mémoires exprimant PD-L1 dans la rate, avec une même tendance observée parmi la population de LT hCD4⁺ mémoires après 3 semaines de traitement ART a été mis en évidence. Plusieurs rapports indiquent une régulation à la hausse à la fois de PD1 et de PD-L1 lors de l'infection VIH-1 et il est clairement démontré que l'expression de PD1 est normalement réduite à l'initiation des ARV. En revanche,

l'expression de PD-L1 semble peu affectée par le traitement (Xicheng Wang et al. 2008) ; il ne permet pas de réduire l'expression de PD-L1 à la surface des CPA (Guglielmo Rosignoli et al. 2007) et celle-ci est corrélée avec la progression de la maladie (Trabattoni et al. 2003). Les travaux de Rosignoli et al. ont démontré que l'expression de PD-L1 augmente à la surface des LT CD4⁺ et CD8⁺ dans le sang, même lorsque les patients reçoivent un traitement ART efficace et ont une charge virale indétectable (G. Rosignoli et al. 2009). Ces premiers travaux suggèrent que la forte expression de PD-L1 pourrait aussi contribuer à la reconstitution immunitaire incomplète et être liée à l'anergie induite par le VIH-1 après un traitement ART efficace. A ce jour, l'importance de l'expression de PD-L1 par les LT est peu connue dans le contexte des infections chroniques. L'expression du PD-L1 à la surface des DC et des LT pourrait être associée à une réponse altérée des LT lors d'une infection grippale aiguë. Au cours d'infections virales chroniques, l'expression de PD-L1 sur les LT a été signalée dans l'altération de la réponse T (Trabattoni et al. 2003). Dans le contexte tumoral, une étude récente a rapporté les effets pléiotropes de l'expression de PD-L1 à la surface des LT et indique une contre-signalisation suppressive qui rivalise avec les effets inhibiteurs bien documentés de la signalisation PD1. Ils mettent en évidence que les LT PD-L1⁺ peuvent être des suppresseurs des LT effecteurs plus efficaces que les CPA PD-L1⁺ et que la signalisation de la synapse immunologique entre les CPA et les LT est bidirectionnelle ; les LT PD-L1⁺ fournissant aussi des signaux suppressifs déterminant le devenir des CPA (Diskin et al. 2020). En revanche, des travaux antérieurs ont montré que l'expression de PD-L1 à la surface des LT est nécessaire à la maturation des DC dans le contexte d'une infection grippale, ce qui suggère que les effets peuvent dépendre à la fois du contexte environnemental et du sous-type de CPA (Talay et al. 2009). Enfin, nous avons évalué l'impact des ARV sur les réservoirs tissulaires après 3 semaines de traitement. Nos résultats ont mis en évidence une diminution significative de l'ADN_v pour toutes les souris dans le TA et les poumons en comparaison des animaux infectés

non traités. A noter que les valeurs restent malgré tout élevées dans les poumons issus d'animaux traités ; ils constituent le deuxième site après le cerveau où la pénétrance des ARV est la plus faible. En revanche dans l'intestin et le foie, le virus n'est plus détecté au sein des souris infectées. Ce résultat surprenant semble indiquer une déplétion drastique des cellules hCD45⁺ à J+42 p.i et reflète probablement un faible niveau d'humanisation, déjà à l'état basal, dans ces tissus. En conclusion, l'infection par le VIH-1 en modèle BRGSF-A2 HIS présentent certaines spécificités dans le sang et les tissus lymphoïdes : (i) maintien du pic de la charge virale pendant plusieurs semaines, (ii) peu de modulation de l'expression de PD1 dans un contexte d'infection contrôlée ou non, (iii) une régulation augmentée de l'expression de PD-L1 au sein des LT et des fractions mémoires de la moelle en phase aiguë, (iv) un contrôle de l'expression de PD-L1 au sein des LT et de la fraction mémoire hCD8⁺ de la rate par les ARV en phase chronique.

Une autre approche thérapeutique concerne les stratégies d'interruption de traitement ART et l'induction d'un contrôle post-arrêt. Un rebond viral rapide, alors que le virus n'était pas détectable dans le sang périphérique (Kulpa and Chomont 2015; Davey et al. 1999; Finzi et al. 1999), rend difficilement envisageable une rémission durable sans ARV pour la grande majorité des patients. Cependant une fraction de patients présente cette particularité. Dans le modèle BRGSF-A2, après 8 semaines de traitement efficace nous avons interrompu le traitement et analysé la charge virale plasmatique ainsi que la réponse T au sein des tissus. Un rebond viral a été observé chez la plupart des souris traitées 11 jours après l'interruption du traitement ART et est revenu à des niveaux proches d'une infection virale non contrôlée. En parallèle, le nombre absolu de LT hCD4⁺ et hCD8⁺ dans la rate et la MO ont diminué rapidement 34 jours après l'interruption du traitement alors que l'impact du rebond viral semblait être peu observé à J+11 post-ART. En effet, les souris traitées et euthanasiées à J+11 post-ART ont montré des valeurs très similaires à celles des souris non infectées, en particulier

pour les hCD4⁺ prélevés dans la rate et la MO. Ces observations mettent en évidence un léger décalage entre les impacts virologiques et immunologiques après l'interruption du traitement selon le site considéré. Aucun impact n'a été observé sur la modulation de PD1 dans les tissus collectés. Ces résultats démontrent que dans ce modèle, le traitement ART seul ne permet pas d'assurer un contrôle virologique et immunologique à long terme après son interruption. Pourtant, il existe de rares patients qui présentent une suppression virologique soutenue pendant des mois ou des années après l'arrêt des ARV (Sáez-Ciri3n et al. 2013; Etemad, Esmailzadeh, and Li 2019). Les mécanismes exacts qui sous-tendent la capacité de ces patients à contrôler l'infection restent incertains. Le modèle BRGSF-A2 représente un outil pertinent pour la mise en place de schémas thérapeutiques favorisant l'induction d'un contrôle post-arrêt. Nous avons émis l'hypothèse que réduire l'inflammation chronique et l'épuisement par immunothérapies associées aux ARV pourrait représenter une stratégie prometteuse pour tendre vers un meilleur contrôle post-arrêt.

IV. Evaluation de deux stratégies d'immunothérapies dans le contexte chronique de l'infection VIH-1

Quelle stratégie choisir pour agir sur l'épuisement ?

PD1 est connu pour être le principal régulateur inhibiteur impliqué dans les mécanismes d'épuisement. Il est également associé à la persistance virale. En effet, une fréquence élevée de cellules exprimant PD1 a été associée à l'épuisement des LT spécifiques chez les patients chroniquement infectés par le VIH-1 (Day et al. 2006) et représente un indicateur prédictif de la latence virale avant même l'initiation du traitement ART (Ghiglione et al. 2019). Pour ces raisons et compte tenu de la similarité des mécanismes d'épuisement des LT dans le contexte tumoral (Wherry and Kurachi 2015) et du succès des thérapies impactant la voie PD1/PD-L1,

ces stratégies ont été envisagées dans l'infection chronique au VIH-1. Des effets indésirables inflammatoires et le risque de développer des maladies auto-immunes ont été signalés chez des patients recevant un traitement α PD1 ou α PD-L1 (Hofmann et al. 2016). En sachant que la mise en place de la trithérapie supprime efficacement les charges virales chez la plupart des patients avec des effets indésirables faibles pendant des décennies, les exigences sont élevées pour justifier un besoin médical de l'utilisation de stratégies anti-ICP qui peuvent présenter un danger sur la santé des patients. Dans le contexte de l'infection par le VIH-1 contrôlée sous traitement ART, l'utilisation de stratégies anti-ICP pourrait avoir de multiples effets bénéfiques pour réduire les dysfonctions du système immunitaire, réduire la charge virale résiduelle et permettre aux individus d'interrompre les ARV en toute sécurité. Les critères d'efficacité sont (i) la restauration des réponses effectrices en levant l'épuisement des LT CD8⁺ et CD4⁺, (ii) l'éradication/diminution de la charge virale résiduelle en réactivant les cellules infectées de manière latente, et (iii) l'induction d'un contrôle post-ART. Le blocage de l'axe PD1/PD-L1 peut reposer sur la stratégie α PD1 ou α PD-L1, la première laissant la voie inhibitrice PD-L1/CD80 intacte et impacte principalement les LT activés, tandis que la seconde laisse la voie PD1/PD-L2 intacte et son impact est plus large (CPA, LT) mais affecte probablement moins les réservoirs viraux. Dans le contexte de l'infection par le VIH-1, le blocage α PD1 est privilégié en clinique. Néanmoins, des études complémentaires sont nécessaires pour délimiter les différences potentielles d'efficacité et de toxicité des α PD1 et α PD-L1 associés aux ARV. En sachant que les ARV régulent à la baisse l'expression de PD1 à la surface des LT mais impacte peu l'expression de PD-L1, une efficacité supérieure de l'association ART/ α PD-L1 en comparaison de ART/ α PD1 serait envisageable. En outre, les travaux de Rosignoli et al. laissent penser que l'expression exotique de PD-L1 à la surface des LT pourrait aussi contribuer à la reconstitution immune incomplète après un traitement ART efficace (G. Rosignoli et al. 2009; Guglielmo Rosignoli et al. 2007). L'importance de l'expression de PD-L1 par les LT et des

stratégies α PD-L1 est à explorer davantage dans ce contexte.

Quels sont les impacts des α PD1 dans l'infection chronique au VIH-1 ?

Chez le macaque rhésus infecté par le SIV, il a été démontré que le blocage *in vivo* de PD1 par des anticorps neutralisants α PD1 en phase chronique de l'infection SIV (i) entraîne l'expansion rapide et la restauration des LT CD8⁺ polyfonctionnels spécifiques du SIV, (ii) diminue la charge virale plasmatique, et (iii) prolonge la survie des macaques infectés (Velu et al. 2009). D'autres effets bénéfiques du blocage α PD1 ont été montrés dans ce modèle, comme la diminution de la signalisation IFN et de la perméabilité intestinale (Shetty et al. 2012). Dans un modèle de souris BLT, le blocage α PD1 a entraîné une réduction significative de la charge virale et a confirmé une augmentation significative des LT CD8⁺ spécifiques du VIH-1 (Seung et al. 2013). En particulier, ces résultats ont mis en évidence une réponse différente au traitement α PD1 selon le niveau d'expression de PD1 à la surface des LT hCD8⁺ avant l'initiation du traitement. Sur cette base, un plus grand nombre de LT hCD8⁺ spécifiques du VIH-1 chez les souris exprimant fortement PD1 permettrait un meilleur contrôle de la charge virale suite au traitement α PD1 par rapport aux souris exprimant peu PD1. Nous avons souhaité compléter ces travaux en étudiant plus spécifiquement les modifications du compartiment T dans ces stratégies α PD1. Comme les modèles animaux utilisés précédemment, nous avons montré que la souris BRGSF-A2 HIS répondait au blocage α PD1 (induit pendant 10 jours) par une diminution de la charge virale plasmatique de l'ordre de 1 log pour certains animaux. Un autre effet observé repose sur une forte diminution de la proportion de LT mémoires de la rate à J+11 post- α PD1 par rapport aux souris non traitées. Cette différence semble transitoire et n'a pas été retrouvée à J+34 post- α PD1. De plus, ce résultat semble spécifique de la rate. Nos résultats ne permettent pas de distinguer les animaux ayant une forte ou faible proportion de LT exprimant PD1⁺ mais nos résultats précédents ont montré que les LT mémoires exprimaient

PD1 de façon quasi constitutive dans le contexte d'une infection VIH-1 non contrôlée. Cette diminution drastique de la fraction mémoire dans la rate pourrait être causée par une mort par suractivation ou une sénescence rapide. Cette hypothèse semble peu probable dans la mesure où nous n'avons pas constaté d'augmentation importante de l'expression de CD57 dans ce tissu. De plus, le blocage α PD1 devrait permettre de lever l'épuisement de la fraction de LT exprimant la plus fortement PD1 et d'inverser la latence virale des cellules réservoirs. Nous posons l'hypothèse que cette observation est le résultat d'une restauration fonctionnelle et d'une migration des cellules mémoires vers les tissus non lymphoïdes servant de réservoirs anatomiques. Ces résultats soulignent à nouveau le potentiel de la stratégie α PD1 pour contrôler la charge virale et certains paramètres immunologiques de la réponse T.

Les travaux de Mylvaganam et al. ont cherché à évaluer, en modèle macaque, l'impact d'une association ART/ α PD1. Le blocage α PD1 pourrait entraîner des effets cytopathiques induits par l'activation des LT CD4⁺ infectés, diminuant la demi-vie globale de la cellule CD4⁺ infectée et entraînant une diminution plus rapide de la virémie après l'association ART/ α PD1. Leurs résultats montrent que le blocage α PD1 peut être combiné de manière sûre et efficace avec un traitement ART pour renforcer la réponse T CD8⁺, réduire l'inflammation associée à la muqueuse et réduire le réservoir viral inductible du sang périphérique. Cependant, contrairement aux études sans ARV chez le macaque, il y a eu une expansion plus limitée des LT CD8⁺ spécifiques. La réduction potentielle de l'expression globale de PD1 due à un plus faible niveau d'antigènes persistants et au traitement ART continu (Cockerham et al. 2014) ont probablement contribué à des réponses plus faibles dans ce contexte mais significatives par rapport aux animaux ne recevant pas de traitement α PD1. Ils démontrent également un retard du rebond viral après l'interruption du traitement ART par rapport aux animaux sous ART seul (Mylvaganam et al. 2018). Les résultats de cette étude démontrent que le blocage α PD1 peut augmenter de manière significative les réponses antivirales, agir en synergie avec les ARV pour

augmenter la cinétique de la suppression virale et potentiellement déstabiliser les réservoirs viraux latents. Les effets étaient néanmoins peu significatifs en terme clinique, et le bénéfice thérapeutique d'un ralentissement de la remontée de la charge virale peu convaincant. Notre étude s'est intéressée à l'impact de l'association ART/ α PD1 à travers une autre stratégie thérapeutique : combinaison ART/ α PD1 au stade tardif de la phase chronique et nous avons utilisé comme paramètres d'efficacité l'induction d'un contrôle post-arrêt. Nos résultats en suivi longitudinal ont révélé un rebond viral rapide pour l'ensemble des animaux sous traitement combiné, avec un profil similaire aux souris sous ART seul. Toutefois, une tendance à une charge virale plus élevée a été observée pour les animaux ART/ α PD1 euthanasiés 34 jours après l'interruption du traitement combiné, par rapport aux animaux contrôles. Ce résultat a été mis en évidence chez des macaques rhésus sans ARV, où le blocage α PD1 induit une augmentation transitoire de la virémie (Velu et al. 2009; Finnefrock et al. 2009). Nous n'avons donc pas observé de bénéfices à l'association ART/ α PD1 en phase tardive de l'infection, confirmant les limites potentielles de ces stratégies.

Néanmoins, nous mettons en évidence un effet différent selon que le blocage α PD1 soit réalisé dans un contexte d'infection seule ou contrôlée par des ARV. En étudiant les paramètres du compartiment T dans la rate, aucun changement concernant la proportion de LT mémoires n'a été observé. Nous posons l'hypothèse que le niveau d'inflammation diffère entre ces deux contextes et impacte la réponse des LT mémoires. Enfin, nous n'avons pas constaté de changements sur les proportions de LT mémoires exprimant TIGIT ou CD57. En revanche, le profil d'expression de Ki67 parmi les LT mémoires a augmenté à J+34 pour les souris ART/ α PD1 par rapport aux souris ART dans la rate. La faible augmentation de la charge virale observée à J+34 post-ART/ α PD1 semble alors associée à la prolifération des LT CD4⁺, suggérant que le blocage α PD1 favorise aussi l'activation des LT CD4⁺ et conduit à inverser la latence virale. Nos résultats démontrent qu'un traitement ART efficace combiné au blocage

α PD1 n'améliore pas le contrôle post-arrêt chez les souris BRGSF-A2 HIS. Cependant, une augmentation de la charge virale et de la proportion de LT exprimant Ki67 à J+34 après l'interruption du traitement ART/ α PD1 pourrait refléter une réactivation des réservoirs latents et lever la prolifération des LT.

Quelle stratégie alternative de modulation de la voie PD1/PD-L1 choisir ?

Un autre objectif thérapeutique important à atteindre est d'optimiser l'équilibre entre l'amélioration des réponses immunitaires et le contrôle d'une inflammation systémique. Pendant la phase chronique de l'infection contrôlée, l'inflammation résiduelle persiste, la signature IFN augmente et la réponse immunitaire est fragile. Des réflexions ont été menées au cours des dernières années sur la manière de réduire l'inflammation résiduelle : (i) diminuer la production endogène d'IFN-I en limitant l'induction par les cellules productrices d'IFN ou (ii) limiter la transduction du signal dans les cellules cibles. L'inflammation reste une réponse physiologique à bons nombres d'agressions de l'organisme, il est donc important de trouver une stratégie permettant de réduire sans éteindre la réponse IFN. Nous avons donc testé l'impact d'une stratégie α JAK, dont la bonne tolérance a été démontrée dans des contextes d'auto-immunité. D'une part, cette stratégie nous permet de conserver la production d'IFN-I par les cellules productrices, les pDC principalement et les monocytes et cDC. D'autre part, il nous a semblé plus pertinent d'agir via des inhibiteurs de JAK afin de ne pas bloquer complètement la signalisation IFN. Toutefois, compte tenu des activités complexes de l'IFN-I, il sera essentiel de délimiter l'effet de la voie IFN-I pendant les différents stades de l'infection chronique, car une modulation incorrecte du traitement α IFNAR ou α JAK pourrait au contraire avoir des effets néfastes sur la progression de la maladie.

Quels sont les impacts de l'association ART/ α JAK dans l'infection chronique au VIH-1 ?

Les travaux de Benci et al. dans le contexte tumoral ont démontré que la signalisation prolongée des IFN-I et II augmente l'expression des ISG tels que PD-L1 et que son inhibition permet de lever le mécanisme de résistance adaptative aux anti-ICP en combinaison. De façon intéressante, cette stratégie rend même les cellules tumorales plus sensibles aux anti-ICP en monothérapie (Benci et al. 2016). Par analogie, nous posons l'hypothèse qu'une exposition prolongée aux IFN-I pourrait contribuer à l'épuisement des réponses T en phase chronique de l'infection VIH-1, en modulant l'expression de PD-L1 et que son inhibition au stade précoce de la phase chronique pourrait permettre de contrôler à la fois l'inflammation résiduelle et l'épuisement des réponses T. Les souris BRGSF-A2 ont été infectées pendant 3 semaines puis traitées avec les ARV les 3 semaines suivantes. Le baricitinib a été combiné tous les jours au traitement ART durant la dernière semaine. L'initiation du baricitinib après 2 semaines de traitement ART nous a semblé pertinente puisque sur cette fenêtre thérapeutique l'inflammation est détectable, la virémie diminue et par conséquent l'activité anti-virale de la voie IFN-I n'est plus absolument nécessaire ; bloquer la voie IFN-I plus tôt présenterait le risque de perdre le contrôle viral via cette signalisation sans autre couverture anti-virale. De plus, une durée d'une semaine de traitement au baricitinib a été choisie car il cible efficacement la signalisation IFN-I chez des souris infectées par le LCMV (Wilson et al. 2013).

Chez les souris BRGSF-A2, le traitement α JAK n'a pas d'impact sur les compartiments lymphoïdes et myéloïdes au sein des PBMC, de la rate et de la MO. De façon plus importante encore, la charge virale plasmatique était similaire entre les souris ART/ α JAK et les souris ART. Il s'agit de deux contrôles essentiels pour pouvoir considérer le baricitinib dans l'infection par le VIH-1 : la charge virale plasmatique est restée supprimée et le compartiment immunitaire n'a pas été altéré en termes de nombre absolu. Ensuite, nous avons constaté que le

traitement α JAK n'affecte pas la modulation de PD1 parmi les LT mémoires. De façon surprenante, nous n'avons pas observé de modulation de l'expression de PD-L1 au sein des cellules hCD33⁺ et une légère tendance a été observé au sein des monocytes du sang périphérique, un effet pourtant attendu sur les populations myéloïdes. En revanche, nos résultats ont mis en évidence une diminution significative de la proportion de LT PD-L1⁺ dans le sang périphérique des souris BRGSF-A2 traitées par ART/ α JAK par rapport aux souris ART. En outre, les LT hCD4⁺ et hCD8⁺ spléniques ont tous deux montré une tendance similaire avec une proportion plus faible de LT PD-L1⁺. Enfin, nous avons posé l'hypothèse que la capacité des souris à répondre au traitement α JAK pourrait dépendre du niveau d'expression de PD-L1 sous traitement ART avant l'initiation du baricitinib. Nous n'avons trouvé aucune différence entre les deux groupes de souris sur ce critère. En conclusion, nous démontrons qu'un traitement ART efficace combiné au blocage α JAK réduit encore la proportion de LT PD-L1⁺ dans le sang et la rate des souris BRGSF-A2 HIS. Ces résultats suggèrent que le blocage α JAK en combinaison pourrait conférer un avantage supplémentaire sur le profil d'épuisement des LT lors de l'infection chronique par le VIH-1, en ciblant plus spécifiquement les fractions LT PD-L1⁺.

Bien que le consensus général soit en faveur d'un lien entre inflammation et activation immunitaire, la contribution de l'inflammation à l'épuisement reste moins clairement définie. Dans l'infection persistante par le virus LCMV chez la souris, le blocage de la signalisation IFN-I peut réduire l'activation immunitaire, diminuer la suppression immunitaire, rétablir l'architecture lymphoïde et accélérer la clairance du virus (Wilson et al. 2013; Teijaro et al. 2013; Ng et al. 2015). Les résultats de Zhen et al. en souris BLT démontrent que la signalisation IFN-I pendant l'infection chronique est l'un des moteurs de l'inflammation chronique, de l'activation immunitaire et de l'épuisement des LT CD8⁺, et que le blocage α IFNAR réduit

l'épuisement des LT (PD1, TIM3) et pourrait améliorer les réponses T (Zhen et al. 2017). Nos résultats confirment l'existence d'un lien entre l'inflammation à bas bruit et l'épuisement des réponses T, proche de celui décrit par Benci et al : l'inhibition de la voie IFN-I pourrait réduire l'épuisement des réponses T en modulant l'expression de PD-L1 sur les LT. Cette stratégie pourrait donc favorablement moduler d'une part l'inflammation résiduelle et d'autre part les facteurs d'épuisement de type PD-L1. Des données supplémentaires sur l'expression des ISG dans le modèle BRGSF-A2 pourraient compléter cette étude.

L'ensemble de nos résultats évaluant le blocage α PD1 ou α JAK dans le modèle d'infection BRGSF-A2 nous a permis de démontrer que (i) le blocage α PD1 semble réduire temporairement la charge virale sans toutefois permettre un contrôle post-arrêt efficace et durable lorsqu'il est associé aux ARV, (iii) la combinaison ART/ α JAK confère un bénéfice thérapeutique supplémentaire aux ARV en réduisant la proportion de LT PD-L1⁺, suggérant que l'inhibition de la voie IFN-I au stade précoce de la phase chronique pourrait permettre de contrôler l'épuisement des réponses T.

V. Perspectives et conclusions

Nous avons principalement axé ce travail de thèse sur la mise en place d'un modèle HIS pertinent pour l'étude de l'infection VIH-1 et l'évaluation de deux stratégies d'immunothérapies en association avec les ARV. Le modèle BRGSF-A2 apparaît être un outil préclinique robuste pour évaluer les bénéfices d'immunothérapies avant les essais cliniques chez l'homme. Agir sur l'inflammation à bas bruit et l'épuisement des réponses T représentent deux approches thérapeutiques prometteuses, chacune basée sur une fenêtre thérapeutique

distincte au cours de la phase chronique de l'infection. Néanmoins, l'évaluation de ces stratégies thérapeutiques reste à approfondir.

Quels sont les axes d'amélioration de ces travaux de thèse ?

Nous avons souhaité aborder la problématique par trois niveaux de monitoring différents. Or, ces approches requièrent un nombre important de cellules et le modèle HIS peut parfois être limitant sur cet aspect. Pour compléter ces travaux, il nous paraît important d'approfondir les points suivants :

- Caractérisation de la réponse T CD8⁺ spécifique

Nous avons constaté que le pic de la charge virale se maintient plus longtemps dans le modèle BRGSF-A2 que dans les modèles d'infection SIV chez le macaque et VIH-1 chez l'homme. Le maintien du pic de la charge virale observé pourrait indiquer un retard dans le contrôle de la réplication virale par les LT hCD8⁺ spécifiques ou refléter un système immunitaire immature. S'assurer de la qualité de la réponse CD8⁺ spécifique à des temps précoces pourrait permettre de lever cette interrogation. Nous pouvons également nous questionner sur la qualité de la réponse hCD8⁺ spécifique en fonction du tissu considéré et de la présentation autologue et hétérologue au sein de ce modèle chimérique.

- Caractérisation de l'inflammation en phase aiguë et chronique de l'infection

Nos résultats ont mis en évidence que la combinaison ART/ α JAK offre un bénéfice thérapeutique supplémentaire en réduisant la proportion de LT PD-L1⁺ laissant suggérer que l'inhibition de la voie IFN-I au stade précoce de la phase chronique pourrait permettre de contrôler à la fois l'inflammation résiduelle et l'épuisement des réponses T. Toutefois, du fait du faible nombre de cellules disponibles chez les modèles HIS, nous n'avons pas pu évaluer

l'inflammation à la suite de la stratégie ART/ α JAK. L'apport de données sur l'expression des ISG tels que MX1, IP-10, PD-L1 ou le dosage des IFN-I par SIMOA permettrait de nous assurer du contrôle de l'inflammation résiduelle dans ce contexte.

- Expression de PD-L1 lors du blocage α PD1

Nous avons axé nos études sur la caractérisation du compartiment T et son profil d'épuisement et de sénescence lors des stratégies α PD1. En considérant désormais l'expression de PD-L1 à la surface des LT comme une expression essentielle dans le processus d'épuisement et non plus une expression exotique peu cruciale dans la physiopathologie, il serait intéressant d'évaluer l'expression de PD-L1 au sein des LT lors du blocage α PD1 en combinaison ou non aux ARV.

- Induction d'un contrôle post-arrêt à la suite du traitement ART/ α JAK

Dans le modèle BRGSF-A2, le blocage α PD1 semble réduire temporairement la charge virale mais n'est pas suffisant pour induire un contrôle post-arrêt efficace et durable lorsqu'il est associé aux ARV. La combinaison ART/ α JAK confère un bénéfice thérapeutique supplémentaire en réduisant la proportion de LT PD-L1⁺ et potentiellement l'épuisement de la réponse T. La question de savoir si l'association ART/ α JAK au stade précoce de l'infection chronique permettrait l'induction d'un meilleur contrôle post-arrêt reste à explorer et pourrait donner des bases supplémentaires à cette approche.

- Proposer d'autres fenêtres thérapeutiques des combinaisons ART/ α PD1 et ART/ α JAK spécifiquement adaptées à ce modèle

Nos travaux ont mis en évidence une déplétion LT hCD4⁺ rapide, avec une diminution drastique en 3 semaines qui se stabilise par la suite. En sachant que la déplétion progressive des LT hCD4⁺ est plus classiquement décrite entre 3 et 6 semaines p.i dans les autres modèles HIS, nous

pouvons nous interroger sur le type d'infection induite dans ce modèle. Cette déplétion rapide pourrait traduire un modèle d'infection sévère malgré un tropisme R5. En outre, nos résultats semblent révéler une déplétion drastique de cellules hCD45⁺ dans l'intestin après 6 semaines d'infection, ne nous permettant plus de détecter le virus dans un site pourtant essentiel dans la physiopathologie de l'infection VIH-1. Dans cette hypothèse, certains aspects de la physiopathologie de l'infection peuvent poser question dans ce modèle et soulever certaines limites (ou avantages) d'un modèle d'infection probablement moins disséminé. D'autre part, nous pouvons nous interroger sur la fenêtre thérapeutique que nous avons choisi et si d'autres effets majeurs seraient détectables dans le cas d'une infection seule plus courte et d'une initiation des ARV à 2 semaines au lieu de 3 semaines p.i, suivie des combinaisons ART/ α PD1 ou ART/ α JAK comme définies précédemment.

- Etude des réservoirs tissulaires et distribution des ARV et immunothérapies

Pour approfondir ces travaux par les deux autres niveaux de monitoring évalués, des études tissulaires seraient pertinentes. En particulier, il serait intéressant d'établir une caractérisation des réservoirs tissulaires et cellulaires selon les différents contextes infectieux : VIH, ART, ART/ α PD1 et ART/ α JAK. Ces données permettraient d'évaluer en détails l'impact des différentes stratégies et combinaison de traitements sur les réservoirs viraux. Également, la cartographie de la distribution des ARV et des immunothérapies α PD1 et α JAK au sein des tissus, cellules et liquides biologiques aurait une plus-value importante, également pour d'autres pathologies utilisant ces médicaments. L'obtention d'une pharmacocinétique cellulaire et d'une distribution tissulaire optimales des médicaments constituerait une condition préalable à l'élimination des réservoirs viraux et à l'évaluation de synergies de traitements combinés. Toutefois, ces approches requièrent un nombre important de cellules et les modèles HIS peuvent être limitant, en particulier pour les tissus non lymphoïdes faiblement humanisés. La

complémentarité des études avec les modèles PNH constituerait une approche plus robuste pour ces aspects.

Doit-on envisager différentes immunothérapies en combinaison aux ARV ?

Le traitement ART a démontré son efficacité pour réduire la progression de la maladie, tout en diminuant de manière spectaculaire la transmission. A ce jour, seule l'initiation précoce aux ARV représente une approche consensuelle. Cette stratégie fournit un contrôle viral post-traitement pendant plusieurs mois/années pour une fraction de patients traités très précocement ainsi qu'une rémission fonctionnelle durable chez de très rares enfants et adultes (Rajasuriar, Wright, and Lewin 2015).

En raison de la coexistence de plusieurs voies impliquées dans le dysfonctionnement des LT et l'inflammation à bas bruit, une combinaison d'approches thérapeutiques basées sur les immunothérapies et la vaccination est probablement nécessaire pour générer des résultats plus significatifs. De plus, étant donné que le réservoir viral reste invisible du système immunitaire, des approches basées sur certaines cytokines et agents anti-latence semblent également nécessaires pour réactiver le virus (Archin et al. 2012). Bien que les effets décrits du blocage α PD1 soient encourageants, ce traitement ne semble pas être utilisable en monothérapie. En outre, Routy et al. ont récemment décrit l'influence de la dysbiose intestinale sur l'efficacité du blocage α PD1 (Routy et al. 2018). En particulier, les auteurs montrent que l'utilisation d'antibiotiques compromet l'efficacité du blocage α PD1 dans les modèles tumoraux et chez les patients cancéreux, et que la présence de certaines espèces bactériennes commensales améliore au contraire la réponse au blocage α PD1. Une analyse future de l'influence du microbiote sur l'efficacité des immunothérapies dans l'infection par le VIH-1 serait instructive pour comprendre comment le microbiote façonne la dynamique immunitaire pendant le blocage des ICP.

Certaines immunothérapies en développement clinique (CTLA4, TIM3 et LAG3) (McGary et al. 2017; Fromentin et al. 2016) auraient le potentiel de reverser de manière plus significative le dysfonctionnement des LT épuisés et d'impacter plus largement la stabilité du réservoir viral. Cependant, la toxicité associée à l'ipilimumab (α CTLA4) est probablement trop grave pour être utilisée chez les personnes infectées sous ART qui sont par ailleurs en bonne santé (Bui and Mellors 2015). La balance bénéfice/risque reste un aspect essentiel à considérer pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Hormis les anti-ICP, d'autres stratégies en combinaison seraient à envisager. Par exemple, il a été démontré que le blocage *in vitro* de la signalisation de PD1 et de l'IL-10 restaure la fonctionnalité des LT CD4⁺ et des cellules NK (Porichis et al. 2018). En outre, une étude récente a utilisé un inhibiteur de caspase pendant une infection aiguë et a démontré une meilleure préservation des LT CD4⁺ mémoires et un meilleur contrôle viral (Laforge et al. 2018). Il serait intéressant d'étudier le blocage de PD1/IL-10 ou PD1 et un inhibiteur de caspase, en combinaison aux ARV, pour évaluer si une synergie peut être obtenue. En outre, l'administration concomitante d'anti-ICP avec des adjuvants TLR, dont il a été récemment démontré qu'ils avaient un impact sur le contrôle viral après l'interruption du traitement ART (Lim et al. 2018), ou de molécules de costimulation, pourrait renforcer davantage les réponses spécifiques au virus.

Globalement, toutes ces stratégies doivent faire face aux dommages provoqués par l'activation chronique directement induite par le virus lui-même mais aussi par la translocation microbienne qui conduit à l'activation myéloïde et lymphoïde même après plusieurs années de traitement. Le microbiote intestinal est apparu comme un facteur responsable de l'amorçage d'une réponse immunitaire systémique aberrante dans le cancer et dans l'infection VIH-1 (W. B. Williams et al. 2015; Zitvogel et al. 2015). Ainsi, des thérapies ciblées sur les muqueuses intestinales seront nécessaires et peuvent comprendre des pré- et probiotiques, des cytokines (Sáez-Cirión et al. 2013; Ortiz et al. 2016) ou des inhibiteurs de cytokines ou encore des agents

modulant les TLR (Deeks et al. 2012). Une étape importante serait d'évaluer les événements précoces induits dans les modèles HIS où l'interaction LT humains /cellules épithéliales est nécessairement biaisée.

Bibliographie

- Abreu, Celina M., Rebecca T. Veenhuis, Claudia R. Avalos, Shelby Graham, Daymond R. Parrilla, Edna A. Ferreira, Suzanne E. Queen, et al. 2019. "Myeloid and CD4 T Cells Comprise the Latent Reservoir in Antiretroviral Therapy-Suppressed SIVmac251-Infected Macaques." *MBio* 10 (4).
- Ahmed, Rafi, Aimo Salmi, Larry D. Butler, Jacques M. Chiller, and Michael B.A. Oldstone. 1984. "Selection of Genetic Variants of Lymphocytic Choriomeningitis Virus in Spleens of Persistently Infected Mice: Role in Suppression of Cytotoxic T Lymphocyte Response and Viral Persistence." *Journal of Experimental Medicine* 160 (2): 521–40.
- Ahmed, Zahra, Tatsuyoshi Kawamura, Shinji Shimada, and Vincent Piguet. 2015. "The Role of Human Dendritic Cells in HIV-1 Infection." *Journal of Investigative Dermatology*. Nature Publishing Group.
- Akbar, Arne N., Peter C.L. Beverley, and Mike Salmon. 2004. "Will Telomere Erosion Lead to a Loss of T-Cell Memory?" *Nature Reviews Immunology*. Nat Rev Immunol.
- Akbar, Arne N., and Sian M. Henson. 2011. "Are Senescence and Exhaustion Intertwined or Unrelated Processes That Compromise Immunity?" *Nature Reviews Immunology*. Nat Rev Immunol.
- Akkina, Ramesh. 2013. "New Generation Humanized Mice for Virus Research: Comparative Aspects and Future Prospects." *Virology*. Virology.
- Akkina, Ramesh, Atef Allam, Alejandro B. Balazs, Joel N. Blankson, John C. Burnett, Sofia Casares, J. Victor Garcia, et al. 2016. "Improvements and Limitations of Humanized Mouse Models for HIV Research: NIH/NIAID 'Meet the Experts' 2015 Workshop Summary." *AIDS Research and Human Retroviruses* 32 (2): 109–19.
- Aldrovandi, Grace M., Gerold Feuer, Lianying Gao, Beth Jamieson, Marlene Kristeva, Irvin S.Y. Chen, and Jerome A. Zack. 1993. "The SCID-Hu Mouse as a Model for HIV-1 Infection." *Nature* 363 (6431): 732–36.
- Ali, Niwa, Barry Flutter, Robert Sanchez Rodriguez, Ehsan Sharif-Paghaleh, Linda D Barber, Giovanna Lombardi, and Frank O Nestle. 2012. "Xenogeneic Graft-versus-Host-Disease in NOD-Scid IL-2R γ null Mice Display a T-Effector Memory Phenotype." *PLoS One* 7 (8): e44219.
- Allavena, Clotilde, Matthieu Hanf, David Rey, Claudine Duvivier, Firouze BaniSadr, Isabelle Poizot-Martin, Christine Jacomet, et al. 2018. "Antiretroviral Exposure and Comorbidities in an Aging HIV-Infected Population: The Challenge of Geriatric Patients." *PLoS ONE* 13 (9).
- Allen, Todd M., David H. O'Connor, Peicheng Jing, John L. Dzuris, Bianca R. Mothé, Thorsten U. Vogel, Ed Dunphy, et al. 2000. "Tat-Specific Cytotoxic T Lymphocytes Select for SIV Escape Variants during Resolution of Primary Viraemia." *Nature* 407 (6802): 386–90.
- Allers, Kristina, Gero Hütter, Jörg Hofmann, Christoph Loddenkemper, Kathrin Rieger, Eckhard Thiel, and Thomas Schneider. 2011. "Evidence for the Cure of HIV Infection by CCR5 Δ 32/ Δ 32 Stem Cell Transplantation." *Blood* 117 (10): 2791–99.
- Almeida, Jorge R., Delphine Sauce, David A. Price, Laura Papagno, Youn Shin So, Arnaud Moris, Martin Larsen, et al. 2009. "Antigen Sensitivity Is a Major Determinant of CD8+ T-Cell Polyfunctionality and HIV-Suppressive Activity." *Blood* 113 (25): 6351–60.
- Alter, Galit, Nickolas Teigen, Benjamin T. Davis, Marylyn M. Addo, Todd J. Suscovich, Michael T. Waring, Hendrik Streeck, et al. 2005. "Sequential Deregulation of NK Cell Subset Distribution and Function Starting in Acute HIV-1 Infection." *Blood* 106 (10): 3366–69.
- Althoff, Keri N, Kathleen A McGinnis, Christina M Wyatt, Matthew S Freiberg, Cynthia Gilbert, Krisann K Oursler, David Rimland, et al. 2015. "Comparison of Risk and Age at Diagnosis of Myocardial Infarction, End-Stage Renal Disease, and Non-AIDS-Defining Cancer in HIV-Infected versus Uninfected Adults." *Clinical Infectious Diseases: An*

- Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 60 (4): 627–38.
- Ambrose, Zandrea, Vineet N. KewalRamani, Paul D. Bieniasz, and Theodora Hatzioannou. 2007. “HIV/AIDS: In Search of an Animal Model.” *Trends in Biotechnology* 25 (8): 333–37.
- Ananworanich, Jintanat, Karine Dubé, and Nicolas Chomont. 2015. “How Does the Timing of Antiretroviral Therapy Initiation in Acute Infection Affect HIV Reservoirs?” *Current Opinion in HIV and AIDS*. Lippincott Williams and Wilkins.
- Anderson, Ana C., Nicole Joller, and Vijay K. Kuchroo. 2016. “Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-Inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation.” *Immunity*. Cell Press.
- André, Maya C., Annika Erbacher, Christian Gille, Vanessa Schmauke, Barbara Goecke, Alexander Hohberger, Philippa Mang, et al. 2010. “Long-Term Human CD34 + Stem Cell-Engrafted Nonobese Diabetic/SCID/IL-2R γ Null Mice Show Impaired CD8 + T Cell Maintenance and a Functional Arrest of Immature NK Cells.” *The Journal of Immunology* 185 (5): 2710–20.
- Antoine, Pierre, Véronique Ollislagers, Ariane Huygens, Sandra Lecomte, Corinne Liesnard, Catherine Donner, and Arnaud Marchant. 2012. “Functional Exhaustion of CD4 + T Lymphocytes during Primary Cytomegalovirus Infection.” *The Journal of Immunology* 189 (5): 2665–72.
- Appay, V., and D. Sauce. 2008. “Immune Activation and Inflammation in HIV-1 Infection: Causes and Consequences.” *Journal of Pathology*. J Pathol.
- Appay, Victor, Jorge R. Almeida, Delphine Sauce, Brigitte Autran, and Laura Papagno. 2007. “Accelerated Immune Senescence and HIV-1 Infection.” *Experimental Gerontology*. Elsevier Inc.
- Appay, Victor, Solène Fastenackels, Christine Katlama, Hocine Ait-Mohand, Luminita Schneider, Amélie Guihot, Michael Keller, et al. 2011. “Old Age and Anti-Cytomegalovirus Immunity Are Associated with Altered T-Cell Reconstitution in HIV-1-Infected Patients.” *AIDS* 25 (15): 1813–22.
- Aquaro, Stefano, Raffaele Calì, Jan Balzarini, Maria Concetta Bellocchi, Enrico Garaci, and Carlo Federico Perno. 2002. “Macrophages and HIV Infection: Therapeutical Approaches toward This Strategic Virus Reservoir.” *Antiviral Research*. Antiviral Res.
- Araínga, Mariluz, Hang Su, Larisa Y. Poluektova, Santhi Gorantla, and Howard E. Gendelman. 2016. “HIV-1 Cellular and Tissue Replication Patterns in Infected Humanized Mice.” *Scientific Reports* 6 (March).
- Archin, N. M., A. L. Liberty, A. D. Kashuba, S. K. Choudhary, J. D. Kuruc, A. M. Crooks, D. C. Parker, et al. 2012. “Administration of Vorinostat Disrupts HIV-1 Latency in Patients on Antiretroviral Therapy.” *Nature* 487 (7408): 482–85.
- Arribas, Jose R, Anton L Pozniak, Joel E Gallant, Edwin Dejesus, Brian Gazzard, Rafael E Campo, Shan-Shan Chen, et al. 2008. “Tenofovir Disoproxil Fumarate, Emtricitabine, and Efavirenz Compared with Zidovudine/Lamivudine and Efavirenz in Treatment-Naive Patients: 144-Week Analysis.” *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 47 (1): 74–78.
- Asao, Hironobu, Chikara Okuyama, Satoru Kumaki, Naoto Ishii, Shigeru Tsuchiya, Don Foster, and Kazuo Sugamura. 2001. “Cutting Edge: The Common γ -Chain Is an Indispensable Subunit of the IL-21 Receptor Complex.” *The Journal of Immunology* 167 (1): 1–5.
- Ashizawa, Tadashi, Akira Iizuka, Chizu Nonomura, Ryota Kondou, Chie Maeda, Haruo Miyata, Takashi Sugino, et al. 2017. “Antitumor Effect of Programmed Death-1 (PD-1) Blockade in Humanized the NOG-MHC Double Knockout Mouse.” *Clinical Cancer Research* 23 (1): 149–58.

- Attanasio, John, and E. John Wherry. 2016. "Costimulatory and Coinhibitory Receptor Pathways in Infectious Disease." *Immunity*. Cell Press.
- Autran, B., G. Carcelain, T. S. Li, C. Blanc, D. Mathez, R. Tubiana, C. Katlama, P. Debré, and J. Leibowitch. 1997. "Positive Effects of Combined Antiretroviral Therapy on CD4+ T Cell Homeostasis and Function in Advanced HIV Disease." *Science* 277 (5322): 112–16.
- Avettand-Fenoel, Véronique, Laurent Hocqueloux, Michaela Müller-Trutwin, Thierry Prazuck, Adeline Melard, Marie Laure Chaix, Eric Agoute, Christophe Michau, and Christine Rouzioux. 2011. "Greater Diversity of HIV DNA Variants in the Rectum Compared to Variants in the Blood in Patients without HAART." *Journal of Medical Virology* 83 (9): 1499–1507.
- Azuma, Hisaya, Nicole Paulk, Aarati Ranade, Craig Dorrell, Muhsen Al-Dhalimy, Ewa Ellis, Stephen Strom, Mark A. Kay, Milton Finegold, and Markus Grompe. 2007. "Robust Expansion of Human Hepatocytes in Fah^{-/-}/Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/-} Mice." *Nature Biotechnology* 25 (8): 903–10.
- Baarle, Debbie Van, Aster Tsegaye, Frank Miedema, and Arne Akbar. 2005. "Significance of Senescence for Virus-Specific Memory T Cell Responses: Rapid Ageing during Chronic Stimulation of the Immune System." *Immunology Letters*. Immunol Lett.
- Baenziger, Stefan, Roxane Tussiwand, Erika Schlaepfer, Luca Mazzucchelli, Mathias Heikenwalder, Michael O. Kurrer, Silvia Behnke, et al. 2006. "Disseminated and Sustained HIV Infection in CD34+ Cord Blood Cell-Transplanted Rag2^{-/-}/Ic^{-/-} Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (43): 15951–56.
- Banga, Riddhima, Francesco Andrea Procopio, Alessandra Noto, Georgios Pollakis, Matthias Cavassini, Khalid Ohmiti, Jean Marc Corpataux, Laurence De Leval, Giuseppe Pantaleo, and Matthieu Perreau. 2016. "PD-1+ and Follicular Helper T Cells Are Responsible for Persistent HIV-1 Transcription in Treated Aviremic Individuals." *Nature Medicine* 22 (7): 754–61.
- Barber, Daniel L., E. John Wherry, David Masopust, Baogong Zhu, James P. Allison, Arlene H. Sharpe, Gordon J. Freeman, and Rafi Ahmed. 2006. "Restoring Function in Exhausted CD8 T Cells during Chronic Viral Infection." *Nature* 439 (7077): 682–87.
- Barre-Sinoussi, F, J. Chermann, F Rey, M. Nugeyre, S Chamaret, J Gruest, C Daugey, et al. 1983. "Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS)." *Science* 220 (4599): 868–71.
- Barré-Sinoussi, Françoise, Anna Laura Ross, and Jean-François Delfraissy. 2013. "Past, Present and Future: 30 Years of HIV Research." *Nature Reviews Microbiology* 11 (12): 877–83.
- Bastard, Jean-Philippe, Soraya Fellahi, Camille Couffignal, François Raffi, Guillaume Gras, Lucile Hardel, Alain Sobel, et al. 2015. "Increased Systemic Immune Activation and Inflammatory Profile of Long-Term HIV-Infected ART-Controlled Patients Is Related to Personal Factors, but Not to Markers of HIV Infection Severity." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70 (6): 1816–24.
- Battegay, Manuel, Reto Nüesch, Bernard Hirschel, and Gilbert R. Kaufmann. 2006. "Immunological Recovery and Antiretroviral Therapy in HIV-1 Infection." *Lancet Infectious Diseases*. Lancet Infect Dis.
- Baxter, Alan George, and Anne Cooke. 1993. "Complement Lytic Activity Has No Role in the Pathogenesis of Autoimmune Diabetes in NOD Mice." *Diabetes* 42 (11): 1574–78.
- Beaumier, Coreen M., Levelle D. Harris, Simoy Goldstein, Nichole R. Klatt, Sonya Whitted, John McGinty, Cristian Apetrei, Ivona Pandrea, Vanessa M. Hirsch, and Jason M. Brenchley. 2009. "CD4 Downregulation by Memory CD4+ T Cells in Vivo Renders African Green Monkeys Resistant to Progressive SIVagm Infection." *Nature Medicine* 15

(8): 879–85.

- Beer, B, J Scherer, J zur Megede, S Norley, M Baier, and R Kurth. 1996. “Lack of Dichotomy between Virus Load of Peripheral Blood and Lymph Nodes during Long-Term Simian Immunodeficiency Virus Infection of African Green Monkeys.” *Virology* 219 (2): 367–75.
- Belkaid, Yasmine, and Timothy W. Hand. 2014. “Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation.” *Cell*. Cell Press.
- Bella, Ramona, Rafal Kaminski, Pietro Mancuso, Won Bin Young, Chen Chen, Rahsan Sariyer, Tracy Fischer, et al. 2018. “Removal of HIV DNA by CRISPR from Patient Blood Engrafts in Humanized Mice.” *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 12 (September): 275–82.
- Benci, Joseph L., Bihui Xu, Yu Qiu, Tony J. Wu, Hannah Dada, Christina Twyman-Saint Victor, Lisa Cucolo, et al. 2016. “Tumor Interferon Signaling Regulates a Multigenic Resistance Program to Immune Checkpoint Blockade.” *Cell* 167 (6): 1540-1554.e12.
- Bensch, Bertram, Andy L. Johnson, Makoto Kurachi, Pamela M. Odorizzi, Kristen E. Pauken, John Attanasio, Erietta Stelekati, et al. 2016. “Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8+ T Cell Exhaustion.” *Immunity* 45 (2): 358–73.
- Berg, Timo K. van den, and C. Ellen van der Schoot. 2008. “Innate Immune ‘self’ Recognition: A Role for CD47-SIRP α Interactions in Hematopoietic Stem Cell Transplantation.” *Trends in Immunology*. Trends Immunol.
- Berges, Bradford K., Sarah R. Akkina, Joy M. Folkvord, Elizabeth Connick, and Ramesh Akkina. 2008. “Mucosal Transmission of R5 and X4 Tropic HIV-1 via Vaginal and Rectal Routes in Humanized Rag2-/- Γ c-/- (RAG-Hu) Mice.” *Virology* 373 (2): 342–51.
- Berges, Bradford K., and Mark R. Rowan. 2011. “The Utility of the New Generation of Humanized Mice to Study HIV-1 Infection: Transmission, Prevention, Pathogenesis, and Treatment.” *Retrovirology*. Retrovirology.
- Berges, Bradford K., William H. Wheat, Brent E. Palmer, Elizabeth Connick, and Ramesh Akkina. 2006. “HIV-1 Infection and CD4 T Cell Depletion in the Humanized Rag2-/- Γ c-/- (RAG-Hu) Mouse Model.” *Retrovirology* 3 (November).
- Bernstein, Helene B., Mary C. Plasterer, Sherrie E. Schiff, Christina M. R. Kitchen, Scott Kitchen, and Jerome A. Zack. 2006. “CD4 Expression on Activated NK Cells: Ligation of CD4 Induces Cytokine Expression and Cell Migration.” *The Journal of Immunology* 177 (6): 3669–76.
- Betts, Michael R., David R. Ambrozak, Daniel C. Douek, Sebastian Bonhoeffer, Jason M. Brenchley, Joseph P. Casazza, Richard A. Koup, and Louis J. Picker. 2001. “Analysis of Total Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Specific CD4+ and CD8+ T-Cell Responses: Relationship to Viral Load in Untreated HIV Infection.” *Journal of Virology* 75 (24): 11983–91.
- Betts, Michael R., Martha C. Nason, Sadie M. West, Stephen C. De Rosa, Stephen A. Migueles, Jonathan Abraham, Michael M. Lederman, et al. 2006. “HIV Nonprogressors Preferentially Maintain Highly Functional HIV-Specific CD8+ T Cells.” *Blood* 107 (12): 4781–89.
- Bhatia, Ramona, Patrick Ryscavage, and Babafemi Taiwo. 2012. “Accelerated Aging and Human Immunodeficiency Virus Infection: Emerging Challenges of Growing Older in the Era of Successful Antiretroviral Therapy.” *Journal of NeuroVirology* 18 (4): 247–55.
- Billerbeck, Eva, Walter T. Barry, Kathy Mu, Marcus Dorner, Charles M. Rice, and Alexander Ploss. 2011. “Development of Human CD4+FoxP3+ Regulatory T Cells in Human Stem Cell Factor-, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-, and Interleukin-3-Expressing NOD-SCID IL2R γ null Humanized Mice.” *Blood* 117 (11): 3076–86.

- Biswas, Subhabrata, Hong Chang, Phuong T N Sarkis, Erol Fikrig, Quan Zhu, and Wayne A Marasco. 2011. "Humoral Immune Responses in Humanized BLT Mice Immunized with West Nile Virus and HIV-1 Envelope Proteins Are Largely Mediated via Human CD5+ B Cells." *Immunology* 134 (4): 419–33.
- Blackburn, Shawn D., Haina Shin, W. Nicholas Haining, Tao Zou, Creg J. Workman, Antonio Polley, Michael R. Betts, Gordon J. Freeman, Dario A.A. Vignali, and E. John Wherry. 2009. "Coregulation of CD8+ T Cell Exhaustion by Multiple Inhibitory Receptors during Chronic Viral Infection." *Nature Immunology* 10 (1): 29–37.
- Blankson, Joel N., Deborah Persaud, and Robert F. Siliciano. 2002. "The Challenge of Viral Reservoirs in HIV-1 Infection." *Annual Review of Medicine* 53 (1): 557–93.
- Boasso, Adriano, Andrew W. Hardy, Alan L. Landay, Jeffrey L. Martinson, Stephanie A. Anderson, Matthew J. Dolan, Mario Clerici, and Gene M. Shearer. 2008. "PDL-1 Upregulation on Monocytes and T Cells by HIV via Type I Interferon: Restricted Expression of Type I Interferon Receptor by CCR5-Expressing Leukocytes." *Clinical Immunology* 129 (1): 132–44.
- Bonyhadi, M L, K Moss, A Voytovich, J Auten, C Kalfoglou, I Plavec, S Forestell, L Su, E Böhnlein, and H Kaneshima. 1997. "RevM10-Expressing T Cells Derived in Vivo from Transduced Human Hematopoietic Stem-Progenitor Cells Inhibit Human Immunodeficiency Virus Replication." *Journal of Virology* 71 (6): 4707–16.
- Borrow, P, H Lewicki, B H Hahn, G M Shaw, and M B Oldstone. 1994. "Virus-Specific CD8+ Cytotoxic T-Lymphocyte Activity Associated with Control of Viremia in Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection." *Journal of Virology* 68 (9): 6103–10.
- Borrow, Persephone, and Nina Bhardwaj. 2008. "Innate Immune Responses in Primary HIV-1 Infection." *Current Opinion in HIV and AIDS*. Curr Opin HIV AIDS.
- Bosinger, Steven E., Qingsheng Li, Shari N. Gordon, Nichole R. Klatt, Lijie Duan, Luoling Xu, Nicholas Francella, et al. 2009. "Global Genomic Analysis Reveals Rapid Control of a Robust Innate Response in SIV-Infected Sooty Mangabeys." *Journal of Clinical Investigation* 119 (12): 3556–72.
- Bosma, Gayle C., R. Philip Custer, and Melvin J. Bosma. 1983. "A Severe Combined Immunodeficiency Mutation in the Mouse." *Nature* 301 (5900): 527–30.
- Bosma, Gayle C., Michal Fried, R. Philip Custer, Ann Carroll, David M. Gibson, and Melvin J. Bosma. 1988. "Evidence of Functional Lymphocytes in Some (Leaky) Scid Mice." *Journal of Experimental Medicine* 167 (3): 1016–33.
- Bosma, M. J., and A. M. Carroll. 1991. "The Scid Mouse Mutant: Definition, Characterization, and Potential Uses." *Annual Review of Immunology*. Annu Rev Immunol.
- Bosque, Alberto, and Vicente Planelles. 2009. "Induction of HIV-1 Latency and Reactivation in Primary Memory CD4+ T Cells." *Blood* 113 (1): 58–65.
- Bournazos, Stylianos, David J. DiLillo, and Jeffrey V. Ravetch. 2014. "Humanized Mice to Study FcγR Function." *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer Verlag.
- Bourry, Olivier, Abdelkrim Mannioui, Pierre Sellier, Camille Roucairol, Lucie Durand-Gasselin, Nathalie Dereuddre-Bosquet, Henri Benech, Pierre Roques, and Roger Le Grand. 2010. "Effect of a Short-Term HAART on SIV Load in Macaque Tissues Is Dependent on Time of Initiation and Antiviral Diffusion." *Retrovirology* 7 (September).
- Bowers, Nathan L., E. Scott Helton, Richard P.H. Huijbregts, Paul A. Goepfert, Sonya L. Heath, and Zdenek Hel. 2014. "Immune Suppression by Neutrophils in HIV-1 Infection: Role of PD-L1/PD-1 Pathway." *PLoS Pathogens* 10 (3).
- Brahmer, Julie R., Charles G. Drake, Ira Wollner, John D. Powderly, Joel Picus, William H. Sharfman, Elizabeth Stankevich, et al. 2010. "Phase I Study of Single-Agent Anti-Programmed Death-1 (MDX-1106) in Refractory Solid Tumors: Safety, Clinical Activity, Pharmacodynamics, and Immunologic Correlates." *Journal of Clinical Oncology* 28 (19):

3167–75.

- Brainard, D. M., E. Seung, N. Frahm, A. Cariappa, C. C. Bailey, W. K. Hart, H.-S. Shin, et al. 2009. “Induction of Robust Cellular and Humoral Virus-Specific Adaptive Immune Responses in Human Immunodeficiency Virus-Infected Humanized BLT Mice.” *Journal of Virology* 83 (14): 7305–21.
- Brake, O. ter, N. Legrand, K. J. von Eije, M. Centlivre, H. Spits, K. Weijer, B. Blom, and B. Berkhout. 2009. “Evaluation of Safety and Efficacy of RNAi against HIV-1 in the Human Immune System (Rag-2-/- Γ c-/-) Mouse Model.” *Gene Therapy* 16 (1): 148–53.
- Brehm, Michael A., Amy Cuthbert, Chaoxing Yang, David M. Miller, Philip DiIorio, Joseph Laning, Lisa Burzenski, et al. 2010. “Parameters for Establishing Humanized Mouse Models to Study Human Immunity: Analysis of Human Hematopoietic Stem Cell Engraftment in Three Immunodeficient Strains of Mice Bearing the IL2rynull Mutation.” *Clinical Immunology* 135 (1): 84–98.
- Brenchley, Jason M., Brenna J. Hill, David R. Ambrozak, David A. Price, Francisco J. Guenaga, Joseph P. Casazza, Janaki Kuruppu, et al. 2004. “T-Cell Subsets That Harbor Human Immunodeficiency Virus (HIV) In Vivo: Implications for HIV Pathogenesis.” *Journal of Virology* 78 (3): 1160–68.
- Brenchley, Jason M., Nitin J. Karandikar, Michael R. Betts, David R. Ambrozak, Brenna J. Hill, Laura E. Crotty, Joseph P. Casazza, et al. 2003. “Expression of CD57 Defines Replicative Senescence and Antigen-Induced Apoptotic Death of CD8+ T Cells.” *Blood* 101 (7): 2711–20.
- Brenchley, Jason M., Timothy W. Schacker, Laura E. Ruff, David A. Price, Jodie H. Taylor, Gregory J. Beilman, Phuong L. Nguyen, et al. 2004. “CD4+ T Cell Depletion during All Stages of HIV Disease Occurs Predominantly in the Gastrointestinal Tract.” *Journal of Experimental Medicine* 200 (6): 749–59.
- Brenchley, Jason M., and Mirko Paiardini. 2011. “Immunodeficiency Lentiviral Infections in Natural and Non-Natural Hosts.” *Blood* 118 (4): 847–54.
- Breton, Gaëlle, Nicolas Chomont, Hiroshi Takata, Rémi Fromentin, Jeffrey Ahlers, Abdelali Filali-Mouhim, Catherine Riou, et al. 2013. “Programmed Death-1 Is a Marker for Abnormal Distribution of Naive/Memory T Cell Subsets in HIV-1 Infection.” *The Journal of Immunology* 191 (5): 2194–2204.
- Brown, Matthew E., Ying Zhou, Brian E. McIntosh, Ian G. Norman, Hannah E. Lou, Mitch Biermann, Jeremy A. Sullivan, et al. 2018. “A Humanized Mouse Model Generated Using Surplus Neonatal Tissue.” *Stem Cell Reports* 10 (4): 1175–83.
- Bruner, Katherine M, Alexandra J Murray, Ross A Pollack, Mary G Soliman, Sarah B Laskey, Adam A Capoferri, Jun Lai, et al. 2016. “Defective Proviruses Rapidly Accumulate during Acute HIV-1 Infection.” *Nature Medicine* 22 (9): 1043–49.
- Bui, John K., and John W. Mellors. 2015. “Reversal of T-Cell Exhaustion as a Strategy to Improve Immune Control of HIV-1.” *AIDS*. Lippincott Williams and Wilkins.
- Burger, Harold, and Donald Hoover. 2008. “HIV-1 Tropism, Disease Progression, and Clinical Management.” *The Journal of Infectious Diseases* 198 (8): 1095–97.
- Burton, Gregory F., Brandon F. Keele, Jacob D. Estes, Tyler C. Thacker, and Suzanne Gartner. 2002. “Follicular Dendritic Cell Contributions to HIV Pathogenesis.” *Seminars in Immunology*. Elsevier.
- Butte, Manish J., Mary E. Keir, Theresa B. Phamduy, Arlene H. Sharpe, and Gordon J. Freeman. 2007. “Programmed Death-1 Ligand 1 Interacts Specifically with the B7-1 Costimulatory Molecule to Inhibit T Cell Responses.” *Immunity* 27 (1): 111–22.
- Buzon, Maria J., Hong Sun, Chun Li, Amy Shaw, Katherine Seiss, Zhengyu Ouyang, Enrique Martin-Gayo, et al. 2014. “HIV-1 Persistence in CD4+ T Cells with Stem Cell-like Properties.” *Nature Medicine* 20 (2): 139–42.

- Callahan, Margaret K., Michael A. Postow, and Jedd D. Wolchok. 2016. "Targeting T Cell Co-Receptors for Cancer Therapy." *Immunity*. Cell Press.
- Calvez, Vincent, Laurent Hocqueloux, Jean-Luc Meynard, Patrice Muret, Bernard Castan, Jean-Claude Tardy, Gilles Peytavin, and Roland Landman. 2017. "Less-Drug Regimen Including Atazanavir in Maintenance Treatment of HIV Infection: How, Who, When, Why?" *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72 (1): 19–28.
- Cameron, Paul U., Suha Saleh, Georgina Sallmann, Ajantha Solomon, Fiona Wightman, Vanessa A. Evans, Genevieve Boucher, et al. 2010. "Establishment of HIV-1 Latency in Resting CD4+ T Cells Depends on Chemokine-Induced Changes in the Actin Cytoskeleton." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (39): 16934–39.
- Campillo-Gimenez, Laure, Sarah Casulli, Yasmine Dudoit, Sophie Seang, Guislaine Carcelain, Sidonie Lambert-Niclot, Victor Appay, Brigitte Autran, Roland Tubiana, and Carole Elbim. 2014. "Neutrophils in Antiretroviral Therapy-Controlled HIV Demonstrate Hyperactivation Associated with a Specific IL-17/IL-22 Environment." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 134 (5): 1142-1152.e5.
- Canaud, Guillaume, Nathalie Dejuq-Rainsford, Véronique Avettand-Fenoël, Jean Paul Viard, Dany Anglicheau, Frank Bienaimé, Mordi Muorah, et al. 2014. "The Kidney as a Reservoir for HIV-1 after Renal Transplantation." *Journal of the American Society of Nephrology* 25 (2): 407–19.
- Cao, Xiqing, Elizabeth W. Shores, Jane Hu-Li, Miriam R. Anver, Brian L. Kelsail, Sarah M. Russell, John Drago, et al. 1995. "Defective Lymphoid Development in Mice Lacking Expression of the Common Cytokine Receptor γ Chain." *Immunity* 2 (3): 223–38.
- Capeau, Jacqueline, Vincent Bouteloup, Christine Katlama, Jean-Philippe Bastard, Vincent Guiyedi, Dominique Salmon-Ceron, Camelia Protopopescu, et al. 2012. "Ten-Year Diabetes Incidence in 1046 HIV-Infected Patients Started on a Combination Antiretroviral Treatment." *AIDS (London, England)* 26 (3): 303–14.
- Carter, Carol A., and Lorna S. Ehrlich. 2008. "Cell Biology of HIV-1 Infection of Macrophages." *Annual Review of Microbiology* 62 (1): 425–43.
- Carter, Christoph C., Adewunmi Onafuwa-Nuga, Lucy A. McNamara, James Riddell, Dale Bixby, Michael R. Savona, and Kathleen L. Collins. 2010. "HIV-1 Infects Multipotent Progenitor Cells Causing Cell Death and Establishing Latent Cellular Reservoirs." *Nature Medicine* 16 (4): 446–51.
- Catalfamo, Marta, Christopher Wilhelm, Lueng Tcheung, Michael Proschan, Travis Friesen, Jung-Hyun Park, Joseph Adelsberger, et al. 2011. "CD4 and CD8 T Cell Immune Activation during Chronic HIV Infection: Roles of Homeostasis, HIV, Type I IFN, and IL-7." *The Journal of Immunology* 186 (4): 2106–16.
- Cecchinato, Valentina, Elzbieta Trynieszewska, Zhong Min Ma, Monica Vaccari, Adriano Boasso, Wen-Po Tsai, Constantinos Petros, et al. 2008. "Immune Activation Driven by CTLA-4 Blockade Augments Viral Replication at Mucosal Sites in Simian Immunodeficiency Virus Infection." *The Journal of Immunology* 180 (8): 5439–47.
- Cellerai, Cristina, Alexandre Harari, Hans Stauss, Sabine Yerly, Anna-Maria Geretti, Anne Carroll, Thynn Yee, et al. 2011. "Early and Prolonged Antiretroviral Therapy Is Associated with an HIV-1-Specific T-Cell Profile Comparable to That of Long-Term Non-Progressors." *PloS One* 6 (4): e18164.
- Chakrabarti, L. A., S. R. Lewin, L. Zhang, A. Gettie, A. Luckay, L. N. Martin, E. Skulsky, D. D. Ho, C. Cheng-Mayer, and P. A. Marx. 2000. "Normal T-Cell Turnover in Sooty Mangabeys Harboring Active Simian Immunodeficiency Virus Infection." *Journal of Virology* 74 (3): 1209–23.
- Chappaz, Stéphane, and Daniela Finke. 2010. "The IL-7 Signaling Pathway Regulates Lymph

- Node Development Independent of Peripheral Lymphocytes.” *The Journal of Immunology* 184 (7): 3562–69.
- Chastain, Daniel B., Kayla R. Stover, and Daniel M. Riche. 2017. “Evidence-Based Review of Statin Use in Patients with HIV on Antiretroviral Therapy.” *Journal of Clinical and Translational Endocrinology*. Elsevier B.V.
- Chattopadhyay, P. K., M. R. Betts, D. A. Price, E. Gostick, H. Horton, M. Roederer, and S. C. De Rosa. 2008. “The Cytolytic Enzymes Granzyme A, Granzyme B, and Perforin: Expression Patterns, Cell Distribution, and Their Relationship to Cell Maturity and Bright CD57 Expression.” *Journal of Leukocyte Biology* 85 (1): 88–97.
- Chawla, Anita, Christina Wang, Cody Patton, Miranda Murray, Yogesh Punekar, Annemiek de Ruiter, and Corklin Steinhart. 2018. “A Review of Long-Term Toxicity of Antiretroviral Treatment Regimens and Implications for an Aging Population.” *Infectious Diseases and Therapy*. Springer Healthcare.
- Chen, Pei Ling, Whijae Roh, Alexandre Reuben, Zachary A. Cooper, Christine N. Spencer, Peter A. Prieto, John P. Miller, et al. 2016. “Analysis of Immune Signatures in Longitudinal Tumor Samples Yields Insight into Biomarkers of Response and Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade.” *Cancer Discovery* 6 (8): 827–37.
- Chen, Qingfeng, Fang He, Jimmy Kwang, Jerry K. Y. Chan, and Jianzhu Chen. 2012. “GM-CSF and IL-4 Stimulate Antibody Responses in Humanized Mice by Promoting T, B, and Dendritic Cell Maturation.” *The Journal of Immunology* 189 (11): 5223–29.
- Chen, Qingfeng, Maroun Khoury, and Jianzhu Chen. 2009. “Expression of Human Cytokines Dramatically Improves Reconstitution of Specific Human-Blood Lineage Cells in Humanized Mice.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (51): 21783–88.
- Chen, Xin, Lina Kozhaya, Cihan Tastan, Lindsey Placek, Mikail Dogan, Meghan Horne, Rebecca Abblett, et al. 2018. “Functional Interrogation of Primary Human T Cells via CRISPR Genetic Editing.” *The Journal of Immunology* 201 (5): 1586–98.
- Cheng, Liang, Jianping Ma, Jingyun Li, Dan Li, Guangming Li, Feng Li, Qing Zhang, et al. 2017. “Blocking Type I Interferon Signaling Enhances T Cell Recovery and Reduces HIV-1 Reservoirs.” *Journal of Clinical Investigation* 127 (1): 269–79.
- Chew, Glen M., Tsuyoshi Fujita, Gabriela M. Webb, Benjamin J. Burwitz, Helen L. Wu, Jason S. Reed, Katherine B. Hammond, et al. 2016. “TIGIT Marks Exhausted T Cells, Correlates with Disease Progression, and Serves as a Target for Immune Restoration in HIV and SIV Infection.” *PLoS Pathogens* 12 (1).
- Choi, Bongkum, Eunyoung Chun, Miyoung Kim, Seong Tae Kim, Keejung Yoon, Ki Young Lee, and Sung Joo Kim. 2011. “Human B Cell Development and Antibody Production in Humanized NOD/SCID/IL-2R γ null (NSG) Mice Conditioned by Busulfan.” *Journal of Clinical Immunology* 31 (2): 253–64.
- Choi, Eun Young, Weon Seo Park, Kyeong Cheon Jung, Doo Hyun Chung, Young Mee Bae, Tae Jin Kim, Hyung Geun Song, et al. 1997. “Thymocytes Positively Select Thymocytes in Human System.” *Human Immunology* 54 (1): 15–20.
- Chomont, Nicolas, Mohamed El-Far, Petronela Ancuta, Lydie Trautmann, Francesco A. Procopio, Bader Yassine-Diab, Geneviève Boucher, et al. 2009. “HIV Reservoir Size and Persistence Are Driven by T Cell Survival and Homeostatic Proliferation.” *Nature Medicine* 15 (8): 893–900.
- Choudhary, S. K., N. M. Archin, M. Cheema, N. P. Dahl, J. V. Garcia, and D. M. Margolis. 2012. “Latent HIV-1 Infection of Resting CD4 $^{+}$ T Cells in the Humanized Rag2 $^{-/-}$ c $^{-/-}$ Mouse.” *Journal of Virology* 86 (1): 114–20.
- Choudhary, Shailesh K., Naser L. Rezk, William L. Ince, Manzoor Cheema, Liguozhang,

6 (1): 111.

- Connor, R I, K E Sheridan, D Ceradini, S Choe, and N R Landau. 1997. "Change in Coreceptor Use Correlates with Disease Progression in HIV-1--Infected Individuals." *The Journal of Experimental Medicine* 185 (4): 621–28.
- Coombs, Robert W., Patricia S. Reichelderfer, and Alan L. Landay. 2003. "Recent Observations on HIV Type-1 Infection in the Genital Tract of Men and Women." *AIDS*. AIDS.
- Cooper, Megan A., Todd A. Fehniger, and Michael A. Caligiuri. 2001. "The Biology of Human Natural Killer-Cell Subsets." *Trends in Immunology*. Trends Immunol.
- Cosgun, Kadriye Nehir, Susann Rahmig, Nicole Mende, Sören Reinke, Ilona Hauber, Carola Schäfer, Anke Petzold, et al. 2014. "Kit Regulates HSC Engraftment across the Human-Mouse Species Barrier." *Cell Stem Cell* 15 (2): 227–38.
- Cottrell, MacKenzie L., Nithya Srinivas, and Angela D.M. Kashuba. 2015. "Pharmacokinetics of Antiretrovirals in Mucosal Tissue." *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* 11 (6): 893–905.
- Crawford, Alison, Jill M. Angelosanto, Charlly Kao, Travis A. Doering, Pamela M. Odorizzi, Burton E. Barnett, and E. John Wherry. 2014. "Molecular and Transcriptional Basis of CD4+ T Cell Dysfunction during Chronic Infection." *Immunity* 40 (2): 289–302.
- Crowe, Suzanne, Tuofu Zhu, and William A. Muller. 2003. "The Contribution of Monocyte Infection and Trafficking to Viral Persistence, and Maintenance of the Viral Reservoir in HIV Infection." *Journal of Leukocyte Biology* 74 (5): 635–41.
- Czechowicz, Agnieszka, Daniel Kraft, Irving L Weissman, and Deepta Bhattacharya. 2007. "Efficient Transplantation via Antibody-Based Clearance of Hematopoietic Stem Cell Niches." *Science (New York, N.Y.)* 318 (5854): 1296–99.
- Czesnikiewicz-Guzik, Marta, Won Woo Lee, Dapeng Cui, Yuko Hiruma, David L. Lamar, Zhi Zhang Yang, Joseph G. Ouslander, Cornelia M. Weyand, and Jörg J. Goronzy. 2008. "T Cell Subset-Specific Susceptibility to Aging." *Clinical Immunology* 127 (1): 107–18.
- D'Souza, Michelle, Andrew P. Fontenot, Doug G. Mack, Catherine Lozupone, Stephanie Dillon, Amie Meditz, Cara C. Wilson, Elizabeth Connick, and Brent E. Palmer. 2007. "Programmed Death 1 Expression on HIV-Specific CD4 + T Cells Is Driven by Viral Replication and Associated with T Cell Dysfunction ." *The Journal of Immunology* 179 (3): 1979–87.
- Daharsh, Lance, Jianshui Zhang, Amanda Ramer-Tait, and Qingsheng Li. 2019. "A Double Humanized Blt-Mice Model Featuring a Stable Human-like Gut Microbiome and Human Immune System." *Journal of Visualized Experiments* 2019 (150).
- Dalgleish, A G, P C Beverley, P R Clapham, D H Crawford, M F Greaves, and R A Weiss. 1984. "The CD4 (T4) Antigen Is an Essential Component of the Receptor for the AIDS Retrovirus." *Nature* 312 (5996): 763–67.
- Damouche, Abderaouf, Thierry Lazure, Véronique Avettand-Fènoël, Nicolas Huot, Nathalie Dejuçq-Rainsford, Anne Pascale Satie, Adeline Mélard, et al. 2015. "Adipose Tissue Is a Neglected Viral Reservoir and an Inflammatory Site during Chronic HIV and SIV Infection." *PLoS Pathogens* 11 (9).
- Damouche, Abderaouf, Guillaume Pourcher, Valérie Pourcher, Stéphane Benoist, Elodie Busson, Jean Jacques Lataillade, Mélanie Le Van, et al. 2017. "High Proportion of PD-1-Expressing CD4+ T Cells in Adipose Tissue Constitutes an Immunomodulatory Microenvironment That May Support HIV Persistence." *European Journal of Immunology* 47 (12): 2113–23.
- Danner, Rebecca, Snehal N. Chaudhari, John Rosenberger, Jacqueline Surls, Thomas L. Richie, Teodor Doru Brumeanu, and Sofia Casares. 2011. "Expression of HLA Class II Molecules in Humanized NOD.Rag1KO.IL2RgcKO Mice Is Critical for Development and Function of Human T and B Cells." *PLoS ONE* 6 (5).

- Dash, Prasanta K., Santhi Gorantla, Howard E. Gendelman, Jaclyn Knibbe, George P. Casale, Edward Makarov, Adrian A. Epstein, Harris A. Gelbard, Michael D. Boska, and Larisa Y. Poluektova. 2011. "Loss of Neuronal Integrity during Progressive HIV-1 Infection of Humanized Mice." *Journal of Neuroscience* 31 (9): 3148–57.
- Dash, Prasanta K., Rafal Kaminski, Ramona Bella, Hang Su, Saumi Mathews, Taha M. Ahooyi, Chen Chen, et al. 2019. "Sequential LASER ART and CRISPR Treatments Eliminate HIV-1 in a Subset of Infected Humanized Mice." *Nature Communications* 10 (1).
- Davey, Richard T., Niranjan Bhat, Christian Yoder, Tae Wook Chun, Julia A. Metcalf, Robin Dewar, Ven Natarajan, et al. 1999. "HIV-1 and T Cell Dynamics after Interruption of Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) in Patients with a History of Sustained Viral Suppression." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (26): 15109–14.
- Day, Cheryl L., Daniel E. Kaufmann, Photini Kiepiela, Julia A. Brown, Eshia S. Moodley, Sharon Reddy, Elizabeth W. Mackey, et al. 2006. "PD-1 Expression on HIV-Specific T Cells Is Associated with T-Cell Exhaustion and Disease Progression." *Nature* 443 (7109): 350–54.
- Daza-Vamenta, Riza, Gustavo Glusman, Lee Rowen, Brandon Guthrie, and Daniel E. Geraghty. 2004. "Genetic Divergence of the Rhesus Macaque Major Histocompatibility Complex." *Genome Research* 14 (8): 1501–15.
- Decrion, Anne, Isabelle Dichamp, Audrey Varin, and Georges Herbein. 2005. "HIV and Inflammation." *Current HIV Research* 3 (3): 243–59.
- Deeks, Steven G., Brigitte Autran, Ben Berkhout, Moncef Benkirane, Scott Cairns, Nicolas Chomont, Tae Wook Chun, et al. 2012. "Towards an HIV Cure: A Global Scientific Strategy." *Nature Reviews Immunology*. Nat Rev Immunol.
- Deeks, Steven G., Christina M.R. Kitchen, Lea Liu, Hua Guo, Ron Gascon, Amy B. Narváez, Peter Hunt, et al. 2004. "Immune Activation Set Point during Early HIV Infection Predicts Subsequent CD4+ T-Cell Changes Independent of Viral Load." *Blood* 104 (4): 942–47.
- Deeks, Steven G., Pamela M. Odorizzi, and Rafick Pierre Sekaly. 2017. "The Interferon Paradox: Can Inhibiting an Antiviral Mechanism Advance an HIV Cure?" *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation.
- Deeks, Steven G., Russell Tracy, and Daniel C. Douek. 2013. "Systemic Effects of Inflammation on Health during Chronic HIV Infection." *Immunity*. Immunity.
- Deeks, Steven G., and Bruce D. Walker. 2007. "Human Immunodeficiency Virus Controllers: Mechanisms of Durable Virus Control in the Absence of Antiretroviral Therapy." *Immunity*. Immunity.
- Delobel, Pierre, Karine Sandres-Sauné, Michelle Cazabat, Fatima Ezzahra L'Faqihi, Christian Aquilina, Martine Obadia, Christophe Pasquier, Bruno Marchou, Patrice Massip, and Jacques Izopet. 2005. "Persistence of Distinct HIV-1 Populations in Blood Monocytes and Naive and Memory CD4 T Cells during Prolonged Suppressive HAART." *AIDS* 19 (16): 1739–50.
- Deng, H, R Liu, W Ellmeier, S Choe, D Unutmaz, M Burkhart, P Di Marzio, et al. 1996. "Identification of a Major Co-Receptor for Primary Isolates of HIV-1." *Nature* 381 (6584): 661–66.
- Deng, Yuping, Yu Jing, Ann E. Campbell, and Stefan Gravenstein. 2004. "Age-Related Impaired Type 1 T Cell Responses to Influenza: Reduced Activation Ex Vivo, Decreased Expansion in CTL Culture In Vitro, and Blunted Response to Influenza Vaccination In Vivo in the Elderly." *The Journal of Immunology* 172 (6): 3437–46.
- Denton, P. W., R. Olesen, S. K. Choudhary, N. M. Archin, A. Wahl, M. D. Swanson, M. Chateau, et al. 2012. "Generation of HIV Latency in Humanized BLT Mice." *Journal of Virology* 86 (1): 630–34.

- Denton, P W, T Nochi, A Lim, J F Krisko, F Martinez-Torres, S K Choudhary, A Wahl, et al. 2012. "IL-2 Receptor γ -Chain Molecule Is Critical for Intestinal T-Cell Reconstitution in Humanized Mice." *Mucosal Immunology* 5 (5): 555–66.
- Denton, Paul W., and J. Víctor García. 2011. "Humanized Mouse Models of HIV Infection." *AIDS Reviews*.
- Denton, Paul W., John F. Krisko, Daniel A. Powell, Melissa Mathias, Youn Tae Kwak, Francisco Martinez-Torres, Wei Zou, Deborah A. Payne, Jacob D. Estes, and J. Victor Garcia. 2010. "Systemic Administration of Antiretrovirals Prior to Exposure Prevents Rectal and Intravenous HIV-1 Transmission in Humanized BLT Mice." *PLoS ONE* 5 (1).
- Deruaz, Maud, and Andrew D Luster. 2013. "BLT Humanized Mice as Model to Study HIV Vaginal Transmission." *The Journal of Infectious Diseases* 208 Suppl 2 (November): S131-6.
- Desai, Seema, and Alan Landay. 2010. "Early Immune Senescence in HIV Disease." *Current HIV/AIDS Reports*. Curr HIV/AIDS Rep.
- Descours, Benjamin, Gaël Petitjean, José Luis López-Zaragoza, Timothée Bruel, Raoul Raffel, Christina Psomas, Jacques Reynes, et al. 2017. "CD32a Is a Marker of a CD4 T-Cell HIV Reservoir Harbouring Replication-Competent Proviruses." *Nature* 543 (7646): 564–67.
- Desruisseaux, Mahalia S., Nagajyothi, Maria E. Trujillo, Herbert B. Tanowitz, and Philipp E. Scherer. 2007. "Adipocyte, Adipose Tissue, and Infectious Disease." *Infection and Immunity*. Infect Immun.
- Diamond, Tracy L., Mikhail Roshal, Varuni K. Jamburuthugoda, Holly M. Reynolds, Aaron R. Merriam, Kwi Y. Lee, Mini Balakrishnan, et al. 2004. "Macrophage Tropism of HIV-1 Depends on Efficient Cellular DNTP Utilization by Reverse Transcriptase." *Journal of Biological Chemistry* 279 (49): 51545–53.
- Diop, O M, A Gueye, M Dias-Tavares, C Kornfeld, A Faye, P Ave, M Huerre, S Corbet, F Barre-Sinoussi, and M C Müller-Trutwin. 2000. "High Levels of Viral Replication during Primary Simian Immunodeficiency Virus SIVagm Infection Are Rapidly and Strongly Controlled in African Green Monkeys." *Journal of Virology* 74 (16): 7538–47.
- Disanto, James P., Werner Müller, Delphine Guy-Grand, Alain Fischer, and Klaus Rajewsky. 1995. "Lymphoid Development in Mice with a Targeted Deletion of the Interleukin 2 Receptor γ Chain." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (2): 377–81.
- Diskin, Brian, Salma Adam, Marcelo F. Cassini, Gustavo Sanchez, Miguel Liria, Berk Aykut, Chandan Buttar, et al. 2020. "PD-L1 Engagement on T Cells Promotes Self-Tolerance and Suppression of Neighboring Macrophages and Effector T Cells in Cancer." *Nature Immunology* 21 (4): 442–54.
- Donnell, Deborah, Jared M. Baeten, James Kiarie, Katherine K. Thomas, Wendy Stevens, Craig R. Cohen, James McIntyre, Jairam R. Lingappa, and Connie Celum. 2010. "Heterosexual HIV-1 Transmission after Initiation of Antiretroviral Therapy: A Prospective Cohort Analysis." *The Lancet* 375 (9731): 2092–98.
- Doranz, B J, J Rucker, Y Yi, R J Smyth, M Samson, S C Peiper, M Parmentier, R G Collman, and R W Doms. 1996. "A Dual-Tropic Primary HIV-1 Isolate That Uses Fusin and the Beta-Chemokine Receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as Fusion Cofactors." *Cell* 85 (7): 1149–58.
- Douek, Daniel C., Jason M. Brenchley, Michael R. Betts, David R. Ambrozak, Brenna J. Hill, Yukari Okamoto, Joseph P. Casazza, et al. 2002. "HIV Preferentially Infects HIV-Specific CD4+ T Cells." *Nature* 417 (6884): 95–98.
- Dudek, Timothy E., Daniel C. No, Edward Seung, Vladimir D. Vrbanac, Lena Fadda, Priyasma Bhoumik, Christian L. Boutwell, et al. 2012. "Rapid Evolution of HIV-1 to Functional CD8+ T Cell Responses in Humanized BLT Mice." *Science Translational Medicine* 4

(143).

- Dufloo, Jérémy, Timothée Bruel, and Olivier Schwartz. 2018. "HIV-1 Cell-to-Cell Transmission and Broadly Neutralizing Antibodies." *Retrovirology*. BioMed Central Ltd.
- Duncan, Christopher J.A., Rebecca A. Russell, and Quentin J. Sattentau. 2013. "High Multiplicity HIV-1 Cell-to-Cell Transmission from Macrophages to CD4+ T Cells Limits Antiretroviral Efficacy." *AIDS* 27 (14): 2201–6.
- Dutertre, Charles Antoine, Sonia Amraoui, Annalisa DeRosa, Jean Pierre Jourdain, Lene Vimeux, Matthieu Goguet, Séverine Degrelle, et al. 2012. "Pivotal Role of M-DC8+ Monocytes from Viremic HIV-Infected Patients in TNF α Overproduction in Response to Microbial Products." *Blood* 120 (11): 2259–68.
- Ebert, Lisa M., and Shaun R. McColl. 2002. "Up-Regulation of CCR5 and CCR6 on Distinct Subpopulations of Antigen-Activated CD4 + T Lymphocytes ." *The Journal of Immunology* 168 (1): 65–72.
- Effros, Rita B., Mirabelle Dagarag, Carolyn Spaulding, and Janice Man. 2005. "The Role of CD8+ T-Cell Replicative Senescence in Human Aging." *Immunological Reviews*. Immunol Rev.
- Eisenman, June, Mino Ahdieh, Courtney Beers, Kenneth Brasel, Mary K. Kennedy, Tiep Le, Timothy P. Bonnert, Raymond J. Paxton, and Linda S. Park. 2002. "Interleukin-15 Interactions with Interleukin-15 Receptor Complexes: Characterization and Species Specificity." *Cytokine* 20 (3): 121–29.
- Elbim, C., M. H. Prevot, F. Bouscarat, E. Franzini, S. Chollet-Martin, J. Hakim, and M. A. Gougerot-Pocidalò. 1995. "Impairment of Polymorphonuclear Neutrophil Function in Hiv-Infected Patients." *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 25: S66–70.
- Else, Laura J., Stephen Taylor, David J. Back, and Saye H. Khoo. 2011. "Pharmacokinetics of Antiretroviral Drugs in Anatomical Sanctuary Sites: The Male and Female Genital Tract." *Antiviral Therapy*.
- Ene, L., D. Duiculescu, and S. M. Ruta. 2011. "How Much Do Antiretroviral Drugs Penetrate into the Central Nervous System?" *Journal of Medicine and Life*.
- Eriksson, Susanne, Erin H. Graf, Viktor Dahl, Matthew C. Strain, Steven A. Yukl, Elena S. Lysenko, Ronald J. Bosch, et al. 2013. "Comparative Analysis of Measures of Viral Reservoirs in HIV-1 Eradication Studies." *PLoS Pathogens* 9 (2).
- Estes, Jacob D. 2013. "Pathobiology Of HIV/SIV-Associated Changes In Secondary Lymphoid Tissues." *Immunological Reviews* 254 (1): 65–77.
- Estes, Jacob D, Shari N Gordon, Ming Zeng, Ann M Chahroudi, Richard M Dunham, Silvija I Staprans, Cavan S Reilly, Guido Silvestri, and Ashley T Haase. 2008. "Early Resolution of Acute Immune Activation and Induction of PD-1 in SIV-Infected Sooty Mangabeys Distinguishes Nonpathogenic from Pathogenic Infection in Rhesus Macaques." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180 (10): 6798–6807.
- Etemad, Behzad, Elmira Esmaeilzadeh, and Jonathan Z. Li. 2019. "Learning From the Exceptions: HIV Remission in Post-Treatment Controllers." *Frontiers in Immunology*. NLM (Medline).
- Evans, David T, and Guido Silvestri. 2013. "Nonhuman Primate Models in AIDS Research." *Current Opinion in HIV and AIDS* 8 (4): 255–61.
- Evans, Vanessa A., Renée M. Van Der Sluis, Ajantha Solomon, Ashanti Dantanarayana, Catriona McNeil, Roger Garsia, Sarah Palmer, et al. 2018. "Programmed Cell Death-1 Contributes to the Establishment and Maintenance of HIV-1 Latency." *AIDS* 32 (11): 1491–97.
- Fabre-Mersseman, Véronique, Jacques Dutrieux, Anne Louise, Sandra Rozlan, Aurélia Lamine, Raphaëlle Parker, Magali Rancez, et al. 2011. "CD4+ Recent Thymic Emigrants Are Infected by HIV in Vivo, Implication for Pathogenesis." *AIDS* 25 (9): 1153–62.

- Fauci, AS, and RC Desrosiers. 1997. *Pathogenesis of HIV and SIV. Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Favre, David, Sharon Lederer, Bittoo Kanwar, Zhong Min Ma, Sean Proll, Zeljka Kasakow, Jeff Mold, et al. 2009. "Critical Loss of the Balance between Th17 and T Regulatory Cell Populations in Pathogenic SIV Infection." *PLoS Pathogens* 5 (2).
- Feeney, M E. 2004. "HIV and Children: The Developing Immune System Fights Back." *The West Indian Medical Journal* 53 (5): 359–62.
- Fenwick, Craig, Victor Joo, Patricia Jacquier, Alessandra Noto, Riddhima Banga, Matthieu Perreau, and Giuseppe Pantaleo. 2019. "T-Cell Exhaustion in HIV Infection." *Immunological Reviews*. Blackwell Publishing Ltd.
- Fenwick, Craig, Juan Luis Loredó-Varela, Victor Joo, Céline Pellaton, Alex Farina, Navina Rajah, Line Esteves-Leuenerger, et al. 2019. "Tumor Suppression of Novel Anti-PD-1 Antibodies Mediated through CD28 Costimulatory Pathway." *Journal of Experimental Medicine* 216 (7).
- Février, Michèle, Karim Dorgham, and Angelita Rebollo. 2011. "CD4 +T Cell Depletion in Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection: Role of Apoptosis." *Viruses*.
- Finnefrock, Adam C., Aimin Tang, Fengsheng Li, Daniel C. Freed, Meizhen Feng, Kara S. Cox, Kara J. Sykes, et al. 2009. "PD-1 Blockade in Rhesus Macaques: Impact on Chronic Infection and Prophylactic Vaccination." *The Journal of Immunology* 182 (2): 980–87.
- Finzi, Diana, Joel Blankson, Janet D. Siliciano, Joseph B. Margolick, Karen Chadwick, Theodore Pierson, Kendall Smith, et al. 1999. "Latent Infection of CD4+ T Cells Provides a Mechanism for Lifelong Persistence of HIV-1, Even in Patients on Effective Combination Therapy." *Nature Medicine* 5 (5): 512–17.
- Finzi, Diana, Monika Hermankova, Theodore Pierson, Lucy M. Carruth, Christopher Buck, Richard E. Chaisson, Thomas C. Quinn, et al. 1997. "Identification of a Reservoir for HIV-1 in Patients on Highly Active Antiretroviral Therapy." *Science* 278 (5341): 1295–1300.
- Fischl, Margaret A., Douglas D. Richman, Michael H. Grieco, Michael S. Gottlieb, Paul A. Volberding, Oscar L. Laskin, John M. Leedom, et al. 1987. "The Efficacy of Azidothymidine (AZT) in the Treatment of Patients with AIDS and AIDS-Related Complex." *New England Journal of Medicine* 317 (4): 185–91.
- Flanagan, S. P. 1966. "'Nude', a New Hairless Gene with Pleiotropic Effects in the Mouse." *Genetical Research* 8 (3): 295–309.
- Flannery, Erika L., Lander Foquet, Vorada Chuenchob, Matthew Fishbaugher, Zachary Billman, Mary Jane Navarro, William Betz, et al. 2018. "Assessing Drug Efficacy against Plasmodium Falciparum Liver Stages in Vivo." *JCI Insight* 3 (1).
- Fletcher, Courtney V., Kathryn Staskus, Stephen W. Wietgreffe, Meghan Rothenberger, Cavan Reilly, Jeffrey G. Chipman, Greg J. Beilman, et al. 2014. "Persistent HIV-1 Replication Is Associated with Lower Antiretroviral Drug Concentrations in Lymphatic Tissues." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (6): 2307–12.
- Fogli, Manuela, Domenico Mavilio, Enrico Brunetta, Stefania Varchetta, Khaled Ata, Gregg Roby, Colin Kovacs, et al. 2008. "Lysis of Endogenously Infected CD4+ T Cell Blasts by RIL-2 Activated Autologous Natural Killer Cells from HIV-Infected Viremic Individuals." *PLoS Pathogens* 4 (7).
- Fonteneau, Jean-François, Marie Larsson, Anne-Sophie Beignon, Kelli McKenna, Ida Dasilva, Ali Amara, Yong-Jun Liu, Jeffrey D. Lifson, Dan R. Littman, and Nina Bhardwaj. 2004. "Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activates Plasmacytoid Dendritic Cells and Concomitantly Induces the Bystander Maturation of Myeloid Dendritic Cells." *Journal of Virology* 78 (10): 5223–32.
- Freed, Eric O. 2015. "HIV-1 Assembly, Release and Maturation." *Nature Reviews*

- Microbiology* 13 (8): 484–96.
- French, Martyn A., Martin S. King, Jean M. Tschampa, Barbara A. da Silva, and Alan L. Landay. 2009. “Serum Immune Activation Markers Are Persistently Increased in Patients with HIV Infection after 6 Years of Antiretroviral Therapy despite Suppression of Viral Replication and Reconstitution of CD4 + T Cells .” *The Journal of Infectious Diseases* 200 (8): 1212–15.
- Fromentin, Rémi, Wendy Bakeman, Mariam B. Lawani, Gabriela Khoury, Wendy Hartogensis, Sandrina DaFonseca, Marisela Killian, et al. 2016. “CD4+ T Cells Expressing PD-1, TIGIT and LAG-3 Contribute to HIV Persistence during ART.” *PLoS Pathogens* 12 (7).
- Fromentin, Rémi, Sandrina DaFonseca, Cecilia T. Costiniuk, Mohamed El-Far, Francesco Andrea Procopio, Frederick M. Hecht, Rebecca Hoh, et al. 2019. “PD-1 Blockade Potentiates HIV Latency Reversal Ex Vivo in CD4 + T Cells from ART-Suppressed Individuals.” *Nature Communications* 10 (1).
- Frommer, Friederike, and Ari Waisman. 2010. “B Cells Participate in Thymic Negative Selection of Murine Auto-Reactive CD4+ T Cells.” *PLoS ONE* 5 (10).
- Fukazawa, Yoshinori, Richard Lum, Afam A. Okoye, Haesun Park, Kenta Matsuda, Jin Young Bae, Shoko I. Hagen, et al. 2015. “B Cell Follicle Sanctuary Permits Persistent Productive Simian Immunodeficiency Virus Infection in Elite Controllers.” *Nature Medicine* 21 (2): 132–39.
- Fuller, Michael J., and Allan J. Zajac. 2003. “Ablation of CD8 and CD4 T Cell Responses by High Viral Loads.” *The Journal of Immunology* 170 (1): 477–86.
- Furie, Richard, Munther Khamashta, Joan T. Merrill, Victoria P. Werth, Kenneth Kalunian, Philip Brohawn, Gabor G. Illei, Jorn Drappa, Liangwei Wang, and Stephen Yoo. 2017. “Anifrolumab, an Anti-Interferon- α Receptor Monoclonal Antibody, in Moderate-to-Severe Systemic Lupus Erythematosus.” *Arthritis and Rheumatology* 69 (2): 376–86.
- Gallant, Joel E., Edwin Dejesus, José R. Arribas, Anton L. Pozniak, Brian Gazzard, Rafael E. Campo, Biao Lu, et al. 2006. “Tenofovir DF, Emtricitabine, and Efavirenz vs. Zidovudine, Lamivudine, and Efavirenz for HIV.” *New England Journal of Medicine* 354 (3): 251–60.
- Ganusov, Vitaly V., and Rob J. De Boer. 2007. “Do Most Lymphocytes in Humans Really Reside in the Gut?” *Trends in Immunology* 28 (12): 514–18.
- Gardner, Murray B., and Paul A. Luciw. 2008. “Macaque Models of Human Infectious Disease.” *ILAR Journal*. Oxford University Press.
- Garff, Gwenaëlle Le, Assia Samri, Sidonie Lambert-Niclot, Sophie Even, Armelle Lavolé, Jacques Cadranet, Jean Philippe Spano, Brigitte Autran, Anne Geneviève Marcelin, and Amélie Guihot. 2017. “Transient HIV-Specific T Cells Increase and Inflammation in an HIV-Infected Patient Treated with Nivolumab.” *AIDS*. Lippincott Williams and Wilkins.
- Gattinoni, Luca, Enrico Lugli, Yun Ji, Zoltan Pos, Chrystal M. Paulos, Máire F. Quigley, Jorge R. Almeida, et al. 2011. “A Human Memory T Cell Subset with Stem Cell-like Properties.” *Nature Medicine* 17 (10): 1290–97.
- Gavegnano, Christina, Jessica H. Brehm, Franck P. Dupuy, Aarthi Talla, Susan Pereira Ribeiro, Deanna A. Kulpa, Cheryl Cameron, et al. 2017. “Novel Mechanisms to Inhibit HIV Reservoir Seeding Using Jak Inhibitors.” *PLoS Pathogens* 13 (12).
- Gavegnano, Christina, Mervi Detorio, Catherine Montero, Alberto Bosque, Vicente Planelles, and Raymond F. Schinazi. 2014. “Ruxolitinib and Tofacitinib Are Potent and Selective Inhibitors of HIV-1 Replication and Virus Reactivation in Vitro.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (4): 1977–86.
- Gavegnano, Christina, and Raymond F. Schinazi. 2009. “Antiretroviral Therapy in Macrophages: Implication for HIV Eradication.” *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 20 (2): 63–78.
- Gay, Cynthia L, Ronald J Bosch, Justin Ritz, Jason M Hataye, Evgenia Aga, Randall L Tressler,

- Stephen W Mason, et al. 2017. "Clinical Trial of the Anti-PD-L1 Antibody BMS-936559 in HIV-1 Infected Participants on Suppressive Antiretroviral Therapy." *The Journal of Infectious Diseases* 215 (11): 1725–33.
- Geraert, Luc, Günter Kraus, and Roger J. Pomerantz. 2008. "Hide-and-Seek: The Challenge of Viral Persistence in HIV-1 Infection." *Annual Review of Medicine* 59 (1): 487–501.
- Geijtenbeek, Teunis B.H., Douglas S. Kwon, Ruurd Torensma, Sandra J. Van Vliet, Gerard C.F. Van Duynhoven, Jeena Middel, Ine L.M.H.A. Cornelissen, et al. 2000. "DC-SIGN, a Dendritic Cell-Specific HIV-1-Binding Protein That Enhances Trans-Infection of T Cells." *Cell* 100 (5): 587–97.
- Gendelman, H E, J M Orenstein, M A Martin, C Ferrua, R Mitra, T Phipps, L A Wahl, H C Lane, A S Fauci, and D S Burke. 1988. "Efficient Isolation and Propagation of Human Immunodeficiency Virus on Recombinant Colony-Stimulating Factor 1-Treated Monocytes." *The Journal of Experimental Medicine* 167 (4): 1428–41.
- Ghiglione, Yanina, César Trifone, Jimena Salido, Ajantha Rhodes, María Julia Ruiz, María Laura Polo, Horacio Salomón, et al. 2019. "PD-1 Expression in HIV-Specific CD8+ T Cells before Antiretroviral Therapy Is Associated with HIV Persistence." *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 80 (1): 1–6.
- Gibbs, Richard A., Jeffrey Rogers, Michael G. Katze, Roger Bumgarner, George M. Weinstock, Elaine R. Mardis, Karin A. Remington, et al. 2007. "Evolutionary and Biomedical Insights from the Rhesus Macaque Genome." *Science*.
- Gill, Amanda L., Samantha A. Green, Shahed Abdullah, Cecile Le Saout, Stefania Pittaluga, Hui Chen, Refika Turnier, et al. 2016. "Programed Death-1/Programed Death-Ligand 1 Expression in Lymph Nodes of HIV Infected Patients: Results of a Pilot Safety Study in Rhesus Macaques Using Anti-Programed Death-Ligand 1 (Avelumab)." *AIDS* 30 (16): 2487–93.
- Gille, Christian, Thorsten W Orlikowsky, Baerbel Spring, Udo F Hartwig, Aylene Wilhelm, Andreas Wirth, Barbara Goecke, Rupert Handgretinger, Christian F Poets, and Maya C André. 2012. "Monocytes Derived from Humanized Neonatal NOD/SCID/IL2R γ (Null) Mice Are Phenotypically Immature and Exhibit Functional Impairments." *Human Immunology* 73 (4): 346–54.
- Gilson, R., S. L. Man, A. Copas, A. Rider, S. Forsyth, T. Hill, L. Bansi, et al. 2010. "Discordant Responses on Starting Highly Active Antiretroviral Therapy: Suboptimal CD4 Increases despite Early Viral Suppression in the UK Collaborative HIV Cohort (UK CHIC) Study." *HIV Medicine* 11 (2): 152–60.
- Gimeno, Ramon, Kees Weijer, Arie Voordouw, Christel H. Uittenbogaart, Nicolas Legrand, Nuno L. Alves, Erwin Wijnands, Bianca Blom, and Hergen Spits. 2004. "Monitoring the Effect of Gene Silencing by RNA Interference in Human CD34+ Cells Injected into Newborn RAG2 $^{-/-}$ Γ c $^{-/-}$ Mice: Functional Inactivation of P53 in Developing T Cells." *Blood* 104 (13): 3886–93.
- Giorgi, Janis V., and Roger Detels. 1989. "T-Cell Subset Alterations in HIV-Infected Homosexual Men: NIAID Multicenter AIDS Cohort Study." *Clinical Immunology and Immunopathology* 52 (1): 10–18.
- Giralt, Marta, Pere Domingo, and Francesc Villarroya. 2011. "Adipose Tissue Biology and HIV-Infection." *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* 25 (3): 487–99.
- Giuffre, Angelica C., Joanne Higgins, Robert W. Buckheit, and Thomas W. North. 2003. "Susceptibilities of Simian Immunodeficiency Virus to Protease Inhibitors." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (5): 1756–59.
- Gonzalez, Louis, Natasa Strbo, and Eckhard R. Podack. 2013. "Humanized Mice: Novel Model for Studying Mechanisms of Human Immune-Based Therapies." *Immunologic Research*

57 (1–3): 326–34.

- Corantla, Santhi, Edward Makarov, Jennifer Finke-Dwyer, Antonio Castaneda, Adelina Holguin, Catherine L. Gebhart, Howard E. Gendelman, and Larisa Poluektova. 2010. “Links between Progressive HIV-1 Infection of Humanized Mice and Viral Neuropathogenesis.” *American Journal of Pathology* 177 (6): 2938–49.
- Gordon, Shari N, Nichole R Klatt, Steven E Bosinger, Jason M Brenchley, Jeffrey M Milush, Jessica C Engram, Richard M Dunham, et al. 2007. “Severe Depletion of Mucosal CD4+ T Cells in AIDS-Free Simian Immunodeficiency Virus-Infected Sooty Mangabeys.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179 (5): 3026–34.
- Gougeon, M L, H Lecoeur, F Boudet, E Ledru, S Marzabal, S Boullier, R Roué, S Nagata, and J Heeney. 1997. “Lack of Chronic Immune Activation in HIV-Infected Chimpanzees Correlates with the Resistance of T Cells to Fas/Apo-1 (CD95)-Induced Apoptosis and Preservation of a T Helper 1 Phenotype.” *The Journal of Immunology* 158 (6).
- Grabmeier-Pfistershammer, Katharina, Peter Steinberger, Armin Rieger, Judith Leitner, and Norbert Kohrgruber. 2011. “Identification of PD-1 as a Unique Marker for Failing Immune Reconstitution in HIV-1-Infected Patients on Treatment.” *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 56 (2): 118–24.
- Greenblatt, Matthew B., Vladimir Vbranac, Trevor Tivey, Kelly Tsang, Andrew M. Tager, and Antonios O. Aliprantis. 2012. “Graft versus Host Disease in the Bone Marrow, Liver and Thymus Humanized Mouse Model.” *PLoS ONE* 7 (9).
- Grevenynghe, Julien Van, Rafael A. Cubas, Alessandra Noto, Sandrina DaFonseca, Zhong He, Yoav Peretz, Abdelali Filali-Mouhim, et al. 2011. “Loss of Memory B Cells during Chronic HIV Infection Is Driven by Foxo3a- and TRAIL-Mediated Apoptosis.” *Journal of Clinical Investigation* 121 (10): 3877–88.
- Groot, Fedde, Sonja Welsch, and Quentin J. Sattentau. 2008. “Efficient HIV-1 Transmission from Macrophages to T Cells across Transient Virological Synapses.” *Blood* 111 (9): 4660–63.
- Grunfeld, Carl, Joseph A C Delaney, Christine Wanke, Judith S Currier, Rebecca Scherzer, Mary L Biggs, Phyllis C Tien, et al. 2009. “Preclinical Atherosclerosis Due to HIV Infection: Carotid Intima-Medial Thickness Measurements from the FRAM Study.” *AIDS (London, England)* 23 (14): 1841–49.
- Guihot, A, A-G Marcelin, M-A Massiani, A Samri, C Soulié, B Autran, and J-P Spano. 2018. “Drastic Decrease of the HIV Reservoir in a Patient Treated with Nivolumab for Lung Cancer.” *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 29 (2): 517–18.
- Guihot, Amélie, Anne Bourgarit, Guislaine Carcelain, and Brigitte Autran. 2011. “Immune Reconstitution after a Decade of Combined Antiretroviral Therapies for Human Immunodeficiency Virus.” *Trends in Immunology*. Trends Immunol.
- Guihot, Amélie, Roland Tubiana, Guillaume Breton, Anne Geneviève Marcelin, Assia Samri, Lambert Assoumou, Emilia Goncalves, et al. 2010. “Immune and Virological Benefits of 10 Years of Permanent Viral Control with Antiretroviral Therapy.” *AIDS* 24 (4): 614–17.
- Guimond, Martin, Aharon G. Freud, Hsiaoyn C. Mao, Jianhua Yu, Bradley W. Blaser, Jeffrey W. Leong, Jeffrey B. Vandeusen, et al. 2010. “In Vivo Role of Flt3 Ligand and Dendritic Cells in NK Cell Homeostasis.” *The Journal of Immunology* 184 (6): 2769–75.
- Guo, Haitao, Jianmei Gao, Debra J. Taxman, Jenny P.Y. Ting, and Lishan Su. 2014. “HIV-1 Infection Induces Interleukin-1 β Production via TLR8 Protein-Dependent and NLRP3 Inflammasome Mechanisms in Human Monocytes.” *Journal of Biological Chemistry* 289 (31): 21716–26.
- Haase, A. T. 1999. “Population Biology of HIV-1 Infection: Viral and CD4 + T Cell Demographics and Dynamics in Lymphatic Tissues.” *Annual Review of Immunology* 17

- (1): 625–56.
- Haile, Woldeab B., Christina Gavegnano, Sijia Tao, Yong Jiang, Raymond F. Schinazi, and William R. Tyor. 2016. “The Janus Kinase Inhibitor Ruxolitinib Reduces HIV Replication in Human Macrophages and Ameliorates HIV Encephalitis in a Murine Model.” *Neurobiology of Disease* 92 (Pt B): 137–43.
- Halkias, Joanna, Bonnie Yen, Kayleigh T Taylor, Olaf Reinhartz, Astar Winoto, Ellen A Robey, and Heather J Melichar. 2015. “Conserved and Divergent Aspects of Human T-Cell Development and Migration in Humanized Mice.” *Immunology and Cell Biology* 93 (8): 716–26.
- Hammer, S M, D A Katzenstein, M D Hughes, H Gundacker, R T Schooley, R H Haubrich, W K Henry, et al. 1996. “A Trial Comparing Nucleoside Monotherapy with Combination Therapy in HIV-Infected Adults with CD4 Cell Counts from 200 to 500 per Cubic Millimeter. AIDS Clinical Trials Group Study 175 Study Team.” *The New England Journal of Medicine* 335 (15): 1081–90.
- Harari, Alexandre, Stéphanie Petitpierre, Florence Vellelian, and Giuseppe Pantaleo. 2004. “Skewed Representation of Functionally Distinct Populations of Virus-Specific CD4 T Cells in HIV-1-Infected Subjects with Progressive Disease: Changes after Antiretroviral Therapy.” *Blood* 103 (3): 966–72.
- Hardy, Gareth A.D., Scott Sieg, Benigno Rodriguez, Donald Anthony, Robert Asaad, Wei Jiang, Joseph Mudd, et al. 2013. “Interferon- α Is the Primary Plasma Type-I IFN in HIV-1 Infection and Correlates with Immune Activation and Disease Markers.” *PLoS ONE* 8 (2).
- Hardy, W David. 2019. *Fundamentals of HIV Medicine*. Edited by American Academy of HIV Medicine.
- Harley, Calvin B., A. Bruce Futcher, and Carol W. Greider. 1990. “Telomeres Shorten during Ageing of Human Fibroblasts.” *Nature* 345 (6274): 458–60.
- Harman, Andrew N., Joey Lai, Stuart Turville, Shamith Samarajiwa, Lachlan Gray, Valerie Marsden, Sarah Mercier, et al. 2011. “HIV Infection of Dendritic Cells Subverts the IFN Induction Pathway via IRF-1 and Inhibits Type 1 IFN Production.” *Blood* 118 (2): 298–308.
- Harris, Levelle D., Brian Tabb, Donald L. Sodora, Mirko Paiardini, Nichole R. Klatt, Daniel C. Douek, Guido Silvestri, et al. 2010. “Downregulation of Robust Acute Type I Interferon Responses Distinguishes Nonpathogenic Simian Immunodeficiency Virus (SIV) Infection of Natural Hosts from Pathogenic SIV Infection of Rhesus Macaques.” *Journal of Virology* 84 (15): 7886–91.
- Hasse, Barbara, Bruno Ledergerber, Hansjakob Furrer, Manuel Battegay, Bernhard Hirschel, Matthias Cavassini, Barbara Bertisch, Enos Bernasconi, Rainer Weber, and Swiss HIV Cohort Study. 2011. “Morbidity and Aging in HIV-Infected Persons: The Swiss HIV Cohort Study.” *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 53 (11): 1130–39.
- Hatzioannou, Theodora, Zandrea Ambrose, Nancy P.Y. Chung, Michael Piatak, Fang Yuan, Charles M. Trubey, Vicky Coalter, et al. 2009. “A Macaque Model of HIV-1 Infection.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (11): 4425–29.
- Hayakawa, Jun, Matthew M Hsieh, Naoya Uchida, Oswald Phang, and John F Tisdale. 2009. “Busulfan Produces Efficient Human Cell Engraftment in NOD/LtSz-Scid IL2Rgamma(Null) Mice.” *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 27 (1): 175–82.
- Hayflick, L. 1968. “Human Cells and Aging.” *Scientific American* 218 (3): 32–37.
- Hazenber, Mette D., Dörte Hamann, Hanneke Schuitemaker, and Frank Miedema. 2000. “T Cell Depletion in HIV-1 Infection: How CD4+ T Cells Go out of Stock.” *Nature*

- Immunology*. Presse Dienstleistungsgesellschaft mbH und Co. KG.
- Hendrickson, E A, M S Schlissel, and D T Weaver. 1990. "Wild-Type V(D)J Recombination in Scid Pre-B Cells." *Molecular and Cellular Biology* 10 (10): 5397–5407.
- Henriquez, Soledad, Camille Lécuroux, Marie Bitu, Véronique Avettand-Fenoel, Françoise Churaqui, Pilartxo Catalan, Antoine Chéret, et al. 2019. "The Proportion of CD57+ Cells among Effector CD8+ T Cells Is Lower in HIV Controllers Compared with Antiretroviral Therapy-Treated Patients." *AIDS (London, England)* 33 (14): 2137–47.
- Hensley-McBain, Tiffany, and Nichole R. Klatt. 2018. "The Dual Role of Neutrophils in HIV Infection." *Current HIV/AIDS Reports* 15 (1).
- Henson, Sian M., and Arne N. Akbar. 2009. "KLRG1-More than a Marker for T Cell Senescence." *Age. Age (Dordr)*.
- Henson, Sian M., Ornella Franzese, Richard Macaulay, Valentina Libri, Rita I. Azevedo, Sorena Kiani-Alikhan, Fiona J. Plunkett, et al. 2009. "KLRG1 Signaling Induces Defective Akt (Ser473) Phosphorylation and Proliferative Dysfunction of Highly Differentiated CD8+ T Cells." *Blood* 113 (26): 6619–28.
- Herbeuval, Jean Philippe, Adriano Boasso, Jean Charles Grivel, Andrew W. Hardy, Stephanie A. Anderson, Matthew J. Dolan, Claire Chougnet, Jeffrey D. Lifson, and Gene M. Shearer. 2005. "TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) in HIV-1-Infected Patients and Its in Vitro Production by Antigen-Presenting Cells." *Blood* 105 (6): 2458–64.
- Herbeuval, Jean Philippe, Jean Charles Grivel, Adriano Boasso, Andrew W. Hardy, Claire Chougnet, Matthew J. Dolan, Hideo Yagita, Jeffrey D. Lifson, and Gene M. Shearer. 2005. "CD4+ T-Cell Death Induced by Infectious and Noninfectious HIV-1: Role of Type 1 Interferon-Dependent, TRAIL/DR5-Mediated Apoptosis." *Blood* 106 (10): 3524–31.
- Herbeuval, Jean Philippe, Andrew W. Hardy, Adriano Boasso, Stephanie A. Anderson, Matthew J. Dolan, Michel Dy, and Gene M. Shearer. 2005. "Regulation of TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand on Primary CD4 + T Cells by HIV-1: Role of Type I IFN-Producing Plasmacytoid Dendritic Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (39): 13974–79.
- Herbst, Roy S., Jean Charles Soria, Marcin Kowanzetz, Gregg D. Fine, Omid Hamid, Michael S. Gordon, Jeffery A. Sosman, et al. 2014. "Predictive Correlates of Response to the Anti-PD-L1 Antibody MPDL3280A in Cancer Patients." *Nature* 515 (7528): 563–67.
- Herndler-Brandstetter, Dietmar, Liang Shan, Yi Yao, Carmen Stecher, Valerie Plajer, Melanie Lietzenmayer, Till Strowig, et al. 2017. "Humanized Mouse Model Supports Development, Function, and Tissue Residency of Human Natural Killer Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (45): E9626–34.
- Hersperger, Adam R., Florencia Pereyra, Martha Nason, Korey Demers, Premeet Sheth, Lucy Y. Shin, Colin M. Kovacs, et al. 2010. "Perforin Expression Directly Ex Vivo by HIV-Specific CD8+ T-Cells Is a Correlate of HIV Elite Control." *PLoS Pathogens* 6 (5): 1–13.
- Hesselton, R M, D L Greiner, J P Mordes, T V Rajan, J L Sullivan, and L D Shultz. 1995. "High Levels of Human Peripheral Blood Mononuclear Cell Engraftment and Enhanced Susceptibility to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection in NOD/LtSz-Scid/Scid Mice." *The Journal of Infectious Diseases* 172 (4): 974–82.
- Heuts, Frank, Dolores Gavier-Widén, Berit Carow, Julius Juarez, Hans Wigzell, and Martin E. Rottenberg. 2013. "CD4+ Cell-Dependent Granuloma Formation in Humanized Mice Infected with Mycobacteria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (16): 6482–87.
- Hilger, Nadja, Jakob Glaser, Claudia Müller, Christoph Halbich, Anne Müller, Ulla Schwertassek, Jörg Lehmann, et al. 2016. "Attenuation of Graft-versus-Host-Disease in NOD Scid IL-2R γ ^{-/-} (NSG) Mice by Ex Vivo Modulation of Human CD4+ T Cells."

- Cytometry Part A* 89 (9): 803–15.
- Hirsch, Vanessa M., Robert A. Olmsted, Michael Murphey-Corb, Robert H. Purcell, and Philip R. Johnson. 1989. “An African Primate Lentivirus (SIVsm) Closely Related to HIV-2.” *Nature* 339 (6223): 389–92.
- Hocqueloux, Laurent, Véronique Avettand-Fènoël, Sophie Jacquot, Thierry Prazuck, Eric Legac, Adeline Mélard, Mohamadou Niang, et al. 2013. “Long-Term Antiretroviral Therapy Initiated during Primary HIV-1 Infection Is Key to Achieving Both Low HIV Reservoirs and Normal T Cell Counts.” *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68 (5): 1169–78.
- Hoffmann, C, T Welz, M Sabranski, M Kolb, E Wolf, H-J Stellbrink, and C Wyen. 2017. “Higher Rates of Neuropsychiatric Adverse Events Leading to Dolutegravir Discontinuation in Women and Older Patients.” *HIV Medicine* 18 (1): 56–63.
- Hofmann, Lars, Andrea Forschner, Carmen Loquai, Simone M. Goldinger, Lisa Zimmer, Selma Ugurel, Maria I. Schmidgen, et al. 2016. “Cutaneous, Gastrointestinal, Hepatic, Endocrine, and Renal Side-Effects of Anti-PD-1 Therapy.” *European Journal of Cancer* 60 (June): 190–209.
- Holt, Nathalia, Jianbin Wang, Kenneth Kim, Geoffrey Friedman, Xingchao Wang, Vanessa Taupin, Gay M. Crooks, et al. 2010. “Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Modified by Zinc-Finger Nucleases Targeted to CCR5 Control HIV-1 in Vivo.” *Nature Biotechnology* 28 (8): 839–47.
- Holyoake, Tessa L., Franck E. Nicolini, and Connie J. Eaves. 1999. “Functional Differences between Transplantable Human Hematopoietic Stem Cells from Fetal Liver, Cord Blood, and Adult Marrow.” *Experimental Hematology* 27 (9): 1418–27.
- Horiike, Mariko, Shingo Iwami, Makoto Kodama, Akihiko Sato, Yuji Watanabe, Mika Yasui, Yuki Ishida, Takeshi Kobayashi, Tomoyuki Miura, and Tatsuhiko Igarashi. 2012. “Lymph Nodes Harbor Viral Reservoirs That Cause Rebound of Plasma Viremia in SIV-Infected Macaques upon Cessation of Combined Antiretroviral Therapy.” *Virology* 423 (2): 107–18.
- Hryniewicz, Anna, Adriano Boasso, Yvette Edghill-Smith, Monica Vaccari, Dietmar Fuchs, David Venzon, Janos Nacsa, et al. 2006. “CTLA-4 Blockade Decreases TGF- β , IDO, and Viral RNA Expression in Tissues of SIVmac251-Infected Macaques.” *Blood* 108 (12): 3834–42.
- Hsue, Priscilla Y., Danny Li, Yifei Ma, Amorina Ishai, Maura Manion, Matthias Nahrendorf, Peter Ganz, Paul M. Ridker, Steven G. Deeks, and Ahmed Tawakol. 2018. “IL-1 β Inhibition Reduces Atherosclerotic Inflammation in HIV Infection.” *Journal of the American College of Cardiology*. Elsevier USA.
- Hu, P F, L E Hultin, P Hultin, M A Hausner, K Hirji, A Jewett, B Bonavida, R Detels, and J V Giorgi. 1995. “Natural Killer Cell Immunodeficiency in HIV Disease Is Manifest by Profoundly Decreased Numbers of CD16+CD56+ Cells and Expansion of a Population of CD16dimCD56- Cells with Low Lytic Activity.” *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology: Official Publication of the International Retrovirology Association* 10 (3): 331–40.
- Hua, Wei, Yanmei Jiao, Hongwei Zhang, Tong Zhang, Dexi Chen, Yonghong Zhang, Xinyue Chen, and Hao Wu. 2012. “Central Memory CD4 Cells Are an Early Indicator of Immune Reconstitution in HIV/AIDS Patients with Anti-Retroviral Treatment.” *Immunological Investigations* 41 (1): 1–14.
- Huang, Ruea Yea, Ariel Francois, Aj Robert McGray, Anthony Miliotto, and Kunle Odunsi. 2017. “Compensatory Upregulation of PD-1, LAG-3, and CTLA-4 Limits the Efficacy of Single-Agent Checkpoint Blockade in Metastatic Ovarian Cancer.” *Oncology* 6 (1).

- Hunt, Peter W., Jason Brenchley, Elizabeth Sinclair, Joseph M. McCune, Michelle Roland, Kimberly Page-Shafer, Priscilla Hsue, et al. 2008. "Relationship between T Cell Activation and CD4 + T Cell Count in HIV-Seropositive Individuals with Undetectable Plasma HIV RNA Levels in the Absence of Therapy ." *The Journal of Infectious Diseases* 197 (1): 126–33.
- Hunt, Peter W. 2012. "HIV and Inflammation: Mechanisms and Consequences." *Current HIV/AIDS Reports* 9 (2): 139–47.
- Huntington, Nicholas D., Nicolas Legrand, Nuno L. Alves, Barbara Jaron, Kees Weijer, Ariane Plet, Erwan Corcuff, et al. 2009. "IL-15 Trans-Presentation Promotes Human NK Cell Development and Differentiation in Vivo." *Journal of Experimental Medicine* 206 (1): 25–34.
- Hurst, Jacob, Matthias Hoffmann, Matthew Pace, James P. Williams, John Thornhill, Elizabeth Hamlyn, Jodi Meyerowitz, et al. 2015. "Immunological Biomarkers Predict HIV-1 Viral Rebound after Treatment Interruption." *Nature Communications* 6 (October).
- Hutter, Gero, Daniel Nowak, Maximilian Mossner, Susanne Ganepola, Arne Müß, Kristina Allers, Thomas Schneider, et al. 2009. "Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation." *New England Journal of Medicine* 360 (7): 692–98.
- Ibegbu, Chris C., Yong-Xian Xu, Wayne Harris, David Maggio, Joseph D. Miller, and Athena P. Kourtis. 2005. "Expression of Killer Cell Lectin-Like Receptor G1 on Antigen-Specific Human CD8 + T Lymphocytes during Active, Latent, and Resolved Infection and Its Relation with CD57 ." *The Journal of Immunology* 174 (10): 6088–94.
- Ishikawa, Fumihiko, Masaki Yasukawa, Bonnie Lyons, Shuro Yoshida, Toshihiro Miyamoto, Goichi Yoshimoto, Takeshi Watanabe, Koichi Akashi, Leonard D. Shultz, and Mine Harada. 2005. "Development of Functional Human Blood and Immune Systems in NOD/SCID/IL2 Receptor γ Chainnull Mice." *Blood* 106 (5): 1565–73.
- Ito, Mamoru, Hidefumi Hiramatsu, Kimio Kobayashi, Kazutomo Suzue, Mariko Kawahata, Kyoji Hioki, Yoshito Ueyama, et al. 2002. "NOD/SCID/ Γ cnnull Mouse: An Excellent Recipient Mouse Model for Engraftment of Human Cells." *Blood* 100 (9): 3175–82.
- Ito, Ryoji, Takeshi Takahashi, and Mamoru Ito. 2018. "Humanized Mouse Models: Application to Human Diseases." *Journal of Cellular Physiology*. Wiley-Liss Inc.
- Ito, Ryoji, Takeshi Takahashi, Ikumi Katano, and Mamoru Ito. 2012. "Current Advances in Humanized Mouse Models." *Cellular and Molecular Immunology*. Cell Mol Immunol.
- Ito, Ryoji, Takeshi Takahashi, Ikumi Katano, Kenji Kawai, Tsutomu Kamisako, Tomoyuki Ogura, Miyuki Ida-Tanaka, et al. 2013. "Establishment of a Human Allergy Model Using Human IL-3/GM-CSF–Transgenic NOG Mice." *The Journal of Immunology* 191 (6): 2890–99.
- Ivashkiv, Lionel B., and Laura T. Donlin. 2014. "Regulation of Type I Interferon Responses." *Nature Reviews Immunology*. Nat Rev Immunol.
- Iwuji, C. C., B. N. Mayanja, H. A. Weiss, E. Atuhumuza, P. Hughes, D. Maher, and H. Grosskurth. 2011. "Morbidity in HIV-1-Infected Individuals before and after the Introduction of Antiretroviral Therapy: A Longitudinal Study of a Population-Based Cohort in Uganda." *HIV Medicine* 12 (9): 553–61.
- Jaafoura, S., M. G. De Goër De Herve, E. A. Hernandez-Vargas, H. Hendel-Chavez, M. Abdoh, M. C. Mateo, R. Krzysiek, et al. 2014. "Progressive Contraction of the Latent HIV Reservoir around a Core of Less-Differentiated CD4 + Memory T Cells." *Nature Communications* 5.
- Jacquelin, Béatrice, Véronique Mayau, Brice Targat, Anne Sophie Liovat, Désirée Kunkel, Gaël Petitjean, Marie Agnès Dillies, et al. 2009. "Nonpathogenic SIV Infection of African Green Monkeys Induces a Strong but Rapidly Controlled Type I IFN Response." *Journal*

- of Clinical Investigation* 119 (12): 3544–55.
- Jaks, Eva, Martynas Gavutis, Gilles Uzé, Jacques Martal, and Jacob Piehler. 2007. “Differential Receptor Subunit Affinities of Type I Interferons Govern Differential Signal Activation.” *Journal of Molecular Biology* 366 (2): 525–39.
- Jeffrey, Martin, and Paul Volberding. 2010. “HIV and Premature Aging: A Field Still in Its Infancy.” *Annals of Internal Medicine* 153 (7): 477–79.
- Jenkins, Russell W., David A. Barbie, and Keith T. Flaherty. 2018. “Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors.” *British Journal of Cancer* 118 (1): 9–16.
- Jin, Hyun Tak, Ana C. Anderson, Wendy G. Tan, Erin E. West, Sang Jun Ha, Koichi Araki, Gordon J. Freeman, Vijay K. Kuchroo, and Rafi Ahmed. 2010. “Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (33): 14733–38.
- Jin, Xia, Daniel E. Bauer, Sarah E. Tuttleton, Sharon Lewin, Agegnehu Gettie, James Blanchard, Craig E. Irwin, et al. 1999. “Dramatic Rise in Plasma Viremia after CD8+ T Cell Depletion in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Macaques.” *Journal of Experimental Medicine* 189 (6): 991–98.
- Joas, Simone, Ulrike Saueremann, Berit Roshani, Antonina Klippert, Maria Daskalaki, Kerstin Mätz-Rensing, Nicole Stolte-Leeb, et al. 2020. “Nef-Mediated CD3-TCR Downmodulation Dampens Acute Inflammation and Promotes SIV Immune Evasion.” *Cell Reports* 30 (7): 2261-2274.e7.
- Jones, R. Brad, Lishomwa C. Ndhlovu, Jason D. Barbour, Prameet M. Sheth, Aashish R. Jha, Brian R. Long, Jessica C. Wong, et al. 2008. “Tim-3 Expression Defines a Novel Population of Dysfunctional T Cells with Highly Elevated Frequencies in Progressive HIV-1 Infection.” *Journal of Experimental Medicine* 205 (12): 2763–79.
- Joos, Beda, Marek Fischer, Herbert Kuster, Satish K. Pillai, Joseph K. Wong, Jürg Böni, Bernard Hirschel, et al. 2008. “HIV Rebounds from Latently Infected Cells, Rather than from Continuing Low-Level Replication.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (43): 16725–30.
- Joseph, A., J. H. Zheng, K. Chen, M. Dutta, C. Chen, G. Stiegler, R. Kunert, A. Follenzi, and H. Goldstein. 2010. “Inhibition of In Vivo HIV Infection in Humanized Mice by Gene Therapy of Human Hematopoietic Stem Cells with a Lentiviral Vector Encoding a Broadly Neutralizing Anti-HIV Antibody.” *Journal of Virology* 84 (13): 6645–53.
- Joseph, A., J. H. Zheng, A. Follenzi, T. DiLorenzo, K. Sango, J. Hyman, K. Chen, et al. 2008. “Lentiviral Vectors Encoding Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Specific T-Cell Receptor Genes Efficiently Convert Peripheral Blood CD8 T Lymphocytes into Cytotoxic T Lymphocytes with Potent In Vitro and In Vivo HIV-1-Specific Inhibitory Activity.” *Journal of Virology* 82 (6): 3078–89.
- Kalayjian, Robert C., Alan Landay, Richard B. Pollard, Dennis D. Taub, Barry H. Gross, Isaac R. Francis, Anne Sevin, et al. 2003. “Age-Related Immune Dysfunction in Health and in Human Immunodeficiency Virus (HIV) Disease: Association of Age and HIV Infection with Naive CD8 + Cell Depletion, Reduced Expression of CD28 on CD8 + Cells, and Reduced Thymic Volumes .” *The Journal of Infectious Diseases* 187 (12): 1924–33.
- Kaminski, R., R. Bella, C. Yin, J. Otte, P. Ferrante, H. E. Gendelman, H. Li, et al. 2016. “Excision of HIV-1 DNA by Gene Editing: A Proof-of-Concept in Vivo Study.” *Gene Therapy* 23 (8–9): 690–95.
- Kaminski, Rafal, Yilan Chen, Tracy Fischer, Ellen Tedaldi, Alessandro Napoli, Yonggang Zhang, Jonathan Karn, Wenhui Hu, and Kamel Khalili. 2016. “Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-Lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing.” *Scientific Reports* 6 (March).
- Kamphorst, Alice O., Andreas Wieland, Tahseen Nasti, Shu Yang, Ruan Zhang, Daniel L.

- Barber, Bogumila T. Konieczny, et al. 2017. "Rescue of Exhausted CD8 T Cells by PD-1-Targeted Therapies Is CD28-Dependent." *Science* 355 (6332): 1423–27.
- Kang, Young Kyung, Yunmi Ko, Aery Choi, Hyeong Jwa Choi, Jin-Hee Seo, Minyoung Lee, and Jun Ah Lee. 2016. "Humanizing NOD/SCID/IL-2R γ null (NSG) Mice Using Busulfan and Retro-Orbital Injection of Umbilical Cord Blood-Derived CD34(+) Cells." *Blood Research* 51 (1): 31–36.
- Kardava, Lela, Susan Moir, Wei Wang, Jason Ho, Clarisa M. Buckner, Jacqueline G. Posada, Marie A. O'Shea, et al. 2011. "Attenuation of HIV-Associated Human B Cell Exhaustion by SiRNA Downregulation of Inhibitory Receptors." *Journal of Clinical Investigation* 121 (7): 2614–24.
- Kared, Hassen, Serena Martelli, Tze Pin Ng, Sylvia L.F. Pender, and Anis Larbi. 2016. "CD57 in Human Natural Killer Cells and T-Lymphocytes." *Cancer Immunology, Immunotherapy* 65 (4): 441–52.
- Karlsson, Ingrid, Benoît Malleret, Patricia Brochard, Benoît Delache, Julien Calvo, Roger Le Grand, and Bruno Vaslin. 2007. "Dynamics of T-Cell Responses and Memory T Cells during Primary Simian Immunodeficiency Virus Infection in Cynomolgus Macaques." *Journal of Virology* 81 (24): 13456–68.
- Karpel, Marshall E., Christian L. Boutwell, and Todd M. Allen. 2015. "BLT Humanized Mice as a Small Animal Model of HIV Infection." *Current Opinion in Virology*. Elsevier B.V.
- Kaser, Arthur, Shigekazu Nagata, and Herbert Tilg. 1999. "Interferon α Augments Activation-Induced T Cell Death by Upregulation of Fas (CD95/APO-1) and Fas Ligand Expression." *Cytokine* 11 (10): 736–43.
- Kassu, Afework, Roland A. Marcus, Michelle B. D'Souza, Elizabeth A. Kelly-McKnight, Lucy Golden-Mason, Ramesh Akkina, Andrew P. Fontenot, Cara C. Wilson, and Brent E. Palmer. 2010. "Regulation of Virus-Specific CD4 + T Cell Function by Multiple Costimulatory Receptors during Chronic HIV Infection." *The Journal of Immunology* 185 (5): 3007–18.
- Katano, Ikumi, Chiyoko Nishime, Ryoji Ito, Tsutomu Kamisako, Takuma Mizusawa, Yuyo Ka, Tomoyuki Ogura, et al. 2017. "Long-Term Maintenance of Peripheral Blood Derived Human NK Cells in a Novel Human IL-15- Transgenic NOG Mouse." *Scientific Reports* 7 (1).
- Katano, Ikumi, Takeshi Takahashi, Ryoji Ito, Tsutomu Kamisako, Takuma Mizusawa, Yuyo Ka, Tomoyuki Ogura, Hiroshi Suemizu, Yutaka Kawakami, and Mamoru Ito. 2015. "Predominant Development of Mature and Functional Human NK Cells in a Novel Human IL-2-Producing Transgenic NOG Mouse." *The Journal of Immunology* 194 (7): 3513–25.
- Kataoka, S., J. Satoh, H. Fujiya, T. Toyota, R. Suzuki, K. Itoh, and K. Kumagai. 1983. "Immunologic Aspects of the Nonobese Diabetic (NOD) Mouse. Abnormalities of Cellular Immunity." *Diabetes* 32 (3): 247–53.
- Kaufmann, Daniel E., Daniel G. Kavanagh, Florencia Pereyra, John J. Zaunders, Elizabeth W. Mackey, Toshiyuki Miura, Sarah Palmer, et al. 2007. "Upregulation of CTLA-4 by HIV-Specific CD4+ T Cells Correlates with Disease Progression and Defines a Reversible Immune Dysfunction." *Nature Immunology* 8 (11): 1246–54.
- Kaufmann, Daniel E., and Bruce D. Walker. 2009. "PD-1 and CTLA-4 Inhibitory Cosignaling Pathways in HIV Infection and the Potential for Therapeutic Intervention." *The Journal of Immunology* 182 (10): 5891–97.
- Kaufmann, G. R., H. Furrer, B. Ledergerber, L. Perrin, M. Opravil, P. Vernazza, M. Cavassini, et al. 2005. "Characteristics, Determinants, and Clinical Relevance of CD4 T Cell Recovery to <500 Cells/ L in HIV Type 1-Infected Individuals Receiving Potent Antiretroviral Therapy." *Clinical Infectious Diseases* 41 (3): 361–72.
- Kaufmann, Gilbert R., Philip Cunningham, Anthony D. Kelleher, John Zaunders, Andrew Carr,

- Jeanette Vizzard, Matthew Law, and David A. Cooper. 1998. "Patterns of Viral Dynamics during Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection." *The Journal of Infectious Diseases* 178 (6): 1812–15.
- Keele, B. F., L. Tazi, S. Gartner, Y. Liu, T. B. Burgon, J. D. Estes, T. C. Thacker, K. A. Crandall, J. C. McArthur, and G. F. Burton. 2008. "Characterization of the Follicular Dendritic Cell Reservoir of Human Immunodeficiency Virus Type 1." *Journal of Virology* 82 (11): 5548–61.
- Keele, Brandon F., Elena E. Giorgi, Jesus F. Salazar-Gonzalez, Julie M. Decker, Kimmy T. Pham, Maria G. Salazar, Chuanxi Sun, et al. 2008. "Identification and Characterization of Transmitted and Early Founder Virus Envelopes in Primary HIV-1 Infection." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (21): 7552–57.
- Kelly, Jeremy, Margaret H Beddall, Dongyang Yu, Subashini R Iyer, Jon W Marsh, and Yuntao Wu. 2008. "Human Macrophages Support Persistent Transcription from Unintegrated HIV-1 DNA." *Virology* 372 (2): 300–312.
- Keystone, Edward C., Peter C. Taylor, Edit Drescher, Douglas E. Schlichting, Scott D. Beattie, Pierre Yves Berclaz, Chin H. Lee, et al. 2015. "Safety and Efficacy of Baricitinib at 24 Weeks in Patients with Rheumatoid Arthritis Who Have Had an Inadequate Response to Methotrexate." *Annals of the Rheumatic Diseases* 74 (2): 333–40.
- Khoury, Gabriela, Rémi Fromentin, Ajantha Solomon, Wendy Hartogensis, Marisela Killian, Rebecca Hoh, Ma Somsouk, et al. 2017. "Human Immunodeficiency Virus Persistence and T-Cell Activation in Blood, Rectal, and Lymph Node Tissue in Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals Receiving Suppressive Antiretroviral Therapy." *The Journal of Infectious Diseases* 215 (6): 911–19.
- Killian, M. Scott, Sue H. Fujimura, Frederick M. Hecht, and Jay A. Levy. 2006. "Similar Changes in Plasmacytoid Dendritic Cell and CD4 T-Cell Counts during Primary HIV-1 Infection and Treatment." *AIDS* 20 (9): 1247–52.
- Kim, Jiae, Kristina K. Peachman, Ousman Jobe, Elaine B. Morrison, Atef Allam, Linda Jagodzinski, Sofia A. Casares, and Mangala Rao. 2017. "Tracking Human Immunodeficiency Virus-1 Infection in the Humanized DRAG Mouse Model." *Frontiers in Immunology* 8 (OCT).
- Kim, Kang Chang, Byeong Sun Choi, Kyung Chang Kim, Ki Hoon Park, Hee Jung Lee, Young Keol Cho, Sang Il Kim, Sung Soon Kim, Yu Kyoung Oh, and Young Bong Kim. 2016. "A Simple Mouse Model for the Study of Human Immunodeficiency Virus." *AIDS Research and Human Retroviruses* 32 (2): 194–202.
- King, M A et al. 2009. "Human Peripheral Blood Leucocyte Non-Obese Diabetic-Severe Combined Immunodeficiency Interleukin-2 Receptor Gamma Chain Gene Mouse Model of Xenogeneic Graft-Versus-Host-Like Disease and the Role of Host Major Histocompatibility Complex." *Clin Exp Immunol* 157 (1): 104–18.
- King, Marie, Todd Pearson, Leonard D Shultz, Jean Leif, Rita Bottino, Massimo Trucco, Mark A Atkinson, et al. 2008. "A New Hu-PBL Model for the Study of Human Islet Alloreactivity Based on NOD-Scid Mice Bearing a Targeted Mutation in the IL-2 Receptor Gamma Chain Gene." *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 126 (3): 303–14.
- Kirchhoff, Frank, and Guido Silvestri. 2008. "Is Nef the Elusive Cause of HIV-Associated Hematopoietic Dysfunction?" *The Journal of Clinical Investigation* 118 (5): 1622–25.
- Kirkland, James L., and Tamara Tchkonina. 2015. "Clinical Strategies and Animal Models for Developing Senolytic Agents." *Experimental Gerontology* 68 (August): 19–25.
- Kitchen, Scott G, Bernard R Levin, Gregory Bristol, Valerie Rezek, Sohn Kim, Christian Aguilera-Sandoval, Arumugam Balamurugan, Otto O Yang, and Jerome A Zack. 2012. "In Vivo Suppression of HIV by Antigen Specific T Cells Derived from Engineered

- Hematopoietic Stem Cells.” *PLoS Pathogens* 8 (4): e1002649.
- Klatt, N. R., L. A. Canary, T. H. Vanderford, C. L. Vinton, J. C. Engram, R. M. Dunham, H. E. Cronise, et al. 2012. “Dynamics of Simian Immunodeficiency Virus SIVmac239 Infection in Pigtail Macaques.” *Journal of Virology* 86 (2): 1203–13.
- Klatzmann, D, E Champagne, S Chamaret, J Gruet, D Guetard, T Hercend, J C Gluckman, and L Montagnier. 1984. “T-Lymphocyte T4 Molecule Behaves as the Receptor for Human Retrovirus LAV.” *Nature* 312 (5996): 767–68.
- Klein, Florian, Ariel Halper-Stromberg, Joshua A. Horwitz, Henning Gruell, Johannes F. Scheid, Stylianos Bournazos, Hugo Mouquet, et al. 2012. “HIV Therapy by a Combination of Broadly Neutralizing Antibodies in Humanized Mice.” *Nature*. Nature.
- Knibbe-Hollinger, Jaclyn S., Natasha R. Fields, Tammy R. Chaudoin, Adrian A. Epstein, Edward Makarov, Sidra P. Akhter, Santhi Gorantla, Stephen J. Bonasera, Howard E. Gendelman, and Larisa Y. Poluektova. 2015. “Influence of Age, Irradiation and Humanization on NSG Mouse Phenotypes.” *Biology Open* 4 (10): 1243–52.
- Kordelas, Lambros, Jens Verheyen, and Stefan Esser. 2014. “Shift of HIV Tropism in Stem-Cell Transplantation with CCR5 Delta32 Mutation.” *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society.
- Kornfeld, Christopher, Mickaël J-Y Ploquin, Ivona Pandrea, Abdourahmane Faye, Richard Onanga, Cristian Apetrei, Virginie Poaty-Mavoungou, et al. 2005. “Antiinflammatory Profiles during Primary SIV Infection in African Green Monkeys Are Associated with Protection against AIDS.” *The Journal of Clinical Investigation* 115 (4): 1082–91.
- Koup, R A, J T Safrin, Y Cao, C A Andrews, G McLeod, W Borkowsky, C Farthing, and D D Ho. 1994. “Temporal Association of Cellular Immune Responses with the Initial Control of Viremia in Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Syndrome.” *Journal of Virology* 68 (7): 4650–55.
- Kremer, Joel M., Bradley J. Bloom, Ferdinand C. Breedveld, John H. Coombs, Mark P. Fletcher, David Gruben, Sriram Krishnaswami, et al. 2009. “The Safety and Efficacy of a JAK Inhibitor in Patients with Active Rheumatoid Arthritis: Results of a Double-Blind, Placebo-Controlled Phase IIa Trial of Three Dosage Levels of CP-690,550 versus Placebo.” *Arthritis and Rheumatism* 60 (7): 1895–1905.
- Kruize, Zita, and Neeltje A. Kootstra. 2019. “The Role of Macrophages in HIV-1 Persistence and Pathogenesis.” *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.
- Kulpa, Deanna A, and Nicolas Chomont. 2015. “HIV Persistence in the Setting of Antiretroviral Therapy: When, Where and How Does HIV Hide?” *Journal of Virus Eradication* 1 (2): 59–66.
- Kuri-Cervantes, Leticia, Gonzalo Salgado-Montes de Oca, Santiago Ávila-Ríos, Ramón Hernández-Juan, and Gustavo Reyes-Terán. 2014. “Activation of NK Cells Is Associated with HIV-1 Disease Progression.” *Journal of Leukocyte Biology* 96 (1): 7–16.
- Kwong, Lai Shan, Marion H. Brown, A. Neil Barclay, and Deborah Hatherley. 2014. “Signal-Regulatory Protein α from the NOD Mouse Binds Human CD47 with an Exceptionally High Affinity - Implications for Engraftment of Human Cells.” *Immunology* 143 (1): 61–67.
- La Rochere, Philippe De, Silvia Guil-Luna, Didier Decaudin, Georges Azar, Sukhvinder S. Sidhu, and Eliane Piaggio. 2018. “Humanized Mice for the Study of Immuno-Oncology.” *Trends in Immunology*. Elsevier Ltd.
- Labarthe, Laura, Soledad Henriquez, Olivier Lambotte, James P. Di Santo, Roger Le Grand, Françoise Pflumio, Marie Laure Arcangeli, Nicolas Legrand, and Christine Bourgeois. 2020. “Frontline Science: Exhaustion and Senescence Marker Profiles on Human T Cells in BRGSF-A2 Humanized Mice Resemble Those in Human Samples.” *Journal of Leukocyte Biology* 107 (1): 27–42.

- Ladell, Kristin, Marc K. Hellerstein, Denise Cesar, Robert Busch, Drina Boban, and Joseph M. McCune. 2008. "Central Memory CD8 + T Cells Appear to Have a Shorter Lifespan and Reduced Abundance as a Function of HIV Disease Progression ." *The Journal of Immunology* 180 (12): 7907–18.
- Laforge, Mireille, Ricardo Silvestre, Vasco Rodrigues, Julie Garibal, Laure Campillo-Gimenez, Shahul Mouhamad, Valérie Monceaux, et al. 2018. "The Anti-Caspase Inhibitor Q-VD-OPH Prevents AIDS Disease Progression in SIV-Infected Rhesus Macaques." *Journal of Clinical Investigation* 128 (4): 1627–40.
- Lambotte, Olivier, Marie Laure Chaix, Brigitte Gubler, Nadine Nasreddine, Christine Wallon, Cécile Goujard, Christine Rouzioux, Yassine Taoufik, and Jean François Delfraissy. 2004. "The Lymphocyte HIV Reservoir in Patients on Long-Term HAART Is a Memory of Virus Evolution." *AIDS* 18 (8): 1147–58.
- Lan, Ping, Noriko Tonomura, Akira Shimizu, Shumei Wang, and Yong Guang Yang. 2006. "Reconstitution of a Functional Human Immune System in Immunodeficient Mice through Combined Human Fetal Thymus/Liver and CD34+ Cell Transplantation." *Blood* 108 (2): 487–92.
- Lang, Julie, Margot Kelly, Brian M. Freed, Martin D. McCarter, Ross M. Kedl, Raul M. Torres, and Roberta Pelanda. 2013. "Studies of Lymphocyte Reconstitution in a Humanized Mouse Model Reveal a Requirement of T Cells for Human B Cell Maturation." *The Journal of Immunology* 190 (5): 2090–2101.
- Lang, Sylvie, Murielle Mary-Krause, Anne Simon, Marialuisa Partisani, Jacques Gilquin, Laurent Cotte, Franck Boccara, Dominique Costagliola, and French Hospital Database on HIV (FHDH)–ANRS CO4. 2012. "HIV Replication and Immune Status Are Independent Predictors of the Risk of Myocardial Infarction in HIV-Infected Individuals." *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 55 (4): 600–607.
- Langebeek, Nienke, Katherine W. Kooij, Ferdinand W. Wit, Ineke G. Stolte, Mirjam A.G. Sprangers, Peter Reiss, Pythia T. Nieuwkerk, et al. 2017. "Impact of Comorbidity and Ageing on Health-Related Quality of Life in HIV-Positive and HIV-Negative Individuals." *AIDS* 31 (10): 1471–81.
- Langford, Simone E., Jintanat Ananworanich, and David A. Cooper. 2007. "Predictors of Disease Progression in HIV Infection: A Review." *AIDS Research and Therapy*.
- Lapidot, Tsvee, Françoise Pflumio, Monica Doedens, Barbara Murdoch, Douglas E. Williams, and John E. Dick. 1992. "Cytokine Stimulation of Multilineage Hematopoiesis from Immature Human Cells Engrafted in SCID Mice." *Science* 255 (5048): 1137–41.
- Larder, Brendan A., Graham Darby, and Douglas D. Richman. 1989. "HIV with Reduced Sensitivity to Zidovudine (AZT) Isolated during Prolonged Therapy." *Science* 243 (4899): 1731–34.
- Larkin, J., V. Chiarion-Sileni, R. Gonzalez, J. J. Grob, C. L. Cowey, C. D. Lao, D. Schadendorf, et al. 2015. "Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma." *New England Journal of Medicine* 373 (1): 23–34.
- Laskey, Sarah B, and Robert F Siliciano. 2014. "A Mechanistic Theory to Explain the Efficacy of Antiretroviral Therapy." *Nature Reviews. Microbiology* 12 (11): 772–80.
- Lavender, Kerry J., Kathrin Gibbert, Karin E. Peterson, Erik Van Dis, Sandra Francois, Tyson Woods, Ronald J. Messer, et al. 2016. "Interferon Alpha Subtype-Specific Suppression of HIV-1 Infection In Vivo ." *Journal of Virology* 90 (13): 6001–13.
- Lavender, Kerry J., Craig Pace, Kathrin Sutter, Ronald J. Messer, Dakota L. Pouncey, Nathan W. Cummins, Sekar Natesampillai, et al. 2018. "An Advanced BLT-Humanized Mouse Model for Extended HIV-1 Cure Studies." *AIDS* 32 (1): 1–10.
- Lavender, Kerry J., Wendy W. Pang, Ronald J. Messer, Amanda K. Duley, Brent Race, Katie

- Phillips, Dana Scott, et al. 2013. "BLT-Humanized C57BL/6 Rag2-/- Γ c-/-CD47-/- Mice Are Resistant to GVHD and Develop B- and T-Cell Immunity to HIV Infection." *Blood* 122 (25): 4013–20.
- Lederer, Sharon, David Favre, Kathie Anne Walters, Sean Proll, Bittoo Kanwar, Zeljka Kasakow, Carole R. Baskin, Robert Palermo, Joseph M. McCune, and Michael G. Katze. 2009. "Transcriptional Profiling in Pathogenic and Non-Pathogenic SIV Infections Reveals Significant Distinctions in Kinetics and Tissue Compartmentalization." *PLoS Pathogens* 5 (2).
- Ledergerber, B., H. Furrer, M. Rickenbach, R. Lehmann, L. Elzi, B. Hirschel, M. Cavassini, et al. 2007. "Factors Associated with the Incidence of Type 2 Diabetes Mellitus in HIV-Infected Participants in the Swiss HIV Cohort Study." *Clinical Infectious Diseases* 45 (1): 111–19.
- Lederman, Michael M., Nicholas T. Funderburg, Rafick P. Sekaly, Nichole R. Klatt, and Peter W. Hunt. 2013. "Residual Immune Dysregulation Syndrome in Treated HIV Infection." In *Advances in Immunology*, 119:51–83. Academic Press Inc.
- Lee, Eun Bong, Roy Fleischmann, Stephen Hall, Bethanie Wilkinson, John D. Bradley, David Gruben, Tamas Koncz, et al. 2014. "Tofacitinib versus Methotrexate in Rheumatoid Arthritis." *New England Journal of Medicine* 370 (25): 2377–86.
- Legendre, C, M Raphael, G Gras, E A Lefevre, J Feuillard, D Dormont, and Y Richard. 1998. "CD80 Expression Is Decreased in Hyperplastic Lymph Nodes of HIV+ Patients." *International Immunology* 10 (12): 1847–51.
- Leghmari, Kaoutar, Yamina Bennasser, and Elmostafa Bahraoui. 2008. "HIV-1 Tat Protein Induces IL-10 Production in Monocytes by Classical and Alternative NF- κ B Pathways." *European Journal of Cell Biology* 87 (12): 947–62.
- Legrand, Nicolas, Nicholas D. Huntington, Maho Nagasawa, Arjen Q. Bakker, Remko Schotte, Hélène Strick-Marchand, Sandra J. De Geus, et al. 2011. "Functional CD47/Signal Regulatory Protein Alpha (SIRP α) Interaction Is Required for Optimal Human T- and Natural Killer- (NK) Cell Homeostasis in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (32): 13224–29.
- Legrand, Nicolas, Kees Weijer, and Hergen Spits. 2006. "Experimental Models to Study Development and Function of the Human Immune System In Vivo." *The Journal of Immunology* 176 (4): 2053–58.
- Lehmann, Clara, Mark Lafferty, Alfredo Garzino-Demo, Norma Jung, Pia Hartmann, Gerd Fätkenheuer, Jeffrey S. Wolf, Jan van Lunzen, and Fabio Romerio. 2010. "Plasmacytoid Dendritic Cells Accumulate and Secrete Interferon Alpha in Lymph Nodes of HIV-1 Patients." *PLoS ONE* 5 (6).
- Lemaitre, Julien, Antonio Cosma, Delphine Desjardins, Olivier Lambotte, and Roger Le Grand. 2020. "Mass Cytometry Reveals the Immaturity of Circulating Neutrophils during SIV Infection." *Journal of Innate Immunity* 12 (2): 170–81.
- Lemp, G F, S F Payne, D Neal, T Temelso, and G W Rutherford. 1990. "Survival Trends for Patients with AIDS." *JAMA* 263 (3): 402–6.
- Lepus, Christin M, Thomas F Gibson, Scott A Gerber, Ivana Kawikova, Marian Szczepanik, Jaber Hossain, Vitaly Ablamunits, et al. 2009. "Comparison of Human Fetal Liver, Umbilical Cord Blood, and Adult Blood Hematopoietic Stem Cell Engraftment in NOD-Scid/ Γ mac-/-, Balb/c-Rag1-/- Γ mac-/-, and C.B-17-Scid/B Γ Immunodeficient Mice." *Human Immunology* 70 (10): 790–802.
- Lewinski, Mary K., Masahiro Yamashita, Michael Emerman, Angela Ciuffi, Heather Marshall, Gregory Crawford, Francis Collins, et al. 2006. "Retroviral DNA Integration: Viral and Cellular Determinants of Target-Site Selection." *PLoS Pathogens* 2 (6): 0611–22.
- Li, Guangming, Menglan Cheng, Jun ichi Nunoya, Liang Cheng, Haitao Guo, Haisheng Yu,

- Yong jun Liu, Lishan Su, and Liguozhang. 2014. "Plasmacytoid Dendritic Cells Suppress HIV-1 Replication but Contribute to HIV-1 Induced Immunopathogenesis in Humanized Mice." *PLoS Pathogens* 10 (7).
- Li, Yan, Guillemette Masse-Ranson, Zacarias Garcia, Timothée Bruel, Ayrin Kök, Helene Strick-Marchand, Gregory Jouvion, et al. 2018. "A Human Immune System Mouse Model with Robust Lymph Node Development." *Nature Methods* 15 (8): 623–30.
- Li, Yan, Jean Jacques Mention, Nathalie Court, Guillemette Masse-Ranson, Antoine Toubert, Hergen Spits, Nicolas Legrand, Erwan Corcuff, Helene Strick-Marchand, and James P. Di Santo. 2016. "A Novel Flt3-Deficient HIS Mouse Model with Selective Enhancement of Human DC Development." *European Journal of Immunology* 46 (5): 1291–99.
- Li, Yang, Nato Teteloshvili, Shulian Tan, Samhita Rao, Arnold Han, Yong Guang Yang, and Rémi J. Creusot. 2019. "Humanized Mice Reveal New Insights into the Thymic Selection of Human Autoreactive CD8+ T Cells." *Frontiers in Immunology* 10 (FEB).
- Lichterfeld, Mathias, Daniel E. Kaufmann, Xu G. Yu, Stanley K. Mui, Marylyn M. Addo, Mary N. Johnston, Daniel Cohen, et al. 2004. "Loss of HIV-1-Specific CD8+ T Cell Proliferation after Acute HIV-1 Infection and Restoration by Vaccine-Induced HIV-1-Specific CD4 + T Cells." *Journal of Experimental Medicine* 200 (6): 701–12.
- Lim, So Yon, Christa E. Osuna, Peter T. Hraber, Joe Hesselgesser, Jeffrey M. Gerold, Tiffany L. Barnes, Srisowmya Sanisetty, et al. 2018. "TLR7 Agonists Induce Transient Viremia and Reduce the Viral Reservoir in SIV-Infected Rhesus Macaques on Antiretroviral Therapy." *Science Translational Medicine* 10 (439).
- Lindqvist, Madelene, Jan Van Lunzen, Damien Z. Soghoian, Bjorn D. Kuhl, Srinika Ranasinghe, Gregory Kranias, Michael D. Flanders, et al. 2012. "Expansion of HIV-Specific T Follicular Helper Cells in Chronic HIV Infection." *Journal of Clinical Investigation* 122 (9): 3271–80.
- Liovat, Anne-Sophie, Béatrice Jacquelin, Mickaël J Ploquin, Françoise Barré-Sinoussi, and Michaela C Müller-Trutwin. 2009. "African Non Human Primates Infected by SIV - Why Don't They Get Sick? Lessons from Studies on the Early Phase of Non-Pathogenic SIV Infection." *Current HIV Research* 7 (1): 39–50.
- Liovat, Anne Sophie, Marie Anne Rey-Cuillé, Camille Lécuroux, Béatrice Jacquelin, Isabelle Girault, Gaël Petitjean, Yasmine Zitoun, et al. 2012. "Acute Plasma Biomarkers of T Cell Activation Set-Point Levels and of Disease Progression in HIV-1 Infection." *PLoS ONE* 7 (10).
- Little, Susan J., Angela R. McLean, Celsa A. Spina, Douglas D. Richman, and Diane V. Havlir. 1999. "Viral Dynamics of Acute HIV-1 Infection." *Journal of Experimental Medicine* 190 (6): 841–50.
- Liu, Yong-Jun. 2005. "IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors." *Annual Review of Immunology* 23 (1): 275–306.
- Llewellyn, George N., Eduardo Seclén, Stephen Wietgreffe, Siyu Liu, Morgan Chateau, Hua Pei, Katherine Perkey, et al. 2019. "Humanized Mouse Model of HIV-1 Latency with Enrichment of Latent Virus in PD-1 + and TIGIT + CD4 T Cells ." *Journal of Virology* 93 (10).
- Llibre, Josep M., Chien Ching Hung, Cynthia Brinson, Francesco Castelli, Pierre Marie Girard, Lesley P. Kahl, Elizabeth A. Blair, et al. 2018. "Efficacy, Safety, and Tolerability of Dolutegravir-Rilpivirine for the Maintenance of Virological Suppression in Adults with HIV-1: Phase 3, Randomised, Non-Inferiority SWORD-1 and SWORD-2 Studies." *The Lancet* 391 (10123): 839–49.
- Long, B. R., and C. A. Stoddart. 2012. "Alpha Interferon and HIV Infection Cause Activation of Human T Cells in NSG-BLT Mice." *Journal of Virology* 86 (6): 3327–36.
- Lopez-Lastra, Silvia, Guillemette Masse-Ranson, Oriane Fiquet, Sylvie Darche, Nicolas

- Serafini, Yan Li, Mathilde Dusséaux, Helene Strick-Marchand, and James P. Di Santo. 2017. "A Functional DC Cross Talk Promotes Human ILC Homeostasis in Humanized Mice." *Blood Advances* 1 (10): 601–14.
- Lopker, M., J. Easlick, S. Sterrett, J. M. Decker, H. Barbian, G. Learn, B. F. Keele, et al. 2013. "Heterogeneity in Neutralization Sensitivities of Viruses Comprising the Simian Immunodeficiency Virus SIVsmE660 Isolate and Vaccine Challenge Stock." *Journal of Virology* 87 (10): 5477–92.
- Low, Andrea, Georgios Gavriilidis, Natasha Larke, Marie-Renee B-Lajoie, Olivier Drouin, John Stover, Lulu Muhe, and Philippa Easterbrook. 2016. "Incidence of Opportunistic Infections and the Impact of Antiretroviral Therapy Among HIV-Infected Adults in Low- and Middle-Income Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Clinical Infectious Diseases* 62 (12): 1595–1603.
- Lu, Wei, Vikram Mehraj, Kishanda Vyboh, Wei Cao, Taisheng Li, and Jean Pierre Routy. 2015. "CD4:CD8 Ratio as a Frontier Marker for Clinical Outcome, Immune Dysfunction and Viral Reservoir Size in Virologically Suppressed HIV-Positive Patients." *Journal of the International AIDS Society*. International AIDS Society.
- Lubong Sabado, Rachel, Meagan O'Brien, Abhignya Subedi, Li Qin, Nan Hu, Elizabeth Taylor, Oliver Dibben, et al. 2010. "Evidence of Dysregulation of Dendritic Cells in Primary HIV Infection." *Blood* 116 (19): 3839–52.
- Lute, Kenneth D., Kenneth F. May, Ping Lu, Huiming Zhang, Ergun Kocak, Bedrick Mosinger, Christopher Wolford, et al. 2005. "Human CTLA4 Knock-in Mice Unravel the Quantitative Link between Tumor Immunity and Autoimmunity Induced by Anti-CTLA-4 Antibodies." *Blood* 106 (9): 3127–33.
- Ma, Shi Dong, Xuequn Xu, Richard Jones, Henri Jacques Delecluse, Nicholas A. Zumwalde, Akshat Sharma, Jenny E. Gumperz, and Shannon C. Kenney. 2016. "PD-1/CTLA-4 Blockade Inhibits Epstein-Barr Virus-Induced Lymphoma Growth in a Cord Blood Humanized-Mouse Model." *PLoS Pathogens* 12 (5).
- Maartens, Gary, Connie Celum, and Sharon R. Lewin. 2014. "HIV Infection: Epidemiology, Pathogenesis, Treatment, and Prevention." In *The Lancet*, 384:258–71. Lancet Publishing Group.
- Maciel, Rafael Aguiar, Helena Moreira Klück, Madeleine Durand, and Eduardo Sprinz. 2018. "Comorbidity Is More Common and Occurs Earlier in Persons Living with HIV than in HIV-Uninfected Matched Controls, Aged 50 Years and Older: A Cross-Sectional Study." *International Journal of Infectious Diseases* 70 (May): 30–35.
- Majji, Sai, Wathsala Wijayalath, Soumya Shashikumar, Luis Pow-Sang, Eileen Villasante, Teodor D. Brumeanu, and Sofia Casares. 2016. "Differential Effect of HLA Class-I versus Class-II Transgenes on Human T and B Cell Reconstitution and Function in NRG Mice." *Scientific Reports* 6 (June).
- Malleret, Benoît, Benjamin Manéglier, Ingrid Karlsson, Pierre Lebon, Michelina Nascimbeni, Leïla Perié, Patricia Brochard, et al. 2008. "Primary Infection with Simian Immunodeficiency Virus: Plasmacytoid Dendritic Cell Homing to Lymph Nodes, Type I Interferon, and Immune Suppression." *Blood* 112 (12): 4598–4608.
- Man, Kevin, Sarah S. Gabriel, Yang Liao, Renee Gloury, Simon Preston, Darren C. Henstridge, Marc Pellegrini, et al. 2017. "Transcription Factor IRF4 Promotes CD8+ T Cell Exhaustion and Limits the Development of Memory-like T Cells during Chronic Infection." *Immunity* 47 (6): 1129-1141.e5.
- Manches, Olivier, Davor Frleta, and Nina Bhardwaj. 2014. "Dendritic Cells in Progression and Pathology of HIV Infection." *Trends in Immunology*. Trends Immunol.
- Manz, Markus G. 2007. "Human-Hemato-Lymphoid-System Mice: Opportunities and Challenges." *Immunity*. Cell Press.

- Marcolino, Isabel, Grzegorz K. Przybylski, Marie Koschella, Christian A. Schmidt, David Voehringer, Michael Schlesier, and Hanspeter Pircher. 2004. "Frequent Expression of the Natural Killer Cell Receptor KLRG1 in Human Cord Blood T Cells: Correlation with Replicative History." *European Journal of Immunology* 34 (10): 2672–80.
- Marle, Guido van, M. John Gill, Dione Kolodka, Leah McManus, Tannika Grant, and Deirdre L. Church. 2007. "Compartmentalization of the Gut Viral Reservoir in HIV-1 Infected Patients." *Retrovirology* 4 (December).
- Marsden, M. D., M. Kovochich, N. Suree, S. Shimizu, R. Mehta, R. Cortado, G. Bristol, D. S. An, and J. A. Zack. 2012. "HIV Latency in the Humanized BLT Mouse." *Journal of Virology* 86 (1): 339–47.
- Martin, Genevieve E., Matthew Pace, John P. Thornhill, Chansavath Phetsouphanh, Jodi Meyerowitz, Morgane Gossez, Helen Brown, et al. 2018. "CD32-Expressing CD4 T Cells Are Phenotypically Diverse and Can Contain Proviral HIV DNA." *Frontiers in Immunology* 9 (MAY).
- Martinez-Torres, Francisco, Tomonori Nochi, Angela Wahl, J Victor Garcia, and Paul W Denton. 2014. "Hypogammaglobulinemia in BLT Humanized Mice--an Animal Model of Primary Antibody Deficiency." *PLoS One* 9 (10): e108663.
- Martinot, Amanda J., Mareike Meythaler, Lu Ann Pozzi, Karen Dalecki Boisvert, Heather Knight, Dennis Walsh, Susan Westmoreland, Daniel C. Anderson, Amitinder Kaur, and Shawn P. O'Neil. 2013. "Acute SIV Infection in Sooty Mangabey Monkeys Is Characterized by Rapid Virus Clearance from Lymph Nodes and Absence of Productive Infection in Germinal Centers." *PLoS ONE* 8 (3).
- Masse-Ranson, Guillemette, Mathilde Dusséaux, Oriane Fiquet, Sylvie Darche, Maud Boussand, Yan Li, Silvia Lopez-Lastra, et al. 2019. "Accelerated Thymopoiesis and Improved T-Cell Responses in HLA-A2/-DR2 Transgenic BRGS-Based Human Immune System Mice." *European Journal of Immunology* 49 (6): 954–65.
- Matano, Tetsuro, Riri Shibata, Christine Siemon, Mark Connors, H. Clifford Lane, and Malcolm A. Martin. 1998. "Administration of an Anti-CD8 Monoclonal Antibody Interferes with the Clearance of Chimeric Simian/Human Immunodeficiency Virus during Primary Infections of Rhesus Macaques." *Journal of Virology* 72 (1): 164–69.
- Mattapallil, Joseph J, Daniel C Douek, Brenna Hill, Yoshiaki Nishimura, Malcolm Martin, and Mario Roederer. 2005. "Massive Infection and Loss of Memory CD4+ T Cells in Multiple Tissues during Acute SIV Infection." *Nature* 434 (7037): 1093–97.
- Mavilio, Domenico, Janet Benjamin, Marybeth Daucher, Gabriella Lombardo, Shyam Kottlil, Marie A. Planta, Emanuela Marcenaro, et al. 2003. "Natural Killer Cells in HIV-1 Infection: Dichotomous Effects of Viremia on Inhibitory and Activating Receptors and Their Functional Correlates." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (25): 15011–16.
- Mavilio, Domenico, Gabriella Lombardo, Janet Benjamin, Diana Kim, Dean Follman, Emanuela Marcenaro, M. Angeline O'Shea, et al. 2005. "Characterization of CD56-/CD16+ Natural Killer (NK) Cells: A Highly Dysfunctional NK Subset Expanded in HIV-Infected Viremic Individuals." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (8): 2886–91.
- McComsey, Grace A., Carlee Moser, Judith Currier, Heather J. Ribaud, Pawel Paczuski, Michael P. Dubé, Theodoros Kelesidis, Jennifer Rothenberg, James H. Stein, and Todd T. Brown. 2016. "Body Composition Changes after Initiation of Raltegravir or Protease Inhibitors: ACTG A5260s." *Clinical Infectious Diseases* 62 (7): 853–62.
- McCune, J., H. Kaneshima, J. Krowka, R. Namikawa, H. Outzen, B. Peault, L. Rabin, et al. 1991. "The SCID-Hu MOUSE: A Small Animal Model for HIV Infection and Pathogenesis." *Annual Review of Immunology*. Annu Rev Immunol.

- McCune, J. M. 2001. "The Dynamics of CD4+ T-Cell Depletion in HIV Disease." *Nature*.
Nature.
- McCune, J. M., R. Namikawa, H. Kaneshima, L. D. Shultz, M. Lieberman, and I. L. Weissman. 1988. "The SCID-Hu Mouse: Murine Model for the Analysis of Human Hematolymphoid Differentiation and Function." *Science* 241 (4873): 1632–39.
- McCune, Joseph M., Reiko Namikawa, Chu Chih Shih, Linda Rabin, and Hideto Kaneshima. 1990. "Suppression of HIV Infection in AZT-Treated SCID-Hu Mice." *Science* 247 (4942): 564–66.
- McDermott, Sean P., Kolja Eppert, Eric R. Lechman, Monica Doedens, and John E. Dick. 2010. "Comparison of Human Cord Blood Engraftment between Immunocompromised Mouse Strains." *Blood* 116 (2): 193–200.
- McElrath, M. J., K. Smythe, J. Randolph-Habecker, K. R. Melton, T. A. Goodpaster, S. M. Hughes, M. MacK, et al. 2013. "Comprehensive Assessment of HIV Target Cells in the Distal Human Gut Suggests Increasing HIV Susceptibility toward the Anus." *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 63 (3): 263–71.
- McGary, Colleen S., Claire Deleage, Justin Harper, Luca Micci, Susan P. Ribeiro, Sara Paganini, Leticia Kuri-Cervantes, et al. 2017. "CTLA-4+PD-1– Memory CD4+ T Cells Critically Contribute to Viral Persistence in Antiretroviral Therapy-Suppressed, SIV-Infected Rhesus Macaques." *Immunity* 47 (4): 776–788.e5.
- McIntosh, Brian E., Matthew E. Brown, Bret M. Duffin, John P. Maufort, David T. Vereide, Igor I. Slukvin, and James A. Thomson. 2015. "Nonirradiated NOD.B6.SCID Il2ry^{-/-}KitW41/W41 (NBSGW) Mice Support Multilineage Engraftment of Human Hematopoietic Cells." *Stem Cell Reports* 4 (2): 171–80.
- McMichael, Andrew J., Persephone Borrow, Georgia D. Tomaras, Nilu Goonetilleke, and Barton F. Haynes. 2010. "The Immune Response during Acute HIV-1 Infection: Clues for Vaccine Development." *Nature Reviews Immunology*.
- Mehandru, Saurabh, Michael A. Poles, Klara Tenner-Racz, Amir Horowitz, Arlene Hurley, Christine Hogan, Daniel Boden, Paul Racz, and Martin Markowitz. 2004. "Primary HIV-1 Infection Is Associated with Preferential Depletion of CD4+ T Lymphocytes from Effector Sites in the Gastrointestinal Tract." *Journal of Experimental Medicine* 200 (6): 761–70.
- Meier, Angela, Aranya Bagchi, Harlyn K. Sidhu, Galit Alter, Todd J. Suscovich, Daniel G. Kavanagh, Hendrik Streeck, et al. 2008. "Upregulation of PD-L1 on Monocytes and Dendritic Cells by HIV-1 Derived TLR Ligands." *AIDS* 22 (5): 655–58.
- Mela, Christopher M., Catherine T. Burton, Nesrina Imami, Mark Nelson, Alan Steel, Brian G. Gazzard, Frances M. Gotch, and Martin R. Goodier. 2005. "Switch from Inhibitory to Activating NKG2 Receptor Expression in HIV-1 Infection: Lack of Reversion with Highly Active Antiretroviral Therapy." *AIDS* 19 (16): 1761–69.
- Melichar, Heather J., Jenny O. Ross, Kayleigh T. Taylor, and Ellen A. Robey. 2015. "Stable Interactions and Sustained TCR Signaling Characterize Thymocyte–Thymocyte Interactions That Support Negative Selection." *The Journal of Immunology* 194 (3): 1057–61.
- Melkus, Michael W, Jacob D Estes, Angela Padgett-Thomas, Joel Gatlin, Paul W Denton, Florence A Othieno, Anja K Wege, Ashley T Haase, and J Victor Garcia. 2006. "Humanized Mice Mount Specific Adaptive and Innate Immune Responses to EBV and TSST-1." *Nature Medicine* 12 (11): 1316–22.
- Mellman, Ira, George Coukos, and Glenn Dranoff. 2011. "Cancer Immunotherapy Comes of Age." *Nature*. Nature Publishing Group.
- Michailidis, C., G. Giannopoulos, V. Vigklis, K. Armenis, A. Tsakris, and P. Gargalianos. 2012. "Impaired Phagocytosis among Patients Infected by the Human Immunodeficiency

- Virus: Implication for a Role of Highly Active Anti-Retroviral Therapy.” *Clinical and Experimental Immunology* 167 (3): 499–504.
- Migueles, Stephen A., Christine M. Osborne, Cassandra Royce, Alex A. Compton, Rohan P. Joshi, Kristin A. Weeks, Julia E. Rood, et al. 2008. “Lytic Granule Loading of CD8+ T Cells Is Required for HIV-Infected Cell Elimination Associated with Immune Control.” *Immunity* 29 (6): 1009–21.
- Miller, C. J., M. Genesca, K. Abel, D. Montefiori, D. Forthal, K. Bost, J. Li, D. Favre, and J. M. McCune. 2007. “Antiviral Antibodies Are Necessary for Control of Simian Immunodeficiency Virus Replication.” *Journal of Virology* 81 (10): 5024–35.
- Miller, Paul H., Alice M.S. Cheung, Philip A. Beer, David J.H.F. Knapp, Kiran Dhillon, Gabrielle Rabu, Shabnam Rostamirad, R. Keith Humphries, and Connie J. Eaves. 2013. “Enhanced Normal Short-Term Human Myelopoiesis in Mice Engineered to Express Human-Specific Myeloid Growth Factors.” *Blood* 121 (5).
- Minn, Andy J., and E. John Wherry. 2016. “Combination Cancer Therapies with Immune Checkpoint Blockade: Convergence on Interferon Signaling.” *Cell*. Cell Press.
- Moir, S, R Lapointe, A Malaspina, M Ostrowski, C E Cole, T W Chun, J Adelsberger, M Baseler, P Hwu, and A S Fauci. 1999. “CD40-Mediated Induction of CD4 and CXCR4 on B Lymphocytes Correlates with Restricted Susceptibility to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection: Potential Role of B Lymphocytes as a Viral Reservoir.” *Journal of Virology* 73 (10): 7972–80.
- Moir, Susan, and Anthony S. Fauci. 2009. “B Cells in HIV Infection and Disease.” *Nature Reviews Immunology*. Nat Rev Immunol.
- Molina-Pinelo, Sonia, Alejandro Vallejo, Laura Díaz, Natalia Soriano-Sarabia, Sara Ferrando-Martínez, Salvador Resino, María Angeles Muñoz-Fernández, and Manuel Leal. 2009. “Premature Immunosenescence in HIV-Infected Patients on Highly Active Antiretroviral Therapy with Low-Level CD4 T Cell Repopulation.” *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64 (3): 579–88.
- Mombaerts, Peter, John Iacomini, Randall S. Johnson, Karl Herrup, Susumu Tonegawa, and Virginia E. Papaioannou. 1992. “RAG-1-Deficient Mice Have No Mature B and T Lymphocytes.” *Cell* 68 (5): 869–77.
- Moore, David M., Robert S. Hogg, Benita Yip, Evan Wood, Mark Tyndall, Paula Braitstein, and Julio S.G. Montaner. 2005. “Discordant Immunologic and Virologic Responses to Highly Active Antiretroviral Therapy Are Associated with Increased Mortality and Poor Adherence to Therapy.” *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 40 (3): 288–93.
- Morlat, Philippe, Caroline Roussillon, Sandrine Henard, Dominique Salmon, Fabrice Bonnet, Patrice Cacoub, Aurore Georget, et al. 2014. “Causes of Death among HIV-Infected Patients in France in 2010 (National Survey).” *AIDS* 28 (8): 1181–91.
- Morrow, W. J., M. Wharton, D. Lau, and J. A. Levy. 1987. “Small Animals Are Not Susceptible to Human Immunodeficiency Virus Infection.” *Journal of General Virology* 68 (August): 2253–57.
- Mosier, Donald E., Richard J. Gulizia, Stephen M. Baird, and Darcy B. Wilson. 1988. “Transfer of a Functional Human Immune System to Mice with Severe Combined Immunodeficiency.” *Nature* 335 (6187): 256–59.
- Muñoz-Espín, Daniel, and Manuel Serrano. 2014. “Cellular Senescence: From Physiology to Pathology.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group.
- Myburgh, Renier, Sandra Ivic, Michael S. Pepper, Gustavo Gers-Huber, Duo Li, Annette Audigé, Mary-Aude Rochat, et al. 2015. “Lentivector Knockdown of CCR5 in Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Confers Functional and Persistent HIV-1 Resistance in Humanized Mice.” *Journal of Virology* 89 (13): 6761–72.

- Mylvaganam, Geetha H., Lynette S. Chea, Gregory K. Tharp, Sakeenah Hicks, Vijayakumar Velu, Smita S. Iyer, Claire Deleage, et al. 2018. "Combination Anti-PD-1 and Antiretroviral Therapy Provides Therapeutic Benefit against SIV." *JCI Insight* 3 (18).
- Nakamoto, Nobuhiro, Hyosun Cho, Abraham Shaked, Kim Olthoff, Mary E. Valiga, Mary Kaminski, Emma Gostick, et al. 2009. "Synergistic Reversal of Intrahepatic HCV-Specific CD8 T Cell Exhaustion by Combined PD-1/CTLA-4 Blockade." *PLoS Pathogens* 5 (2).
- Namikawa, Reiko, Katherine N. Weilbaecher, Hideto Kaneshima, Edwin J. Yee, and Joseph M. McCune. 1990. "Longterm Human Hematopoiesis in the SCID-Hu Mouse." *Journal of Experimental Medicine* 172 (4): 1055–63.
- Nascimbeni, Michelina, Leïla Perié, Laurent Chorro, Seckou Diocou, Louis Kreitmann, Stéphanie Louis, Laurent Garderet, et al. 2009. "Plasmacytoid Dendritic Cells Accumulate in Spleens from Chronically HIV-Infected Patients but Barely Participate in Interferon- α Expression." *Blood* 113 (24): 6112–19.
- Neff, Preston C., Thomas Ndolo, Apurva Tandon, Yuichiro Habu, and Ramesh Akkina. 2010. "Oral Pre-Exposure Prophylaxis by Anti-Retrovirals Raltegravir and Maraviroc Protects against HIV-1 Vaginal Transmission in a Humanized Mouse Model." *PLoS ONE* 5 (12).
- Neuhaus, Jacqueline, David R. Jacobs, Jr, Jason V. Baker, Alexandra Calmy, Daniel Duprez, Alberto La Rosa, Lewis H. Kuller, et al. 2010. "Markers of Inflammation, Coagulation, and Renal Function Are Elevated in Adults with HIV Infection." *The Journal of Infectious Diseases* 201 (12): 1788–95.
- Ng, Cherie T., Brian M. Sullivan, John R. Tejjaro, Andrew M. Lee, Megan Welch, Stephanie Rice, Kathleen C.F. Sheehan, Robert D. Schreiber, and Michael B.A. Oldstone. 2015. "Blockade of Interferon Beta, but Not Interferon Alpha, Signaling Controls Persistent Viral Infection." *Cell Host and Microbe* 17 (5): 653–61.
- Nganou-Makamdop, Krystelle, and Daniel C. Douek. 2019. "Manipulating the Interferon Signaling Pathway: Implications for HIV Infection." *Virologica Sinica*. Science Press.
- Nguyen, Thi Loan Anh, Sara Vieira-Silva, Adrian Liston, and Jeroen Raes. 2015. "How Informative Is the Mouse for Human Gut Microbiota Research?" *DMM Disease Models and Mechanisms* 8 (1): 1–16.
- Nie, Chuanyi, Kei Sato, Naoko Misawa, Hiroko Kitayama, Hisanori Fujino, Hidefumi Hiramatsu, Toshio Heike, et al. 2009. "Selective Infection of CD4+ Effector Memory T Lymphocytes Leads to Preferential Depletion of Memory T Lymphocytes in R5 HIV-1-Infected Humanized NOD/SCID/IL-2R γ null Mice." *Virology* 394 (1): 64–72.
- Nightingale, Sam, Alan Winston, Scott Letendre, Benedict D. Michael, Justin C. McArthur, Saye Khoo, and Tom Solomon. 2014. "Controversies in HIV-Associated Neurocognitive Disorders." *The Lancet Neurology*. Lancet Publishing Group.
- Nischang, Marc, Roger Suttmüller, Gustavo Gers-Huber, Annette Audigé, Duo Li, Mary Aude Rochat, Stefan Baenziger, et al. 2012. "Humanized Mice Recapitulate Key Features of HIV-1 Infection: A Novel Concept Using Long-Acting Anti-Retroviral Drugs for Treating HIV-1." *PLoS ONE* 7 (6).
- Nochi, Tomonori, Paul W Denton, Angela Wahl, and J Victor Garcia. 2013. "Cryptopatches Are Essential for the Development of Human GALT." *Cell Reports* 3 (6): 1874–84.
- Noel, Nicolas, Faroudy Boufassa, Camille Lécuroux, Asier Saez-Cirion, Christine Bourgeois, Catherine Dunyach-Remy, Cécile Goujard, et al. 2014. "Elevated IP10 Levels Are Associated with Immune Activation and Low CD4+ T-Cell Counts in HIV Controller Patients." *AIDS* 28 (4): 467–76.
- Norwood, Jamison, Megan Turner, Carmen Bofill, Peter Rebeiro, Bryan Shepherd, Sally Bebawy, Todd Hulgan, et al. 2017. "Brief Report: Weight Gain in Persons With HIV Switched From Efavirenz-Based to Integrase Strand Transfer Inhibitor-Based Regimens." *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)* 76 (5): 527–31.

- Notta, Faiyaz, Sergei Doulatov, and John E Dick. 2010. "Engraftment of Human Hematopoietic Stem Cells Is More Efficient in Female NOD/SCID/IL-2Rgc-Null Recipients." *Blood* 115 (18): 3704–7.
- Nou, Eric, Janet Lo, and Steven K. Grinspoon. 2016. "Inflammation, Immune Activation, and Cardiovascular Disease in HIV." *AIDS*. Lippincott Williams and Wilkins.
- O'Brien, Meagan, Olivier Manches, and Nina Bhardwaj. 2012. "Plasmacytoid Dendritic Cells in HIV Infection." In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 762:71–107. Adv Exp Med Biol.
- O'Brien, W. A. 1994. "HIV-1 Entry and Reverse Transcription in Macrophages." *Journal of Leukocyte Biology*. Federation of American Societies for Experimental Biology.
- Odorizzi, Pamela M., Kristen E. Pauken, Michael A. Paley, Arlene Sharpe, and E. John Wherry. 2015. "Genetic Absence of PD-1 Promotes Accumulation of Terminally Differentiated Exhausted CD8+ T Cells." *Journal of Experimental Medicine* 212 (7): 1125–37.
- Okoye, Afam A., and Louis J. Picker. 2013. "CD4+ T-Cell Depletion In Hiv Infection: Mechanisms Of Immunological Failure." *Immunological Reviews* 254 (1): 54–64.
- Ortiz, A. M., Z. A. Klase, S. R. DiNapoli, I. Vujkovic-Cvijin, K. Carmack, M. R. Perkins, N. Calantone, et al. 2016. "IL-21 and Probiotic Therapy Improve Th17 Frequencies, Microbial Translocation, and Microbiome in ARV-Treated, SIV-Infected Macaques." *Mucosal Immunology* 9 (2): 458–67.
- Otting, Nel, Corrine M.C. Heijmans, Riet C. Noort, Natasja G. De Groot, Gaby G.M. Doxiadis, Jon J. Van Rood, David I. Watkins, and Ronald E. Bontrop. 2005. "Unparalleled Complexity of the MHC Class I Region in Rhesus Macaques." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (5): 1626–31.
- Ouyang, Qin, Wolfgang M. Wagner, David Voehringer, Anders Wikby, Tatjana Klatt, Steffen Walter, Claudia A. Müller, Hanspeter Pircher, and Graham Pawelec. 2003. "Age-Associated Accumulation of CMV-Specific CD8+ T Cells Expressing the Inhibitory Killer Cell Lectin-like Receptor G1 (KLRG1)." *Experimental Gerontology* 38 (8): 911–20.
- Pace, Matthew J, Luis Agosto, Erin H Graf, and Una O'Doherty. 2011. "HIV Reservoirs and Latency Models." *Virology* 411 (2): 344–54.
- Paiardini, Mirko, Barbara Cervasi, Elane Reyes-Aviles, Luca Micci, Alexandra M. Ortiz, Ann Chahroudi, Carol Vinton, et al. 2011. "Low Levels of SIV Infection in Sooty Mangabey Central Memory CD4 + T Cells Are Associated with Limited CCR5 Expression." *Nature Medicine* 17 (7): 830–36.
- Paiardini, Mirko, and Michaela Müller-Trutwin. 2013. "HIV-Associated Chronic Immune Activation." *Immunological Reviews* 254 (1): 78–101.
- Pallikkuth, Suresh, Margaret A Fischl, and Savita Pahwa. 2013. "Combination Antiretroviral Therapy with Raltegravir Leads to Rapid Immunologic Reconstitution in Treatment-Naive Patients with Chronic HIV Infection." *The Journal of Infectious Diseases* 208 (10): 1613–23.
- Palmer, Brent E., C. Preston Neff, Jonathan LeCureux, Angelica Ehler, Michelle DSouza, Leila Remling-Mulder, Alan J. Korman, Andrew P. Fontenot, and Ramesh Akkina. 2013. "In Vivo Blockade of the PD-1 Receptor Suppresses HIV-1 Viral Loads and Improves CD4 + T Cell Levels in Humanized Mice ." *The Journal of Immunology* 190 (1): 211–19.
- Palmer, Christine D., Marisol Romero-Tejeda, Eileen P. Scully, Ainsley Lockhart, Michael S. Seaman, Ariel Goldenthal, Alicja Piechocka-Trocha, et al. 2016. "Increased Frequencies of CD8+CD57+ T Cells Are Associated with Antibody Neutralization Breadth against HIV in Viraemic Controllers." *Journal of the International AIDS Society* 19 (1).
- Pandrea, Ivona, Cristian Apetrei, Shari Gordon, Joseph Barbercheck, Jason Dufour, Rudolf Bohm, Beth Sumpter, et al. 2007. "Paucity of CD4+CCR5+ T Cells Is a Typical Feature of Natural SIV Hosts." *Blood* 109 (3): 1069–76.

- Pandrea, Ivona V., Rajeev Gautam, Ruy M. Ribeiro, Jason M. Brenchley, Isolde F. Butler, Melissa Pattison, Terri Rasmussen, et al. 2007. "Acute Loss of Intestinal CD4 + T Cells Is Not Predictive of Simian Immunodeficiency Virus Virulence ." *The Journal of Immunology* 179 (5): 3035–46.
- Pardoll, Drew M. 2012. "The Blockade of Immune Checkpoints in Cancer Immunotherapy." *Nature Reviews Cancer*. Nat Rev Cancer.
- Parkin, Neil T, and Jonathan M Schapiro. 2004. "Antiretroviral Drug Resistance in Non-Subtype B HIV-1, HIV-2 and SIV." *Antiviral Therapy* 9 (1): 3–12.
- Patsoukis, Nikolaos, Kankana Bardhan, Pranam Chatterjee, Duygu Sari, Bianling Liu, Lauren N. Bell, Edward D. Karoly, et al. 2015. "PD-1 Alters T-Cell Metabolic Reprogramming by Inhibiting Glycolysis and Promoting Lipolysis and Fatty Acid Oxidation." *Nature Communications* 6.
- Pauken, Kristen E., and E. John Wherry. 2015. "Overcoming T Cell Exhaustion in Infection and Cancer." *Trends in Immunology*. Elsevier Ltd.
- Pavert, Serge A. Van De, and Reina E. Mebius. 2010. "New Insights into the Development of Lymphoid Tissues." *Nature Reviews Immunology*. Nat Rev Immunol.
- Péault, B, I L Weissman, C Baum, J M McCune, and A Tsukamoto. 1991. "Lymphoid Reconstitution of the Human Fetal Thymus in SCID Mice with CD34+ Precursor Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 174 (5): 1283–86.
- Peñañiel, Judit, Elisa de Lazzari, Mireia Padilla, Jhon Rojas, Ana Gonzalez-Cordon, Jose L Blanco, Jordi Blanch, et al. 2017. "Tolerability of Integrase Inhibitors in a Real-Life Setting." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72 (6): 1752–59.
- Penton, Patricia K., and Jason T. Blackard. 2014. "Analysis of HIV Quasispecies Suggests Compartmentalization in the Liver." *AIDS Research and Human Retroviruses* 30 (4): 394–402.
- Pereira, L. E., F. Villinger, N. Onlamoon, P. Bryan, A. Cardona, K. Pattanapanyasat, K. Mori, S. Hagen, L. Picker, and A. A. Ansari. 2007. "Simian Immunodeficiency Virus (SIV) Infection Influences the Level and Function of Regulatory T Cells in SIV-Infected Rhesus Macaques but Not SIV-Infected Sooty Mangabeys." *Journal of Virology* 81 (9): 4445–56.
- Peretz, Yoav, Zhong He, Yu Shi, Bader Yassine-Diab, Jean Philippe Goulet, Rebeka Bordi, Ali Filali-Mouhim, et al. 2012. "CD160 and PD-1 Co-Expression on HIV-Specific CD8 T Cells Defines a Subset with Advanced Dysfunction." *PLoS Pathogens* 8 (8).
- Perno, C.-F., F. M. Newcomb, D. A. Davis, S. Aquaro, R. W. Humphrey, R. Calio, and R. Yarchoan. 1998. "Relative Potency of Protease Inhibitors in Monocytes/Macrophages Acutely and Chronically Infected with Human Immunodeficiency Virus." *Journal of Infectious Diseases* 178 (2): 413–22.
- Perreau, Matthieu, Anne Laure Savoye, Elisa De Crignis, Jean-Marc Corpataux, Rafael Cubas, Elias K. Haddad, Laurence De Leval, Cecilia Graziosi, and Giuseppe Pantaleo. 2013. "Follicular Helper T Cells Serve as the Major CD4 T Cell Compartment for HIV-1 Infection, Replication, and Production." *Journal of Experimental Medicine* 210 (1): 143–56.
- Petrini, John H.J., Ann M. Carroll, and Melvin J. Bosma. 1990. "T-Cell Receptor Gene Rearrangements in Functional T-Cell Clones from Severe Combined Immune Deficient (Scid) Mice: Reversion of the Scid Phenotype in Individual Lymphocyte Progenitors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (9): 3450–53.
- Petrovas, Constantinos, Joseph P. Casazza, Jason M. Brenchley, David A. Price, Emma Gostick, William C. Adams, Melissa L. Precopio, et al. 2006. "PD-1 Is a Regulator of Virus-Specific CD8+ T Cell Survival in HIV Infection." *Journal of Experimental Medicine* 203 (10): 2281–92.

- Petrovas, Constantinos, Yvonne M. Mueller, Ioannis D. Dimitriou, Susan R. Altork, Anupam Banerjee, Peter Sklar, Karam C. Mounzer, John D. Altman, and Peter D. Katsikis. 2007. "Increased Mitochondrial Mass Characterizes the Survival Defect of HIV-Specific CD8+ T Cells." *Blood* 109 (6): 2505–13.
- Pilcher, Christopher D., Joseph J. Eron, Shannon Galvin, Cynthia Gay, and Myron S. Cohen. 2004. "Acute HIV Revisited: New Opportunities for Treatment and Prevention." *Journal of Clinical Investigation*. The American Society for Clinical Investigation.
- Pilipow, Karolina, Alessandra Roberto, Mario Roederer, Thomas A. Waldmann, Domenico Mavilio, and Enrico Lugli. 2015. "IL15 and T-Cell Stemness in T-Cell-Based Cancer Immunotherapy." *Cancer Research*. American Association for Cancer Research Inc.
- Pitt, Jonathan M., Mari Vétizou, Romain Daillère, María Paula Roberti, Takahiro Yamazaki, Bertrand Routy, Patricia Lepage, et al. 2016. "Resistance Mechanisms to Immune-Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor-Intrinsic and -Extrinsic Factors." *Immunity*. Cell Press.
- Poles, Michael A., W. John Boscardin, Julie Elliott, Philip Taing, Marie M.P. Fuerst, Ian McGowan, Stephen Brown, and Peter A. Anton. 2006. "Lack of Decay of HIV-1 in Gut-Associated Lymphoid Tissue Reservoirs in Maximally Suppressed Individuals." *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 43 (1): 65–68.
- Pombo, Carolina, E John Wherry, Emma Gostick, David A Price, and Michael R Betts. 2015. "Elevated Expression of CD160 and 2B4 Defines a Cytolytic HIV-Specific CD8+ T-Cell Population in Elite Controllers." *The Journal of Infectious Diseases* 212 (9): 1376–86.
- Popov, Sergei, Agnès-Laurence Chenine, Andreas Gruber, Pei-Lin Li, and Ruth M Ruprecht. 2005. "Long-Term Productive Human Immunodeficiency Virus Infection of CD1a-Sorted Myeloid Dendritic Cells." *Journal of Virology* 79 (1): 602–8.
- Porichis, Filippos, Meghan G. Hart, Alexandra Massa, Holly L. Everett, Antigoni Morou, Jonathan Richard, Nathalie Brassard, et al. 2018. "Immune Checkpoint Blockade Restores HIV-Specific CD4 T Cell Help for NK Cells." *The Journal of Immunology* 201 (3): 971–81.
- Post, Frank A, Graeme J Moyle, Hans Jürgen Stellbrink, Pere Domingo, Daniel Podzamczar, Martin Fisher, Anthony G Norden, et al. 2010. "Randomized Comparison of Renal Effects, Efficacy, and Safety with Once-Daily Abacavir/Lamivudine versus Tenofovir/Emtricitabine, Administered with Efavirenz, in Antiretroviral-Naive, HIV-1-Infected Adults: 48-Week Results from the ASSERT Study." *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)* 55 (1): 49–57.
- Postow, Michael A. 2015. "Managing Immune Checkpoint-Blocking Antibody Side Effects." *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, no. 35 (May): 76–83.
- Potter, Simon J., Christine Lacabartz, Olivier Lambotte, Santiago Perez-Patrigeon, Benoît Vingert, Martine Sinet, Jean-Hervé Colle, et al. 2007. "Preserved Central Memory and Activated Effector Memory CD4+ T-Cell Subsets in Human Immunodeficiency Virus Controllers: An ANRS EP36 Study." *Journal of Virology* 81 (24): 13904–15.
- Price, David A., Jason M. Brenchley, Laura E. Ruff, Michael R. Betts, Brenna J. Hill, Mario Roederer, Richard A. Koup, et al. 2005. "Avidity for Antigen Shapes Clonal Dominance in CD8+ T Cell Populations Specific for Persistent DNA Viruses." *Journal of Experimental Medicine* 202 (10): 1349–61.
- Priol, Yannick Le, Denis Puthier, Cédric Lécureuil, Christophe Combadière, Patrice Debré, Catherine Nguyen, and Béhazine Combadière. 2006. "High Cytotoxic and Specific Migratory Potencies of Senescent CD8 + CD57 + Cells in HIV-Infected and Uninfected Individuals ." *The Journal of Immunology* 177 (8): 5145–54.
- Raffi, François, Hans Jaeger, Eugenia Quiros-Roldan, Helmut Albrecht, Elena Belonosova, Jose M Gatell, Jean-Guy Baril, et al. 2013. "Once-Daily Dolutegravir versus Twice-Daily

- Raltegravir in Antiretroviral-Naive Adults with HIV-1 Infection (SPRING-2 Study): 96 Week Results from a Randomised, Double-Blind, Non-Inferiority Trial." *The Lancet Infectious Diseases* 13 (11): 927–35.
- Rahmig, Susann, Romy Kronstein-Wiedemann, Juliane Fohgrub, Nicole Kronstein, Aleksandra Nevmerzhitskaya, Martin Bornhäuser, Max Gassmann, et al. 2016. "Improved Human Erythropoiesis and Platelet Formation in Humanized NSGW41 Mice." *Stem Cell Reports* 7 (4): 591–601.
- Rajasuriar, Reena, Edwina Wright, and Sharon R. Lewin. 2015. "Impact of Antiretroviral Therapy (ART) Timing on Chronic Immune Activation/Inflammation and End-Organ Damage." *Current Opinion in HIV and AIDS*. Lippincott Williams and Wilkins.
- Rambaut, Andrew, David Posada, Keith A Crandall, and Edward C Holmes. 2004. "The Causes and Consequences of HIV Evolution." *Nature Reviews. Genetics* 5 (1): 52–61.
- Rasmussen, Thomas A., Jenny L. Anderson, Fiona Wightman, and Sharon R. Lewin. 2017. "Cancer Therapies in HIV Cure Research." *Current Opinion in HIV and AIDS*. Lippincott Williams and Wilkins.
- Reagan-Shaw, Shannon, Minakshi Nihal, and Nihal Ahmad. 2008. "Dose Translation from Animal to Human Studies Revisited." *The FASEB Journal* 22 (3): 659–61.
- Rehr, Manuela, Julia Cahenzli, Anna Haas, David A. Price, Emma Gostick, Milo Huber, Urs Karrer, and Annette Oxenius. 2008. "Emergence of Polyfunctional CD8+ T Cells after Prolonged Suppression of Human Immunodeficiency Virus Replication by Antiretroviral Therapy." *Journal of Virology* 82 (7): 3391–3404.
- Reimann, K. A., R. A. Parker, M. S. Seaman, K. Beaudry, M. Beddall, L. Peterson, K. C. Williams, et al. 2005. "Pathogenicity of Simian-Human Immunodeficiency Virus SHIV-89.6P and SIVmac Is Attenuated in Cynomolgus Macaques and Associated with Early T-Lymphocyte Responses." *Journal of Virology* 79 (14): 8878–85.
- Rethi, Bence, Stefano Sammiceli, Sylvie Amu, Simone Pensieroso, Bo Hejdeman, Danika Schepis, Pham H. Thang, and Francesca Chiodi. 2013. "Concerted Effect of Lymphopenia, Viraemia and T-Cell Activation on Fas Expression of Peripheral B Cells in HIV-1-Infected Patients." *AIDS* 27 (2): 155–62.
- Richard, Jonathan, Sardar Sindhu, Tram N.Q. Pham, Jean Philippe Belzile, and Éric A. Cohen. 2010. "HIV-1 Vpr up-Regulates Expression of Ligands for the Activating NKG2D Receptor and Promotes NK Cell-Mediated Killing." *Blood* 115 (7): 1354–63.
- Ringpis, Gene Errol E., Saki Shimizu, Hubert Arokium, Joanna Camba-Colón, Maria V. Carroll, Ruth Cortado, Yiming Xie, et al. 2012. "Engineering HIV-1-Resistant T-Cells from Short-Hairpin RNA-Expressing Hematopoietic Stem/Progenitor Cells in Humanized BLT Mice." *PLoS ONE* 7 (12).
- Riyaten, Prakit, Nicolas Salvadori, Patrinee Traisathit, Nicole Ngo-Giang-Huong, Tim R. Cressey, Prattana Leenasirimakul, Malee Techapornroong, et al. 2015. "New-Onset Diabetes and Antiretroviral Treatments in HIV-Infected Adults in Thailand." *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 69 (4): 453–59.
- Robbins, Gregory K., John G. Spritzler, Ellen S. Chan, David M. Asmuth, Rajesh T. Gandhi, Benigno A. Rodriguez, Gail Skowron, Paul R. Skolnik, Robert W. Shafer, and Richard B. Pollard. 2009. "Incomplete Reconstitution of T Cell Subsets on Combination Antiretroviral Therapy in the AIDS Clinical Trials Group Protocol 384." *Clinical Infectious Diseases* 48 (3): 350–61.
- Robert-Richard, Elodie, Cécile Ged, Jacqueline Ortet, Xavier Santarelli, Isabelle Lamrissi-Garcia, Hubert de Verneuil, and Frédéric Mazurier. 2006. "Human Cell Engraftment after Busulfan or Irradiation Conditioning of NOD/SCID Mice." *Haematologica* 91 (10): 1384.
- Roberts, Lindi, Jo Ann S. Passmore, Carolyn Williamson, Francesca Little, Lisa M. Bebell, Koleka Mlisana, Wendy A. Burgers, et al. 2010. "Plasma Cytokine Levels during Acute

- HIV-1 Infection Predict HIV Disease Progression.” *AIDS* 24 (6): 819–31.
- Robertson, K R, Z Su, D M Margolis, A Krambrink, D V Havlir, S Evans, D J Skiest, and A5170 Study Team. 2010. “Neurocognitive Effects of Treatment Interruption in Stable HIV-Positive Patients in an Observational Cohort.” *Neurology* 74 (16): 1260–66.
- Robinson, Harriet L. 2002. “New Hope for an AIDS Vaccine.” *Nature Reviews. Immunology* 2 (4): 239–50.
- Rodero, Mathieu P., Jérémie Decalf, Vincent Bondet, David Hunt, Gillian I. Rice, Scott Werneke, Sarah L. McGlasson, et al. 2017. “Detection of Interferon Alpha Protein Reveals Differential Levels and Cellular Sources in Disease.” *Journal of Experimental Medicine* 214 (5): 1547–55.
- Rompay, Koen K.A. Van. 2012. “The Use of Nonhuman Primate Models of HIV Infection for the Evaluation of Antiviral Strategies.” *AIDS Research and Human Retroviruses*.
- Rongvaux, Anthony, Hitoshi Takizawa, Till Strowig, Tim Willinger, Elizabeth E. Eynon, Richard A. Flavell, and Markus G. Manz. 2013. “Human Hemato-Lymphoid System Mice: Current Use and Future Potential for Medicine.” *Annual Review of Immunology* 31 (1): 635–74.
- Rongvaux, Anthony, Tim Willinger, Jan Martinek, Till Strowig, Sofia V. Gearty, Lino L. Teichmann, Yasuyuki Saito, et al. 2014. “Development and Function of Human Innate Immune Cells in a Humanized Mouse Model.” *Nature Biotechnology* 32 (4): 364–72.
- . 2017. “Corrigendum: Development and Function of Human Innate Immune Cells in a Humanized Mouse Model.” *Nature Biotechnology*. NLM (Medline).
- Rongvaux, Anthony, Tim Willinger, Hitoshi Takizawa, Chozhavendan Rathinam, Wojtek Auerbach, Andrew J. Murphy, David M. Valenzuela, et al. 2011. “Human Thrombopoietin Knockin Mice Efficiently Support Human Hematopoiesis in Vivo.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (6): 2378–83.
- Rosa, Francesca Di, and Tania H. Watts. 2016. “Editorial: Bone Marrow T Cells at the Center Stage in Immunological Memory.” *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.
- Rosás-Umbert, Miriam, Anuska Llano, Rocío Bellido, Alex Olvera, Marta Ruiz-Riol, Muntsa Rocafort, Marco A. Fernández, et al. 2019. “Mechanisms of Abrupt Loss of Virus Control in a Cohort of Previous HIV Controllers.” *Journal of Virology* 93 (4).
- Rosignoli, G., C. H. Lim, M. Bower, F. Gotch, and N. Imami. 2009. “Programmed Death (PD)-1 Molecule and Its Ligand PD-L1 Distribution among Memory CD4 and CD8 T Cell Subsets in Human Immunodeficiency Virus-1-Infected Individuals.” *Clinical and Experimental Immunology* 157 (1): 90–97.
- Rosignoli, Guglielmo, Alison Cranage, Catherine Burton, Mark Nelson, Alan Steel, Brian Gazzard, Frances Gotch, and Nesrina Imami. 2007. “Expression of PD-L1, a Marker of Disease Status, Is Not Reduced by HAART in Aviraemic Patients.” *AIDS* 21 (10): 1379–81.
- Ross, Allison C, Nesrine Rizk, Mary Ann O’Riordan, Vikram Dogra, Dalia El-Bejjani, Norma Storer, Danielle Harrill, Marisa Tungsiripat, Jerome Adell, and Grace A McComsey. 2009. “Relationship between Inflammatory Markers, Endothelial Activation Markers, and Carotid Intima-Media Thickness in HIV-Infected Patients Receiving Antiretroviral Therapy.” *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 49 (7): 1119–27.
- Routy, Bertrand, Emmanuelle Le Chatelier, Lisa Derosa, Connie P.M. Duong, Maryam Tidjani Alou, Romain Daillère, Aurélie Fluckiger, et al. 2018. “Gut Microbiome Influences Efficacy of PD-1-Based Immunotherapy against Epithelial Tumors.” *Science* 359 (6371): 91–97.
- Rouzioux, Christine, and Douglas Richman. 2013. “How to Best Measure HIV Reservoirs?” *Current Opinion in HIV and AIDS*. Curr Opin HIV AIDS.

- Rowland-Jones, Sarah L. 2003. "Timeline: AIDS Pathogenesis: What Have Two Decades of HIV Research Taught Us?" *Nature Reviews. Immunology* 3 (4): 343–48.
- Sadat-Sowti, Behazine, Patrice Debré, Lucile Mollet, Laurent Quint, Fabienne Hadida, Véronique Leblond, Georges Bismuth, and Brigitte Autran. 1994. "An Inhibitor of Cytotoxic Functions Produced by CD8+CD57+ T Lymphocytes from Patients Suffering from AIDS and Immunosuppressed Bone Marrow Recipients." *European Journal of Immunology* 24 (11): 2882–88.
- Sadler, Anthony J., and Bryan R.G. Williams. 2008. "Interferon-Inducible Antiviral Effectors." *Nature Reviews Immunology*. Nat Rev Immunol.
- Sáez-Cirión, Asier, Charline Bacchus, Laurent Hocqueloux, Véronique Avettand-Fenoel, Isabelle Girault, Camille Lecuroux, Valerie Potard, et al. 2013. "Post-Treatment HIV-1 Controllers with a Long-Term Virological Remission after the Interruption of Early Initiated Antiretroviral Therapy ANRS VISCONTI Study." *PLoS Pathogens* 9 (3).
- Sáez-Cirión, Asier, Christine Lacabaratz, Olivier Lambotte, Pierre Versmisse, Alejandra Urrutia, Faroudy Boufassa, Françoise Barré-Sinoussi, et al. 2007. "HIV Controllers Exhibit Potent CD8 T Cell Capacity to Suppress HIV Infection Ex Vivo and Peculiar Cytotoxic T Lymphocyte Activation Phenotype." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (16): 6776–81.
- Sager, R. 1991. "Senescence as a Mode of Tumor Suppression." In *Environmental Health Perspectives*, 93:59–62. Environ Health Perspect.
- Sakuishi, Kaori, Lionel Apetoh, Jenna M. Sullivan, Bruce R. Blazar, Vijay K. Kuchroo, and Ana C. Anderson. 2010. "Targeting Tim-3 and PD-1 Pathways to Reverse T Cell Exhaustion and Restore Anti-Tumor Immunity." *Journal of Experimental Medicine* 207 (10): 2187–94.
- Saleh, Suha, Ajantha Solomon, Fiona Wightman, Miranda Xhilaga, Paul U. Cameron, and Sharon R. Lewin. 2007. "CCR7 Ligands CCL19 and CCL21 Increase Permissiveness of Resting Memory CD4+ T Cells to HIV-1 Infection: A Novel Model of HIV-1 Latency." *Blood* 110 (13): 4161–64.
- Salgado, Eva, Jose R. Maneiro, Loreto Carmona, and Juan J. Gomez-Reino. 2014. "Safety Profile of Protein Kinase Inhibitors in Rheumatoid Arthritis: Systematic Review and Meta-Analysis." *Annals of the Rheumatic Diseases* 73 (5): 871–82.
- Sandler, Netanya G., Handan Wand, Annelys Roque, Matthew Law, Martha C. Nason, Daniel E. Nixon, Court Pedersen, et al. 2011. "Plasma Levels of Soluble CD14 Independently Predict Mortality in HIV Infection." *Journal of Infectious Diseases* 203 (6): 780–90.
- Sango, Kaori, Aviva Joseph, Mahesh Patel, Kristin Osiecki, Monica Dutta, and Harris Goldstein. 2010. "Highly Active Antiretroviral Therapy Potently Suppresses HIV Infection in Humanized Rag2-/- Γ c-/- Mice." *AIDS Research and Human Retroviruses* 26 (7): 735–46.
- Sanmamed, Miguel F., Inmaculada Rodriguez, Kurt A. Schalper, Carmen Oñate, Arantza Azpilikueta, Maria E. Rodriguez-Ruiz, Aizea Morales-Kastresana, et al. 2015. "Nivolumab and Urelumab Enhance Antitumor Activity of Human T Lymphocytes Engrafted in Rag2-/-IL2R γ null Immunodeficient Mice." *Cancer Research* 75 (17): 3466–78.
- Sansom, D. M. 2000. "CD28, CTLA-4 and Their Ligands: Who Does What and to Whom?" *Immunology*. Immunology.
- Sathaliyawala, Taheri, Masaru Kubota, Naomi Yudanin, Damian Turner, Philip Camp, Joseph J.C. Thome, Kara L. Bickham, et al. 2013. "Distribution and Compartmentalization of Human Circulating and Tissue-Resident Memory T Cell Subsets." *Immunity* 38 (1): 187–97.
- Satheesan, Sangeetha, Haitang Li, John C. Burnett, Mayumi Takahashi, Shasha Li, Shiny

- Xiaqin Wu, Timothy W. Synold, John J. Rossi, and Jiehua Zhou. 2018. "HIV Replication and Latency in a Humanized NSG Mouse Model during Suppressive Oral Combinational Antiretroviral Therapy." *Journal of Virology* 92 (7): e02118-17.
- Sato, K., N. Misawa, M. Fukuhara, S. Iwami, D. S. An, M. Ito, and Y. Koyanagi. 2012. "Vpu Augments the Initial Burst Phase of HIV-1 Propagation and Downregulates BST2 and CD4 in Humanized Mice." *Journal of Virology* 86 (9): 5000–5013.
- Sato, Kei, Chuanyi Nie, Naoko Misawa, Yuetsu Tanaka, Mamoru Ito, and Yoshio Koyanagi. 2010. "Dynamics of Memory and Naïve CD8+ T Lymphocytes in Humanized NOD/SCID/IL-2R γ null Mice Infected with CCR5-Tropic HIV-1." *Vaccine* 28 (SUPPL. 2).
- Sax, Paul E, Camlin Tierney, Ann C Collier, Eric S Daar, Katie Mollan, Chakra Budhathoki, Catherine Godfrey, et al. 2011. "Abacavir/Lamivudine versus Tenofovir DF/Emtricitabine as Part of Combination Regimens for Initial Treatment of HIV: Final Results." *The Journal of Infectious Diseases* 204 (8): 1191–1201.
- Schacker, T, S Little, E Connick, K Gebhard-Mitchell, Z Q Zhang, J Krieger, J Pryor, et al. 2000. "Rapid Accumulation of Human Immunodeficiency Virus (HIV) in Lymphatic Tissue Reservoirs during Acute and Early HIV Infection: Implications for Timing of Antiretroviral Therapy." *The Journal of Infectious Diseases* 181 (1): 354–57.
- Schacker, Timothy, Ann C. Collier, James Hughes, Theresa Shea, and Lawrence Corey. 1996. "Annals of Internal Medicine: Clinical and Epidemiologic Features of Primary HIV Infection." *Annals of Internal Medicine* 125 (4): 257–64.
- Schacker, Timothy W., James P. Hughes, Theresa Shea, Robert W. Coombs, and Lawrence Corey. 1998. "Biological and Virologic Characteristics of Primary HIV Infection." *Annals of Internal Medicine* 128 (8): 613–20.
- Schindler, Michael, Jan Schmökel, Anke Specht, Hui Li, Jan Münch, Mohammad Khalid, Donald L Sodora, Beatrice H Hahn, Guido Silvestri, and Frank Kirchhoff. 2008. "Inefficient Nef-Mediated Downmodulation of CD3 and MHC-I Correlates with Loss of CD4+T Cells in Natural SIV Infection." *PLoS Pathogens* 4 (7): e1000107.
- Schmitz, J. E., M. J. Kuroda, S. Santra, M. A. Simon, M. A. Lifton, W. Lin, R. Khunkhun, et al. 2003. "Effect of Humoral Immune Responses on Controlling Viremia during Primary Infection of Rhesus Monkeys with Simian Immunodeficiency Virus." *Journal of Virology* 77 (3): 2165–73.
- Schneider, William M., Meike Dittmann Chevillotte, and Charles M. Rice. 2014. "Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses." *Annual Review of Immunology* 32 (1): 513–45.
- Schwartzkopff, Sabrina, Carsten Gründemann, Oliver Schweier, Stephan Rosshart, Klaus Erik Karjalainen, Karl-Friedrich Becker, and Hanspeter Pircher. 2007. "Tumor-Associated E-Cadherin Mutations Affect Binding to the Killer Cell Lectin-Like Receptor G1 in Humans." *The Journal of Immunology* 179 (2): 1022–29.
- Sedaghat, Ahmad R., Jennifer German, Tanya M. Teslovich, Joseph Cofrancesco, Chunfa C. Jie, C. Conover Talbot, and Robert F. Siliciano. 2008. "Chronic CD4+ T-Cell Activation and Depletion in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection: Type I Interferon-Mediated Disruption of T-Cell Dynamics." *Journal of Virology* 82 (4): 1870–83.
- Sereti, Irimi, Shelly J Krebs, Nittaya Phanuphak, James L Fletcher, Bonnie Slike, Suteeraporn Pinyakorn, Robert J O'Connell, et al. 2017. "Persistent, Albeit Reduced, Chronic Inflammation in Persons Starting Antiretroviral Therapy in Acute HIV Infection." *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 64 (2): 124–31.
- Seung, Edward, Timothy E. Dudek, Todd M. Allen, Gordon J. Freeman, Andrew D. Luster, and Andrew M. Tager. 2013. "PD-1 Blockade in Chronically HIV-1-Infected Humanized

- Mice Suppresses Viral Loads.” *PLoS ONE* 8 (10).
- Shah, Ankit, Mohitkumar R Gangwani, Nitish S Chaudhari, Alexy Glazyrin, Hari K Bhat, and Anil Kumar. 2016. “Neurotoxicity in the Post-HAART Era: Caution for the Antiretroviral Therapeutics.” *Neurotoxicity Research* 30 (4): 677–97.
- Shah, Ankur H., Bharatwaj Sowrirajan, Zachary B. Davis, Jeffrey P. Ward, Edward M. Campbell, Vicente Planelles, and Edward Barker. 2010. “Degranulation of Natural Killer Cells Following Interaction with HIV-1-Infected Cells Is Hindered by Downmodulation of NTB-A by Vpu.” *Cell Host and Microbe* 8 (5): 397–409.
- Shankar, Esaki Muthu, Karlhans Fru Che, Davorika Messmer, Jeffrey D. Lifson, and Marie Larsson. 2011. “Expression of a Broad Array of Negative Costimulatory Molecules and Blimp-1 in T Cells Following Priming by HIV-1 Pulsed Dendritic Cells.” *Molecular Medicine* 17 (3–4): 229–40.
- Sharma, Bechan. 2014. “Oxidative Stress in HIV Patients Receiving Antiretroviral Therapy.” *Current HIV Research* 12 (1): 13–21.
- Sharma, Padmanee, and James P. Allison. 2015. “The Future of Immune Checkpoint Therapy.” *Science* 348 (6230): 56–61.
- Sharova, Natalia, Catherine Swingler, Mark Sharkey, and Mario Stevenson. 2005. “Macrophages Archive HIV-1 Virions for Dissemination in Trans.” *EMBO Journal* 24 (13): 2481–89.
- Sharpe, Arlene H., and Kristen E. Pauken. 2018. “The Diverse Functions of the PD1 Inhibitory Pathway.” *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group.
- Shearer, William T., Thomas C. Quinn, Philip Larussa, Judy F. Lew, Lynne Mofenson, Susan Almy, Kenneth Rich, et al. 1997. “Viral Load and Disease Progression in Infants Infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1.” *New England Journal of Medicine* 336 (19): 1337–42.
- Shetty, Ravi Dyavar, Vijayakumar Velu, Kehmia Titanji, Steven E. Bosinger, Gordon J. Freeman, Guido Silvestri, and Rama Rao Amara. 2012. “PD-1 Blockade during Chronic SIV Infection Reduces Hyperimmune Activation and Microbial Translocation in Rhesus Macaques.” *Journal of Clinical Investigation* 122 (5): 1712–16.
- Shiels, Meredith S., and Eric A. Engels. 2017. “Evolving Epidemiology of HIV-Associated Malignancies.” *Current Opinion in HIV and AIDS* 12 (1): 6–11.
- Shimizu, Saki, Patrick Hong, Balamurugan Arumugam, Lauren Pokomo, Joshua Boyer, Naoya Koizumi, Panyamol Kittipongdaja, et al. 2010. “A Highly Efficient Short Hairpin RNA Potently Down-Regulates CCR5 Expression in Systemic Lymphoid Organs in the Hu-BLT Mouse Model.” *Blood* 115 (8): 1534–44.
- Shin, Haina, Shawn D. Blackburn, Joseph N. Blattman, and E. John Wherry. 2007. “Viral Antigen and Extensive Division Maintain Virus-Specific CD8 T Cells during Chronic Infection.” *Journal of Experimental Medicine* 204 (4): 941–49.
- Shinkai, Yoichi, Gary Rathbun, Kong Peng Lam, Eugene M. Oltz, Valerie Stewart, Monica Mendelsohn, Jean Charron, et al. 1992. “RAG-2-Deficient Mice Lack Mature Lymphocytes Owing to Inability to Initiate V(D)J Rearrangement.” *Cell* 68 (5): 855–67.
- Shultz, L D, P A Schweitzer, S W Christianson, B Gott, I B Schweitzer, B Tennent, S McKenna, L Mobraaten, T V Rajan, and D L Greiner. 1995. “Multiple Defects in Innate and Adaptive Immunologic Function in NOD/LtSz-Scid Mice.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 154 (1): 180–91.
- Shultz, Leonard D., Michael A. Brehm, J. Victor Garcia-Martinez, and Dale L. Greiner. 2012. “Humanized Mice for Immune System Investigation: Progress, Promise and Challenges.” *Nature Reviews Immunology*. Nat Rev Immunol.
- Shultz, Leonard D., Fumihiko Ishikawa, and Dale L. Greiner. 2007. “Humanized Mice in Translational Biomedical Research.” *Nature Reviews Immunology*. Nat Rev Immunol.

- Shultz, Leonard D., Bonnie L. Lyons, Lisa M. Burzenski, Bruce Gott, Xiaohua Chen, Stanley Chaleff, Malak Kotb, et al. 2005. "Human Lymphoid and Myeloid Cell Development in NOD/LtSz- Scid IL2R γ Null Mice Engrafted with Mobilized Human Hemopoietic Stem Cells ." *The Journal of Immunology* 174 (10): 6477–89.
- Shultz, Leonard D., Yoriko Saito, Yuho Najima, Satoshi Tanaka, Toshiki Ochi, Mariko Tomizawa, Takehiko Doi, et al. 2010. "Generation of Functional Human T-Cell Subsets with HLA-Restricted Immune Responses in HLA Class I Expressing NOD/SCID/IL2rnull Humanized Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (29): 13022–27.
- Sigal, Alex, and David Baltimore. 2012. "As Good as It Gets? The Problem of HIV Persistence despite Antiretroviral Drugs." *Cell Host and Microbe*. Cell Host Microbe.
- Siliciano, Janet D., Joleen Kajdas, Diana Finzi, Thomas C. Quinn, Karen Chadwick, Joseph B. Margolick, Colin Kovacs, Stephen J. Gange, and Robert F. Siliciano. 2003. "Long-Term Follow-up Studies Confirm the Stability of the Latent Reservoir for HIV-1 in Resting CD4+ T Cells." *Nature Medicine* 9 (6): 727–28.
- Silvestri, Guido, Donald L. Sodora, Richard A. Koup, Mirko Paiardini, Shawn P. O’Neil, Harold M. McClure, Silvija I. Staprans, and Mark B. Feinberg. 2003. "Nonpathogenic SIV Infection of Sooty Mangabeys Is Characterized by Limited Bystander Immunopathology despite Chronic High-Level Viremia." *Immunity* 18 (3): 441–52.
- Simmons, Rachel P., Eileen P. Scully, Erin E. Groden, Kelly B. Arnold, J. Judy Chang, Kim Lane, Jeff Lifson, Eric Rosenberg, Douglas A. Lauffenburger, and Marcus Altfeld. 2013. "HIV-1 Infection Induces Strong Production of IP-10 through TLR7/9-Dependent Pathways." *AIDS* 27 (16): 2505–17.
- Simonetta, F., S. Hua, C. Lecuroux, S. Gerard, F. Boufassa, A. Saez-Cirion, G. Pancino, et al. 2014. "High Eomesodermin Expression among CD57+ CD8+ T Cells Identifies a CD8+ T Cell Subset Associated with Viral Control during Chronic Human Immunodeficiency Virus Infection." *Journal of Virology* 88 (20): 11861–71.
- Sluis, Renée M. Van Der, Rienk E. Jeeninga, and Ben Berkhout. 2013. "Establishment and Molecular Mechanisms of HIV-1 Latency in T Cells." *Current Opinion in Virology*. Elsevier B.V.
- Sluis, Renée M. Van der, Nitasha A. Kumar, Rachel D. Pascoe, Jennifer M. Zerbato, Vanessa A. Evans, Ashanti I. Dantanarayana, Jenny L. Anderson, et al. 2020. "Combination Immune Checkpoint Blockade to Reverse HIV Latency." *The Journal of Immunology* 204 (5): 1242–54.
- Smith, Alexia G., Patricia A. Sheridan, Raymond J. Tseng, John F. Sheridan, and Melinda A. Beck. 2009. "Selective Impairment in Dendritic Cell Function and Altered Antigen-Specific CD8+ T-Cell Responses in Diet-Induced Obese Mice Infected with Influenza Virus." *Immunology* 126 (2): 268–79.
- Song, Kyung Hee, Seung Youn Jung, Seong Ho Kho, Sang Gu Hwang, Hunjoo Ha, Seon Young Nam, and Jie Young Song. 2017. "Effects of Low-Dose Irradiation on Mice with Escherichia Coli-Induced Sepsis." *Toxicology and Applied Pharmacology* 333 (October): 17–25.
- Soper, Andrew, Izumi Kimura, Shumpei Nagaoka, Yoriyuki Konno, Keisuke Yamamoto, Yoshio Koyanagi, and Kei Sato. 2018. "Type I Interferon Responses by HIV-1 Infection: Association with Disease Progression and Control." *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.
- Soriano-Sarabia, N., R. E. Bateson, N. P. Dahl, A. M. Crooks, J. D. Kuruc, D. M. Margolis, and N. M. Archin. 2014. "Quantitation of Replication-Competent HIV-1 in Populations of Resting CD4+ T Cells." *Journal of Virology* 88 (24): 14070–77.
- Specht, Anke, M. Quinn DeGottardi, Michael Schindler, Beatrice Hahn, David T. Evans, and

- Frank Kirchhoff. 2008. "Selective Downmodulation of HLA-A and -B by Nef Alleles from Different Groups of Primate Lentiviruses." *Virology* 373 (1): 229–37.
- Spivak, Adam M., Erin T. Larragoite, McKenna K.L. Coletti, Amanda B. Macedo, Laura J. Martins, Alberto Bosque, and Vicente Planelles. 2016. "Janus Kinase Inhibition Suppresses PKC-Induced Cytokine Release without Affecting HIV-1 Latency Reversal Ex Vivo." *Retrovirology* 13 (1).
- Spranger, Stefani, Robbert M. Spaapen, Yuanyuan Zha, Jason Williams, Yuru Meng, Thanh T. Ha, and Thomas F. Gajewski. 2013. "Up-Regulation of PD-L1, IDO, and Tregs in the Melanoma Tumor Microenvironment Is Driven by CD8+ T Cells." *Science Translational Medicine*. Sci Transl Med.
- Stacey, Andrea R., Philip J. Norris, Li Qin, Elizabeth A. Haygreen, Elizabeth Taylor, John Heitman, Mila Lebedeva, et al. 2009. "Induction of a Striking Systemic Cytokine Cascade Prior to Peak Viremia in Acute Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection, in Contrast to More Modest and Delayed Responses in Acute Hepatitis B and C Virus Infections." *Journal of Virology* 83 (8): 3719–33.
- Stahl, Elizabeth C., and Bryan N. Brown. 2015. "Cell Therapy Strategies to Combat Immunosenescence." *Organogenesis* 11 (4): 159–72.
- Stanley, Sharilyn K., Joseph M. McCune, Hideto Kaneshima, J. Shawn Justement, Margery Sullivan, Elizabeth Boone, Michael Baseler, et al. 1993. "Human Immunodeficiency Virus Infection of the Human Thymus and Disruption of the Thymic Microenvironment in the SCID-Hu Mouse." *Journal of Experimental Medicine* 178 (4): 1151–63.
- Sterling, Timothy R., David Vlahov, Jacquie Astemborski, Donald R. Hoover, Joseph B. Margolick, and Thomas C. Quinn. 2001. "Initial Plasma HIV-1 RNA Levels and Progression to AIDS in Women and Men." *New England Journal of Medicine* 344 (10): 720–25.
- Strain, M. C., H. F. Günthard, D. V. Havlir, C. C. Ignacio, D. M. Smith, A. J. Leigh-Brown, T. R. Macaranas, et al. 2003. "Heterogeneous Clearance Rates of Long-Lived Lymphocytes Infected with HIV: Intrinsic Stability Predicts Lifelong Persistence." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (8): 4819–24.
- Strowig, Till, Cagan Gurer, Alexander Ploss, Yi Fang Liu, Frida Arrey, Junji Sashihara, Gloria Koo, et al. 2009. "Priming of Protective T Cell Responses against Virus-Induced Tumors in Mice with Human Immune System Components." *Journal of Experimental Medicine* 206 (6): 1423–34.
- Strowig, Till, Anthony Rongvaux, Chozhavendan Rathinam, Hitoshi Takizawa, Chiara Borsotti, William Philbrick, Elizabeth E. Eynon, Markus G. Manz, and Richard A. Flavell. 2011. "Transgenic Expression of Human Signal Regulatory Protein Alpha in Rag2 γ c-/- Mice Improves Engraftment of Human Hematopoietic Cells in Humanized Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (32): 13218–23.
- Stylianou, Eva, P. Aukrust, K. Bendtzen, F. Müller, and S. S. Frøland. 2000. "Interferons and Interferon (IFN)-Inducible Protein 10 during Highly Active Anti-Retroviral Therapy (HAART) - Possible Immunosuppressive Role of IFN- α in HIV Infection." *Clinical and Experimental Immunology* 119 (3): 479–85.
- Subbaraman, Harini, Merle Schanz, and Alexandra Trkola. 2018. "Broadly Neutralizing Antibodies: What Is Needed to Move from a Rare Event in HIV-1 Infection to Vaccine Efficacy?" *Retrovirology*. BioMed Central Ltd.
- Sun, Zhifeng, Paul W. Denton, Jacob D. Estes, Florence A. Othieno, Bangdong L. Wei, Anja K. Wege, Michael W. Melkus, et al. 2007. "Intrarectal Transmission, Systemic Infection, and CD4+ T Cell Depletion in Humanized Mice Infected with HIV-1." *Journal of Experimental Medicine* 204 (4): 705–14.

- Suzuki, Makiko, Takeshi Takahashi, Ikumi Katano, Ryoji Ito, Mamoru Ito, Hideo Harigae, Naoto Ishii, and Kazuo Sugamura. 2012. "Induction of Human Humoral Immune Responses in a Novel HLA-DR-Expressing Transgenic NOD/Shi-Scid/Tcnull Mouse." *International Immunology* 24 (4): 243–52.
- Swiggard, W. J., C. Baytop, J. J. Yu, J. Dai, C. Li, R. Schretzenmair, T. Theodosopoulos, and U. O'Doherty. 2005. "Human Immunodeficiency Virus Type 1 Can Establish Latent Infection in Resting CD4+ T Cells in the Absence of Activating Stimuli." *Journal of Virology* 79 (22): 14179–88.
- Swingler, Simon, Angela M. Mann, Jin Zhou, Catherine Swingler, and Mario Stevenson. 2007. "Apoptotic Killing of HIV-1-Infected Macrophages Is Subverted by the Viral Envelope Glycoprotein." *PLoS Pathogens* 3 (9): 1281–90.
- Taiwo, Babafemi, Roy M Matining, Lu Zheng, Michael M Lederman, Charles R Rinaldo, Peter S Kim, Baiba I Berzins, et al. 2013. "Associations of T Cell Activation and Inflammatory Biomarkers with Virological Response to Darunavir/Ritonavir plus Raltegravir Therapy." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68 (8): 1857–61.
- Takahashi, Yoshiaki, Siddappa N. Byrareddy, Christina Albrecht, Markus Brameier, Lutz Walter, Ann E. Mayne, Paul Dunbar, et al. 2014. "In Vivo Administration of a JAK3 Inhibitor during Acute SIV Infection Leads to Significant Increases in Viral Load during Chronic Infection." *PLoS Pathogens* 10 (3).
- Takahashi, Yoshiaki, Ann E. Mayne, Ladawan Khowawisetsut, Kovit Pattanapanyasat, Dawn Little, Francois Villinger, and Aftab A. Ansari. 2013. "In Vivo Administration of a JAK3 Inhibitor to Chronically SIV Infected Rhesus Macaques Leads to NK Cell Depletion Associated with Transient Modest Increase in Viral Loads." *PLoS ONE* 8 (7).
- Takenaka, Katsuto, Tatiana K. Prasolava, Jean C.Y. Wang, Steven M. Mortin-Toth, Sam Khalouei, Olga I. Gan, John E. Dick, and Jayne S. Danska. 2007. "Polymorphism in Sirpa Modulates Engraftment of Human Hematopoietic Stem Cells." *Nature Immunology* 8 (12): 1313–23.
- Takizawa, Hitoshi, and Markus G. Manz. 2007. "Macrophage Tolerance: CD47-SIRP- α -Mediated Signals Matter." *Nature Immunology* 8 (12): 1287–89.
- Talay, Oezcan, Ching Hung Shen, Lieping Chen, and Jianzhu Chen. 2009. "B7-H1 (PD-L1) on T Cells Is Required for T-Cell-Mediated Conditioning of Dendritic Cell Maturation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (8): 2741–46.
- Tan, Ruimin, Andrew O. Westfall, James H. Willig, Michael J. Mugavero, Michael S. Saag, Richard A. Kaslow, and Mirjam C. Kempf. 2008. "Clinical Outcome of HIV-Infected Antiretroviral-Naive Patients with Discordant Immunologic and Virologic Responses to Highly Active Antiretroviral Therapy." *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 47 (5): 553–58.
- Taneja, Veena. 2018. "Sex Hormones Determine Immune Response." *Frontiers in Immunology* 9 (August): 1931.
- Tary-Lehmann, M, A Saxon, and P V Lehmann. 1995. "The Human Immune System in Hu-PBL-SCID Mice." *Immunology Today* 16 (11): 529–33.
- Taube, Janis M., Robert A. Anders, Geoffrey D. Young, Haiying Xu, Rajni Sharma, Tracee L. McMiller, Shuming Chen, et al. 2012. "Colocalization of Inflammatory Response with B7-H1 Expression in Human Melanocytic Lesions Supports an Adaptive Resistance Mechanism of Immune Escape." *Science Translational Medicine* 4 (127).
- Taube, Janis M., Alison Klein, Julie R. Brahmer, Haiying Xu, Xiaoyu Pan, Jung H. Kim, Lieping Chen, Drew M. Pardoll, Suzanne L. Topalian, and Robert A. Anders. 2014. "Association of PD-1, PD-1 Ligands, and Other Features of the Tumor Immune Microenvironment with Response to Anti-PD-1 Therapy." *Clinical Cancer Research* 20

- (19): 5064–74.
- Taylor, Peter C., Edward C. Keystone, Desiree Van Der Heijde, Michael E. Weinblatt, Liliana Del Carmen Morales, Jaime Reyes Gonzaga, Sergey Yakushin, et al. 2017. “Baricitinib versus Placebo or Adalimumab in Rheumatoid Arthritis.” *New England Journal of Medicine* 376 (7): 652–62.
- Taylor, Stephen, and Sophia Davies. 2010. “Antiretroviral Drug Concentrations in the Male and Female Genital Tract: Implications for the Sexual Transmission of HIV.” *Current Opinion in HIV and AIDS*.
- Teijaro, John R., Cherie Ng, Andrew M. Lee, Brian M. Sullivan, Kathleen C.F. Sheehan, Megan Welch, Robert D. Schreiber, Juan Carlos De La Torre, and Michael B.A. Oldstone. 2013. “Persistent LCMV Infection Is Controlled by Blockade of Type I Interferon Signaling.” *Science* 340 (6129): 207–11.
- Teixeira, Luciléia, Hernan Valdez, Joseph M. McCune, Richard A. Koup, Andrew D. Badley, Marc K. Hellerstein, Laura A. Napolitano, et al. 2001. “Poor CD4 T Cell Restoration after Suppression of HIV-1 Replication May Reflect Lower Thymic Function.” *AIDS* 15 (14): 1749–56.
- Tenner-Racz, Klara, Paul Racz, Jean Claude Gluckman, and Mikulas Popovic. 1988. “Cell-Free HIV in Lymph Nodes of Patients with AIDS and Generalized Lymphadenopathy.” *New England Journal of Medicine*. N Engl J Med.
- Tenner-Racz, Klara, Hans Jürgen Stellbrink, Jan Van Lunzen, Claus Schneider, Jan Peter Jacobs, Birgit Raschdorff, Gudrun Großschupff, Ralph M. Steinman, and Paul Racz. 1998. “The Unenlarged Lymph Nodes of HIV-1-Infected, Asymptomatic Patients with High CD4 T Cell Counts Are Sites for Virus Replication and CD4 T Cell Proliferation. The Impact of Highly Active Antiretroviral Therapy.” *Journal of Experimental Medicine* 187 (6): 949–59.
- Thompson, Corbin G, Myron S Cohen, and Angela D M Kashuba. 2013. “Antiretroviral Pharmacology in Mucosal Tissues.” *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)* 63 Suppl 2 (July): S240-7.
- Titanji, Kehmia, Angelo De Milito, Alberto Cagigi, Rigmor Thorstensson, Sven Grützmeier, Ann Atlas, Bo Hejdeman, et al. 2006. “Loss of Memory B Cells Impairs Maintenance of Long-Term Serologic Memory during HIV-1 Infection.” *Blood* 108 (5): 1580–87.
- Todesco, Eve, Christophe Rodriguez, Laurence Morand-Joubert, Mélanie Mercier-Darty, Nathalie Desire, Marc Wirden, Pierre-Marie Girard, Christine Katlama, Vincent Calvez, and Anne-Geneviève Marcelin. 2015. “Improved Detection of Resistance at Failure to a Tenofovir, Emtricitabine and Efavirenz Regimen by Ultradeep Sequencing.” *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70 (5): 1503–6.
- Tomaras, G. D., N. L. Yates, P. Liu, L. Qin, G. G. Fouda, L. L. Chavez, A. C. Decamp, et al. 2008. “Initial B-Cell Responses to Transmitted Human Immunodeficiency Virus Type 1: Virion-Binding Immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies Followed by Plasma Anti-Gp41 Antibodies with Ineffective Control of Initial Viremia.” *Journal of Virology* 82 (24): 12449–63.
- Topalian, Suzanne L., Charles G. Drake, and Drew M. Pardoll. 2015. “Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy.” *Cancer Cell*. Cell Press.
- Trabattoni, Daria, Marina Saresella, Mara Biasin, Adriano Boasso, Luca Piacentini, Pasquale Ferrante, Haidong Dong, et al. 2003. “B7-H1 Is up-Regulated in HIV Infection and Is a Novel Surrogate Marker of Disease Progression.” *Blood* 101 (7): 2514–20.
- Traggiai, Elisabetta, Laurie Chicha, Luca Mazzucchelli, Lucio Bronz, Jean Claude Piffaretti, Antonio Lanzavecchia, and Markus G. Manz. 2004. “Development of a Human Adaptive Immune System in Cord Blood Cell-Transplanted Mice.” *Science* 304 (5667): 104–7.

- Tran, Tu Anh, Marie Ghislaine de Goër de Herve, Houria Hendel-Chavez, Bamory Dembele, Emilie Le Névoit, Karim Abbed, Coralie Pallier, et al. 2008. “Resting Regulatory CD4 T Cells: A Site of HIV Persistence in Patients on Long-Term Effective Antiretroviral Therapy.” *PLoS ONE* 3 (10).
- Trautmann, Lydie, Loury Janbazian, Nicolas Chomont, Elias A Said, Sylvain Gimmig, Benoit Bessette, Mohamed-Rachid Boulassel, et al. 2006. “Upregulation of PD-1 Expression on HIV-Specific CD8+ T Cells Leads to Reversible Immune Dysfunction.” *Nature Medicine* 12 (10): 1198–1202.
- Trickey, Adam, Margaret T May, Janne Vehreschild, Niels Obel, Michael John Gill, Heidi Crane, Christoph Boesecke, et al. 2016. “Cause-Specific Mortality in HIV-Positive Patients Who Survived Ten Years after Starting Antiretroviral Therapy.” Edited by Roberto F. Speck. *PloS One* 11 (8): e0160460.
- Trono, Didier, Carine Van Lint, Christine Rouzioux, Eric Verdin, Françoise Barré-Sinoussi, Tae-Wook Chun, and Nicolas Chomont. 2010. “HIV Persistence and the Prospect of Long-Term Drug-Free Remissions for HIV-Infected Individuals.” *Science (New York, N.Y.)* 329 (5988): 174–80.
- Tuboï, Suely Hiromi, Antonio Guilherme Pacheco, Lee H. Harrison, Roslyn A. Stone, Margaret May, Martin W.G. Brinkhof, François Dabis, et al. 2010. “Mortality Associated with Discordant Responses to Antiretroviral Therapy in Resource-Constrained Settings.” *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 53 (1): 70–77.
- Tumeh, Paul C., Christina L. Harview, Jennifer H. Yearley, I. Peter Shintaku, Emma J.M. Taylor, Lidia Robert, Bartosz Chmielowski, et al. 2014. “PD-1 Blockade Induces Responses by Inhibiting Adaptive Immune Resistance.” *Nature* 515 (7528): 568–71.
- Turner, B G, and M F Summers. 1999. “Structural Biology of HIV.” *Journal of Molecular Biology* 285 (1): 1–32.
- UNAIDS. 2019. “Fact Sheet July 2019.”
- Valentin, Antonio, Margherita Rosati, Daniel J. Patenaude, Angelos Hatzakis, Leondios G. Kostrikis, Marios Lazanas, Kathleen M. Wyvill, Robert Yarchoan, and George N. Pavlakis. 2002. “Persistent HIV-1 Infection of Natural Killer Cells in Patients Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (10): 7015–20.
- Veazey, R. S., K. G. Mansfield, I. C. Tham, A. C. Carville, D. E. Shvetz, A. E. Forand, and A. A. Lackner. 2000. “Dynamics of CCR5 Expression by CD4+ T Cells in Lymphoid Tissues during Simian Immunodeficiency Virus Infection.” *Journal of Virology* 74 (23): 11001–7.
- Veazey, Ronald S., Mary Ann DeMaria, Laura V. Chalifoux, Daniel E. Shvetz, Douglas R. Pauley, Heather L. Knight, Michael Rosenzweig, R. Paul Johnson, Ronald C. Desrosiers, and Andrew A. Lackner. 1998. “Gastrointestinal Tract as a Major Site of CD4+ T Cell Depletion and Viral Replication in SIV Infection.” *Science* 280 (5362): 427–31.
- Velu, Vijayakumar, Kehmia Titanji, Baogong Zhu, Sajid Husain, Annette Pladevega, Lilin Lai, Thomas H. Vanderford, et al. 2009. “Enhancing SIV-Specific Immunity in Vivo by PD-1 Blockade.” *Nature* 458 (7235): 206–10.
- Verma, Kriti, Justyna Ogonek, Pavankumar Reddy Varanasi, Susanne Luther, Ivonne Bünting, Katrin Thomay, Yvonne Lisa Behrens, Eva Mischak-Weissinger, and Lothar Hambach. 2017. “Human CD8+ CD57- TEMRA Cells: Too Young to Be Called ‘Old.’” *PLoS ONE* 12 (5).
- Vicenzi, E, P P Bordignon, P Biswas, A Brambilla, C Bovolenta, M Cota, F Sinigaglia, and G Poli. 1999. “Envelope-Dependent Restriction of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Spreading in CD4(+) T Lymphocytes: R5 but Not X4 Viruses Replicate in the Absence of T-Cell Receptor Restimulation.” *Journal of Virology* 73 (9): 7515–23.

- Villaudy, Julien, Remko Schotte, Nicolas Legrand, and Hergen Spits. 2014. "Critical Assessment of Human Antibody Generation in Humanized Mouse Models." *Journal of Immunological Methods* 410 (August): 18–27.
- Vlasak, Josef, and Ruth M. Ruprecht. 2006. "AIDS Vaccine Development and Challenge Viruses: Getting Real." *AIDS*. AIDS.
- Volk, V, A Schneider, L M Spineli, A Grosshennig, and R Stripecke. 2016. "The Gender Gap: Discrepant Human T-Cell Reconstitution after Cord Blood Stem Cell Transplantation in Humanized Female and Male Mice." *Bone Marrow Transplantation* 51 (4): 596–97.
- Vos, Alinda G., Annelieke Hulzebosch, Diederick E. Grobbee, Roos E. Barth, and Kerstin Klipstein-Grobusch. 2017. "Association between Immune Markers and Surrogate Markers of Cardiovascular Disease in HIV Positive Patients: A Systematic Review." *PLoS ONE*. Public Library of Science.
- Vuyyuru, Raja, John Patton, and Tim Manser. 2011. "Human Immune System Mice: Current Potential and Limitations for Translational Research on Human Antibody Responses." *Immunologic Research* 51 (2–3): 257–66.
- Wada, Nikolas Itaru, Lisa P. Jacobson, Joseph B. Margolick, Elizabeth Crabb Breen, Bernard Macatangay, Sudhir Penugonda, Otoniel Martínez-Maza, and Jay H. Bream. 2015. "The Effect of HAART-Induced HIV Suppression on Circulating Markers of Inflammation and Immune Activation." *AIDS* 29 (4): 463–71.
- Wahl, Angela, Michael D. Swanson, Tomonori Nochi, Rikke Olesen, Paul W. Denton, Morgan Chateau, and J. Victor Garcia. 2012. "Human Breast Milk and Antiretrovirals Dramatically Reduce Oral HIV-1 Transmission in BLT Humanized Mice." *PLoS Pathogens* 8 (6).
- Walmsley, Sharon, Axel Baumgarten, Juan Berenguer, Franco Felizarta, Eric Florence, Marie-Aude Khuong-Josses, J Michael Kilby, et al. 2015. "Brief Report: Dolutegravir Plus Abacavir/Lamivudine for the Treatment of HIV-1 Infection in Antiretroviral Therapy-Naive Patients: Week 96 and Week 144 Results From the SINGLE Randomized Clinical Trial." *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)* 70 (5): 515–19.
- Walmsley, Sharon L., Antonio Antela, Nathan Clumeck, Dan Duiculescu, Andrea Eberhard, Felix Gutiérrez, Laurent Hocqueloux, et al. 2013. "Dolutegravir plus Abacavir-Lamivudine for the Treatment of HIV-1 Infection." *New England Journal of Medicine* 369 (19): 1807–18.
- Wang, Xicheng, Zheng Zhang, Shuye Zhang, Junliang Fu, Jinxia Yao, Yanmei Jiao, Hao Wu, and Fu Sheng Wang. 2008. "B7-H1 up-Regulation Impairs Myeloid DC and Correlates with Disease Progression in Chronic HIV-1 Infection." *European Journal of Immunology* 38 (11): 3226–36.
- Wang, Xuefu, Ziping Qi, Haiming Wei, Zhigang Tian, and Rui Sun. 2012. "Characterization of Human B Cells in Umbilical Cord Blood-Transplanted NOD/SCID Mice." *Transplant Immunology* 26 (2–3): 156–62.
- Ward, Jeffrey, Matthew Bonaparte, Jennifer Sacks, Jacqueline Guterman, Manuela Fogli, Domenico Mavilio, and Edward Barker. 2007. "HIV Modulates the Expression of Ligands Important in Triggering Natural Killer Cell Cytotoxic Responses on Infected Primary T-Cell Blasts." *Blood* 110 (4): 1207–14.
- Watanabe, Satoru, Kazuo Terashima, Shinrai Ohta, Shigeo Horibata, Misako Yajima, Yoko Shiozawa, M. Zahidunnabi Dewan, et al. 2007. "Hematopoietic Stem Cell-Engrafted NOD/SCID/IL2R γ null Mice Develop Human Lymphoid Systems and Induce Long-Lasting HIV-1 Infection with Specific Humoral Immune Responses." *Blood* 109 (1): 212–18.
- Watanabe, Yohei, Takeshi Takahashi, Akira Okajima, Miho Shiokawa, Naoto Ishii, Ikumi Katano, Ryoji Ito, et al. 2009. "The Analysis of the Functions of Human B and T Cells in

- Humanized NOD/Shi-Scid/γcnull (NOG) Mice (Hu-HSC NOG Mice).” *International Immunology* 21 (7): 843–58.
- Watkins, David I., Dennis R. Burton, Esper G. Kallas, John P. Moore, and Wayne C. Koff. 2008. “Nonhuman Primate Models and the Failure of the Merck HIV-1 Vaccine in Humans.” *Nature Medicine*. Nat Med.
- Wege, A K, M W Melkus, P W Denton, J D Estes, and J V Garcia. 2008. “Functional and Phenotypic Characterization of the Humanized BLT Mouse Model.” *Current Topics in Microbiology and Immunology* 324: 149–65.
- Wei, Xiping, Julie M. Decker, Shuyi Wang, Huxiong Hui, John C. Kappes, Xiaoyun Wu, Jesus F. Salazar-Gonzalez, et al. 2003. “Antibody Neutralization and Escape by HIV-1.” *Nature* 422 (6929): 307–12.
- Wei, Xiping, Sajal K. Ghosh, Maria E. Taylor, Victoria A. Johnson, Emilio A. Emini, Paul Deutsch, Jeffrey D. Lifson, et al. 1995. “Viral Dynamics in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection.” *Nature* 373 (6510): 117–22.
- Welsh, R. M. 2001. “Assessing CD8 T Cell Number and Dysfunction in the Presence of Antigen.” *Journal of Experimental Medicine*. Rockefeller University Press.
- Werner-klein, Melanie, Judith Proske, Christian Werno, Katharina Schneider, Hans-Stefan Hofmann, Brigitte Rack, Stefan Buchholz, et al. 2014. “Immune Humanization of Immunodeficient Mice Using Diagnostic Bone Marrow Aspirates from Carcinoma Patients.” *PloS One* 9 (5): e97860.
- Wherry, E. John. 2011. “T Cell Exhaustion.” *Nature Immunology*. Nat Immunol.
- Wherry, E. John, Daniel L. Barber, Susan M. Kaech, Joseph N. Blattman, and Rafi Ahmed. 2004. “Antigen-Independent Memory CD8 T Cells Do Not Develop during Chronic Viral Infection.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (45): 16004–9.
- Wherry, E. John, Joseph N. Blattman, Kaja Murali-Krishna, Robbert van der Most, and Rafi Ahmed. 2003. “Viral Persistence Alters CD8 T-Cell Immunodominance and Tissue Distribution and Results in Distinct Stages of Functional Impairment.” *Journal of Virology* 77 (8): 4911–27.
- Wherry, E. John, Sang Jun Ha, Susan M. Kaech, W. Nicholas Haining, Surojit Sarkar, Vandana Kalia, Shruti Subramaniam, Joseph N. Blattman, Daniel L. Barber, and Rafi Ahmed. 2007. “Molecular Signature of CD8+ T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection.” *Immunity* 27 (4): 670–84.
- Wherry, E. John, and Makoto Kurachi. 2015. “Molecular and Cellular Insights into T Cell Exhaustion.” *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group.
- White, Martyn K., Wenhui Hu, and Kamel Khalili. 2016. “Gene Editing Approaches against Viral Infections and Strategy to Prevent Occurrence of Viral Escape.” *PLoS Pathogens* 12 (12).
- Whitney, James B., Alison L. Hill, Srisowmya Sanisetty, Pablo Penaloza-Macmaster, Jinyan Liu, Mayuri Shetty, Lily Parenteau, et al. 2014. “Rapid Seeding of the Viral Reservoir Prior to SIV Viraemia in Rhesus Monkeys.” *Nature* 512 (1): 74–77.
- Wightman, Fiona, Ajantha Solomon, Gabriela Khoury, Justin A. Green, Lachlan Gray, Paul R. Gorry, Yung Shwen Ho, et al. 2010. “Both CD31 + and CD31 – Naive CD4 + T Cells Are Persistent HIV Type 1–Infected Reservoirs in Individuals Receiving Antiretroviral Therapy.” *The Journal of Infectious Diseases* 202 (11): 1738–48.
- Wightman, Fiona, Ajantha Solomon, Sanjeev S. Kumar, Nicolas Urriola, Kerri Gallagher, Bonnie Hiener, Sarah Palmer, Catriona McNeil, Roger Garsia, and Sharon R. Lewin. 2015. “Effect of Ipilimumab on the HIV Reservoir in an HIV-Infected Individual with Metastatic Melanoma.” *AIDS*. Lippincott Williams and Wilkins.
- Wilens, Craig B., John C. Tilton, and Robert W. Doms. 2012. “Molecular Mechanisms of HIV

- Entry." In , 223–42. Springer, Boston, MA.
- Williams, James P., Jacob Hurst, Wolfgang Stöhr, Nicola Robinson, Helen Brown, Martin Fisher, Sabine Kinloch, et al. 2014. "HIV-1 DNA Predicts Disease Progression and Post-Treatment Virological Control." *ELife* 3: e03821.
- Williams, Wilton B., Hua Xin Liao, M. Anthony Moody, Thomas B. Kepler, S. Munir Alam, Feng Gao, Kevin Wiehe, et al. 2015. "Diversion of HIV-1 Vaccine-Induced Immunity by Gp41-Microbiota Cross-Reactive Antibodies." *Science* 349 (6249): aab1253.
- Willinger, Tim, Anthony Rongvaux, Hitoshi Takizawa, George D. Yancopoulos, David M. Valenzuela, Andrew J. Murphy, Wojtek Auerbach, et al. 2011. "Human IL-3/GM-CSF Knock-in Mice Support Human Alveolar Macrophage Development and Human Immune Responses in the Lung." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (6): 2390–95.
- Wilson, Elizabeth B., Douglas H. Yamada, Heidi Elsaesser, Jonathan Herskovitz, Jane Deng, Genhong Cheng, Bruce J. Aronow, Christopher L. Karp, and David G. Brooks. 2013. "Blockade of Chronic Type I Interferon Signaling to Control Persistent LCMV Infection." *Science* 340 (6129): 202–7.
- Wit, Stephane De, Caroline A Sabin, Rainer Weber, Signe Westring Worm, Peter Reiss, Charles Cazanave, Wafaa El-Sadr, et al. 2008. "Incidence and Risk Factors for New-Onset Diabetes in HIV-Infected Patients: The Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs (D:A:D) Study." *Diabetes Care* 31 (6): 1224–29.
- Wittner, Melanie, Gábor A. Dunay, Silke Kummer, Maximillian Bockhorn, Anja Höfner, Stefan Schmiedel, Olaf Degen, Jan Van Lunzen, Johanna M. Eberhard, and Julian Schulze Zur Wiesch. 2018. "CD32 Expression of Different Memory t Cell Subpopulations in the Blood and Lymph Nodal Tissue of HIV Patients and Healthy Controls Correlates with Immune Activation." *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 77 (4): 345–49.
- Witvrouw, Myriam, Christophe Pannecouque, William M. Switzer, Thomas M. Folks, Erik De Clercq, and Walid Heneine. 2004. "Susceptibility of HIV-2, SIV and SHIV to Various Anti-HIV-1 Compounds: Implications for Treatment and Postexposure Prophylaxis." *Antiviral Therapy* 9 (1): 57–65.
- Wong, Joseph K., and Steven A. Yukl. 2016. "Tissue Reservoirs of HIV." *Current Opinion in HIV and AIDS* 11 (4): 362–70.
- Woo, Seng Ryong, Meghan E. Turnis, Monica V. Goldberg, Jaishree Bankoti, Mark Selby, Christopher J. Nirschl, Matthew L. Bettini, et al. 2012. "Immune Inhibitory Molecules LAG-3 and PD-1 Synergistically Regulate T-Cell Function to Promote Tumoral Immune Escape." *Cancer Research* 72 (4): 917–27.
- Wu, Fan, Ilnour Ourmanov, Takeo Kuwata, Robert Goeken, Charles R. Brown, Alicia Buckler-White, Ranjini Iyengar, Ronald Plishka, Scott T. Aoki, and Vanessa M. Hirsch. 2012. "Sequential Evolution and Escape from Neutralization of Simian Immunodeficiency Virus SIVsmE660 Clones in Rhesus Macaques." *Journal of Virology* 86 (16): 8835–47.
- Wu, Li, and Vineet N. KewalRamani. 2006. "Dendritic-Cell Interactions with HIV: Infection and Viral Dissemination." *Nature Reviews Immunology*. Nat Rev Immunol.
- Wunderlich, M., F. S. Chou, K. A. Link, B. Mizukawa, R. L. Perry, M. Carroll, and J. C. Mulloy. 2010. "AML Xenograft Efficiency Is Significantly Improved in NOD/SCID-IL2RG Mice Constitutively Expressing Human SCF, GM-CSF and IL-3." *Leukemia*. Nature Publishing Group.
- Xiao, Yanping, Sanhong Yu, Baogong Zhu, Denis Bedoret, Xia Bu, Loise M. Francisco Duke-Cohan, Dale T. Umetsu, Arlene H. Sharpe, Rosemarie H. DeKruyff, and Gordon J. Freeman. 2014. "RGMB Is a Novel Binding Partner for PD-L2 and Its Engagement with PD-L2 Promotes Respiratory Tolerance." *Journal of Experimental Medicine* 211 (5): 943–59.

- Xu, Huanbin, Xiaolei Wang, and Ronald S. Veazey. 2013. "Mucosal Immunology of HIV Infection." *Immunological Reviews* 254 (1): 10–33.
- Yaguchi, Tomonori, Asuka Kobayashi, Takashi Inozume, Kenji Morii, Haruna Nagumo, Hiroshi Nishio, Takashi Iwata, et al. 2018. "Human PBMC-Transferred Murine MHC Class I/II-Deficient NOG Mice Enable Long-Term Evaluation of Human Immune Responses." *Cellular and Molecular Immunology* 15 (11): 953–62.
- Yajima, Misako, Ken-Ichi Imadome, Atsuko Nakagawa, Satoru Watanabe, Kazuo Terashima, Hiroyuki Nakamura, Mamoru Ito, Norio Shimizu, Naoki Yamamoto, and Shigeyoshi Fujiwara. 2009. "T Cell-Mediated Control of Epstein-Barr Virus Infection in Humanized Mice." *The Journal of Infectious Diseases* 200 (10): 1611–15.
- Yan, Nan, and Zhijian J. Chen. 2012. "Intrinsic Antiviral Immunity." *Nature Immunology*. Nat Immunol.
- Yasutomi, Y, K A Reimann, C I Lord, M D Miller, and N L Letvin. 1993. "Simian Immunodeficiency Virus-Specific CD8+ Lymphocyte Response in Acutely Infected Rhesus Monkeys." *Journal of Virology* 67 (3): 1707–11.
- Yin, Chaoran, Ting Zhang, Xiyang Qu, Yonggang Zhang, Raj Putatunda, Xiao Xiao, Fang Li, et al. 2017. "In Vivo Excision of HIV-1 Provirus by SaCas9 and Multiplex Single-Guide RNAs in Animal Models." *Molecular Therapy* 25 (5): 1168–86.
- Younes, Souheil Antoine, Bader Yassine-Diab, Alam R. Dumont, Mohamed Rachid Boulassel, Zvi Grossman, Jean Pierre Routy, and Rafick Pierre Sékaly. 2003. "HIV-1 Viremia Prevents the Establishment of Interleukin 2-Producing HIV-Specific Memory CD4+ T Cells Endowed with Proliferative Capacity." *Journal of Experimental Medicine* 198 (12): 1909–22.
- Youngblood, Ben, Alessandra Noto, Filippos Porichis, Rama S. Akondy, Zaza M. Ndhlovu, James W. Austin, Rebeka Bordi, et al. 2013. "Cutting Edge: Prolonged Exposure to HIV Reinforces a Poised Epigenetic Program for PD-1 Expression in Virus-Specific CD8 T Cells." *The Journal of Immunology* 191 (2): 540–44.
- Yukl, Steven A., Sara Gianella, Elizabeth Sinclair, Lorrie Epling, Qingsheng Li, Lijie Duan, Alex L. M. Choi, et al. 2010. "Differences in HIV Burden and Immune Activation within the Gut of HIV-Positive Patients Receiving Suppressive Antiretroviral Therapy." *The Journal of Infectious Diseases* 202 (10): 1553–61.
- Yukl, Steven A, Amandeep K Shergill, Terence Ho, Maudi Killian, Valerie Girling, Lorrie Epling, Peilin Li, et al. 2013. "The Distribution of HIV DNA and RNA in Cell Subsets Differs in Gut and Blood of HIV-Positive Patients on ART: Implications for Viral Persistence." *The Journal of Infectious Diseases* 208 (8): 1212–20.
- Zajac, Allan J., Joseph N. Blattman, Kaja Murali-Krishna, David J.D. Sourdive, M. Suresh, John D. Altman, and Rafi Ahmed. 1998. "Viral Immune Evasion Due to Persistence of Activated T Cells without Effector Function." *Journal of Experimental Medicine* 188 (12): 2205–13.
- Zaunders, John, and David Van Bockel. 2013. "Innate and Adaptive Immunity in Long-Term Non-Progression in HIV Disease." *Frontiers in Immunology* 4 (APR).
- Zeng, Ming, Peter J Southern, Cavan S Reilly, Greg J Beilman, Jeffrey G Chipman, Timothy W Schacker, and Ashley T Haase. 2012. "Lymphoid Tissue Damage in HIV-1 Infection Depletes Naïve T Cells and Limits T Cell Reconstitution after Antiretroviral Therapy." *PLoS Pathogens* 8 (1): e1002437.
- Zeng, Yang, Bingrun Liu, Marie Thérèse Rubio, Xinyue Wang, David M. Ojcius, Ruoping Tang, Antoine Durrbach, Zhitao Ru, Yusen Zhou, and Yu Chun Lone. 2017. "Creation of an Immunodeficient HLA-Transgenic Mouse (HUMAMICE) and Functional Validation of Human Immunity after Transfer of HLA-Matched Human Cells." *PLoS ONE* 12 (4).
- Zhang, J., and A. S. Perelson. 2013. "Contribution of Follicular Dendritic Cells to Persistent

- HIV Viremia.” *Journal of Virology* 87 (14): 7893–7901.
- Zhang, Ji Yuan, Zheng Zhang, Xicheng Wang, Jun Liang Fu, Jinxia Yao, Yanmei Jiao, Liangen Chen, et al. 2007. “PD-1 up-Regulation Is Correlated with HIV-Specific Memory CD8+ T-Cell Exhaustion in Typical Progressors but Not in Long-Term Nonprogressors.” *Blood* 109 (11): 4671–78.
- Zhao, Baoguang, Evon Winborne, Sherin S. Abdel-Meguid, Michael D. Minnich, Jeffrey S. Culp, and Christine Debouck. 1993. “Three-Dimensional Structure of a Simian Immunodeficiency Virus Protease/Inhibitor Complex. Implications for the Design of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and 2 Protease Inhibitors.” *Biochemistry* 32 (48): 13054–60.
- Zhen, Anjie, Valerie Rezek, Cindy Youn, Brianna Lam, Nelson Chang, Jonathan Rick, Mayra Carrillo, et al. 2017. “Targeting Type I Interferon-Mediated Activation Restores Immune Function in Chronic HIV Infection.” *Journal of Clinical Investigation* 127 (1): 260–68.
- Zicari, Sonia, Libera Sessa, Nicola Cotugno, Alessandra Ruggiero, Elena Morrocchi, Carlo Concato, Salvatore Rocca, Paola Zangari, Emma C. Manno, and Paolo Palma. 2019. “Immune Activation, Inflammation, and Non-AIDS Co-Morbidities in HIV-Infected Patients under Long-Term ART.” *Viruses*. MDPI AG.
- Zitvogel, Laurence, Lorenzo Galluzzi, Oliver Kepp, Mark J. Smyth, and Guido Kroemer. 2015. “Type I Interferons in Anticancer Immunity.” *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group.
- Zyl, Gert van, Michael J. Bale, and Mary F. Kearney. 2018. “HIV Evolution and Diversity in ART-Treated Patients.” *Retrovirology*. BioMed Central Ltd.

Titre : Immunothérapie et infection VIH-1 : Étude préclinique dans un modèle de souris humanisée pour le système immunitaire

Mots clés : Immunothérapie, VIH-1, souris humanisée pour le système immunitaire, épuisement, PD1/PD-L1, traitement antirétroviral

Résumé : Malgré l'apport du traitement antirétroviral (ART), l'infection chronique par le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) reste associée à des défauts immunitaires. En association au traitement ART, des immunothérapies pourraient notamment permettre d'agir sur l'inflammation à bas bruit et/ou l'épuisement. La mise en place d'un modèle préclinique est nécessaire pour évaluer l'efficacité de stratégies ciblant la voie PD1/PD-L1. Nous avons utilisé le modèle de souris humanisée pour le système immunitaire (HIS) Balb/c Rag2^{KO} IL2^{γc}^{KO} Sirpα^{NOD} Flk2^{KO} HLA-A2^{HHD} (BRGSF-A2).

Nous avons confirmé le développement physiologique du compartiment T humain dans ce modèle, et montré des profils d'épuisement (PD1, TIGIT) et de sénescence (CD57) similaires à ceux observés chez l'homme.

Nous avons ensuite développé un modèle HIS d'infection contrôlée par trithérapie et évalué l'impact de thérapies ciblant la voie PD1/PD-L1. Dans un modèle d'interruption du traitement ART, nous n'avons pas observé d'effets majeurs d'un blocage αPD1 préalable à l'arrêt du traitement ART. Ce résultat pourrait être lié à l'absence de modification de l'expression de PD1 à la surface des lymphocytes T (LT) au cours de l'infection ou du traitement ART. A l'inverse, nous avons observé une modification des proportions de LT PD-L1⁺ en phase aigüe et durant le traitement ART. L'ajout du traitement αJAK accentuait la diminution de la proportion de LT PD-L1⁺ déjà observée sous ART.

Cibler la voie IFN-I permettrait à la fois de moduler l'inflammation et l'épuisement et constituerait un nouveau levier pour améliorer la qualité des réponses dans le contexte de l'infection VIH-1 contrôlée.

Title: Immunotherapy and HIV-1 infection: Preclinical study in a humanized immune system mouse model

Keywords: Immunotherapy, HIV-1 infection, humanized immune system mouse model, exhaustion, PD1/PD-L1, antiretroviral treatment

Abstract: Despite the success of antiretroviral treatment (ART), chronic infection with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) associates with various immune defects. The combination of immunotherapies with ART may be a promising strategy to modulate low-grade inflammation, and/or exhaustion. The development of a preclinical model is required to evaluate the efficacy of therapies targeting the PD1-PDL1 pathway. In this work, we used the Balb/c Rag2^{KO} IL2^{γc}^{KO} Sirpα^{NOD} Flk2^{KO} HLA-A2^{HHD} (BRGSF-A2) humanized immune system (HIS) mouse model.

We confirmed the physiological development of the human T cell compartment in this model, and observed similar exhaustion (PD1, TIGIT) and senescence (CD57) profiles on T cells in HIS mice, as those observed in humans.

We next developed an HIS model of controlled infection induced by tritherapy and evaluated the impact of therapies targeting the PD1/PD-L1 pathway. In a model of ART interruption, we did not observe any major effects of αPD1 blockage induced prior to ART treatment interruption. This result may be related to the absence of modulation of PD1 expression on T cells during infection or ART treatment. On the contrary, we observed changes in the proportion of PD-L1⁺ T cells in the acute phase of the infection, and also during ART treatment. The addition of αJAK reinforced the reduction in the proportion of PD-L1⁺ T cells, already observed upon ART treatment.

Targeting the IFN-I signaling pathway appears to modulate both inflammation and exhaustion. It may represent a valuable strategy to improve immune responses during chronic controlled HIV-1 infection.