HAL
open science

Les nouvelles approches de l'analyse multi-paramétrique en cytométrie de masse : caractérisation des cellules réservoirs du VIH

Aurélien Corneau

To cite this version:

Aurélien Corneau. Les nouvelles approches de l'analyse multi-paramétrique en cytométrie de masse : caractérisation des cellules réservoirs du VIH. Immunité adaptative. PSL Research University, 2018. Français. NNT : . tel-02534972

HAL Id: tel-02534972

https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-02534972v1

Submitted on 7 Apr 2020

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

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

HAL
archives-ouvertes.fr

Les nouvelles approches de l'analyse multi-paramétrique en cytométrie de masse : caractérisation des cellules réservoirs du VIH

Aurelien Corneau

To cite this version:

Aurelien Corneau. Les nouvelles approches de l'analyse multi-paramétrique en cytométrie de masse : caractérisation des cellules réservoirs du VIH. Immunologie. PSL Research University, 2018. Français. NNT : 2018PSLEP038 . tel-02149652

HAL Id: tel-02149652

https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02149652

Submitted on 6 Jun 2019

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

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

THÈSE DE DOCTORAT

de l'Université de recherche Paris Sciences et Lettres
PSL Research University

Préparée à l'École Pratique des Hautes Études

Les nouvelles approches de l'analyse multiparamétrique en cytométrie de masse
- Caractérisation des cellules réservoirs du VIH -

École doctorale de l'EPHE – ED 472

Spécialité : Systèmes intégrés, environnement et biodiversité

COMPOSITION DU JURY :

Dr. Anne-Sophie BEIGNON
C.N.R.S.
Rapporteur

Dr. Mikael ROUSSEL
I.N.S.E.R.M.
Rapporteur

Dr. Vincent VEILLARD
Sorbonne-Univsersité
Examinateur

Dr. Roger LEGRAND
C.E.A.
Examinateur

Dr. Fabien LE GRAND
C.N.R.S.
Examinateur

Soutenue par :
Aurélien CORNEAU
le 09 octobre 2018

Dirigée par :
Dr. Véronique FRACHET
Pr. Brigitte AUTRAN

École Pratique des Hautes Études | PSL RESEARCH UNIVERSITY PARIS

" La façon dont tu vis ta vie est ton affaire.
Mais souviens-toi, notre cœur et notre corps
ne nous sont donnés qu'une fois. "

André Aciman – Call me by your name

" La proportion de 100 % est exclue à tout
jamais de la terminologie scientifique. "

Amélie Nothomb - Péplu

Remerciements

Je tiens à exprimer ma grande reconnaissance au Pr. Brigitte Autran, qui m'a encadré tout au long de cette thèse et qui m'a fait partager une partie de son savoir. Je la remercie chaleureusement de son accueil, de son soutien indéfectible, de m'avoir permis de réaliser cette thèse et de sa confiance qu'elle m'a prodigué. J'ai pu évoluer et apprendre en continu durant ces 4 années, et pour cela je ne peux que lui dire merci.

Je remercie également le Dr. Véronique Frachet, à la fois pour sa confiance et ses encouragements sans failles, de m'avoir guidé, avec sourire et bienveillance, au sein de méandres administratives mais aussi scientifiques, dans lesquels j'ai parfois tendance à me perdre.

Je n'oublie pas le Dr. Xavier Ronot, mon premier co-directeur de thèse et que je remercie infiniment pour sa bonne humeur, son savoir, son dynamisme et sa présence, même après avoir quitté ses fonctions.

Je souhaite remercier la Dr. Anne-Sophie Beignon et le Dr. Mikael Roussel d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse, ils me font l'honneur d'évaluer mon travail.

Je remercie également Vincent Vieillard d'avoir accepté d'être examinateur de ma thèse.

Je tiens à exprimer ici toute ma reconnaissance et mon estime à Roger Legrand, il m'a fait grandir, et je me réjouis qu'il me fasse l'honneur d'être examinateur de ma thèse, je le remercie chaleureusement.

Un grand merci à Fabien Le Grand d'accepter d'être examinateur de ma thèse au pied levé.

Un immense merci à Catherine Blanc, de m'avoir guidé, accueilli au sein de son équipe, de m'y avoir fait une place et de son soutien et accompagnement indéfectible et amical.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude et mon amitié au Dr. Antonio Cosma, au Dr. Hervé Luche et à Samuel Grandjeaud pour m'avoir appris les analyses complexes et d'avoir toujours répondu présents lorsque je vous ai appelés à l'aide.

Je tiens à remercier :

Sophie Even tout particulièrement pour tout le travail technique qu'elle a pu réaliser avec brio et efficacité, et un petit coucou à Chloé, qui est apparue durant ces années.

Timothée Bruel qui m'a été d'une grande aide pour les dernières corrections.

Toutes les personnes ayant travaillé avec moi, Bénédicte Hoareau, Stéphanie Graff-Dubois, Elyes Ben-Salah, Assia Samri, le Dr. Amélie Guihot, Tofike Chrifi, toute l'équipe du T4T8, Julien Verdier, David Ollitrault, Aïda Meghraoui, Gaelle Dzangue Tchoupou, Laetitia Dubouchet, Pauline Maby, Lorenzo Giordani et Gilles Marodon.

Naya Sylla, Betty Dondi et Mathilde Fluhr d'avoir pu assurer quand moi je ne pouvais pas lors des enseignements.

Parce que ces remerciements ne seraient pas possible sans en faire un spécial à Kélhia Sendeyo, avec qui nous avons passé des heures à appréhender les analyses non supervisées, à râler également, et finalement à être satisfaits d'un résultat qui pouvait mettre des semaines à arriver.

Thanks so much à Iulia, Charlotte et Florian pour m'avoir accompagné sur l'écriture et la correction de ce manuscrit.

Parce que mes amis et ma famille sont toujours là malgré mes absences (un spécial remerciement à Elodie, à qui je dois bien cela). A Nico, Bibi, Peter, Mario, Aurélien, Mathieu, le groupe des mémés flingueuses et mon frère Maxime, qui m'ont permis de réussir ce travail en me rappelant qu'il ne faut pas oublier de s'amuser, que ce soit lors d'une escape game, devant RuPaul Drag Race, d'une sortie sur les champs Élysée un soir de victoire de coupe du monde –et malgré mon aversion pour le football-, d'un resto, d'une boite ou juste posé sur la terrasse à côté du ministère de la recherche.

Enfin, parce que ce travail prend de la place dans la vie, un merci à Rudy, il est resté un soutien (presque) indéfectible jour après jour et m'a tenu la main pendant ces 4 années, et pour finir, un immense merci à mes parents, vous m'avez permis d'avancer dans la vie et c'est grâce à vous, à votre présence et à votre amour. Je vous aime.

Table des matières

PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION 16

Physiologie du système immunitaire 17

1. Les Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPA) 17
   - i. Les monocytes 18
   - ii. Les cellules dendritiques (ou DC) 20
     - a. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) 20
     - b. Les cellules dendritiques myéloïdes (mDC) 21
     - c. Les cellules de Langerhans 21
     - d. Les cellules dendritiques interstitielles 22
     - e. Une nouvelle population de DC dans les muqueuses intestinales ? 22
   - iii. Les macrophages 22
2. Les lymphocytes T (LT) 24
   - i. Les LTCD4+ 24
     - a. Les Th1 et Th2 25
     - b. Les TH17 26
     - c. Les T folliculaire helpers (ou Tfh) 26
     - d. Les LT régulateurs (ou Treg) 27
     - e. Les LT mémoires 28
     - f. Le CMH de classe II 30
     - g. Processing spécifique des LTCD4+ 30
   - ii. Les LT CD8+ 31
     - a. Le CMH de classe I 32
     - b. Processign spécifique des LTCD8+ 33
3. Les lymphocytes B 34
   - i. Les anticorps 34
   - ii. Action immunitaire 35

Le Virus de l'Immuno-déficience Humain (V.I.H.) 36

4. La diversité du VIH 36
   - i. La diversité des quasi-espèces et leur distribution 37

ii. La diversité des types et des souches 37
5. La physiopathologie de l'infection 40
i. Les portes d'entrée du VIH 40
ii. Le VIH est un virus qui s'intègre 41
a) Importance de l'activation lymphocytaire 41
b) Pénétration et intégration du virus dans la cellule 43
c) Du provirus intégré à la réplication virale 43
iii. Conséquences physiopathologiques de l'infection par le VIH 45
La réponse immunitaire au VIH 48
1. Les Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPA) 48
i. Les monocytes 48
ii. Les cellules dendritiques (ou DC) 49
iii. Les macrophages 49
2. Réponse humorale et action des anticorps dans le cadre d'une infection VIH 51
3. Les réponses T face à l'infection par le VIH 52
i. Induction d'une réponse T et efficacité chez l'Homme 52
a. La réponse T CD8 52
b. La réponse T CD4 52
ii. Activation lymphocytaire et épuisement cellulaire 54
a. Activation par le virus lui même 54
b. Activation et biomarqueurs 55
1. CD69 55
2. CD25 56
3. HLA-DR 56
4. CD38 56
c. Activation et intégrité digestive 57
d. Lymphocytes T régulateurs (Treg) 58
4. VIH et cure totale 60
i. Atteinte des réservoirs 61
ii. Mécanisme de latence 62
iii. Virémie résiduelle détectable 63

iv. Quantification du réservoir 64
v. Une aiguille dans une botte de foin 64
b. Les immune-checkpoints inhibiteurs 65
1. CTLA-4 65
2. PD-1 66
3. TIGIT 67
4. Tim-3 67
c. Les biomarqueurs des réservoirs 68
vi. Réservoir et cycle cellulaire 70
L'apparition d'une nouvelle technologie multiparamétrique pour caractériser au mieux les cellules infectées par le VIH 72
1. Combler le manque en réalisant une évaluation « one-cell » multidimensionnelle 72
2. Principes technologiques 74
i. Conception d'un projet 74
ii. Le cytomètre de masse 77
a. Introduction de l'échantillon et ionisation 77
b. Interface sous vide et purifications des ions 78
c. Séparation des ions et acquisition 78
iii. Limitations 79
3. Une nouvelle approche pour analyser des données 82
i. Analyse par clusters 83
ii. Analyse par réductions de dimensions 83
Objectifs de l'étude 86
1. L'apport de la cytométrie de masse pour la caractérisation des réservoirs cellulaires 86
2. Apport de la cytométrie de masse dans la caractérisation du cycle cellulaire (Bhebehani G.K., et al., 2012) 89
3. Apport de la cytométrie de masse dans la caractérisation du réservoir VIH 91
i. Entrée, réplication et remodelage du VIH dans les lymphocytes T CD4+ amygdaliens (Cavrois M., et al., 2017) 91
ii. Lymphocytes T CD4+, CD32a et VIH 92
4. Rationnel de l'étude 94
SECONDE PARTIE : RESULTATS 95
Article n°1 96

1. Résumé 97
i. Contexte et objectif : 97
ii. Matériel et méthodes 97
iii. Résultats : 98
iv. Conclusion : 99
Article n°2 127
1. Résumé 128
i. Contexte et objectif : 128
ii. Matériel et méthodes 129
iii. Résultats : 130
iv. Discussion-Conclusion : 132
2. article : Fine characterization of host cells of latent and productive reservoirs of HIV-1 by an innovative multiplex approach (en cours d'écriture) 134
i. Introduction 134
ii. Materials and methods 136
a. Study Subjects 136
b. Antibodies 136
c. Preparation of Cells 137
d. Instrument acquisition details 137
e. Data Analysis 138
iii. Results 140
a. Distribution of CD4 T cell subpopulations of peripheral blood 140
b. Co-expression of markers of activation, cycling and cell depletion in the different peripheral blood TCD4 + subpopulations 140
c. Phenotypic characterization of CD32 cells 141
d. Cell characterization of infected cells 142
iv. Discussion 152
v. References 154
TROISIEME PARTIE : DISCUSSION ET PERSPECTIVES 155
1. L'apport de la cytométrie de masse dans l'analyse des réservoirs du VIH 156
2. La relation cycle cellulaire et marqueurs phénotypiques 157
3. Le réservoir viral : Étude du CD32 et des réservoirs productifs 160

4. L'analyse de données 163
i. L'analyse non supervisée automatique par clustering : utilisation de SPADE 163
ii. L'analyse non supervisée automatique par réduction de dimensions : utilisation de viSNE 165
iii. L'analyse des populations rares 166
5. Perspectives 168
ANNEXES Article Annexe n° 1 170
Article Annexe n° 2 181
Article Annexe n° 3 195
BIBLIOGRAPHIE 208
Résumé 239
Abstract 240

Liste des abréviations

Ac : Anticorps

ADCC : Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ag : Antigène

APC : Cellules Présentatrices d'Antigènes

ARN : Acide ribonucléique

ART : Traitements antirétroviraux combinés

ARV : Antirétroviraux

BHE : Barrière hémato-encéphalique

CCR5 (Chemokine (C-C motif) receptor 5) : Récepteur 5 à chimiokine de motif C-C

CD : Cluster de différentiation

CMF : Cytométrie en flux

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CMM : Cytométrie de masse

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

CTL : Lymphocyte T cytotoxique

CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4

CVP : Charge virale plasmatique

CXCR4 (Chemokine CXC motif receptor 4) : Récepteur 4 à chimiokine de motif CXC

DC : Cellule dendritique

FcR : Récepteur pour le fragment Fc

HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy): Traitement antirétroviral hautement actif

HLA : Histocompatibility leucocyte antigen

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

Lag-3 : Lymphocyte activation gene 3

LB : Lymphocyte B

LCR : Liquide céphalo-rachidien

LT : Lymphocyte T

LTCD4+ : Lymphocyte T CD4+

LTCD8+ : Lymphocytes T CD8+

LTNP (Long terme non progresseur) : Asymptomatique à long terme

mDC : Cellules dendritiques myéloides

NF-kB : Nuclear Factor-kB

NK : Natural killer

PBMC : Cellules mononuclées du sang périphérique

PCR : Polymerase chain reaction

PD-1 : Program cell death - 1

pDC : Cellules dendritiques plasmacytoides

RT : Reverse transcriptase

RT-PCR: Reverse transcription-polymerase chain reaction

SIV : Simian immunodeficiency virus

SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise

SNC : Système nerveux central

TCM : Lymphocyte T central mémoire

TEM : Lymphocyte T effecteur mémoire

Tfh : Lymphocyte T folliculaire auxiliaire

TN : Lymphocyte T naïf

TNF : Tumor necrosis factor

TSCM : Lymphocyte T cellule souche mémoire

TTM : Lymphocyte T transitionnel mémoire

Treg : Lymphocyte T régulateur

TI: Transcriptase inverse

TIGIT : T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains

Tim-3 : T cellimmunoglobulin and mucin-domain containing-3

VIH : Virus de l'immunodéficience humain

Table des figures

Figure 1 : Les populations de macrophages et de DC. 18
Figure 2 : Les monocytes humains sont classés en trois sous-types basés sur l'expression différentielle de CD14 et CD16 : classique (CD14+), intermédiaire (CD14+ CD16+ ou CD14+ CD16low) et les monocytes non classiques (CD14LowCD16+). 19
Figure 3 : Les différentes sous populations de LTCD4+ 28
Figure 4 : Schéma de la différenciation des sous-population de LT mémoire circulants et tissulaires. 29
Figure 5: Schéma de la structure du CMH de classe II 30
Figure 6 : Schéma de l'apprêtement des antigènes protéiques aux LTCD4+ 31
Figure 7 : Schéma de la structure du CMH de classe I 32
Figure 8 : Schéma montrant la structure des Immunoglobulines (Ig) membranaires et solubles 34
Figure 9 : Schéma en image de synthèse du VIH-1 36
Figure 10 : Expression de CCR5 et CXCR4 sur les macrophages et les LT. 39
Figure 11 : Schéma de la liaison VIH – CD4 43
Figure 12 : Représentation schématique du cycle de réplication du VIH 44
Figure 13 : Évolution des paramètres virologiques et immunologiques au cours de l'infection par le VIH. 46
Figure 14 : Graphique de la diminution de la charge virale au cours d'une polychimiothérapie 61
Figure 15 : CD32a caractérise le réservoir de LTCD4+ hébergeant le VIH. 69
Figure 16 : Schéma synthétique de la conception d'un projet de cytométrie de masse jusqu'au passage de l'échantillon 79
Figure 17 : Représentation schématique des principales méthodes d'analyses, ... 82
Figure 18 : Représentation SPADE montrant le programme de différenciation hématopoïétique dans la moelle osseuse humaine d'un donneur sain 87
Figure 19 : Validation de la mesure du cycle cellulaire en cytométrie de masse sur des LT issus de PBMC et stimulés par PMA ionomycine 89
Figure 20 : Caractérisation des sous populations et analyse du cycle cellulaire dans la moelle osseuse, représentation de la lignée B 90
Figure 21 : (B) Représentation des cellules non-infectées et fusionnées par le VIH par t-SNE basé sur l'expression de 35 marqueurs de surface. On retrouve, en rouge, les LT

amygdaliens non infectés ou, en bleu, fusionnés avec le VIH. (C) Identification des principaux sous-ensembles de LT. 91

Résumé

La cytométrie de masse (CMM) permet une très large analyse multiplexe des populations très hétérogènes de cellules immunitaires et a rendu possible la découverte de petits sous-ensembles jusqu'ici inconnus. Elle permet de définir précisément l'état des populations de lymphocytes notamment en ce qui concerne leur différenciation, activation et leur entrée dans le cycle cellulaire. Dans cette étude, la CMM est utilisée pour tenter de mieux caractériser les réservoirs du VIH.

Avec l'introduction de la thérapie antirétrovirale combinée (ART) en 1996, l'infection par le VIH est passée d'un destin fatal à une maladie chronique gérable et une durée de vie normale grâce à une réduction de la réplication virale active en deçà des limites de détections optimales. Si le traitement est interrompu, la charge virale chez le patient augmente à nouveau du fait des réservoirs de provirus viables localisés dans des populations de cellules à longue durée de vie et qui ne peuvent pas être éliminées par les traitements actuels. Ces cellules infectées réservoirs constituent un obstacle majeur à l'éradication du VIH. Deux types de réservoirs ont été mis en évidence :

- Les provirus dans des populations cellulaires au repos ou inactivées sont latents, mais, ils peuvent être réactivés par divers stimuli et ainsi réamorcer le cycle de réplication virale,
- Les provirus dans des cellules activées ou aisément activables peuvent continuer à produire à bas bruit du virus, on parle de réservoir productif.

Le réservoir le mieux caractérisé est celui des lymphocytes T CD4+ et est principalement hébergé dans les TCM, les TTM, les TSCM et les Tfh. Il a très récemment été montré que la majorité du réservoir serait contenu dans des lymphocytes T CD4+ CD32a+ mais cette étude reste contestée. Il existe d'autres réservoirs minoritaires de VIH qui contribuent à la propagation virale dans différentes cellules telles que les macrophages, monocytes ou encore les cellules dendritiques. Cependant, la production du VIH *in vivo* provient de cellules à ce jour mal caractérisées.

Une première étude nous a permis d'évaluer les stades du cycle cellulaire en association à des marqueurs de différenciation, d'activation et d'épuisement, pour aboutir à une évaluation poussée de l'état de quiescence des lymphocytes T CD4 susceptibles d'abriter les réservoirs latents de VIH. Cette large analyse multiplexe démontre que certains sous-ensembles des LTCD4+CD25-HLA-DR- classiquement

considérées "au repos" contiennent en fait des quantités notables de cellules en cycle ou exprimant des récepteurs inhibiteurs, ouvrant de nouvelles voies pour une redéfinition des cellules T CD4 quiescentes du sang périphérique.

Une deuxième étude avait pour but de définir les populations de LT CD4 produisant du VIH *in vivo*. Nous avons développé une analyse multiparamétrique sur des cellules de patients VIH+ sous ART et en phase d'interruption thérapeutique. Cette étude met en évidence que les cellules CD3+CD4+CD32high expriment un fort taux de marqueurs d'activation et reçoivent d'importants signaux d'activation via des cytokines, à l'inverse des cellules CD32a-. D'autre part, l'analyse des LTCD4+ producteurs de VIH (exprimant la protéine de capside p24), nous a permis de détecter un très faible nombre de cellules positives p24+ (inférieur à 0,004% en phase d'ATI mais aucun avant). Le phénotype des cellules productrices a ensuite été mis en évidence. Il s'agit de lymphocytes T n'exprimant pas de CD8 enrichies d'un facteur 4 en cellules TSCM, et un facteur 2 en TFH, très enrichies en cellules activées co-exprimant 3 marqueurs d'activation (d'un facteur 20) et entrées en cycle (Ki67+) et/ou sur-exprimant des molécules de contrôle immunitaire (ICP) avec un enrichissement d'un facteur 500. Ceci nous permet de détecter des cellules productrices avec des fréquences beaucoup plus élevées dans ces populations TCD3+CD8- en cycle à hauteur de 0,08%, et en phase G2 (2,46%), mais également dans les cellules présentant une poly-expressions des 4 immune-checkpoints (2,27%).

L'avènement de la cytométrie de masse a augmenté de façon exponentielle les informations que nous pouvions obtenir sur une cellule. Grâce à cet outil, l'identification du cycle cellulaire en corrélation avec différents marqueurs phénotypiques permet d'explorer des informations jusque-là inaccessibles, entre autres l'analyse des réservoirs latents et productifs du VIH. Ce travail permet ainsi de caractériser le plus précisément possible ces cellules productrices de VIH, mais aussi les cellules latentes, et potentiellement réservoirs du virus.

PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION

Physiologie du système immunitaire

L'importance du système immunitaire (SI) pour conférer une protection contre les pathogènes tels que les virus, les bactéries et les parasites est bien établie. Il s'agit d'un système de défense inné et adaptatif, composé d'une myriade de cellules et de molécules composant un réseau dynamique capable de reconnaitre spécifiquement et d'éliminer un grand nombre de micro-organismes. Cependant, la réponse de l'hôte reste insuffisante pour éliminer l'infection du VIH qui cible les cellules immunitaires.

Le SI comprend 2 voies d'action : le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif. On retrouve dans le premier : les cellules dendritiques (DC), les monocytes, les macrophages et les « Natural killers » (NK) ; quant au second, il comprend les lymphocytes T CD4+ (LTCD4) et CD8 (LTCD8), ou encore les lymphocytes B (LB).

Il est important, pour obtenir une fonction immunitaire optimale, qu'il y ait une communication efficace entre toutes les branches du système immunitaire. Or, les infections virales chroniques représentent un défi unique pour celui-ci : le virus se réplique de manière persistante et supplante (voire renverse) la réponse antivirale initiale, permettant l'établissement d'une infection chronique entrainant une stimulation continue des compartiments immunitaires innés et adaptatifs.

1. Les Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPA)

Les cellules myéloïdes telles que les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (DC) sont des composants clés du système immunitaire inné contribuant au maintien de l'homéostasie tissulaire et au développement des réponses immunitaires face aux agents pathogènes. Elles ont pour particularité d'exprimer la molécule CD4 à leur surface, bien qu'en quantité très inférieure aux LT CD4+. Elles sont de ce fait la cible potentielle du VIH. Les monocytes et les DC circulent dans le sang et infiltrent les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes et ont généralement une courte durée de vie (Àlvarez-Errico D. et al., 2015). Inversement, les macrophages, qu'ils soient issus des monocytes ou issus de précurseurs lors du développement embryonnaire, ont une durée de vie beaucoup plus longue (Hoeffel G. end Ginhoux F. 2015). Des agents pathogènes, tels que le VIH, ciblent la molécule CD4 exprimée par ces cellules et détournent les fonctions de ces cellules myéloïdes pour la réplication virale ou la dissémination et la transmission cellulaire.

i. Les monocytes

Les monocytes sont des cellules immunitaires effectrices qui jouent un rôle important dans la réponse immunitaire innée primaire en ayant la propriété de migrer dans les tissus inflammés grâce à des récepteurs aux chimiokines et à des molécules d'adhésion, en sécrétant des cytokines et en captant des débris cellulaires ou des molécules toxiques. La nature hétérogène des monocytes et leurs capacités à se différencier en macrophages dérivés de monocytes ou en cellules dendritiques dérivées de monocytes leur permettent de servir de pont entre les réponses immunitaires innées et adaptatives (Sampath P. et al., 2018).

Elles patrouillent dans le sang et pénètrent dans les organes pour réapprovisionner les CPA mourantes, ou migrent dans les tissus dans le cas d'infection par un pathogène (Patel A.A., et al. 2017). Les monocytes indifférenciés vont vivre quelques jours dans la circulation sanguine, mais lorsqu'ils rencontrent un pathogène et s'activent, ils vont par division augmenter leur durée de vie de plusieurs mois. Les monocytes représentent respectivement environ 10% des leucocytes du sang périphérique humain, avec un pool considérable situé dans la rate (Ginhoux F. and Jung S., 2014).

Ces cellules présentent une plasticité développementale bien établie lorsqu'ils se différencient en macrophages ou DC, selon le milieu inflammatoire (Anbazhagan K. et al., 2014), mais ce ne sont pas les seuls précurseurs de ces cellules. En revanche, dans l'intestin, la majorité des macrophage et DC proviennent de monocytes sanguins qui sont continuellement réapprovisionnés (Ginhoux F. and Jung S., 2014).

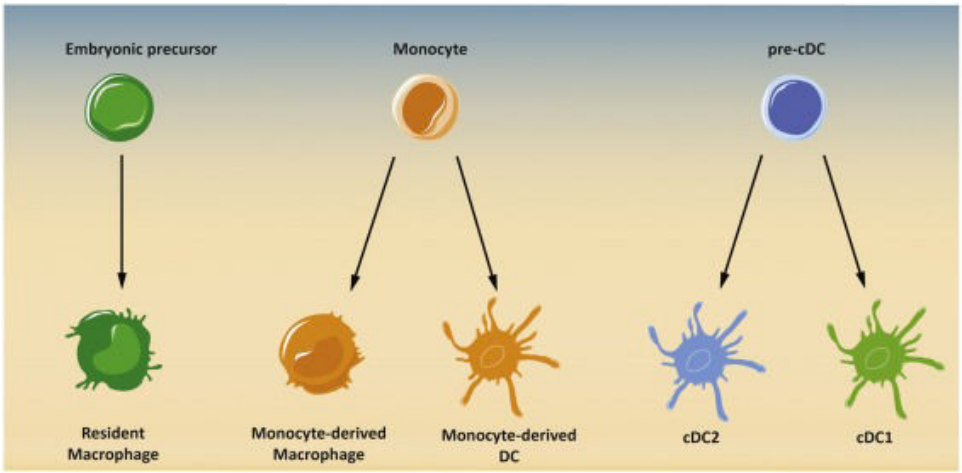
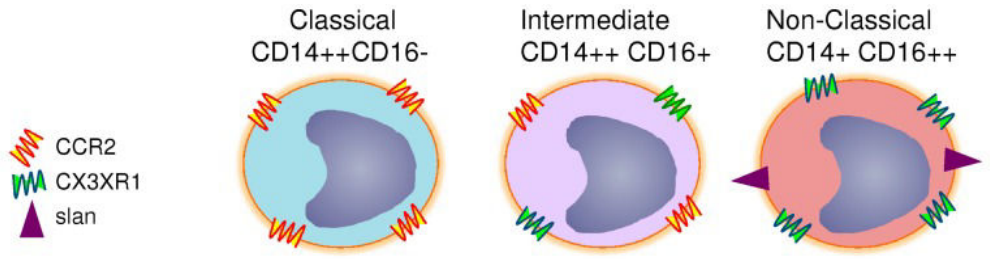


Figure 1 : Les populations de macrophages et de DC peuvent être divisées en deux catégories en fonction de leur ontogenèse : dérivées de monocytes ou de précurseurs dédiés.

Tiré de Human in vivo-differentiated monocyte-derived dendritic cells; TL Tang-Huau, E Segu

L'identification initiale des monocytes était délicate car ils sont difficiles à différencier des DC sanguins, des lymphocytes activés ou des cellules NK sur la seule base de la

morphologie microscopique. Les progrès de la cytométrie en flux ont permis l'identification correcte des monocytes en utilisant des caractéristiques de taille / granularité et l'expression de marqueurs spécifiques. La cytométrie en flux a également fourni des connaissances sur l'hétérogénéité de la population monocytaire. Les monocytes humains sont maintenant classés en trois sous-types basés sur l'expression différentielle de CD14 et CD16 : les « monocytes classiques » CD14 high CD16-, les « monocytes intermédiaires » CD14high CD16+ et les « monocytes non classiques » CD14low CD16high (Ginhoux F. and Jung S., 2014). Le principal marqueur des monocytes humains, CD14, est un antigène de différenciation glycoprotéinique et myélomonocytaire qui fonctionne comme une protéine accessoire du récepteur Toll-like-4 (TLR). Le CD16 (ou le récepteur Fcγ III) est une molécule de la superfamille des Ig impliquée dans la cytotoxicité des LT dépendants des anticorps (ADCC). Les monocytes expriment également le CD4. Les monocytes classiques et les monocytes intermédiaires et non classiques représentent respectivement environ 90% et 10% des monocytes totaux (Ziegler-Heitbrock, 2014). Des études récentes ont permis d'élucider la différentiation et la durée de vie des sous-ensembles monocytaires humains et ont démontré que les monocytes classiques sortent de la moelle osseuse pour se transformer en monocytes intermédiaires qui se différencient ensuite en monocytes non classiques (Pattel A.A., et al. 2017).



Chemotaxis	CCR2/CCL2	CCR2/CCL2 CX3CR1/CX3CL1	CX3CR1/CX3CL1
Surface markers	**CCR2**, CD62L, CD11b, TLR-4	CCR2, CX3CR1, HLA-DR, CD74, CD163,CLEC10A, GFRA2	**CX3CR1**, **slan**, CXCR4, HLA-DR, LFA-1
Cytokines	IL-10, IL-1	TNF-α, IL-10	⇧TNF-α
Frequency in Peripheral Blood	~80-90%	<15%	<15%

Figure 2 : Les monocytes humains sont classés en trois sous-types basés sur l'expression différentielle de CD14 et CD16 : classique (CD14+), intermédiaire (CD14+ CD16+ ou CD14+ CD16low) et les monocytes non classiques (CD14LowCD16+).

Tiré de : The Biology of Monocytes and Dendritic Cells: Contribution to HIV Pathogenesis, Wacleche V.S., et al., 2018

ii. Les cellules dendritiques (ou DC)

Les DC représentent un groupe de CPA hétérogène, sensible aux pathogènes et induisant spécifiquement les réponses T naïves et mémoires. Elles sont situées dans tous les tissus, notamment la peau et les muqueuses et sont capables de capter le pathogène et de migrer vers les ganglions lymphatiques (Barratt-Boyes et al., 1997). Le terme DC regroupe plusieurs sous-populations en fonction de leur état de maturation et de leur localisation (Ueno et al., 2007). On retrouve dans le sang périphérique, des DC humaines caractérisées comme dépourvues de marqueurs T : CD3, CD4, CD8, de marqueurs B : CD19 et CD20 et de marqueurs monocytaires : CD14 et CD16, mais exprimant fortement HLA-DR et d'autres marqueurs de lignée DC comme le CD1a et CD1c.

a. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC)

Les pDC sont une population relativement rare (0,3 à 0,5% des cellules du sang périphérique), et elles sont produites continuellement dans la moelle osseuse et circulent dans le sang. A l'état basal elles résident dans la rate, le thymus, les ganglions lymphatiques, les organes lymphoïdes associés aux muqueuses, le poumon et le foie (Colonna M. et al. 2004, Masten B.J. et al. 2006). Le taux de prolifération des pDC dans les organes lymphoïdes est très faible où moins de 0,3 % des pDC sont en cycle cellulaire. Un remplacement continuel par le sang est nécessaire pour maintenir le pool de pDC dans l'organisme à son niveau homéostatique (Merad M. and Manz M.G. 2009).

Ce sont des cellules spécialisées qui produisent massivement des interférons (IFN) de type 1 lors d'une infection virale. En plus d'induire un large éventail de réponses affectant la fonction de plusieurs cellules immunitaires, les IFN de type 1 bloquent directement la réplication virale, entrainant une clairance des pathogènes (Galicia G. and Gommerman J.L., 2014). Les pDC, contrairement aux autres DC, expriment fortement les TLR-7 et TLR-9 qui détectent les acides nucléiques viraux et bactériens. Une fois activés via ces TLR, les pDC subissent des changements de morphologie, avec l'acquisition de dendrites et régulent l'expression des molécules du CMH et des marqueurs d'activation qui permettront la présentation antigénique aux LT. En effet, les pDC ont été signalées pour activer les LTCD8+ (Pucchio et al., 2008). Les pDC sont divisés en deux sous-ensembles : pDC1 et pDC2. Le pDC1 présente un phénotype immature avec une expression faible du CMH-II et des marqueurs d'activation, tandis que les pDC2 expriment fortement le CMH-II et le marqueur d'activation CD86. Les pDC1 induisent les T-régulateur (Treg) tandis que les pDC2 favorisent la différenciation des LT pro-inflammatoires (Galicia G. and Gommerman J.L.,

2014). Enfin, l'équipe de Soumelis montre en 2018 que l'activation de pDC, avec un seul stimulus qu'il soit microbien ou cytokinique, déclenche une diversification cellulaire en trois sous-populations stables : P1, P2 et P3. Les pDC-P1 (PD-L1 + CD80–) affichent une morphologie plasmacytoïde et une spécialisation pour la production d'interféron de type I. Les pDC-P3 (PD-L1 – CD80 +) ont adopté une morphologie dendritique et des fonctions immunitaires adaptatives. Les pDC P2 (PD-L1 + CD80 +) affichent des fonctions innées et adaptatives. Ainsi, cette étude présente la possibilité pour une cellule qui ne se divise pas de se diversifier en réponse à un seul stimulus, remettant en question le concept de différenciation terminale (Alculumbre S.G. et al., 2018).

b. Les cellules dendritiques myéloïdes (mDC)

Les mDC sont des CPA ayant une forte capacité de détection et d'élimination des antigènes. Les mDC immatures ont des capacités phagocytaires élevées, tandis que les mDC matures ont une capacité accrue à produire des cytokines. Les mDC sont hautement migratoires et circulent régulièrement de la périphérie vers les zones T et B des organes lymphoïdes. À l'état d'équilibre ou pendant l'infection, les mDC régulent les fonctions des LT. On retrouve deux populations majeures : les cDC1 qui expriment le BDCA-3 et les cDC2 exprimant le BDCA-1. Les cDC1 sont trouvées dans les tissus périphériques tels que les poumons, la peau, la lamina propria intestinale et le sang périphérique tandis que les cDC2 abondent dans le sang périphérique (Merad M., et al. 2013) et sont détectées dans les organes lymphoïdes et non lymphoïdes. Les cDC1 induisent une réponse Th1 et cytotoxique CD8, alors que les cDC2 génèrent non seulement des réponses Th1 mais aussi Th2, Th17 et iTreg (Schlitzer A. et al., 2015).

c. Les cellules de Langerhans

Elles sont situées sous la peau et les épithéliums comme celui du vagin, du rectum, de l'anus… Ce sont les premières cellules immunitaires rencontrées par le VIH. Les cellules de Langerhans sont des cellules immatures qui, après contact avec les antigènes, s'activent et acquièrent la capacité de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires où elles deviennent des DC matures capables de présenter les antigènes aux LT et LB.

Toutes ces cellules dendritiques expriment le CD4 et le corécepteur CCR5, et les cellules de Langerhans expriment en plus la langérine, une lectine de type C qui induit la formation d'organelles cytoplasmiques caractéristiques, nommés granules de Birbeck. Leur

infection est extrêmement limitée du fait de la présence de cette lectine, qui internalise et décompose le VIH.

d. Les cellules dendritiques interstitielles

Dans la peau et les muqueuses, elles sont situées plus profondément que les cellules de Langerhans, sous la couche épithéliale. Elles dérivent de précurseurs CD14+ et expriment le marqueur DC-SIGN (DC-specific intercellular adhesion molecule (ICAM) grabbin non-integrin). Ces cellules sont rares et difficiles à isoler. Elles expriment le CD4 et les corécepteurs CCR5 et CXCR4. Ce sont des cellules immatures capables de s'activer et de migrer vers les organes lymphoïdes grâce à l'induction du récepteur CCR7 lors de la maturation (Gurney et al., 2005).

e. Une nouvelle population de DC dans les muqueuses intestinales ?

Une nouvelle population de DC semble émerger : il s'agit de DC dans la muqueuse intestinale, ayant pour phénotype CD11b+ CD11c+ CX3CR1+ CMHII+ CD103- et échantillonne les antigènes de l'intestin en projetant des dendrites au travers de l'épithélium jusque dans la lumière.

iii. Les macrophages

Les macrophages peuplent pratiquement tous les tissus du corps, où ils remplissent une multitude de fonctions essentielles à l'homéostasie tissulaire, comme l'élimination des cellules apoptotiques et interviennent aussi dans la protection cellulaire. La maturation des monocytes en macrophages tissulaires est accompagnée d'une perte d'expression du récepteur CCR2 et d'une augmentation de l'expression des récepteurs CCR1 et CCR5 (Fantuzzi et al., 1999 ; Kaufmann et al., 2001). Les macrophages tissulaires ont été considérés comme provenant exclusivement et de manière continue des monocytes dérivés de la moelle osseuse, dans le cadre du système mononucléaire-phagocytaire (Van Furth R. et al., 1972). Cependant, il est maintenant largement admis que de nombreux tissus sont ensemencés avec des macrophages dérivés du sac vitellin ou du foie fœtal, au cours du développement embryonnaire (Ginhoux F. and Guilliams M., 2016). Une fois sur leur site de résidence, les macrophages prolifèrent localement pour maintenir une taille de population capable de répondre aux besoins du tissu ou de l'organe. Dans certains tissus, tels que le cerveau ou le foie, la population de macrophages résidents semble provenir exclusivement de cellules embryonnaires tout au long de l'âge adulte. Alors que les monocytes s'infiltrant dans ces

tissus en conditions inflammatoires ou pathologiques puis se différenciant en macrophages, ne font pas partie de la population résidente stable (Ajami B. et al., 2011).

Les macrophages sont considérés comme les sentinelles primaires des tissus (Franken L. et al., 2016). Ces cellules sont équipées d'une large gamme de récepteurs capables de détecter toutes les classes de micro-organismes et de multiples types de lésions tissulaires, ainsi que les récepteurs des chimiokines et des cytokines produites par les cellules immunitaires ; on parle de la polarisation des macrophages (Davies L.C., 2013). Lorsqu'un tissu est infecté ou inflammé, les macrophages se mettent en contact avec le LPS bactérien ou sont exposés à l'IFNγ dérivé des LT, conduisant à un état polarisé connu sous le nom de M1, hautement efficace pour tuer les pathogènes intracellulaires ou ingérés (Murray P.J., 2017).

Les macrophages présentent une durée de vie plus longue et une forte capacité de production virale ainsi qu'une moindre accessibilité pour les antiviraux (Shen et al., 2009).

2. Les lymphocytes T (LT)

Les LT sont les cellules effectrices de l'immunité spécifique adaptative. Ils possèdent un récepteur spécifique à l'antigène nommé récepteur T ou TCR (« T Cell Receptor ») qui ne reconnait que des portions peptidiques de l'antigène présenté par les CPA, dans le contexte du CMH de classe II pour les LTCD4+ et dans le contexte du CMH de classe I pour les LTCD8+. La réponse T aboutit à la différenciation des LT naïfs en LT effecteurs et LT mémoires spécifique du peptide antigénique (Seder and Ahmed 2003). On retrouve ces cellules dans les tissus périphériques où elles restent disponibles pour répondre à une stimulation antigénique.

i. Les LTCD4+

Les LTCD4+ sont les médiateurs centraux de la réponse immunitaire chez l'homme, coordonnant les réponses immunitaires cellulaires et humorales contre les infections. Ces cellules jouent un rôle essentiel dans la réponse face aux infections chroniques durant la phase aiguë et dans le confinement de ces infections une fois l'infection chronique établie. Lorsque l'infection persiste, la réponse des LTCD4+ spécifiques du virus change de phénotype.

Les rôles des LTCD4+ dans le contrôle de l'infection sont larges. La fonction des LTCD4+ est traditionnellement définie par la mise en place d'aides aux autres cellules effectrices, telles que la maturation des réponses des Lymphocytes B et des LT CD8+, la prolifération des LT CD8+, l'amélioration des activités phagocytaires ou oxydatives des cellules myéloïdes. Ces fonctions sont médiées par les LTCD4+, qui peuvent être classés en sous-ensembles en fonction des cytokines qu'ils produisent tels que LT helper type 1 (Th1), LT helper type 2 (Th2), LT helper type 17 (Th17), cellules régulatrices T (Treg), des LT folliculaires helper (Tfh) et des LT cytotoxiques CD4 +. L'engagement des LTCD4+ dans l'une de ces lignées est influencé par les signaux reçus lors de l'interaction d'amorçage initial avec les cellules présentatrices d'antigènes, notamment les cytokines, les signaux co-stimulateurs et les signaux issus de la liaison du TCR au complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) II/peptide (Andargachew R., et al., 2018).

Au cours de nombreuses infections virales, les LTCD4+ se différencient en LTh1 produisant l'interféron-gamma de type II (IFN-g) stimulant la production des LTh1, avec un petit sous-ensemble de LTCD4+ cytotoxiques apparentés aux LTh1. En outre, les Tfh se développent au cours d'infections aiguës, fournissant une aide essentielle à la réponse lymphocytaire B, au développement du centre germinatif, à la maturation par affinité des anticorps et au développement de plasmocytes à longue durée de vie.

Lorsque les LT naïfs issus du thymus entrent en contact avec un antigène, elles s'engagent dans plusieurs étapes de différenciation périphérique pouvant être identifiées de manière phénotypique sur la base de l'expression des marqueurs de surface CD45RA, CCR7 et CD27. Les LT naïfs peuvent être identifiés comme CD45RA+ CCR7+ CD27+. Le récepteur CCR7 est utile pour différencier les LT « mémoire centrale » (CD45RA-CCR7+ CD27+) et les LT « effecteurs mémoires» (EM) qui peuvent à leur tour être subdivisés selon l'expression de CD27 en « EM précoce ». (CD45RA-CCR7-CD27 +) et LT « EM tardif » (CD45RA-CCR7-CD27-). De plus, un sous-ensemble à différenciation terminale (TEMRA/TE) qui ré-exprime CD45RA peut être défini (CD45RA + CCR7-).

Les LT effecteurs s'amplifient dans des contextes de stimulation antigénique active (par exemple, pendant une infection virale primaire), capables d'éliminer des virus ou des tumeurs ; en revanche, les LT mémoire-centrales sont des cellules qui restent présentes en l'absence de stimulation antigénique et qui ont la capacité de se développer rapidement après une seconde rencontre avec l'antigène. Cependant, se trouve une classification complexe et controversée d'un nombre croissant de sous-ensembles de LT. La mesure simultanée d'une variété de marqueurs intracellulaires et de surface permet la distinction entre une multitude de sous-ensembles de LT. Au cours des dernières années, un effort considérable a été consacré à la caractérisation détaillée du phénotype et de la fonction de ces populations de LT distinctes, ainsi que de leur(s) voie(s) de différenciation et de leur rôle dans la réponse immunitaire.

a. Les Th1 et Th2

On parle de LTCD4+ « helper » ou auxiliaires de type Th1 ou Th2. On retrouve les Th1 qui sont impliqués essentiellement dans l'éradication des tumeurs et pathogènes intracellulaires. Les Th2 ont un rôle essentiel comme auxiliaires de la production d'Ig par les LB, suite à la production de cytokines (Harrington, Mangan et al. 2006). Une fois l'activation antigénique réalisée, la différentiation du LT naïf vers une réponse Th1 ou Th2 dépend de la production locale d'IL-12 et d'IL-18 pour une réponse Th1 ou d'IL-4 pour une réponse Th2.

Les cellules Th1 sont caractérisées par l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFNγ et le facteur de transcription T-bet ("T-box expressed in T cells"), facteur essentiel pour leur propre développement (Szabo S.J., et al., 2003). Dans les modèles murins les cellules Th1 reconnaissent les antigènes dérivés de tissus, puis, déclenchent une réaction inflammatoire. L'IFNγ provoque l'activation des macrophages, mais favorise aussi l'expression des récepteurs aux chimiokines CXCR3 et son ligand CXCL9, (Cosmi L., et al, 2011) conduisant à un recrutement des leucocytes dans le tissu inflammé (Hill H.J., et al.,

2003). Lors de l'activation cellulaire, une expression accrue de CXCR3 (Pieper J., et al., 2014) et du facteur de transcription Twist1 (Niesner U., et al., 2008) est mise en évidence. Twist1 a été identifié comme un facteur s'exprimant spécifiquement dans les cellules Th1 activées (Albrecht I., et al., 2008), favorisant leur propre survie dans les tissus inflammés. Cependant, la manière dont les cellules Th1 en tant que telles jouent un rôle dans le maintien de l'inflammation n'est toujours pas claire.

Les cellules Th2 produisent les cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 et dépendent du facteur de transcription GATA-3, essentiel pour leur développement (Skapenko A., et al., 2004). Physiologiquement, les cellules Th2 jouent un rôle important dans le contrôle des parasites. Dans des modèles murins et *in vitro*, les cellules Th2 ont montré qu'elles inhibaient les réponses immunitaires médiées par Th1 et Th17 par la sécrétion d'IL-4 ainsi que par l'expression dépendante de GATA-3 induisant la production d'IL-10 (Chang H.D., et al., 2007).

b. Les TH17

Il s'agit de lymphocytes producteurs de l'IL-17 jouant un rôle essentiel dans la défense de l'hôte contre les bactéries extracellulaires et les champignons, notamment par la sécrétion de facteurs antimicrobiens par les LTCD4+ Th17 d'IL-22, d'IL-26 et d'IL-17. Les premières études ont démontré que l'IL-1β et IL-23 étaient importants pour conduire la différenciation des LTCD4+ naïves en producteurs d'IL-17 (Acosta-Rodriguez E.V., et al., 2007). Des études plus récentes ont montré que le TGF-β est essentiel pour le développement des cellules Th17, et agit conjointement avec d'autres cytokines telles que l'IL-1β, IL-6, IL-21 et IL-23, mais pas IL- 12 (Manel N., et al., 2008). En effet, parmi les cytokines de Th17, le TGF-β induit l'expression de RORγt (facteur de transcription essentiel au développement de Th17) et CCR6 (le récepteur de chimiokine exprimé par des cellules Th17 humaines) à partir des LTCD4+ naïfs. Fait important, la stimulation par le TGF-β seul est insuffisante pour induire l'expression d'IL-17 par les LTCD4+ naïfs, et doit coopérer avec les cytokines activant STAT3 telles que l'IL-21, l'IL-21 et l'IL-23 (Manel N., et al., 2008, Schmitt N., et al., 2014).

c. Les T folliculaire helpers (ou Tfh)

Parmi les différents sous-ensembles de lymphocytes T CD4, les LTCD4 folliculaires (Tfh) résident majoritairement dans les follicules des cellules B et les centres germinatifs (GC) du tissu lymphoïde et jouent un rôle majeur dans la production d'anticorps. Les cellules Tfh sont caractérisées par l'expression du récepteur de chimiokines CXCR5 (nécessaire pour la localisation dans les follicules des cellules B) et peuvent exprimer PD-1, CD40L, ICOS et

le facteur de transcription Bcl-6 (Nurieva R.I., et al., 2009). Ces cellules sécrètent également les cytokines IL-21, IL-4 et IL-10 (Crotty S, 2011). Un sous-ensemble de cellules Tfh réside dans les GC (GC-Tfh) et interagit avec les cellules GC-B permettant de faciliter la maturation et la commutation de classe des immunoglobulines (Fazilleau N., et al., 2009). Les cellules GC-Tfh expriment des niveaux plus élevés de PD-1 et Bcl-6 par rapport aux cellules Tfh qui résident à l'extérieur du GC. L'interaction entre les cellules Tfh et les LB est médiée par différents facteurs tel que CD40L et ICOS, mais aussi par des cytokines : IL-21, IL-10 et IL-4 (O'Shea J.J. and Paul W.E., 2010 ; Crotty S, 2011). Les GC sont également constitués d'un sous-ensemble de cellules T CD4 régulatrices appelées cellules régulatrices folliculaires (Tfr), qui aident à réguler les réponses Tfh (Chung Y., et al., 2011 ; Linterman M.A., et al., 2011).

La voie de différenciation Tfh implique la coopération entre de multiples interactions antigène-spécifiques et des voies de signalisation (Crotty S., 2014). Ceux-ci comprennent l'activation du TCR, les facteurs de co-stimulation et les récepteurs aux cytokines et chimiokines. Il est établi que les récepteurs co-stimulateurs, tels que ICOS, CD40L et les récepteurs aux cytokines (IL-12, IL-23, Il-6) régulent la différenciation des Tfh. Bien qu'il ait été démontré que l'IL-12 est essentielle à la différenciation de Th1, il a également été démontré qu'elle était importante pour la différenciation des cellules Tfh chez l'homme (Crotty S, 2011, Schmitt N. et al., 2013).

d. Les LT régulateurs (ou Treg)

Ce sont des cellules jouant un rôle crucial dans le contrôle des réponses adaptatives. Les T reg agissent sur les cellules effectrices sur le site d'inflammation par la production de facteurs solubles (tel que l'IL-10 ou le TGF-β) ou de contact direct (tel que le FAS-L ou CTLA-4) (Askenasy, Kaminitz et al. 2008). Les Tregs du sang présentent l'expression du facteur de transcription FoxP3+ et expriment le récepteur de l'IL-2 : CD25. Ils n'expriment pas en revanche le récepteur de l'IL-7 : CD127. Lorsque les Treg sont au "repos", ils présentent une expression du CD45RA ; en revanche lorsqu'ils s'activent, ils perdent l'expression du CD45RA (Miyara M., et al., 2009).

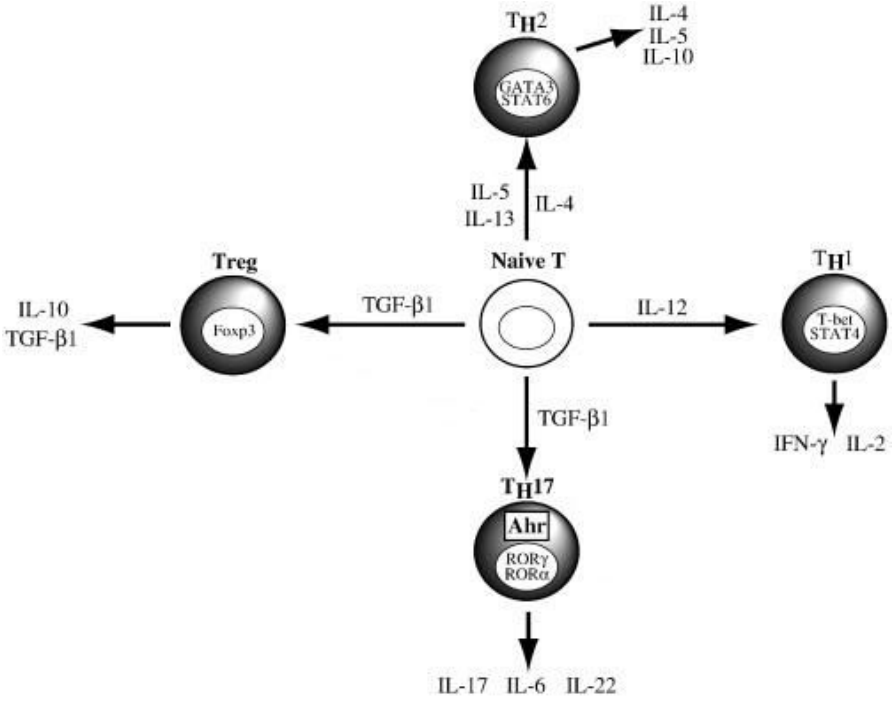


Figure 3 : Les différentes sous populations de LTCD4+

Adapté de : http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576910003176

e. Les LT mémoires

Les LT mémoire représentent la plus grande population de lymphocytes dans le corps humain adulte, et jouent un rôle essentiel dans le maintien de la défense immunitaire antimicrobienne contre des pathogènes spécifiques. Les modèles actuels suggèrent que les LT mémoires se développent lorsque les LTCD4+ ou CD8+ naïfs spécifiques de l'antigène sont activés lors de l'exposition à celui-ci et subissent alors une expansion proliférative et une différenciation (Crotty S. and Ahmed R., 2004). On ne sait pas actuellement si les LT naïfs se développent directement en LT mémoires, ou se différencient d'abord en lymphocytes effecteurs dont quelques-uns sont sélectionnées pour la mémoire immunologique (Restifo N.P. and Gattinoni L., 2013). Les LT mémoires peuvent être divisés en LT mémoires centraux (TCM) et mémoires effecteurs (TEM) (Sallusto F., et al., 2004). Les TCM représentent une population cellulaire de longue durée qui exprime des marqueurs de migration vers le tissu lymphoïde, sécrètent principalement de l'IL-2 lors d'une stimulation par TCR et ont une capacité proliférative élevée et une demi-vie prolongée. En revanche, les TEM présentent des récepteurs de chimiokines et des molécules d'adhésion qui leur permettent l'infiltration dans les tissus inflammés et vont leur permettre d'avoir une action rapide sur les cellules infectées. Les données actuelles suggèrent que ces populations de LT mémoires évoluent dans un processus de développement hiérarchique au cours duquel les LT

immatures à longue durée de vie servent de précurseurs pour des LT différenciés, matures et de courte durée de vie (Sallusto F., et al., 2004 ; Farber D.L. et al., 2014). Ces considérations ont conduit à l'hypothèse que de petites populations de LT mémoire hautement indifférenciés, ayant une longue durée de vie et des propriétés semblables aux cellules souches, pourraient être à la base de la génération continue de LT mémoires et effecteurs. Ces cellules ont été identifiées comme des « LT souches mémoire » (TSCM). Ces LT ont démontré une capacité d'auto-renouvèlement améliorée et une multipotence afin de reconstituer tout le spectre des sous-ensembles de cellules T effectrices et de mémoire. (Gattinoni L. et al., 2011, Muranski P., et al., 2011). Les TSCM ont été définies par l'expression de marqueurs de LT naïfs tels que CD45RA et CCR7, en tandem avec des marqueurs de LT mémoire comprenant la double expression CD95 et CD28. Ces cellules ont été détectées à la fois dans les sous-groupes de LTCD4+ et CD8 +, et représentent entre 2 et 4% des LT totaux. Par ailleurs, *in vitro*, les TSCM peuvent être différenciées en LT naïfs (TN) en utilisant la liaison TCR avec une co-stimulation par CD28 en présence d'IL-7 et IL-15 (Cieri N., et al., 2012).

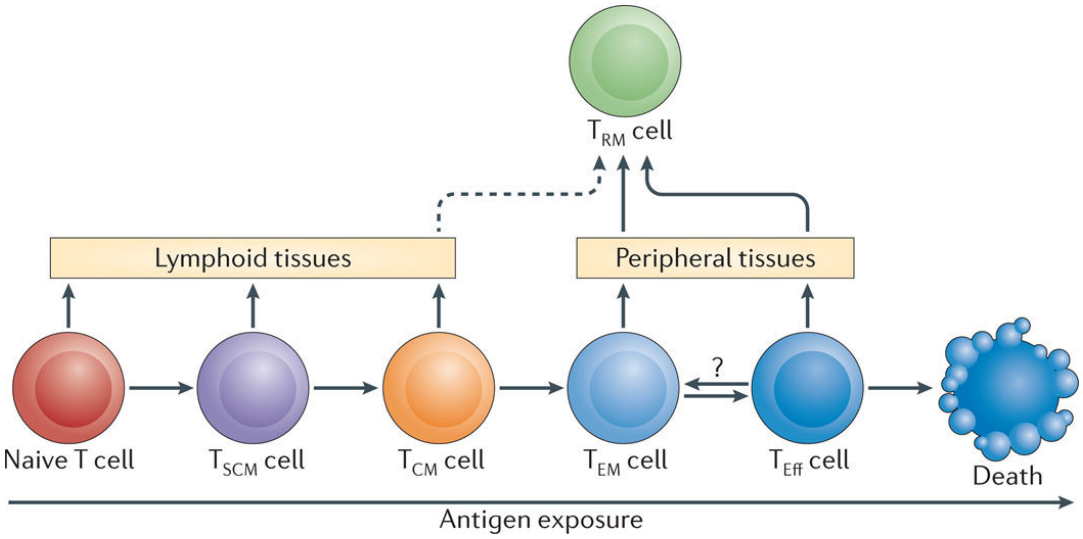


Figure 4 : Schéma de la différenciation des sous-population de LT mémoires circulants et tissulaires.

Tiré de Farber D.L. et al., 2014

Pour résumer, les TCM représente un pool de cellules mémoires moins différenciées, qui, avec les cellules TSCM, circulent dans les organes lymphoïdes secondaires et ont une grande capacité de prolifération et de reconstruction. En revanche les cellules TEM représentent un pool de cellules effectrices circulantes plus différenciées pouvant pénétrer rapidement dans les tissus et en relation avec les cellules TRM, correspondant aux lymphocytes T mémoires résidant des tissus, fournissent une réponse de défense secondaire rapide et efficace. Les TRM jouent un rôle crucial dans le maintien de l'immunité à long terme, en particulier contre les agents pathogènes infectant les muqueuses. Les cellules TRM

ont été identifiées comme des cellules retenues dans les organes non lymphoïdes avec une capacité de recirculation limitée. Les lymphocytes résidant dans les tissus expriment de manière constitutive les molécules d'adhésion et les intégrines qui les aident à rester dans les tissus (Masopust D. et al., 2001 ; Mackay L.K. et al., 2015).

f. Le CMH de classe II

Les LTCD4+ vont reconnaître sur les molécules du CMH de classe II des CPA, des peptides antigéniques dérivés de la dégradation d'antigènes ayant pénétré dans la cellule par endocytose.

Le CMH de classe II résulte de l'association de 3 éléments : deux chaînes polypeptidiques α et β, et un peptide antigénique. Les deux chaînes polypeptidiques sont associées de manière non covalente, chacune présentant 2 domaines extracellulaires : respectivement α1 et α2, β1 et β2. On retrouve 4 parties caractéristiques qui sont : la région de liaison au peptide antigénique nommée région PBR (Peptide Binding Region) formée par les deux domaines α1 et β1, permettant de former la niche peptidique où ira se placer le peptide antigénique ; la région formée des domaines α2 et β2 permettant la fixation du LTCD4+ ; la région transmembranaire provenant de chacune des deux chaînes polypeptidiques α et β ; et enfin, la région intra-cytoplasmique.

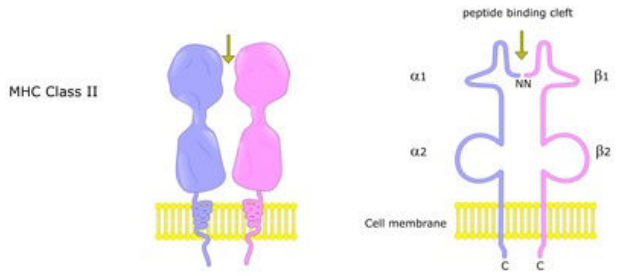


Figure 5: Schéma de la structure du CMH de classe II

Adapté de : Bare lymphocyte syndrome type I, 2018

g. Processing spécifique des LTCD4+

Ces HLA (Human Leucocyte Antigen, correspondant au CMH humain) vont fixer des peptides (de 13 à 17 acides aminés) qui seront apprêtés de manière distincte de ceux du HLA de classe I. Le TCR des LTCD4+ va reconnaître les molécules de classe II où sont chargées les peptides antigéniques. La chaîne invariante possède un segment transmembranaire et un fragment appelé fragment CLIP (pour Class II associated Invariant Peptide) qui s'associera avec la région de liaison au peptide antigénique. La liaison entre la chaîne invariante et les chaînes polypeptidiques se réalise dans le réticulum endoplasmique. Dès lors que la liaison

entre la molécule de CMH et la chaîne invariante est réalisée, le complexe migre vers l'appareil de Golgi, provoquant la dégradation de la chaîne invariante, tout en gardant le peptide CLIP. La formation du complexe molécule de CMH-peptide est réalisée lors de la fusion de la vésicule contenant les chaînes α et β du CMH de classe II-CLIP avec l'endosome contenant les antigènes. La structure en cavité ouverte des molécules du CMH-II permet une certaine variabilité dans la taille du peptide qui s'y associera. Une fois le peptide chargé, le complexe sera envoyé à la membrane plasmique de la CPA.

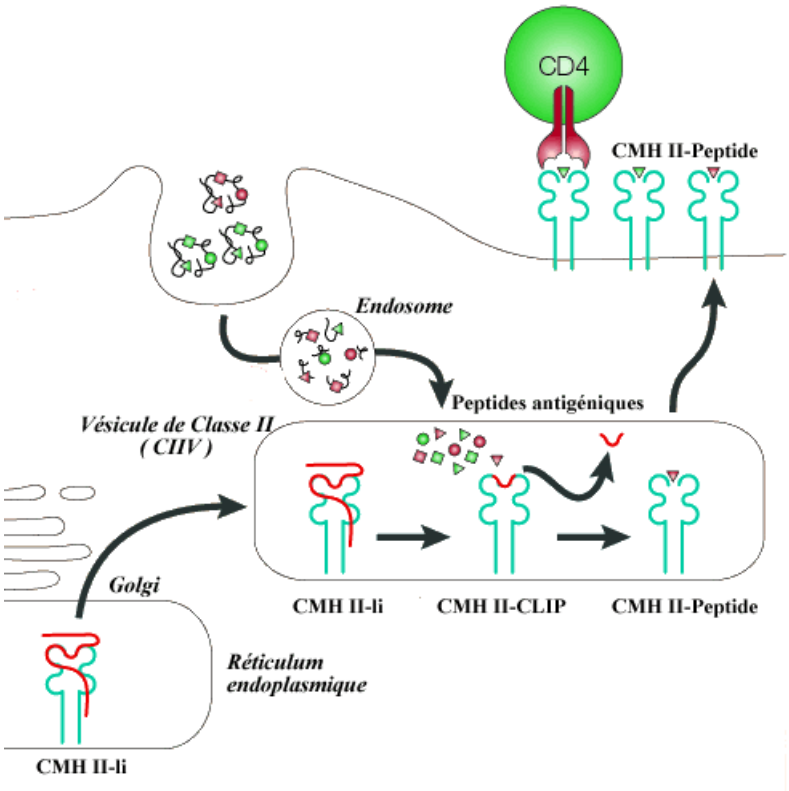


Figure 6 : Schéma de l'apprêtement des antigènes protéiques aux LTCD4+

Tiré de : http://virologie.free.fr/documents/virologie/06-CMH_2/CMH_II.htm

ii. Les LT CD8+

Les LT CD8+ lysent des cellules infectées et des cellules anormales. Ils défendent principalement l'organisme contre les virus (qui sont des parasites intracellulaires obligatoires), les bactéries intracellulaires et les cellules cancéreuses.

Ils sont classés en trois grandes sous populations : naïfs (caractérisés par la présence du CD45RA, CD27, CD62L et CCR7), mémoires centraux (caractérisés par la présence du CD28 et CD95, et l'absence du CD45RA) et mémoires effecteurs (caractérisés par la présence du CD95 et l'absence du CD28). Les LTCD8+ effecteurs sécrètent de l'Interleukine-2 (IL-2), de l'IFNγ, du TNFα, de la perforine ou encore la granzyme B. Le pool de LT CD8 mémoires

est maintenu à long terme par la présence d'IL-7 et d'IL-15, permettant de réaliser une réponse rapide dans le cas d'une réinfection. On retrouve les CD8 effecteurs mémoires principalement au niveau des porte d'entrées des pathogènes, avec la possibilité de réaliser leurs fonctions effectrices immédiates, pouvant cependant se régénérer de façon beaucoup plus limitée. A l'inverse, les CD8 centraux mémoires sont retrouvés au niveau des organes lymphoïdes secondaires et ne peuvent réaliser leurs fonctions effectrices qu'après stimulation antigénique, mais tout en gardant un fort potentiel de renouvellement (Wherry, Barber et al. 2004).

a. Le CMH de classe I

Les LTCD8+ vont reconnaitre sur les molécules du CMH de classe I des cellules cibles, des peptides antigéniques dérivés de protéines endogènes cytosoliques synthétisées par la cellule. On va retrouver principalement des protéines du soi, mais aussi des protéines issues de microorganismes intracellulaires.

Le CMH de classe I résulte de l'association de 3 éléments : la chaîne lourde, la β2-microglobuline et un court peptide de 8 à 10 acides aminés. La β2-microglobuline et le peptide sont essentiels à la stabilisation de la molécule et à sa migration vers la surface cellulaire. Le HLA de classe I comporte 2 parties : un "pied", formé par le 3ème domaine de la chaîne lourde surmonté de la β2-microglobuline ; ce pied assure la connexion avec la portion intracellulaire courte de la molécule, il supporte à son autre extrémité la "tête" de la molécule qui est formée des domaines αl et α2 de la chaîne lourde. Les domaines αl et α2 délimitent une grotte (ou niche), fermée à ses deux extrémités, au niveau de laquelle se fixent les peptides qui seront présentés au système immunitaire.

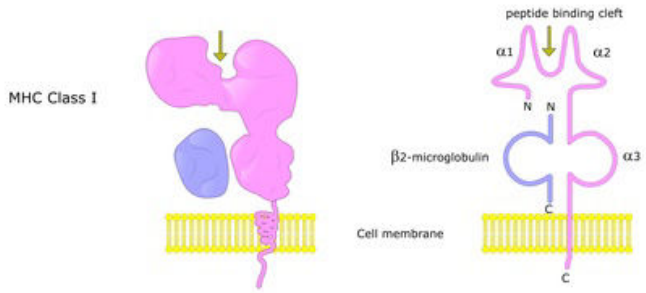


Figure 7 : Schéma de la structure du CMH de classe I

Adapté de : Bare lymphocyte syndrome type I, 2018

b. Processign spécifique des LTCD8+

Dans le cadre d'une infection virale, le virus, après pénétration dans la cellule cible, va utiliser la machinerie cellulaire de l'hôte et synthétiser de nouvelles protéines virales. Ces protéines peuvent être dégradées en peptides par le système enzymatique protéolytique nommé protéasome. Ces peptides (de 8 à 10 acides aminés) seront transportés par le transporteur de peptides TAP (Transporter associated with Antigen Processing) pour traverser la membrane lipidique du réticulum endoplasmique (ou RE) vers la lumière de celui-ci. C'est dans le RE que la chaîne lourde α et la β2-microglobuline du CMH de classe I s'associent et interagissent avec le transporteur TAP pour fixer le peptide. Le complexe α-β2-microglobuline-peptide va migrer vers la surface de la cellule et être présenté aux LTCD8+. Ainsi, chaque cellule de l'organisme expose des centaines de peptides générés à sa surface (on peut parfois retrouver le même peptide plusieurs milliers de fois) (Tsomides, Aldovini et al. 1994).

L'équilibre entre les infections persistantes, l'immunité et la maladie clinique dépend de l'interaction continue entre les réponses immunitaires de l'hôte et du pathogène. De nombreuses études sur les LT CD8 + ont détaillé les mécanismes essentiels du confinement des agents pathogènes. Cependant, certaines études ont également identifié un dysfonctionnement des LTCD8+ lorsqu'une infection virale est chronique. Il a été décrit un épuisement des LT, où l'exposition chronique à l'antigène conduit à une diminution du potentiel de prolifération et une diminution de la fonction effectrice. Ainsi, certaines molécules d'épuisement ont été identifiées : on parlera de récepteurs inhibiteurs. On retrouve notamment la protéine PD-1 et la protéine associée aux lymphocytes cytotoxiques CTLA-4. Lorsque ces molécules sont bloquées, la fonction des LT CD8 + est améliorée (Kaufmann D.E. and Walker B.D., 2009). Ces immunothérapies sont devenues des piliers dans le traitement de nombreux cancers (Ferreira M., et al., 2018), avec des essais débutant dans les infections chroniques (Patil N.K., et al., 2017).

3. Les lymphocytes B

Lorsqu'un antigène pénètre dans l'organisme, il est dégradé par des cellules phagocytaires, pris en charge par des CPA telles que les DC et macrophages. Une fois activées par l'Ag, ces CPA entament des étapes de maturation et de migration vers des zones T des tissus lymphoïdes secondaires régionaux. La réponse aux antigènes pénétrant par voie sanguine a lieu dans la rate alors que la réponse aux antigènes pénétrant par voie cutanée, sous cutanée, intradermique ou muqueuse a lieu dans les ganglions lymphatiques drainant le tissu infecté.

Les lymphocytes B sont des cellules immunitaires possédant un récepteur spécifique à l'antigène nommé le récepteur B ou BCR (B Cell Receptor). Il correspond à des Ig ancrées dans la membrane et permet de reconnaitre l'Ag. Ainsi, le LB joue un double rôle : il va reconnaître l'Ag spécifique grâce au BCR sous sa forme native, puis le LB va s'activer et exercer une fonction de CPA vis-à-vis des LT de même spécificité antigénique. Le LB peut, après activation par un Ag, se transformer en plasmocyte produisant des anticorps qui sont des Ig solubles monomériques (IgD, IgG, IgE, IgA1) ou multimériques (IgA2, IgM). Ce sont les seules cellules capables de produire des anticorps dans l'organisme.

i. Les anticorps

Les Ig sont composées de deux chaînes lourdes identiques, reliées par des ponts disulfures. On distingue cinq isotypes : IgA (Ig muqueux), IgD (impliquée dans l'activation des LB), IgE (impliquée dans la réponse allergique ou la réponse antiparasitaire), IgG (immunoglobuline la plus abondante, sécrétée par les plasmocytes) ou IgM (première classe d'anticorps décelable lors de la réponse immunitaire primaire). Elles sont associées à deux chaînes légères identiques (κ ou λ) de façon covalente. On retrouve aussi une région charnière permettant la flexibilité des 2 bras de la molécule d'Ig.

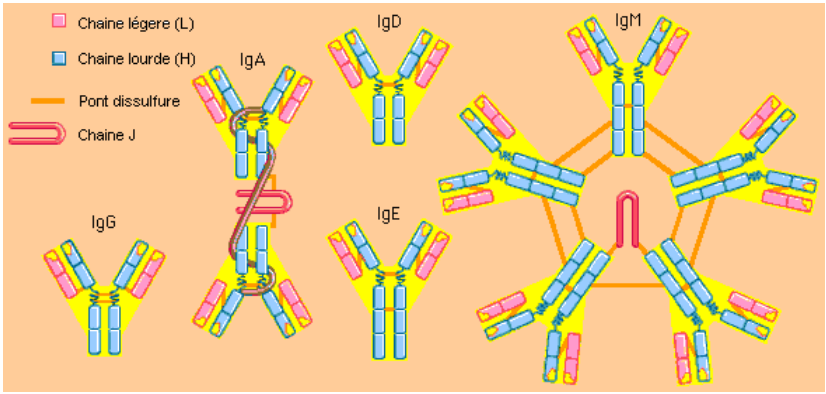


Figure 8 : Schéma montrant la structure des Immunoglobulines (Ig) membranaires et solubles

Adapté de : http://www.britannica.com/EBchecked/media/17661/The-five-main-classes-of-antibodies-IgG-IgA-IgD-IgE

ii. Action immunitaire

Les LB naïfs et mémoires circulent continuellement en l'absence d'antigènes entre les différents organes lymphoïdes via le sang. La réponse humorale se traduit par une production d'Ig solubles dirigées contre le pathogène qui participe à l'élimination des Ag circulants dans les fluides biologiques et à la neutralisation des divers pathogènes.

La réponse humorale est dite primaire lorsque le LB naïf rencontre un Ag pour la première fois. Cette rencontre induit une production rapide d'IgM de faible affinité contre l'antigène, remplacée progressivement par une production d'IgG, IgA ou IgE de forte affinité. Dans le cadre d'une réponse secondaire, c'est-à-dire lors d'un contact de l'organisme avec un antigène déjà rencontré auparavant, l'existence d'une mémoire immunitaire permet alors de recruter rapidement les LB mémoires, générés au cours de la réponse primaire et exprimant une forte affinité pour l'antigène. La maturation de l'affinité des Ig a lieu dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires.

4. La diversité du VIH

Le VIH appartient à la famille des rétrovirus du genre lentivirus. C'est un virus enveloppé se présentant sous forme de particules sphériques, mesurant de 110 à 120 nm de diamètre. L'enveloppe virale est constituée d'une bicouche lipidique provenant de la cellule hôte, dans laquelle sont ancrés des spicules ou protéines d'enveloppe regroupées en trimères. Ces spicules sont constitués de deux sous-unités : la gp120 (surface) et la gp41 (transmembranaire). On retrouve ensuite la protéine de matrice (p16) ancrée dans la face interne de l'enveloppe. Les protéines de capsides forment une structure conique (p24) ; cette structure est le cœur de la particule virale qui renferme des protéines à activité enzymatique : la protéase, l'intégrase et la transcriptase inverse, ainsi que deux molécules d'ARN viral recouvert de la nucléocapside P9 (Chinen and Shearer, 2002).

Le génome du VIH est composé de deux régions répétées aux extrémités (Long Terminal Repeat – LTR), de gènes structuraux : gag (codant les protéines de capside, de la nucléocapside et de la matrice), pol (codant la retro-transcriptase, l'intégrase et la protéase) et env (codant la gp160 qui est ensuite clivée en gp120 et gp41) et de portions de gènes régulateurs codant des facteurs de contrôle (vif, vpr, vpu, tat, rev, nef).

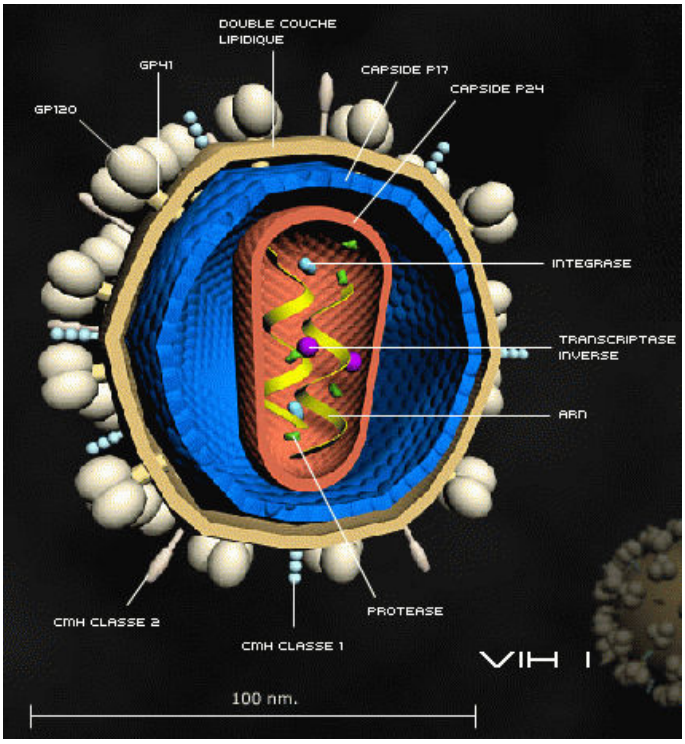


Figure 9 : Schéma en image de synthèse du VIH-1

Tiré de http://www.masef.com/non-medecins2/vih.htm

i. La diversité des quasi-espèces et leur distribution

Le VIH continue de se propager parmi les populations hétérosexuelles, les hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes (HSH), les nourrissons (par la transmission mère-enfant) et les utilisateurs de drogues intraveineuses (UDI), influencés par un ensemble complexe de facteurs biologiques, comportementaux et sociétaux. Alors que les épidémies de sous-type B prédominent chez les HSH et les UDI dans le monde occidental (Wolf E. et al., 2017), les épidémies hétérosexuelles en Afrique et en Asie se sont diversifiées en une maladie de plus en plus complexe, avec neuf sous-types viraux majeurs et plus de 70 formes recombinantes circulantes (Tebit, D.M. et al., 2011). Les migrations et la mondialisation ont contribué à l'introduction et au croisement des épidémies en Amérique et en Europe, où les sous-types viraux non-B représentent désormais respectivement 20% et 60% des nouvelles infections en Amérique du Nord et en Europe (Magiorkinis, G. et al., 2016).

En effet, Le VIH possède des capacités de variation génétique très importantes qui résultent de trois phénomènes :

- La forte variabilité génétique du VIH-1 est une conséquence directe du taux de réplication élevé du virus, lié à la réverse-transcriptase virale qui a pour particularité d'introduire des erreurs dans le génome à un taux estimé à environ 10^{-5} par nucléotides et par cycle viral (Mansky and Temin, 1995)
- La plasticité virale sous pression sélective de l'hôte et du médicament (Rhee, S.Y. et al. 2009).
- Les évènements de recombinaison entre génomes de virus phylogénétiquement éloignés lors d'infections doubles ou de surinfections est le troisième mécanisme à l'origine de la diversité des rétrovirus (Tebit et al., 2007). Cette grande variabilité génétique du VIH a permis l'émergence d'un grand nombre de souches virales dans la nature qui sont aujourd'hui classées en différents groupes et sous-groupes.

ii. La diversité des types et des souches

L'entrée du virus dans la cellule cible nécessite l'interaction entre la gp120 et le CD4 de la cellule, modifiant la conformation du virus et permettant d'interagir avec l'un des corécepteurs du virus : le CCR5 ou le CXCR4. Ces deux récepteurs sont largement distribués et déterminent le tropisme du virus :

- le CXCR4 est un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à une protéine G, au départ nommé fusine (Feng et al., 1996). Oberlin s'est rendu compte que la « fusine » avait comme ligand le SDF-1 (Stroma derived factor 1), qui est une chimiokine de type CXC,

c'est-à-dire qu'elle comporte deux cystines séparées par un autre acide aminé, d'où le nom de CXCR4, et est impliquée dans la réponse immunitaire (Oberlin et al., 1996). Le CXCR4 est exprimé par une grande variété de cellules du système immunitaire et non immunitaire dont les cellules du système nerveux central.

- le CCR5 a été isolé en 1996 : il s'agit d'un récepteur couplé à une protéine G et ses ligands sont : RANTES (Regulated on Activation Normal T Expressed and Secreted), MIP-1α et MIP-1β (Macrophage Inflammatory Protein), qui sont toutes 3 des chimiokines stimulant le système immunitaire. Ce récepteur s'est révélé extrêmement important pour l'infection virale, car il s'est avéré que des individus qui possédaient une délétion de 32 paires de bases (pb) sur l'allèle codant CCR5, étaient fortement résistants à l'infection par le VIH-1. La protéine CCR5 codée par cet allèle défectueux est tronquée et n'est pas transloquée à la surface cellulaire, empêchant ainsi l'attachement et l'entrée de la particule virale dans la cellule cible (Liu et al., 1996). Le CCR5 est exprimé par les macrophages, les cellules dendritiques (DC) et les LTCD4+ activés/mémoires.

Les souches virales sont classifiées selon leurs tropismes : une première classification présente les isolats viraux suivant les cellules infectantes. Les souches virales peuvent être lymphocytotropes et infecter les LTCD4+ (virus à tropisme T), ou monocytotropes et infecter les macrophages et les LTCD4+ (virus à tropisme M). Les virus à tropisme M sont souvent peu réplicatifs et peu cytopathogènes et sont parfois appelés NSI (Non Syncitia Inducing). Ils sont majoritairement isolés chez les patients asymptomatiques. Les virus à tropisme T, appelés SI (Syncitia Inducing), sont à l'inverse, hautement réplicatifs dans les LT (LT) activés et induisent un effet cytopathogène prononcé. Les virus SI sont isolés principalement chez les patients présentant des symptômes biologiques et cliniques (Schuitemaker et al, 1992). Aujourd'hui, les deux corécepteurs CXCR4 et CCR5 sont considérés comme les plus communément utilisés par le VIH. Berger a proposé alors une nouvelle classification : les virus induisant la formation de syncytiums dans les lignées T utilisant le CXCR4 sont désignés X4 ; à l'inverse, l'utilisation du CCR5 est due aux virus ayant un tropisme pour les macrophages : ils sont dénommés R5. Enfin, les isolats capables d'utiliser les 2 corécepteurs sont nommés X4R5 (Berger et al., 1998). Le choix de l'un ou l'autre des deux corécepteurs est dicté par le virus, suivant la conformation de la région variable V3 de la gp120 du virus (Sander et al., 2007). La plupart des patients au début de la maladie présentent des variants R5, la présence de variants X4 augmentant à mesure que la maladie progresse (Panos G. and Watson D.C., 2013). En effet, quand le tropisme R5 permet une dissémination rapide du virus chez l'hôte, particulièrement à l'aide des macrophages infectés, le tropisme X4 permet

d'infecter les LTCD4 naïfs, qui expriment des taux élevés de CXCR4, ainsi l'adaptation virale du VIH en passant du tropisme R5 au tropisme X4 permettrait l'infection des derniers LTCD4+ (Arrildt K.T. et al., 2012).

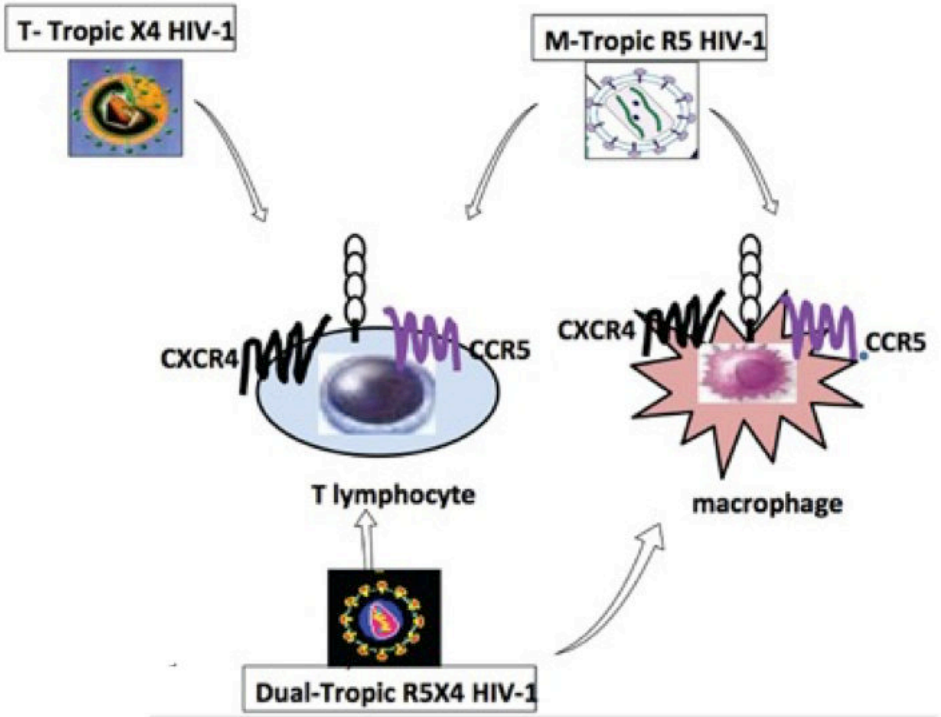


Figure 10 : Les macrophages et les LT expriment CCR5 et CXCR4. Les souches de VIH M- infectent les macrophages et les lymphocytes en utilisant CCR5, tandis les souches T- infectent uniquement les lymphocytes en utilisant CXCR4. Les deux types de cellules peuvent être infectées par les souches à double tropisme en utilisant l'un ou l'autre corécepteur pour l'entrée.

Tiré de : Naïf H.M., 2013

5. La physiopathologie de l'infection

Le VIH a développé une large palette de mécanismes qui lui permet de rester présent chez l'hôte durant toute sa vie. Ce rétrovirus endogène persiste dans le génome des cellules hôtes. Il peut également, au cours de l'infection chronique, entrer en latence virale et durant cette « période de repos », entrer dans un état transcriptionnellement silencieux dans lequel peu de nouveaux virions infectieux sont générés, ce qui lui permet d'éviter la surveillance immunitaire. L'intégration virale, la latence ou encore une réplication virale persistante sont des stratégies efficaces pour établir une infection chronique.

i. Les portes d'entrée du VIH

Il existe trois voies de transmissions du VIH :

- La voie sanguine, lors de l'utilisation d'aiguilles ou d'objets tranchants contaminés.
- La voie mère-enfant par la transmission verticale materno-fœtale.
- La voie sexuelle, représentant la voie majoritaire, par contact au niveau des muqueuses génitales et rectales.

Dans le cadre d'une exposition sexuelle, le risque de transmission du VIH est compris entre 0,04% après un rapport oral (fellation réceptive) et 1,4% après un rapport anal réceptif. Le risque de transmission lors d'un rapport hétérosexuel avec pénétration vaginale est intermédiaire, de l'ordre de 0,1%. Par ailleurs, le risque de séroconversion par acte hétérosexuel est environ deux fois plus élevé chez les femmes que chez les hommes. Les caractéristiques uniques du tractus génital féminin par rapport aux surfaces muqueuses rectales et péniennes confèrent des différences dans le risque de transmission. L'inflammation de la muqueuse, le microbiote et les infections sexuellement transmissibles sont des facteurs déterminants pour évaluer le risque d'infection par le virus (Patel P. et al., 2014).

La charge virale du partenaire infecté par le VIH est le facteur clé de la transmission, d'où un risque majeur en phase d'infection aigüe. Les autres facteurs qui augmentent le risque de transmission sont les infections sexuellement transmissibles, souvent asymptomatiques, la menstruation ou des saignements au cours des rapports sexuels. A l'inverse, le fait que le partenaire infecté soit sous traitement antirétroviral, diminue le risque de transmission, sans qu'il soit possible de déterminer de valeur seuil de la charge virale en dessous de laquelle le risque n'existe plus. Enfin, la circoncision diminue de 2 tiers le risque d'infection chez l'homme.

ii. Le VIH est un virus qui s'intègre

a) Importance de l'activation lymphocytaire

Les cellules cibles initiales du virus sont concentrées au niveau de la *lamina propria*, en dessous de l'épithélium vaginal ou rectal. On y retrouve des LTCD4+ effecteurs activés, des DC, des macrophages et des LTCD4+ transitionnels et effecteurs mémoires, dans un état d'activation important. Le virus infecte quelques-unes de ces cellules, organisées en agrégats dispersés facilitant et amplifiant l'infection. Cette infection provient à 80% d'un seul virus et pour les 20% restants de 2 à 5 virus différents. Ainsi, l'amplification locale de ces populations virales et cellulaires infectées, nommées « fondatrices », se réalise dans les 7 premiers jours suivant l'exposition au virus. Au sein de cet agrégat, on retrouve 2 à 3 cellules infectées dans les premiers jours de l'infection. Les DC jouent alors un rôle primordial dans le processus de dissémination du VIH vers les organes lymphoïdes secondaires en créant des synapses virologiques avec les cellules infectées, et vont aussi contribuer au recrutement de LTCD4+ nouveaux via la sécrétion de MIP-1β. Ainsi, le délai d'apparition de la réponse adaptative ne permet en rien de contenir la dissémination qui se fait dans les premiers jours.

La forte déplétion initiale de LTCD4+ muqueux est suivie par une activation généralisée du système immunitaire qui se maintient tout au long de la phase chronique. Cette activation se manifeste par une augmentation des fréquences de LTCD4+ et CD8+ ayant des phénotypes de différentiation avancée et exprimant des marqueurs d'activation : HLA-DR et CD38, une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires et une augmentation du turnover des LT et LB (Douek D.C. et al., 2003). Cette activation généralisée et chronique du système immunitaire est aujourd'hui perçue comme un mécanisme majeur d'épuisement du pool de LTCD4+.

Le virus peut affecter l'activation des LTCD4+ par :

- stimulation antigénique des LTCD4+ spécifiques du virus (Douek DC et al., 2002),
- l'interaction entre la glycoprotéine virale gp120 et la molécule CD4 (Merrill JE et al., 1989)
- l'activation du système immunitaire inné. En effet, la déplétion des LTCD4+ du GALT (Gut associated Lymphoid Tissue) peut induire une altération de la paroi intestinale et permettre la translocation des bactéries présentes dans la lumière intestinale. Cette entrée provoquerait l'activation du système immunitaire inné, stimulé par la présence de LPS et flagelline, ligands des TLR (Toll Like Receptor), qui sont exprimés par les DC et les

macrophages, et à l'origine d'une importante production de cytokines pro-inflammatoires (IFNα, TNFα, IL-1β et Il-6) (Branchley J.M. et al., 2006).

Ainsi, l'activation chronique induite par le virus génère des proliférations ponctuelles, intenses et répétées de manière anarchique, conduisant à un turn-over important des LTCD4+. L'intégration du VIH-1 dans les gènes favorables à la croissance ou au cycle cellulaire a été observée et peut contribuer à la prolifération de certains clones de cellules infectées (Maldarelli F. et al., 2014, Wagner T.A. et al., 2014). Une analyse de Chomont et al. en 2009 ont suggéré que la prolifération homéostatique induite par l'IL-7 et l'IL-15 pourrait augmenter le nombre de lymphocytes T CD4 + infectés in vivo (Chomont N. et al., 2009). Ces proliférations régénèrent les pools de LTCD4+. Une partie de ces nouvelles cellules se disperseront, principalement au niveau du GALT, mais ceci ne compense pas la déplétion initiale, principalement due à leur demi-vie courte, estimée à 2 semaines dans ce tissu (Picker LJ et al., 2006).

Sont donc mis en jeu :

- les ressources de LTCD4+ au niveau des organes lymphoïdes secondaires, mais conduisant à la fibrose progressive de ces organes due à cette activation excessive et conduisant à la perte de la bonne homéostasie des LTCD4+ résidants (Grossman Z et al., 2002).

- les LT naïfs et les LT différenciés de façon excessive en LTCD4+ mémoires (Hazenberg MD et al. 2000).

- la capacité du thymus à produire de nouvelles cellules naïves, qui va diminuer durant l'infection, notamment suite à l'infection des thymocytes, la diminution de leur demi-vie due aux cytokines pro-inflammatoires et la fibrose thymique (Appay V, 2008).

- les ressources hématopoïétiques qui finissent par s'altérer et sont dans l'incapacité de reconstituer le compartiment lymphoïde.

b) Pénétration et intégration du virus dans la cellule

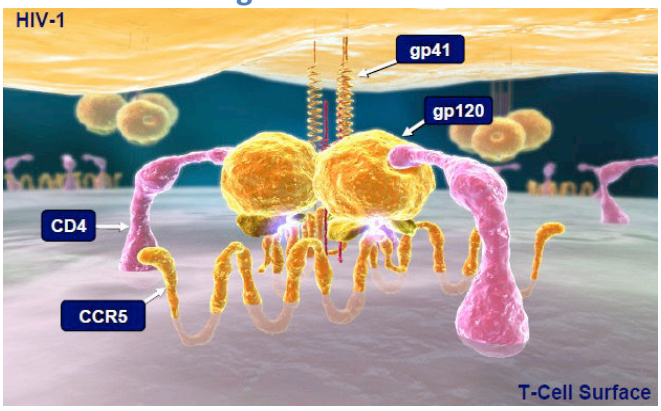


Figure 11 : Schéma de la liaison VIH – CD4

Tiré de la présentation de A.G. Marcelin, tropisme du VIH-1, CHU Pitié salpêtrière

La capside du virus contient deux ARN simple brin et trois enzymes différentes : la transcriptase inverse (TI), la protéase et l'intégrase. Des études ont montré que la capside du VIH induit une interaction avec les pores et la machinerie nucléaire, suggérant que la capside virale est maintenant pendant le trafic vers le noyau (Arhel N.J., et al ; 2007 ; Di Nunzio F. et al., 2012). L'intégralité de la capside est relargué dans le cytoplasme cellulaire proche des pores nucléaires, et l'élaboration d'un complexe ARN-transcriptase inverse permet la formation d'un double brin d'ADN viral (Chinen and Shearer 2002). Il se forme ensuite le complexe de pré-intégration (PIC), lequel est composé de l'ADN viral, de l'intégrase, de la transcriptase inverse, de la protéine virale r (Vpr) et des protéines hôtes tel que HMG1 (High mobility group protein B1), ou LEDGF (lens epithelium-derived growth factor), qui est transporté par l'intermédiaire des microtubules en direction des pores nucléaires. Au niveau du noyau, le PIC permet le passage à travers l'enveloppe nucléaire de l'ADN viral. L'ADN viral va alors soit s'intégrer dans le génome de la cellule hôte, soit se circulariser, ce qui ne permettra pas son intégration dans le génome hôte. L'intégration est possible grâce à l'enzyme virale intégrase et les molécules de l'hôte comme LEDGF qui est un cofacteur traductionnel, et qui va se lier à l'intégrase, promouvant ainsi l'intégration de l'ADN. Une fois intégré, le provirus flanqué de ses séquences LTR va se comporter comme un gène cellulaire : le 5'LTR va agir comme un promoteur et le 3'LTR comme site de la polyadénylation. Ceci termine la phase précoce du cycle viral.

c) Du provirus intégré à la réplication virale

L'activation de la cellule hôte induit la liaison du PIC à des éléments amplificateurs au niveau du 5'LTR, qui agit comme le promoteur du provirus. Il va donc y avoir un rassemblement des facteurs de transcription : NF-κB (nuclear factor-κB), NFAT (nuclear

factor of activated T cell), et SP1 (specificity protein 1), transmettant aux facteurs de la machinerie transcriptionnelle les signaux d'activation de la cellule. Cela engendre ensuite la liaison de l'ARN polymérase II à la TATA box qui initiera la transcription. Une boucle de nucléotide va se former à l'extrémité 5' du LTR du transcrit viral naissant, appelé TAR (transactivation response element), créant ainsi un site de liaison pour la protéine virale Tat. Le recrutement de protéines cellulaires permet de lancer la transcription en augmentant la capacité de fonctionnement de l'ARN polymérase II. La protéine du virus Rev va ensuite réguler le transport entre le noyau et le cytoplasme et l'épissage de l'ARNm viral formé. Dans le cytoplasme, les protéines virales sont synthétisées sous forme d'un grand précurseur, devant être transformé en protéines virales matures et assemblées pour créer les particules virales, qui bourgeonneront et infecteront d'autres cellules.

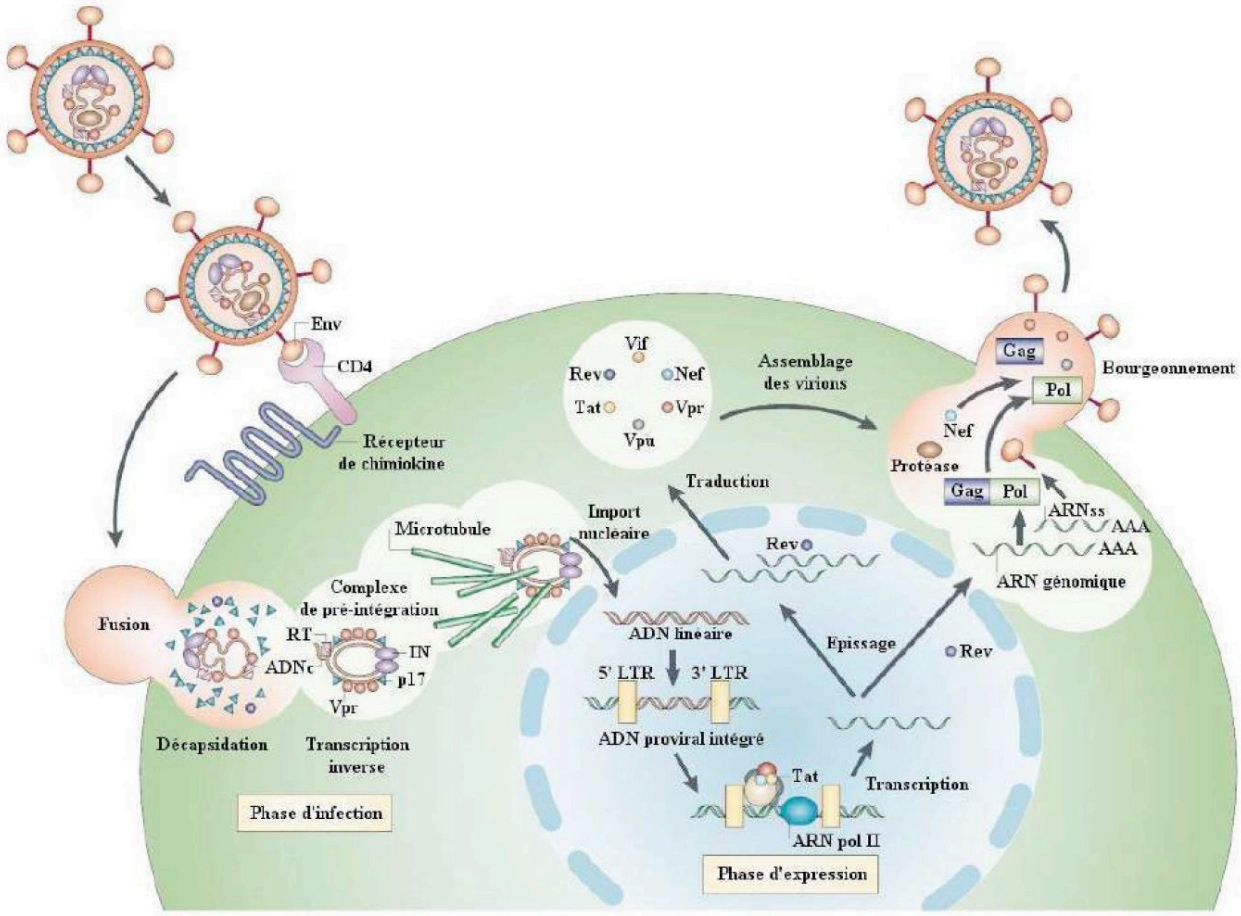


Figure 12 : Représentation schématique du cycle de réplication du VIH

Adapté de Peterlin et Trono, 2003

Chaque étape de cette boucle demande un grand nombre de réactions, de molécules, d'actions, soumis à divers facteurs extérieurs. Ainsi, plusieurs de ces phénomènes biologiques peuvent ne pas aboutir et engager le virus vers une autre voie telle que la latence virale.

Différents éléments, qu'ils soient endogènes à la cellule ou exogènes permettent la formation de cellules dites « réservoirs ».

iii. Conséquences physiopathologiques de l'infection par le VIH

Chez l'Homme, l'histoire naturelle de l'infection peut être décomposée en trois phases principales : la primo-infection, la phase asymptomatique et le stade SIDA. On retrouve dans un premier temps une forte réplication virale avec une production continue de VIH dans les cellules CD4+. Cette phase dure quelques semaines et provoque la chute brutale du nombre de LTCD4+. La réplication va finir par se stabiliser du fait de mécanismes complexes encore mal caractérisés, liés à la mise en place d'une réponse immune spécifique, potentiellement efficace.

Pour évaluer l'évolution de la maladie, on va déterminer plusieurs paramètres chez le patient :

- L'évolution de la charge virale plasmatique par RT-q-PCR (*Reverse Transcriptase quantitative polymerase chain reaction*) de l'ARN viral du VIH dans le sang,
- Le nombre de lymphocytes CD4+ et de LTCD8+ circulants.

Bien que régulièrement discuté, on parlera du stade SIDA, quand le nombre de CD4+ est sous la barre des 200 cellules/µL de sang, que la charge virale plasmatique dépasse 10000 particules d'ARN viraux/mL de sang et que le rapport du nombre de CD4/CD8 est inférieur à 1.

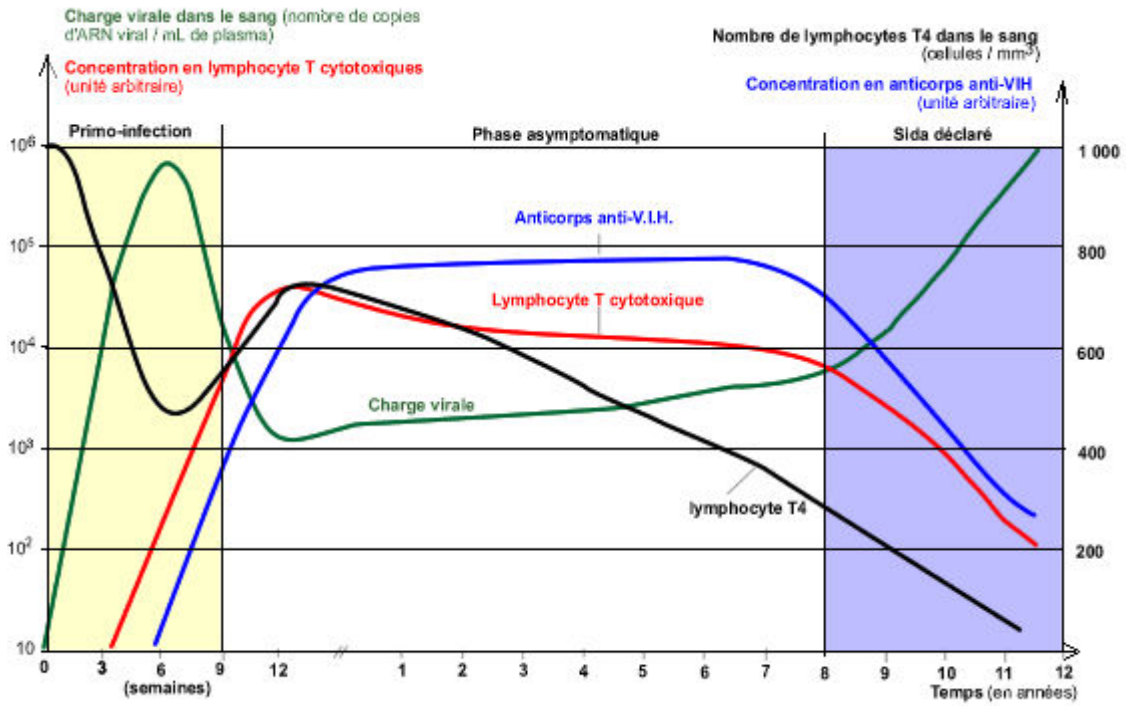


Figure 13 : Évolution des paramètres virologiques et immunologiques au cours de l'infection par le VIH

Tiré de : http://acces.inrp.fr/acces/logiciels/externes/winmdi/cytometrie-et-sida/accueil.htm

Avec toutes ces données, on a pu évaluer différents « types » de patients. Tout d'abord, les patients qui présentent une diminution progressive des T CD4+ ou patients « progresseurs ». En l'absence de traitement, ils progressent vers le stade SIDA en 8 à 10 ans. Moins de 10% des patients appelés « asymptomatiques à long terme » (LTNP) ne développent pas la maladie 10 ans après leur infection. Parmi eux, un certain nombre est infecté depuis plus de 20 ans et ne présentent toujours aucun symptôme lié au SIDA. Contrairement aux patients progresseurs, les LTNP ne présentent pas de déplétion massive des LT4. Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces variations sont très peu connus. Toutefois, des facteurs spécifiques à l'hôte, tels que l'expression de variants de CCR5, du gène SDF-1, de

certains types HLA ou encore une réponse immunitaire cytotoxique plus vigoureuse, ont été corrélés à une progression plus lente de l'infection. Parmi ces derniers, il existe une catégorie supplémentaire : les élites contrôleurs (correspondant à moins de 1% des séropositifs). Ceux-ci sont non seulement capables de contrôler spontanément la réplication du VIH, mais en plus la présence du virus est indétectable dans leur sang (<50 copies/mL), en l'absence de traitement. Les élites contrôleurs ont peu de risques de progresser vers le SIDA.

L'arrivée de la multi-thérapie ciblant le VIH a permis de s'interroger sur des cellules possiblement réservoirs. De ce fait, la charge virale plasmatique n'est pas une mesure efficace pour évaluer la taille des réservoirs viraux, mais il est important d'évaluer les cellules ayant de l'ADN du VIH intégré dans leur génome. Un réservoir viral est un type cellulaire ou un site anatomique, dans lequel une réplication virale compétente persiste beaucoup plus longtemps que dans le pool de cellules infectées soutenant l'infection. Les réservoirs cellulaires sont un ou des types cellulaires, où un virus compétent en termes de réplication persiste durant une période de temps plus longue que la majorité des virus se répliquant activement. La production virale peut être réactivée dans ces cellules réservoirs par de nombreux stimuli cellulaires et ces cellules constituent donc une source permanente de reprise de la production virale en cas d'arrêt du traitement.

Cependant, un grand nombre de cellules contenant l'ADN viral ne peut pas (à priori) répliquer de virus, suite à un ADN viral défectueux. Il faut donc interpréter ces valeurs avec attention, car un grand nombre de cellules contenant l'ADN viral ne sera jamais capable de produire du virus.

1. Les Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPA)

i. Les monocytes

Au cours de l'infection par le VIH, les monocytes subissent des changements dans leur fréquence, leur phénotype et leur fonction. On observe une expansion des monocytes exprimant le CD16 durant les stades chroniques et tardifs de l'infection par le VIH. Cette augmentation va de 30 à 50% chez les patients infectés par le VIH et atteints du SIDA (Allen J.B. et al., 1991 ; Thieblemont N. et al., 1995), contre 5 à 10% chez les individus sains ou recevant un traitement antirétroviral suppressif viral (ART). Cette expansion peut être due à des niveaux élevés du facteur de croissance M-CSF observés chez les sujets infectés par le VIH (Weiner L.M. et al., 1994), ce qui induirait une maturation monocytaire incluant l'acquisition de l'expression de CD16 (Williams D.W. et al., 2012). Il est à noter que l'expression du corécepteur du VIH, le CCR5, est la plus élevée sur les monocytes intermédiaires (Ancuta P. et al., 2003). En 2012, des données de Dutertre et al., ont confirmé l'expansion des monocytes intermédiaires chez des individus infectés par le VIH qui n'étaient pas sous traitement antirétroviral (Dutertre C.A., et al. 2012).

Les monocytes sont résistants à l'infection par le VIH dans des conditions *in vitro* (Coleman C.M. and Wu L., 2009). La restriction du virus dans les monocytes est expliquée en partie par leur capacité limitée à soutenir la transcription inverse en raison des faibles niveaux de désoxyribonucléotides (dNTP) disponibles dans les monocytes (Triques K. and Stevenson M., 2004). En effet, la protéine SAMHD1, impliquée dans le clivage des dNTsP, est fortement induite dans les monocytes et peut expliquer la résistance de ces cellules à l'infection par le VIH (Santa-Marta M. et al., 2013). Cependant, la différenciation des monocytes en macrophages ou en DC *in vitro* révèle la capacité de la cellule à produire et à répliquer du virus (Triques K. and Stevenson M., 2004).

Par ailleurs, un nombre important de protéines du VIH affecte le rôle immunitaire du monocyte.

- La protéine Tat du VIH augmente la survie du monocyte suite à l'augmentation de la protéine Bcl-2, qui est une protéine anti-apoptotique. Il a également été montré que Tat permettait l'augmentation de la production d'une cytokine : l'interleukine 10 (IL10) provoquant une activité immunosuppressive facilitant la progression vers le SIDA.

- La protéine Nef inhibe l'induction d'IL12p40 qui est une sous unité active de l'IL12 jouant un rôle critique dans le développement immunitaire. Ainsi, dans le cas de cette inhibition, le monocyte perd sa fonction immune, conduisant le patient au SIDA.

Cette cellule immunitaire n'est donc pas seulement une cible du virus, mais est une clé dans l'infection au VIH et la progression du SIDA.

ii. Les cellules dendritiques (ou DC)

En raison de leur localisation, les DC jouent un rôle important dans la dissémination de l'infection virale aux LTCD4+. Au début de l'infection, des pDC sont recrutés sur le site de l'infection. Ce recrutement est médié par le CCL20 produit par les cellules épithéliales endocervicales. Les pDC, à leur tour, sécrètent CCL3 et CCL4 menant au trafic des LTCD4+ CCR5+ dans l'endocol (Li Q et al., 2009). En outre, il a été démontré que les cellules épithéliales endocervicales sécrétaient *in vitro* la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP), entraînant l'activation des mDC, qui produisent par la suite du CCL17 et CCL22, attirant davantage de LTCD4+ naïfs permettant, là aussi, l'expansion de l'infection (Fontenot D. et al., 2009).

Les DC expriment fortement les corécepteurs du VIH : le CCR5 et CXCR4, et de faibles niveaux de CD4, permettant ainsi la pénétration du virus dans la cellule (Manches O et al., 2014). En plus de l'expression de ces molécules clés pour l'entrée du VIH, les DC expriment d'autres récepteurs capables de se lier à la protéine d'enveloppe gp120, tel que le DC-SIGN (présent entre autres sur le DC dermiques) permettant l'internalisation du virus dans des vésicules sous-membranaires à pH faible, ce qui va permettre la persistance de la virulence du virion (Kwon D.S., et al., 2002). Cependant, comparativement aux LTCD4+, les DC sont faiblement infectés (Smed-Sörensen et al., 2005), mais sont capables de séquestrer le virus pendant plusieurs jours avant de propager l'infection aux LTCD4+ (Popov S. et al., 2005). Enfin, les DC n'ont pas la même sensibilité à l'infection par le VIH. Une étude récente de 2017 montre, les DC CD141+ présentent une résistance innée à l'infection virale, en revanche, les DC CD1c+ semblent sensible à l'infection, induisant la production d'antigènes viraux et l'altération de leurs fonctions immunitaires et de leur survie (Silvin A. et al., 2017).

iii. Les macrophages

Les macrophages des sous muqueuses vaginales et rectales expriment fortement le CCR5 et le CXCR4 et diffèrent des macrophages intestinaux par leur capacité de production

virale. Cependant, si les virus à tropisme X4 peuvent bien pénétrer dans les macrophages, la production virale est bien moindre que pour les virus de type R5 (Nguyen et al., 2003).

Ainsi, après l'infection de la lignée monocyte/macrophage, la migration des macrophages infectés de la muqueuse vers les ganglions lymphatiques régionaux, le VIH se dissémine rapidement par voie systémique chez l'hôte contribuant ainsi à la mise en place de réservoir pour l'infection chronique. Par ailleurs ces cellules ont la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique, contribuant à la neuropathogénèse associée au VIH (Gonzales-Scarano F. and Martin-Garcia J., 2005).

Parfois, les LTCD4+ infectées peuvent servir de véhicules pour la dissémination systémique du VIH (Murooka T.T. et al., 2012), et éventuellement transmettre le virus aux macrophages résidants tissulaires. Durant la phase chronique, la population virale évolue pour devenir plus « Macrophage-trophique », vraisemblablement parce que la perte étendue de LTCD4+ fait du macrophage la cible cellulaire la plus abondante dans l'avancée de la maladie (Richards K.H. et al., 2010).

2. Réponse humorale et action des anticorps dans le cadre d'une infection VIH

Trois à quatre semaines après l'infection virale, des anticorps anti-VIH chez les sujets infectés sont retrouvés dans le sang. Ils sont classiquement détectés 8 jours après l'apparition de la virémie. On retrouve des anticorps libres dirigés contre la gp41 d'Env dans un premier temps, puis 15 jours après, des anticorps anti gp120. Des IgM et IgG sont principalement retrouvées et les anticorps neutralisants, faiblement efficaces, sont identifiés 9 semaines à un an après l'infection, dirigés dans un premier temps contre l'enveloppe virale. Des anticorps neutralisants à plus large spectre sont observés quelques années après chez certains patients ELITE ciblant la région Env (Simek M.D. et al., 2009). Ces anticorps appelés bNAbs présentent des caractéristiques moléculaires telles que l'hypermutation intensive. In vitro le bNAbs neutraliseraient l'infection de nombreuses souches virales et déclenche l'ADCC (Antibody-Dependant Cell-mediated Cytotoxicity), par ailleurs, les bNAbs auraient la capacité de limiter (voir supprimer) la transmission du virus cellules à cellules (Bruel T., et al., 2017).

Le VIH entraine un grand nombre de dysfonctionnements de la réponse humorale spécifique. En effet, le taux de mutations virales importantes permet un échappement du virus contre les réponses B, provoquant le retard et l'inadaptation constantes de cette réponse contre les variants viraux présents à l'instant donné. Le taux de LB, en augmentant de façon conséquente, provoque un épuisement des LB lié à leur activation polyclonale, affaiblissant la réponse humorale mais aussi provoquant la perte des LB mémoires lié à l'apoptose et à la baisse de leur induction causée par la lymphopénie T CD4+ (Moir and Fauci 2009).

L'étude d'un patient infecté par le VIH et traité par le Rituximab (déplétant les LB), montre que cette déplétion entraine une perte du contrôle viral et la chute du taux de LTCD4+ sanguins (Huang, Bonsall et al. 2010). Ainsi, les réponses humorales neutralisantes semblent participer au contrôle de l'infection ; cependant, cela semble faible chez les patients LTNP, ou ayant une charge virale faible. L'hypothèse suggérée est donc que l'exposition répétée aux Ag viraux par immunisation permettra la maturation et le développement d'une réponse neutralisante de large spectre, intéressante dans le cadre d'une vaccination préventive (Montefiori and Mascola 2009). Cependant, d'autres fonctions des anticorps ont été démontrées ces dernières années, tel que l'ADCC, la protection muqueuse, les anticorps inhibiteurs ou encore la lyse du complément.

3. Les réponses T face à l'infection par le VIH

i. Induction d'une réponse T et efficacité chez l'Homme

a. La réponse T CD8

Les LTCD8+ jouent un rôle important dans le contrôle de l'infection par le VIH. Cependant, la réponse CD8 spécifique n'empêche pas la progression vers la maladie ; à l'inverse, une réponse importante est corrélée à une charge virale plasmatique élevée (Oxenius, Price et al. 2004). La non-progression de la maladie a été associée à une meilleure qualité de la réponse, telle que la production d'IL-2, d'IFNγ, de TNFα avec ou sans dégranulation et avec une capacité de prolifération : on parle de réponse T polyfonctionnelle. Cette réponse est retrouvée de façon plus fréquente chez les patients non progresseurs (Betts, Nason et al. 2006). Les LTCD8+ des patients Elite Controler (patients infectés par le VIH mais ayant une charge virale indétectable) ont aussi la capacité à contrôler la réplication virale dans les LTCD4+ infectés, ce qui n'est pas le cas des patients avec une virémie détectable. Cependant, une étude de 2010 a montré que la déplétion de LTCD8+ n'entrainait pas une augmentation de la survie des cellules infectés, ce qui donne des résultats difficiles à concilier (Klatt N.R., et al., 2010). Une hypothèse est avancée, en expliquant que les cellules infectées seraient tuées dans une fenêtre temporelle au cours de laquelle les cellules ne produiraient pas encore de virus (Althaus and De Boer 2011). Enfin, les clones lymphocytaires des LTCD8+ des patients contrôleurs possèdent des sensibilités antigéniques élevées avec des seuils d'activation bas. Ils possèdent des TCR de forte avidité, traduisant une forte capacité à tuer les cellules cibles exprimant l'antigène, même en faible quantité (Almeida, Sauce et al. 2009).

b. La réponse T CD4

Destruction des LTCD4+par le VIH directement

Plusieurs études menées à la fin des années 1980 et au début des années 1990 ont confirmé l'hypothèse d'une « destruction accélérée » des LTCD4+ par une attaque virale et l'épuisement lent des cellules CD4 (De Boer R.J., 2007). Par ailleurs, cette lymphopénie est renforcée par de faibles réponses proliferatives lymphocytaires après stimulation par des antigènes et une inversion du rapport des LT auxiliaires par rapport aux LT cytotoxiques (Wei X. et al., 1995). D'autres études ont confirmé que le VIH infecte et détruit sélectivement les LTCD4+ (Nishimura Y. et al., 2005). Il a ensuite été montré que la suppression de la réplication du VIH avec la thérapie antirétrovirale (ART) augmente rapidement le nombre de LTCD4+ dans le sang périphérique (Nowak M.A. et al., 1997). Actuellement, le monde scientifique concède que le VIH infecte majoritairement les LTCD4+ en se liant à la molécule

CD4 et à un corécepteur (CXCR5 ou CCR4), puis le virus va se répliquer en leur sein. Ceci entraîne la destruction des cellules infectées et conduit à un déclin régulier de cette population de LT. *In vitro*, l'infection des LTCD4+ par le VIH induit une production virale et cela conduit à la lyse de la cellule hôte ou à la formation de cellules géantes, dans lesquelles des cellules infectées et non infectées fusionnent, entraînant la propagation de l'infection (Nishimura Y. et al., 2005). Des modèles animaux d'infection à SIV montrent une déplétion sévère des LTCD4+ dans le tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT), qui est le principal producteur de LTCD4+ dans le corps ; le même phénomène de déplétion des LTCD4+du GALT se produit également dans l'infection par le VIH chez l'humain (Brenchley J.M. et al., 2004). Il a été établi que les estimations quantitatives du nombre absolu de LTCD4+ et de leur pourcentage sont fortement corrélées à la progression de la maladie. Il existe en effet une réponse homéostatique par laquelle la perte de LTCD4+ due à l'infection par le VIH est compensée par la production de LT. Cependant, cet équilibre est rompu une fois que la production de LT en réponse à l'homéostasie est épuisée. Cela a été confirmé par la mise en évidence d'une diminution du nombre de LTCD4+ et une augmentation des taux de prolifération cellulaire et d'apoptose chez les individus infectés par le VIH (Hazenberg M.D. et al., 2000). Ainsi, un adulte normal héberge environ 22×10^{11} LTCD4+, alors que l'individu infecté par le virus, montre un nombre de LTCD4+ qui est réduit de moitié tombant à 200 cellules/µL de sang. Le nombre de LTCD4+ circulants chez les sujets VIH+ est l'outil le plus utilisé pour prédire l'apparition de l'immunodéficience manifeste et le meilleur marqueur de l'évolution de la maladie (Okoye A.A. et al. 2013). L'infection par le VIH accélère donc à la fois la production et la destruction des LTCD4+ dans les premiers stades de l'infection (les LTCD4+ mourants sont remplacés par des LTCD4+ originaires du thymus). Au cours de l'infection par le VIH, environ 1 milliard de particules virales sont produites par jour, ce qui entraîne une augmentation croissante du nombre de LTCD4+ infectées (Hazenberg M.D. et al., 2000). Par la suite, l'infection se propage aux cellules mémoires du thymus où le virus commence à s'y répliquer. L'analyse du renouvellement des LT chez les humains infectés par le VIH suggère que le pool des LTCD4+ en division est supérieur de deux à trois fois par rapport à l'humain sain (Fleury S. et al., 2000), avec une fraction plus importante pour la population mémoire/effectrice CD45RA-. Alors que la cytolyse virale des LTCD4+ clarifie en partie la cause de la déplétion lymphocytaire, la perte de LTCD4+ non infectés et de cellules CD8 naïves pendant la phase asymptomatique de l'infection par le VIH ne peut être expliquée par ce mécanisme.

ii. Activation lymphocytaire et épuisement cellulaire

a. Activation par le virus lui même

Un autre modèle dynamique a alors émergé pour compléter les mécanismes de la pathogenèse du SIDA et l'appauvrissement en LTCD4+ : c'est l'activation immunitaire chronique, Plusieurs études ont démontré que le niveau d'activation immunitaire chez les sujets infectés par le VIH est un meilleur prédicteur de la progression de la maladie que les niveaux de réplication virale (Giorgi J.V. et al, 1993 and Rodriguez B. et al., 2006). L'activation chronique du système immunitaire induite par la production antigénique massive et permanente due à la réplication virale non contrôlée et à la production de variants viraux, induit une division cellulaire accrue dans les LT mémoires et augmente leur capacité d'auto-renouvèlement, mais induit simultanément des mécanismes de frein pour éviter l'augmentation du nombre cellulaire (Février M. et al., 2011). Un de ces mécanismes de frein est la mort cellulaire dont l'amplification au cours de l'infection VIH entretient l'inflammation par le biais du relargage intense de débris cellulaires. Ainsi Yates et al. ont proposé que les LTCD4+ activés ont une durée de vie raccourcie et sont détruits rapidement par leur mort cellulaire (Gougeon M.L. et al., 1997 and Hellerstein M.K. et al., 2003). Depuis, plusieurs études ont montré que lors de l'infection par le pathogène, le système immunitaire reste dans un état hyperactif caractérisé par un renouvellement élevé, une activation et une prolifération non spécifiques des LT, ainsi qu'une activation polyclonale des lymphocytes B et des cytokines pro-inflammatoires élevées. De plus l'infection virale active directement le système immunitaire à travers les produits de ses propres gènes Nef, Tat, Vpr et Vpu et également par la production de cytokines inflammatoires et des molécules stimulées par les IFN de type I. Par exemple, Nef et Vpr sont impliqués dans la stimulation des monocytes et des macrophages (Unutmaz D. et al., 1994). Ainsi, le niveau d'activation cellulaire prédit la progression du déficit CD4 et de la maladie chez les sujets infectés par le VIH autant voire mieux que la pathogenèse virale (Deeks S.G. and Walker B.D., 2004).

En général, l'activation immunitaire chronique associée au VIH est caractérisée par des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires circulantes et de chimiokines (Appay V. and Sauce D., 2008). De nombreuses autres protéines, y compris les cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF-β1 et la protéine induite par l'IFN-de type I (IP-10), se sont révélées être augmentées dans le plasma au cours de l'infection aiguë. Ainsi, une augmentation massive de la libération de cytokines, appelée tempête cytokinique, caractérise l'infection aiguë et chronique par le VIH et contribue à prédire l'activation immunitaire et la déplétion lymphocytaire (Harari A. et al., 2004). Bien que moins importante, cette production

anormalement élevée de cytokines inflammatoires se maintient au cours de l'infection chronique. Les traitements antirétroviraux ont amené un bénéfice majeur en réduisant de façon très significative cette activation immune et l'inflammation associée (Autran et al, Science 1997) sans pour autant la réduire totalement. Néanmoins, une activation immunitaire et une inflammation minimes persistent après plus de 10 ans de contrôle thérapeutique efficace de la réplication virale (Guihot et al. AIDS 2010, 2011), entretenues notamment par les co-infections persistantes associées à CMV (S Deeks et al. 2006 ; F Caby et al. 2016) ou HCV (Griesbeck M. et al., 2017). L'importance de l'activation immunitaire dans la pathogenèse du VIH est également soulignée dans l'infection de primates non humains africains présentant une infection endémique du virus d'immunodéficience simienne (SIV) associés a une réplication élevée de celui-ci sans déficit immunitaire ni infections opportunistes (Silvestri, Paiardini, Pandrea, Lederman et Sodora, 2007). Chez ces animaux, l'activation immunitaire est transitoire après une infection aiguë et est généralement maîtrisée (Harris et al., 2010). En revanche, les macaques rhésus asiatiques infectés expérimentalement avec le SIV subissent un processus caractérisé à la fois par un déficit immunitaire progressif et par des niveaux élevés d'activation immunitaire systémique (Silvestri et al., 2007).

b. Activation et biomarqueurs

Ainsi, outre l'immunodéficience profonde, l'activation anormale des cellules T (Gottlieb et al., 1981) et l'inflammation sont caractéristiques de la maladie (Appay V. and Sauce D., 2008). Un grand nombre d'études ont montré un lien entre les biomarqueurs de l'activation des LTCD4+ et CD8+, principalement définis par la co-expression de CD38 et HLA-DR (mais aussi par l'expression de CD69 et/ou de CD25) au risque de progression de la maladie (Giorgi et al., 1999).

1. CD69

Le CD69 est une glycoprotéine transmembranaire de signalisation qui est impliquée dans l'induction de la prolifération des LT. Cette protéine est exprimée à de très faibles niveaux sur les LT au repos (<5%). Il s'agit d'une des premières molécules d'activation qui est exprimée à la surface cellulaire avec un pic d'expression autour de 16 à 24 heures post-activation suivie de sa diminution pour devenir à peine détectable après 72 heures.

Lorsque la protéine CD69 est exprimée à la surface des LT, elle agit comme une molécule de co-stimulation pour l'activation et la prolifération des LT (Ziegler S.F. et al., 1994).

2. CD25

Le CD25 correspond à la chaine α du récepteur de l'IL-2 qui est inductible suite à l'activation par le TCR du LT. Les chaines β (ou CD122, également inductible) et γ (exprimée de façon constitutive) du récepteur à l'IL-2 forment un récepteur de faible affinité à l'IL-2 mais l'association avec la chaine α, CD25, forme un récepteur doté d'une forte affinité et permet donc de répondre efficacement à la cytokine (Janeway C. et al., 2009). Le CD25 est induit par la stimulation du TCR dans les heures suivant l'expression de CD69. Cependant CD25 n'est pas seulement un marqueur spécifique de l'activation T, en effet, les cellules T régulatrices expriment également ce marqueur (Aandahl E.M., 2004).

3. HLA-DR

HLA-DR est une molécule du CMH de classe II présente sur les cellules présentatrices d'antigène myeloïdes, la plupart des progéniteurs lymphoïdes et les Lymphocytes B. Sa surexpression dans les phases ultérieures de l'activation antigénique des lymphocytes T activés (Caruso A. et al., 1997) peut également refléter une induction par les cytokines de type Interferons de type I et II ou le TNF-a, Par ailleurs, plusieurs études ont également montré que les cellules HLA-DR+ étaient enrichies en cellules engagée en cycle cellulaire (Speizer D.E. et al., 2001). Il s'agit d'une des dernières molécules d'activation exprimée à la surface cellulaire avec un début d'expression autour de 5 jours post activation.

4. CD38

Le CD38 a été initialement identifié sur les thymocytes et les LT. Il est aujourd'hui considéré comme ubiquitaire dans le système immunitaire, avec un niveau d'expression variable. Cette molécule joue un double rôle en tant que récepteur et ectoenzyme, elle est dotée d'activités complexes liées à la signalisation et à l'homéostasie cellulaire.

CD38 est un biomarqueur de l'activation et de la prolifération des LT humains inductible sur les LT activés par la voie du TCR, d'apparition plus tardive que le HLA-DR mais persistante. De plus le CD38 est également inductible par les interférons et le TNF-a. L'interaction entre le CD38 et un anticorps agoniste de CD38 (A10) sur des lignées cellulaires humaines augmente l'expression des marqueurs d'activation CD25 et HLA-DR. De plus, cette liaison induit une prolifération des cellules cibles. Ce signal passerait par l'intermédiaire de la machinerie transductionnelle du TCR/CD3 (Funaro et al., 1990 and Morra M. et al., 1998).

Enfin, CD38 est une ecto-enzyme multifonctionnelle de type ADP-ribosylcyclase (States D.J. et al., 1992) qui catalyse la synthèse de l'ADP et intervient également dans

l'hydrolyse du ADP-Ribose cyclique en ADP-Ribose et du NAD+ ainsi que dans la régulation du niveau calcique. CD38 participe notamment au recyclage des nucléotides extracellulaires (Howard M et al., 1993, Zocchi E. et al., 1995 and Deterre P. et al., 1996). Ainsi, lorsque CD38 est exprimé ses activités enzymatiques couplées à l'activation permettent ainsi de fournir l'énergie nécessaires aux LT (Jin D. et al., 2007). Ainsi, dans le cas de l'infection par le VIH, la surexpression de CD38 à la surface des LT présente un intérêt double : diminuer la biosynthèse de nucléotides et produire le NAD+ qui en traversant la membrane cellulaire peut exercer une activité antivirale en inhibant la réplication virale au niveau post-intégration et en augmentant la survie des cellules infectées par le VIH en empêchant l'apoptose (Murray M.F. et al., 1995 and Savarino A., et al. 1999).

L'expression accrue de CD38 et HLA-DR sur les cellules T CD4 + et CD8 + lors d'une infection à VIH non traitée a été associée à une survie plus courte et à une progression plus rapide de la maladie (J Giorgi et al. 1999, Deeks S.G. et al., 2004). Après traitement anti rétroviral, l'expression de CD38 et de HLA-DR sur les LTCD4+ et LTCD8+ diminue rapidement mais reste plus élevée que chez les témoins non infectés (Autran B. et al., 1997, Hunt P.W. et al., 2003). Une élévation persistante de CD38 et HLA-DR sur les LT a été associée à une diminution de l'amplitude et de la vitesse de reconstitution des LTCD4+ (Fernandez S. et al., 2006).

c. Activation et intégrité digestive

Au début de l'infection généralement par voie muqueuse, le virus perturbe principalement les LT de la muqueuse intestinale qui représente 50% du tissu lymphoïde. La perte d'intégrité de la muqueuse gastro-intestinale et la translocation microbienne contribuent à l'induction de l'inflammation locale et à l'activation immunitaire chronique associée au VIH, qui conduisent à la progression de la maladie et à la déplétion des LTCD4+. Plusieurs études ont montré qu'une translocation mal contrôlée des produits microbiens immunostimulants à lieu chez les personnes infectées par le VIH (Dillon S.M. et al., 2016 and Estébanez-Muños M. et al., 2012). Grâce à la stimulation de plusieurs TLR, ces produits microbiens activent divers types de cellules immunitaires et induisent la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF-α, l'IL-6, l'IL-1β et les IFN de type I (Birx D.L. et al., 1990). Ces réponses contribuent de manière significative à l'activation immunitaire aberrante dans l'infection chronique par le VIH. La rupture de la barrière intestinale semble corrélée avec le niveau d'activation immunitaire et de déplétion des LTCD4+Th17, un type de cellules

normalement abondant dans la muqueuse et impliqué dans l'immunité contre les bactéries commensales (Van Wijk F. and Cheroutre H., 2010).

En résumé, l'infection par le VIH est caractérisée par une activation généralisée du système immunitaire et par une production massive de cytokines pro-inflammatoires, entraînant à leur tour la déplétion clonale et la perte progressive de LTCD4+ périphériques (Sandler N.G. and Douek D.C., 2012).

d. Lymphocytes T régulateurs (Treg)

C'est en 2005 qu'Effena et al. ont proposé le rôle des cellules LTCD4+ CD25high CD127- dans les modèles d'infection chronique expérimentale contribuant à la suppression des réponses des LT (Eggena M.P. et al., 2005). En effet, une fréquence accrue de LTCD4+ exprimant le CD25 a été observée chez des individus infectés par le VIH-2, indépendamment du degré d'appauvrissement en CD4 et des nive'agaux d'activation immunitaire. Ces cellules jouent un rôle vital dans l'homéostasie lymphocytaire T et limitent l'immunopathologie par la suppression de réponses spécifiques des LT telles que l'activation, la prolifération et la fonction effectrice. Ainsi, dans l'infection par le VIH, les Treg jouent un rôle majeur, à la fois bénéfique et préjudiciable. Ils régulent le système immunitaire de sorte que l'inflammation et la propagation du virus par les cellules T activées sont supprimées (Estes J.D., et al., 2006). Cependant, la suppression de l'activation immunitaire limite également la clairance virale et favorise la formation du réservoir. Une étude entreprise par Foxall et al. en 2011 a démontré que la déplétion des LTCD4+ est associée à une expansion relative des Treg, indépendamment de la présence ou de l'absence de virus circulant, conduisant à une meilleure conservation des Treg circulantes par rapport aux autres sous-ensembles de LTCD4+ lors de l'infection par le VIH.

D'autre part, les LTCD4+ sont caractérisées par une capacité accrue à produire de l'IL-2. L'expansion de cette population de cellules n'est pas observée dans l'infection par le VIH-1. La présence de niveaux plus élevés de ces cellules chez les individus infectés par le VIH-2 peut indiquer une capacité améliorée à reconstituer leur réserve de CD4 et une virulence plus faible de l'infection par le VIH-2 par rapport à celle du VIH-1. La population de Treg peut être subdivisée en CD45RA + (cellules naïves) et en CD45RA- (cellules mémoires). Il a été montré que la majorité des Treg chez les individus infectés par le VIH-2 ne présentait pas d'expression de CD45RA, ce qui implique que la plupart des Treg chez ces individus appartiennent au phénotype « mémoire ».

Ces résultats soutiennent en outre un lien étroit entre la déplétion des CD4 et l'activation immunitaire. Ainsi, il est plausible que les Treg jouent également un rôle dans le ralentissement de la progression de la maladie associée à l'infection par le VIH-2 (Foxall R.B. et al., 2011).

4. VIH et cure totale

L'avènement de la multi-thérapie antirétrovirale en 1995, ciblant le VIH, s'est traduit par une chute significative de la mortalité et de la morbidité des patients infectés. En effet, ces traitements, ont permis une réduction de la virémie plasmatique en dessous du seuil de détection par des méthodes de RT-q-PCR ultra sensibles. Cette découverte permettait d'entendre pour la première fois des mots d'espoirs de cure totale. En utilisant un modèle mathématique, les chercheurs ont estimé, sauf complications, que les médicaments permettraient l'éradication totale du virus chez les patients infectés en moins de 3 ans (Siliciano R.F., et al., 2011). Lors de la prise d'un traitement antirétroviral, une diminution de la charge virale plasmatique est observée. Celle-ci se décompose en plusieurs phases : la première chute dure 2 semaines, elle est exponentielle et représente l'élimination du virus plasmatique (demi-vie : 6 heures), et des cellules infectées produisant le virus, principalement les LTCD4+ activés (demi-vie : 2 jours). S'ensuit une seconde baisse (environ 6 mois), plus lente, correspondant à la seconde population de cellules infectées telles que les macrophages (ayant une demi-vie de deux semaines). Alors que le virus ne semble plus présent dans le sang, l'arrêt de la multi-thérapie se traduit par un rebond viral. Une hypothèse est alors émise, celle d'une résistance aux médicaments et/ou d'une persistance du virus dans un autre compartiment de l'organisme. C'est ainsi qu'en 1997 l'équipe de Siliciano *et al.* suspecte l'existence d'un petit groupe de cellules dormantes contenant le VIH intégré dans son ADN. On parlera de réservoirs latents viraux, et cela correspond à la troisième phase de diminution virale plasmatique, presque stable, de durée inconnue, avec une virémie plasmatique, avoisinant 1 copie d'ARN viral/mL. Cela correspondrait à cette troisième population de cellules réservoir, qui sont des cellules infectées ayant une demi-vie extrêmement longue (plusieurs dizaines d'années), certainement des cellules quiescentes. En 1999, Robert Siliciano revient alors sur les prévisions émises lors de la découverte de la multi-thérapie, estimant nécessaire une prise de médicaments anti-VIH pendant environ 60 ans pour une élimination complète du virus de l'organisme. Par ailleurs, bien que le virus soit mieux contrôlé, l'espérance de vie d'un patient VIH+ sous traitement est réduite de 10 ans en moyenne. En effet, un traitement sur le long terme est rarement sans danger pour l'organisme. On retrouve une augmentation des risques cardiovasculaires, un grand nombre de désordres métaboliques, des anomalies neurocognitives, des maladies au niveau du foie et des reins, des troubles osseux ou encore des cancers. Sans oublier qu'un patient séropositif est en constante inflammation, ce qui cause de nombreux désordres immunitaires.

Le champ d'action de la recherche va rapidement changer après la découverte de nouvelles molécules anti VIH (32 molécules ciblant le virus et au moins une douzaine de plus en cours de développement), associée à une amélioration de la tolérance envers ces molécules. Aujourd'hui, la communauté scientifique se tourne vers la recherche d'une cure totale, sous entendant l'éradication des réservoirs viraux (Hughes 2010). Malheureusement, le virus intégré dans l'ADN ne peut pas être pris pour cible par les antirétroviraux et ainsi, il y trouve refuge, et reste a priori intouchable.

30 ans ont déjà été consacrés à la recherche d'un traitement définitif contre le SIDA ayant pour but de cibler la totale éradication du virus du corps humain. Cet objectif reste encore aujourd'hui hors d'atteinte.

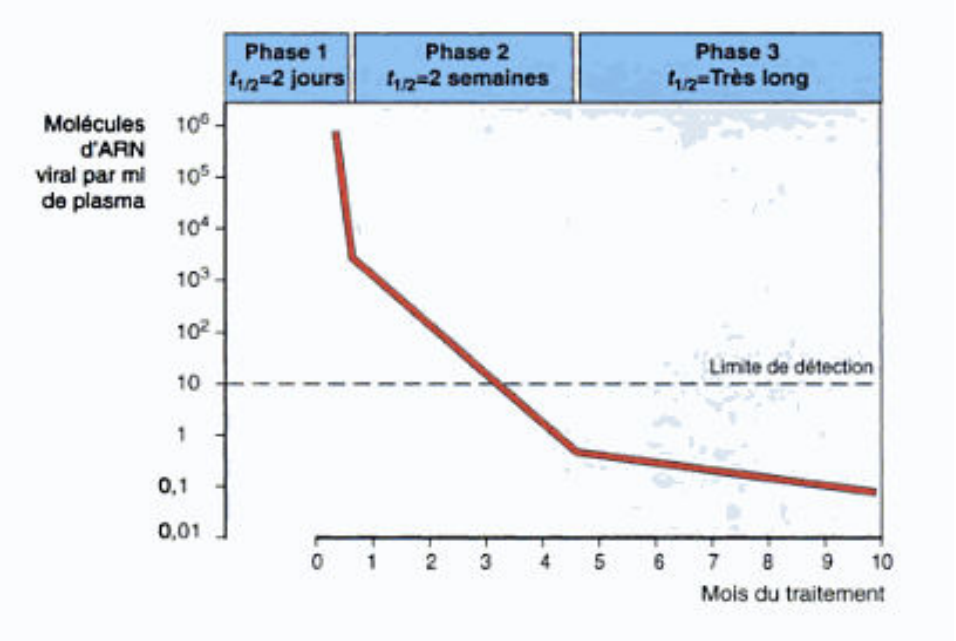


Figure 14 : Graphique de la diminution de la charge virale au cours d'une polychimiothérapie

Tiré de : Immunobiologie, Charles A. Janeway, Paul Travers, 2003

i. Atteinte des réservoirs

Comme cela vient d'être exposé, l'ART inhibe la réplication du VIH mais n'éradique pas le virus. Celui-ci persiste dans les réservoirs cellulaires et anatomiques (Finzi D., et al., 1997 ; Wong J.K., et al., 1997, Chun T.W., et al., 1997). Deux mécanismes majeurs contribuent à la persistance du VIH pendant les traitements. Le premier mécanisme correspond au VIH qui peut encore se répliquer à de faibles niveaux dans les réservoirs anatomiques dans lesquels les médicaments antirétroviraux peuvent ne pas diffuser correctement (Fletcher C.V., et al., 2014). Le second mécanisme correspond à la mise en place, au début de l'infection, d'un petit pool de cellules infectées ayant une longue durée de vie et à infection latente et qui confèrent au virus une niche cellulaire qui assure son maintien

pendant des décennies (Silicano J.D., et al., 2003). Par ailleurs, l'étude de Bourry O. et al., en 2010 montre qu'un traitement HAART initié tôt avant le pic de virémie chez le primate infecté par le SIV, peut avoir un impact sur la dissémination et la réplication du virus dans les tissus. Un traitement semble être plus efficace lorsqu'il est initié le plus tôt possible, cependant même un traitement 4h après l'infection n'empêche pas le virus d'être détecté chez l'hôte (Bourry O. et al. 2010).

Plusieurs études ont clairement montré que l'amplitude du réservoir viral est fortement associée aux niveaux résiduels d'activation immunitaire qui persiste pendant le traitement, suggérant que la persistance du VIH et l'inflammation résiduelle sont corrélées (Chomont N., 2009 ; Cockerham L.R., et al., 2014). L'inflammation continue observée chez la majorité des individus sous ART peut contribuer au maintien d'un réservoir stable pour le VIH en favorisant les deux mécanismes de persistance.

Le principal réservoir identifié est constitué des LTCD4+ mémoires au repos. La littérature abonde de descriptions de possibles réservoirs anatomiques, comme les poumons, la moelle osseuse, le thymus, le rein, le lait maternel… Les réservoirs anatomiques et cellulaires sont néanmoins en relation et il n'est pas exclu que des compartiments nouveaux restent à découvrir. Toute cette description des réservoirs du VIH reste récente et incomplète ; cependant, de nouvelles voies de recherche sont actuellement ouvertes, visant à mettre au point de nouvelles molécules agissant sur les facteurs cellulaires provoquant la latence de la cellule, ou encore sur l'activation des cellules latentes. Actuellement, le développement de nouvelles molécules vise à interférer contre ces mécanismes, ce qui permettra de réduire la taille du réservoir viral, une condition préalable à la rémission totale. Les réservoirs viraux constituent ainsi une cible thérapeutique majeure.

ii. Mécanisme de latence

La majorité des LT auxiliaires latents infectés proviennent de l'infection de LTCD4+ activés, qui retournent à l'état de repos en tant que cellules mémoires CD4 avant de mourir en raison de l'effet cytopathogène du virus (Vanzke S. and Keppler O.T., 2006). Les mécanismes de latence moléculaire du VIH dans ces LTCD4+ quiescents sont complexes et peuvent inclure : l'absence de facteurs de transcription centraux (comme NFKB et Sp1), l'absence d'expression du facteur de transcription Tat du VIH ou encore des changements épigénétiques tels que la condensation de la chromatine par les histones et les méthylations de l'ADN qui suppriment l'expression des gènes VIH-1. Puisque ces cellules expriment ainsi peu ou pas de

molécules d'ARN viral et de protéines virales, elles sont difficiles à reconnaître par le système immunitaire et résistent aux traitements actuels (Battistini A. ans Sgarbanti M., 2014).

Pour aggraver les choses, la durée de vie des cellules mémoire T CD4 au repos, avec une demi-vie de plusieurs années, est considérablement augmentée. En outre, le pool de LTCD4+ infectés de manière latente est également maintenu par la prolifération clonale cellulaire (Chomont N. et al., 2009). Lors de l'arrêt du traitement, ces cellules infectées de manière latente peuvent redevenir actives sur le plan transcriptionnel, relançant la réplication du VIH dans l'organisme.

Des études récentes sur la taille et la distribution du réservoir viral suggèrent que la majorité des cellules infectées par le VIH se trouvent dans le tissu lymphatique du tractus intestinal (Estes J.D., 2017). Le réservoir viral dans ce compartiment anatomique ne semble guère diminuer pendant plusieurs années sous ART, ce qui est vraisemblablement lié à sa position spéciale, tant au point de vue immunologique que pharmacologique.

iii. Virémie résiduelle détectable

On ne sait toujours pas dans quelle mesure, sous ART, avec suppression de la charge virale plasmatique sous le seuil de détection des systèmes de test PCR commerciaux, des cycles d'infection productifs à bas bruits se produisent. Même après plusieurs années de traitement réussi, la virémie résiduelle est détectable chez la plupart des patients par des méthodes de détection ultrasensibles (Cilio A.R., et al., 2014). Il est probable qu'il s'agisse d'une production virale à partir de cellules réactivées, précédemment infectées de manière latente (Zyl G., et al., 2017). Cependant, plusieurs études suggèrent que chez une majorité de patients sous antirétroviraux, en dépit d'une charge virale indétectable conventionnelle dans le sang périphérique, on retrouve une évolution virale dans les tissus lymphoïdes attribués aux faibles pénétrations des médicaments dans ces « sites sanctuaires » (Estes J.D., et al., 2017, Lorenzo-Redondo R., et al., 2016). En effet, les concentrations d'ART dans certains tissus, tels que la muqueuse intestinale, les voies génitales, les ganglions lymphatiques et le système nerveux central, se sont avérées plus faibles par rapport à leurs niveaux dans le sang périphérique et ces tissus sont enrichis en cellules infectées par le VIH (Kim R.B., et al., 1998 ; Else L.J., et al., 2011 ; Fletcher C.V., et al., 2014 ; Rothenberger M.K., et al., 2015). Dans ce contexte, la concentration élevée de LTCD4+ dans ces sanctuaires anatomiques, combinée à une sensibilité moindre à l'action d'inhibition de l'ART, peut favoriser la transmission du VIH de cellule à cellule (Sigal A., et al., 2011). Enfin, la réplication résiduelle du VIH peut induire l'activation des cellules résidentes, ce qui pourrait rendre plus

permissif l'infection de ces cellules par le VIH (Biancotto A., et al., 2008), contribuant à une reconstitution lente mais continue des réservoirs viraux.

iv. Quantification du réservoir

Afin d'identifier le réservoir viral, un « marqueur de substitution » est admis : le nombre de copies de l'ADN proviral dans les LTCD4+ du sang périphérique. L'inconvénient de cette méthode, basée sur la PCR, est qu'elle ne permet pas de réaliser la distinction entre l'ADN du VIH proviral réplicable et celui défectueux. Par conséquent, une autre méthode est proposée : celle du « test de croissance virale quantitative », dans lequel les LTCD4+ sont isolées à partir d'échantillons de patients et examinées *in vitro* après stimulation. On mesure alors la réplication virale. Cependant, ces méthodes sont limitées par le fait que seules les cellules sanguines périphériques sont examinées, alors que la plupart des réservoirs viraux sont situés dans les organes lymphoïdes secondaires. Néanmoins, la taille du réservoir viral dans le pool de LTCD4+ circulants semble être un marqueur de substitution utile pour estimer la taille totale du réservoir viral (Williams J.P., et al., 2014).

v. Une aiguille dans une botte de foin

Afin de mieux examiner le réservoir de VIH latent dans une petite fraction de LTCD4+ au repos et de développer de nouvelles stratégies pour son élimination, l'identification de biomarqueurs spécifiques à la surface de ces cellules est devenue une haute priorité scientifique. Malgré l'absence d'expression génique virale, la cellule a pu avoir des changements à sa surface en réponse à l'infection VIH précédente, ce qui pourrait permettre son identification comme une signature indirecte.

Étant donné que le système immunitaire ne parvient pas à éradiquer l'infection rapidement, de nombreuses voies inhibitrices sont initiées pour freiner la réponse immunitaire et prévenir des dommages sur les tissus : ce processus est appelé « épuisement » (Kim, P.S. and Ahmed R., 2010). La meilleure description de ces voies inhibitrices est l'inhibition médiée par 2 marqueurs d'épuisement (ou immune-checkpoint) : CTLA-4 et PD-1. L'expression de ces récepteurs inhibiteurs a été trouvée sur des cellules spécifiques du virus et est associée à un dysfonctionnement de la réponse cellulaire et à une charge virale accrue. De plus, le blocage des voies PD-1 et CTLA-4 *in vitro* restaure la capacité antivirale des LT (Kim, P.S. and Ahmed R., 2010). Depuis, ce blocage a été utilisé avec succès pour améliorer les réponses immunitaires face aux tumeurs chez les patients atteints de cancer. Bien que ces traitements soient associés à des lésions tissulaires inflammatoires, en particulier dans le foie

et le tractus gastro-intestinal, ces approches immunothérapeutiques pourraient être la prochaine étape dans le traitement contre l'infection par le VIH (Hassel J.C., et al., 2017).

b. Les immune-checkpoints inhibiteurs

1. CTLA-4

L'activation des LT nécessite à la fois une liaison au récepteur des LT (TCR) et une co-stimulation via CD28. Le récepteur CTLA-4 sur les lymphocytes entre directement en compétition avec le CD28 et délivre un signal inhibiteur, qui est essentiel pour prévenir l'auto-immunité létale. En effet, des souris déficientes en CTLA-4 succombent à une auto-immunité généralisée avec une puissante activation des LTCD4+ et CD8+ dans les 3-4 premières semaines de leur vie (Waterhouse P., et al., 1995). CTLA-4 est fortement exprimé sur les LT régulatrices (Treg) et est important pour leur survie et leur activité. Par conséquent, cette auto-immunité pourrait être entraînée partiellement suite à des défauts fonctionnels des Tregs. Chez l'Homme, une substitution de l'adénosine (A) en guanine (G) au résidu +49 de l'exon 1 (+49G) sur l'allèle du CTLA-4 entraine à une réduction de l'ARNm de la molécule (Mäurer M., et al., 2002), provoquant une activation accrue des LT et une augmentation de l'incidence de multiples maladies auto-immunes (Gerold K.D., et al., 2011). Cependant, cette substitution semble suggérer qu'une inhibition de CTLA-4 pourrait faciliter le contrôle de certains pathogènes. Plusieurs études ont montré une protection contre le développement viral des virus responsables de hépatites B et C (Danilovic D.L. et al, 2012, Xu H., et al., 2013), et contre le développement du cancer du col de l'utérus après une infection par le papillomavirus humain (Hu L., 2010).

Lors de l'infection par le VIH ou le SIV, CTLA-4 est exprimé à la fois par les LT répondeurs au virus et par les LT infectés. La forte expression de CTLA-4 sur les LTCD4+ est corrélée à une aggravation de l'évolution de la maladie et à leur épuisement (Kaufmann D.E., et al., 2007). Par conséquent, le blocage du CTLA-4 devrait théoriquement améliorer l'immunité antivirale chez ces patients. Cependant, bloquer CTLA-4 chez les patients infectés pourrait également augmenter la réplication virale en activant les LT infectés et en induisant leur prolifération (Fromentin R., et al., 2016). Cette hypothèse semble être vraie en début d'infection, car le blocage de CTLA-4 lors de l'infection aiguë par SIV augmente la réplication virale dans les sites muqueux et augmente l'expression des facteurs immunosuppresseurs, entraînant une immunité anti-SIV compromise (Cecchinato V., et al., 2008). En revanche, un traitement plus tardif au cours de l'infection (environ 90 semaines après l'infection) a montré des bénéfices en réduisant à la fois la charge virale dans les

ganglions lymphatiques et l'expression des facteurs immunomodulateurs (Velu V., et al., 2009). Il est possible que l'inhibition de CTLA-4 à ce moment précis, suivie d'une réactivation subséquente des LTCD4+ infectés, aboutisse à l'élimination du réservoir viral latent en permettant à ces cellules d'entrer dans le cycle cellulaire puis de mourir. Récemment, un patient infecté par le virus et traité par anti-CTLA-4 pour un mélanome métastatique, a montré une augmentation des LTCD4+ mémoires et effecteurs, mais aussi une augmentation de 19,6 fois de l'ARN viral après traitement, suggérant une augmentation de la réplication virale active (Wightman F., et al., 2015).

2. PD-1

L'expression de PD-1 est induite par plusieurs types de cellules immunitaires après une infection : les LT, les LB et les cellules NK. Lors de l'engagement de l'un de ses ligands PD-L1 ou PD-L2, PD-1 atténue la signalisation du récepteur TCR ou BCR, inhibant ainsi la prolifération et supprimant la production cytokinique (Riella L.V., et al., 2012). Des études sur des PBMC humains ont montré la capacité des immune-checkpoints inhibiteur à rétablir les LT épuisés. Cependant, cette étude ne reflète pas précisément les populations présentes dans les tissus infectés. D'autres études, réalisées sur modèle animal, montrent que l'inhibition de la signalisation de PD-1 semble protectrice lors de l'infection par le VIH. En effet, dans des souris humanisées, le blocage de PD-1 réduit significativement les titres viraux et renforce le nombre de LTCD8+ *in vivo* (Seung E., et al., 2013). Chez les macaques infectés par le SIV, le blocage de PD-1 a augmenté le nombre de LT antiviraux dans le sang et l'intestin, ainsi que l'augmentation de l'expression des molécules effectrices et des cytokines (Velu V., et al., 2009 ; Finnefrock A.C., et al., 2009). En plus de renforcer les réponses LT, le traitement anti-PD-1 a également amélioré la réponse des LB chez ces macaques infectés, à la fois dans l'expansion des LB mémoires et l'augmentation du titre d'anticorps anti-SIV accru. Ces effets du traitement anti-PD-1 ont été observés que ce soit lorsque le traitement a été initié précocement (10 semaines après l'infection par SIV) ou tardivement (90 semaines après l'infection par SIV) (Velu V., et al., 2009). Enfin, les ARN viraux du SIV ont également été réduits considérablement suite au traitement par de l'anti-PD-1, indiquant que le blocage de PD-1 ne facilite pas la réplication virale dans les cellules infectées.

PD-1 est également exprimé sur les LT auxiliaires folliculaires (Tfh), un sous-ensemble spécialisé des LTCD4+ qui favorisent les réponses germinales B (Thornhill J.P., et al., 2017). Au cours d'une infection persistante, les LTCD4+ adoptent majoritairement un phénotype PD-1^{hi} CXCR5+ de type « Tfh » chez les patients infectés par le VIH. Ces

lymphocytes Tfh, lors de l'infection par le VIH, sont moins fonctionnels, ce qui est sans doute dû à des interactions PD-1/PD-L1 dans le centre germinal (Thornhill J.P., et al., 2017, Cubas R.A., et al., 2013). Lors du blocage *in vitro* de PD-L1 dans les PBMC dérivées de patients VIH+, la prolifération et la capacité des LTCD4+ épuisés à produire de nombreuses cytokines augmente, incluant la production de l'IL-21 produite spécifiquement par les Tfh (Porichis D.S., et al., 2011). Enfin, le blocage *in vitro* de PBMC par de l'anti-PD-1 montre une augmentation de la production d'anticorps anti-VIH, suggérant que le blocage de PD-1 renforce la réponse humorale au VIH, en permettant aux populations Tfh de mieux interagir avec les LB (Cubas R.A., et al., 2013, Nicholas K.J., et al., 2013).

3. TIGIT

L'expression de TIGIT sur les LT lors de l'infection par le VIH est en corrélation avec la progression de la maladie et est présent sur les cellules fortement épuisées. Chew et al. ont trouvé que la fréquence des LTCD4+ TIGIT+ était corrélée à la teneur en ADN du VIH dans les cellules CD4+, ce qui pourrait être dû au fait que les LTCD4+TIGIT+PD-1+LAG3+ sont enrichis en cellules infectées par le VIH (Fromentin R., 2016). La majorité des LTCD8+ TIGIT+ chez les patients VIH co-expriment PD-1, inhibant davantage la fonctionnalité cellulaire. Significativement, le blocage simultané de TIGIT et PD-L1 conduit à un effet synergique qui permet de restaurer la prolifération des LT et la production d'IFNγ *in vitro* (Chew G.M., et al., 2016). Dans un modèle murin d'infection chronique, le co-blocage de PD-1 et de TIGIT *in vivo* a rétabli les réponses des LT à un degré beaucoup plus élevé que l'un ou l'autre de ces traitements utilisés seuls (Johnston R.J., et al. 2014). Le mécanisme par lequel TIGIT inhibe la fonction des LT est encore mal décrit.

4. Tim-3

L'interaction entre le récepteur Tim-3 et son ligand, galectine-9 (Gal-9), déclenche une série d'événements de signalisation qui régulent les réponses immunitaires. Une balance mutuelle de Gal-9 et de Tim-3 a été rapportée : l'inactivation du gène de Gal-9 régule à la baisse les niveaux de Tim-3 et inversement, l'inactivation du gène de Tim-3 inhibe la sécrétion de Gal-9 dans les cellules U-937 (Gonzales Silva I., et al., 2016).

L'expression de Tim-3 est régulée à la surface des LTCD4+ et CD8+ effecteurs chez les patients infectés par le VIH (Zhu C., et al., 2005 ; Sada-Ovalle I, et al., 2015). L'interaction Tim-3/Gal-9 entraîne la déplétion de ces cellules effectrices et pourrait entraîner la déplétion de LT épuisés. En outre, les taux plasmatiques de Tim-3 augmentent chez les patients présentant une infection par le VIH, qu'elle soit précoce ou chronique non traitée. De

plus, les taux plasmatiques de Tim-3 et la fréquence des pDC exprimant Tim-3 chez les patients infectés par le VIH se sont révélés positivement corrélés à la charge virale et négativement corrélés avec les numérations lymphocytaires CD4+ (Clayton K.L., et al., 2015 ; Schwartz J.A., et al., 2017).

Ainsi, Tim-3 peut servir de biomarqueur utile chez des patients infectés par le VIH. En effet, lors de co-cultures de LT de patients infectés par le VIH avec du *Mycobacterium tuberculosis*, le traitement par anticorps-anti-Tim3 ou anti-galectine-9 supprime les UFC bactériennes (Sada-Ovalle I, et al., 2015). Compte tenu du risque élevé d'infection à Mycobacterium tuberculosis chez les patients infectés par le VIH, les résultats suggèrent les effets bénéfiques de l'inhibition de Gal-9/Tim-3 dans le contrôle de la croissance de la bactérie chez les patients infectés par le VIH.

Comme cela a été décrit plus haut, l'une des principales caractéristiques de l'infection chronique par le VIH est l'activation immunitaire persistante déclenchée dès les premiers stades de l'infection, suivie de l'apparition de phénomènes d'épuisement qui empêchent les cellules immunitaires de réagir. Cet état d'épuisement est caractérisé par une perte des fonctions effectrices des cellules immunitaires telles que la prolifération, la production de cytokines, ainsi que par le potentiel cytotoxique et est attribuable à une réponse accrue des Treg et à l'expression dans différentes populations cellulaires de molécules inhibitrices (PD-1, CTLA-4, Tim-3 ou TIGIT). L'importance de ces molécules repose donc sur la possibilité de restaurer la réponse immunitaire une fois que ces molécules sont bloquées, constituant une cible thérapeutique potentielle pour le traitement lors d'une infection par le VIH.

c. Les biomarqueurs des réservoirs

Récemment, les molécules de surface cellulaire CD32a et IFITM ont été proposées comme candidates pour être des biomarqueurs de cellules réservoirs (Descourt B., et al., 2017, Raposo R.A.S. et al., 2017), mais leur pertinence n'est pas encore claire.

Dans leur étude, Descourt B. et al., ont montré que l'expression de CD32a semblait être un candidat comme marqueur de réservoir dans un modèle *in vitro* de LTCD4+ quiescentes infectées par le VIH. Pour ce faire, la production LT non stimulées, infectées de manière latente a été mise en place, afin d'identifier une signature d'expression génique qui les distingue de leurs homologues non infectés. Concrètement, des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) provenant de quatre témoins séronégatifs ont été isolées et exposées à des particules de type viral (VLP) contenant la protéine accessoire Vpx (VLP-

Vpx) de SIVmac251, qui induisent la dégradation de SAMHD1 (SAMHD1 a été identifié comme facteur de restriction empêchant une synthèse efficace de l'ADN du VIH dans les LTCD4+ au repos, ainsi la perte de l'expression de SAMHD1 est en corrélation avec une permissivité accrue à l'infection par le VIH-1 (Decourt B., et al., 2012)). Les cellules traitées au Vpx ont ensuite été infectées par un vecteur dérivé du VIH-1 exprimant la protéine fluorescente verte (GFP). Quatre jours plus tard, les LTCD4+ au repos GFP+ et GFP- ont été triées et l'ARN total a été extrait. Des analyses de séquençage d'RNA-seq ont été réalisé sur ces cellules pour déterminer l'effet de l'infection virale sur le programme de transcription des LTCD4+ quiescentes. L'analyse de la signature d'expression génique a identifié 103 gènes régulés à la hausse, spécifiques des cellules infectées de manière latente. Ce criblage *in vitro* de l'expression des LTCD4+ quiescents infectés par le VIH a montré que le récepteur CD32a, est celui qui est le plus fortement induit. Singulièrement, un traitement avec l'inhibiteur de l'intégrase (le raltégravir) avant l'infection, empêchait l'expression de CD32a par les LTCD4+ au repos infectés et, qu'un traitement stimulant les LTCD4+ (par la phytohémagglutinine (PHA) et l'IL-2) avant l'infection, montrait que l'expression de CD32a par les LTCD4+ productif n'était pas associée à une induction significative de CD32a. Tout ceci suggérant l'importance de l'étape d'intégration pour l'induction de CD32a qui serait un mécanisme dépendant de la quiescence est nécessaire pour son induction. Enfin une analyse du sang périphérique de patients infectés par le VIH-1 recevant une ART suppressive a été réalisée, une sous-population de 0,012% de LTCD4+CD32a+ a été mise en évidence, ces cellules hébergeant jusqu'à trois copies d'ADN viral par cellule (Figure 15).

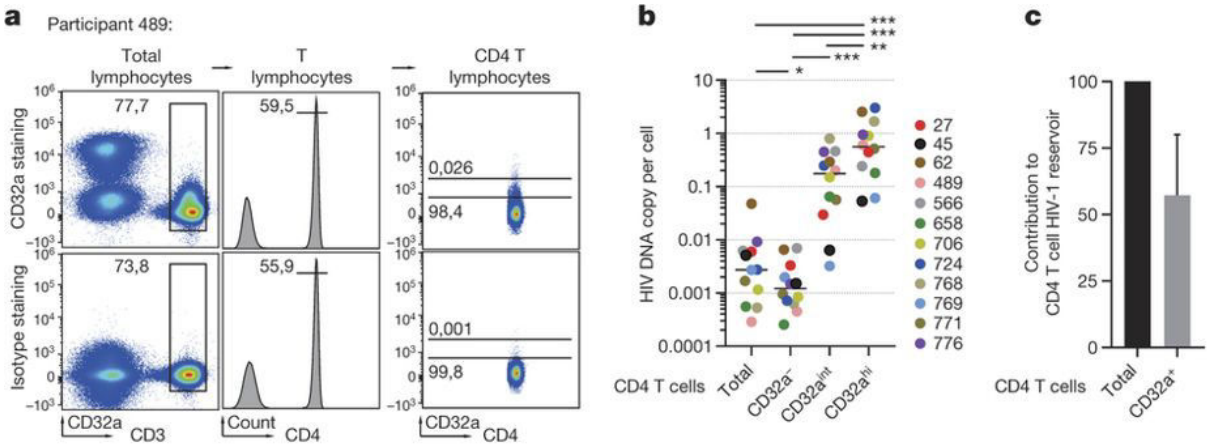


Figure 15 : CD32a caractérise le réservoir de LTCD4+ hébergeant le VIH. (Descourt B., et al., 2017)

Ainsi, ce marqueur potentiel de cellules réservoirs du VIH CD32a+ semble être fortement enrichi en provirus inductibles par réplication et peut être prédominant chez

certains participants. Cette avancée représente le premier pas dans la détermination du réservoir latent du VIH, jusqu'alors insaisissable.

vi. Réservoir et cycle cellulaire

Comme mentionné précédemment, l'inflammation est associée à l'activation et à la prolifération des LT au cours de l'infection par le VIH, même sous ART. La fréquence des LTCD4+ hébergeant l'ADN intégré du VIH est associée à la fréquence des LTCD4+ proliférant (mesurés par Ki67) chez les individus sous traitement (Chomont N., et al., 2009). La relation directe entre la prolifération des LT et la persistance virale a été récemment montrée dans deux études. Maldarelli et al. et Wagner et al. ont identifié des sites spécifiques d'intégration du VIH liés à l'expansion clonale des cellules infectées. Des intégrations de provirus ont été fréquemment trouvées dans des gènes associés aux cancers ou à la régulation du cycle cellulaire, favorisant la persistance des cellules infectées par le VIH via leur prolifération et l'augmentation de la survie cellulaire (Maldarelli F., et al., 2014 ; Wagner T.A., et al., 2014).

Deux études ont renforcé le concept de prolifération en tant que mécanisme de persistance virale dans les LTCD4+ mémoire dans le sang et les tissus lymphoïdes chez des patients sous ART. Une analyse phylogénétique longitudinale approfondie des virus plasmatiques et associés aux cellules a révélé qu'une majorité de séquences virales sont identiques, ce qui suggère que le VIH persiste à travers la prolifération cellulaire plutôt que par une réplication continue chez ces individus (Josefsson L., et al., 2013 ; Von Stockenstrom S., et al., 2015). D'autres investigations seront nécessaires pour établir comment l'inflammation favoriserait l'un ou l'autre mécanisme. De plus, les LTCD4+ mémoires effecteurs hébergent plus fréquemment des provirus avec des séquences identiques que les sous-ensembles de LTCD4+ moins différenciés, indiquant que l'expansion clonale des cellules infectées par le VIH est une caractéristique des cellules différenciées. Des fréquences plus élevées de ces cellules différenciées ont été observées chez des individus sous traitement avec une lymphopénie persistante (Massanella M., et al., 2015) suggérant que la prolifération homéostatique peut conduire à la persistance du VIH chez ce groupe de sujets. L'IL-7 est un contributeur majeur à la prolifération des LTCD4+ *in vivo* (Camargo J.F., et al., 2009). Il a été rapporté que l'administration d'IL-7 augmente la taille du réservoir de VIH par induction de la prolifération des LTCD4+ sans augmenter la diversité génétique de la population provirale (Vandergeeten R., et al., 2013). Cette étude démontre clairement la contribution de la

prolifération induite par l'IL-7 au maintien de cellules infectées de manière latente durant le traitement.

L'apparition d'une nouvelle technologie multiparamétrique pour caractériser au mieux les cellules infectées par le VIH

1. Combler le manque en réalisant une évaluation « one-cell » multidimensionnelle

La cytométrie en flux, dont le nom en grec signifie « mesure de cellules » en flux, est une technique biologique qui permet l'étude multiparamétrique précise, quantitative et qualitative, de particules isolées en suspension entrainées par un flux liquide. Déjà connue dans les années 1930, cette technique ne prend réellement son essor que vers la fin des années 1960 avec les travaux de Kamentsky, en 1965 et 1967 (Kamentsky L.A., et al. 1965 ; Kamentsky L.A. and Melamed M.R., 1967). Les progrès dans la détection et le traitement du signal lumineux ont alors permis à l'équipe d'Herzenberg (1931-2013) de développer le premier cytomètre ayant une fonction de tri rendant ainsi possible la séparation de cellules d'intérêt grâce à un système de formation de gouttelettes reprenant le même principe que l'imprimante à jet d'encre (Bonner W.A., et al. 1972). C'est ce principe qui a été appliqué avec de nombreuses améliorations ces dernières décennies.

L'expansion et le succès de la cytométrie en flux sont indissociables de la production d'anticorps monoclonaux, mise au point par Köhler et Milstein en 1975 (Köhler G. and al., 1975), et de la possibilité d'y fixer de façon covalente différentes molécules fluorescentes, comme l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) dès 1950 (Coons A.H. et al. 1950), auxquelles il faut leur adjoindre de nombreuses sondes fonctionnelles synthétisées notamment sous l'égide de R. Haughland. La cytométrie en flux est aujourd'hui omniprésente, aussi bien utilisée dans les laboratoires d'analyses médicales que dans les laboratoires de recherche. On la retrouve également embarquée sur des navires, voire des bouées, pour des études de biologie marine dans lesquelles les pigments naturels des micro-organismes sont les principaux critères d' identification et de quantification des populations.

Illustrée par l'utilisation omniprésente de la cytométrie en flux dans les recherches en immunologie, l'analyse unicellulaire est depuis longtemps une obsession des immunologistes cellulaires. Ainsi, ces dernières années ont vu une progression importante des capacités des nouveaux appareils. La cytométrie en flux actuelle permet une collection plus importante de données et donc, des analyses plus fines et parfois plus rapides. Un saut technologique a été récemment franchi avec la cytométrie couplée à la spectrométrie de masse, dans laquelle les fluorochromes ont été remplacés par des métaux lourds de la famille des lanthanides,

comprenant de nombreux isotopes non radioactifs de masses moléculaires différentes, élargissant ainsi considérablement les possibilités de détections simultanées de manière fiable sur des cellules individualisées, et permettant ainsi de franchir les limites des méthodes traditionnelles pour la définition des cellules immunitaires.

Les anticorps sont soit directement conjugués, soit purifiés et peuvent être alors couplés à façon grâce à des méthodes de couplage standardisées, reproductibles et rapides.

Le cytomètre de masse Helios comprend 135 canaux de détection de masse atomique de 75 à 209 Da. Ce potentiel permet une capacité analytique inégalée à générer des profils phénotypiques et fonctionnels. Les isotopes analysés ont des masses supérieures à 80 Da : ce sont des isotopes particulièrement rares dans la nature et donc il existe très peu de signal endogène dérivé des cellules elles-mêmes. Actuellement, seuls 47 isotopes sont purifiés, mais dans l'avenir cette gamme va s'étendre et ne cessera d'incrémenter la performance de cette technologie.

En parallèle du développement technologique, de nombreuses nouvelles formes de visualisations, des méthodes de clusterisation et des myriades de méthodes d'analyse de haute dimension, permettent d'exploiter au maximum ces données générées très complexes (Grégori G., et al. 2012). Néanmoins, extraire la signification sous-jacente ou l'utilité fonctionnelle de chacun de ces innombrables sous-ensembles cellulaires reste un défi.

2. Principes technologiques

i. Conception d'un projet

A l'origine, la cytométrie de masse est la fusion de deux appareils technologiques : la cytométrie en flux et la spectrométrie de masse élémentaire. L'outil qui repose sur cette technologie est appelé CyTOF, pour cytométrie par temps de vol (Bandura D.R., et al., 2009 ; Bjornson Z.B., et al., 2013). L'objectif derrière cette fusion était d'augmenter le nombre de paramètres cellulaires pouvant être quantifiés simultanément. L'avantage de l'utilisation de la spectrométrie de masse comme moyen de quantification réside dans la capacité à distinguer les différents isotopes de façon spécifique. La cytométrie en flux conventionnelle utilise des fluorochromes en tant que « rapporteurs », mettant en lien leur émission de lumière par rapport à l'expression moléculaire. Cependant, les spectres d'émission des fluorochromes se chevauchent, ce qui les rend plus difficile à distinguer les uns des autres, d'autant plus lorsque le nombre de paramètres mesuré dans une seule expérience est grand. En revanche, la spectrométrie de masse est capable de discriminer les isotopes de différents poids atomiques avec une grande précision. Cette différence fondamentale permet d'évaluer de manière significative plus de fonctionnalités cellulaires en utilisant une technologie basée sur la masse. Ainsi, plutôt que de coupler des sondes (souvent des anticorps) à des fluorochromes, les expériences de cytométrie de masse utilisent des sondes couplées à des isotopes de métaux lourds et stables. De même qu'en cytométrie en flux, la quantité d'ions dans un canal de masse particulier devient proportionnelle à l'expression moléculaire de l'antigène reconnu par la sonde avec un minimum de chevauchement des signaux entre chaque paramètre.

La cytométrie de masse est un outil puissant pour interroger des systèmes biologiques complexes. Cependant, chaque expérience de cytométrie de masse est une entreprise qui prend du temps. Maximiser le contenu d'informations générées nécessite une organisation stricte et rigoureuse pour aboutir à une stratégie expérimentale et technique propre à l'expérience.

L'aspect le plus critique d'une expérience reste de définir un ou plusieurs objectifs clairs dès le début : à quelle(s) question(s) l'expérience doit-elle répondre ? Est-ce un mécanisme biologique spécifique qui est recherché ? Faut-il mesurer le comportement d'un échantillon ou l'intérêt est-il de travailler sur une série d'échantillons d'une cohorte de patients ? Ces questions et les réponses qui en découlent ont des conséquences sur la conception expérimentale finale du projet. Parce que de nombreux aspects différents de la biologie peuvent être interrogés en utilisant la cytométrie de masse, il est essentiel de clarifier l'intention expérimentale dès le début. Les expériences de cytométrie de masse peuvent aller

de l'identification de presque tous les types et sous-types de cellules dans un échantillon donné (Spitzer M.H., et al., 2015) à la déduction de quelques paramètres qui révèlent de larges classes de cellules tout en utilisant les paramètres restants pour mesurer les états comportementaux individuels (Bodenmiller B., et al., 2012).

Par exemple, si l'on prend le cas de l'analyse du cycle cellulaire : si une étude vise à fournir une détermination précise de l'état du cycle cellulaire, il faut inclure plusieurs paramètres qui permettent de discriminer les phases G0, G1, S, G2 et M (Behbehani G.K., et al., 2012). Si en revanche, la division cellulaire n'est qu'un aspect de l'étude, un marqueur de prolifération plus large tel que le Ki-67 suffit.

Ainsi, lors de la création d'un panel, l'important est de commencer par créer une liste de marqueurs sans tenir compte de l'aspect pratique, puis de rétrécir la liste en hiérarchisant les types de cellules qui semblent les plus intéressants. Ensuite, il faut prioriser les attributs intracellulaires les plus pertinents. Enfin, il faut déterminer quels marqueurs nécessiteraient un nouveau développement, pour terminer par les conditions du marquage, et vérifier si elles sont compatibles les unes avec les autres.

Ainsi, lors de la conception d'un projet de cytométrie de masse, il faut passer par l'étape de création d'un panel d'anticorps couplés aux métaux lourds, étape cruciale qui est loin d'être si simple à mettre en place. En effet, la technologie présente moins de réactifs commerciaux que ceux pour les approches basées sur la fluorescence. Les panels d'anticorps hautement personnalisés nécessitent donc souvent de conjuguer en interne les anticorps purifiés nécessaires à des ions de métaux lourds (Bjornson Z.B., et al., 2013 ; Lou X., et al., 2007). Alors que la chimie impliquée pour ce couplage est une méthode conventionnelle (couplage maléimide par groupes -SH), il reste essentiel que tous les anticorps nouvellement conjugués soient soumis à une validation rigoureuse et soient titrés, afin de confirmer la liaison et de déterminer la concentration appropriée. Le protocole actuel de conjugaison métal-anticorps consiste à utiliser un polymère liner (X8) ou dendrimère (DN3) pour faire le pont entre le métal et l'anticorps (Bandura D.R., et al., 2009, Majonis D., et al., 2010). Chaque anticorps pourrait être fixé par 4-5 polymères chélatés par des métaux. Une telle liaison covalente est comparativement aussi forte que la streptavidine-biotine (KD) (Bjornson Z.B., et al., 2013, Tanner S.D., et al., 2013). Généralement, les anticorps purifiés exempts de protéine porteuse (c'est-à-dire de BSA ou de gélatine) sont utilisés pour la conjugaison du métal, car ces protéines porteuses peuvent également réagir avec les agents de réticulation polymères.

Ensuite, lors de la création du panel, il faut tenir compte de plusieurs facteurs : l'abondance de l'antigène, la sensibilité du système aux isotopes, les sources du bruit de fond et l'oxydation possible des ions. Le choix des isotopes du panel est également réalisé en fonction de la sensibilité du cytomètre de masse sur lequel les échantillons seront acquis.

Les sources principales de bruit de fond sont dérivées de l'environnement. Certains métaux lourds peuvent être trouvés dans des produits utilisés lors de la préparation des échantillons. En particulier, la contamination par le baryum (130-138 Da) ainsi que ses oxydes (masse atomique +16 = 146-154Da), contribuent au bruit de fond. Le baryum est l'un des éléments les plus abondants de la croûte terrestre et peut contaminer les échantillons exposés dans l'environnement normal du laboratoire (en raison des retombées de poussière). De plus, les savons, le verre de laboratoire et les flacons de réactifs provenant de sources commerciales peuvent contenir des niveaux élevés de baryum, et l'utilisation de tels récipients doit être évitée. En outre, on peut trouver de faibles taux de mercure, de plomb, d'iode et d'étain dans certains tampons de laboratoire. Pour éviter cela, il faut s'assurer de préparer des tampons de laboratoire dans des plastiques certifiés "sans élément chimique lourds". Avant les premiers marquages des échantillons en vue du passage sur un cytomètre de masse (CMM) il est recommandé de tester chaque tampon pour évaluer la contamination de l'environnement.

Comme la sensibilité de l'instrument varie à travers la gamme de masse des isotopes, et que chaque isotope métallique est disponible avec des puretés légèrement différentes, choisir le meilleur canal pour chaque paramètre nécessite une planification préalable. Par exemple, alors que les métaux avec plusieurs isotopes stables peuvent être hautement purifiés (95-99%), les faibles niveaux résiduels d'autres isotopes entraîneront un signal contaminant dans un autre du même élément. De plus, plusieurs ions métalliques s'oxydent à basse fréquence (1-3%), gagnant une masse de 16Da et entraînant ainsi un signal dans le canal correspondant. Toutefois, comme les interférences entre les isotopes sont plus faibles que celles des fluorochromes, les complications de cytométrie de flux multicolore dues aux artefacts de compensation ne sont pas un problème en cytométrie de masse.

Afin d'éviter le potentiel risque de spillover en CMM, un protocole et un algorithme a été proposé en 2018 par Chevrier et al., en proposant un workflow afin de générer des compensations basées à l'aide de bille et de R qui estime et corrige les interférences entre les canaux. Cette approche simplifie grandement le développement de nouveaux panels d'anticorps, augmente la flexibilité pour le couplage anticorps-métal, ouvre la voie à

l'utilisation d'isotopes moins purs et améliore la qualité globale des données, réduisant ainsi le risque de déclaration d'artefacts phénotypiques (Chevrier S. Et al., 2018).

Enfin, les étapes de préparation cellulaire, bien que sensiblement identiques à celles de la cytométrie en flux, présentent quelques nuances listées ci-dessous :

- Ajout du Cisplatine (ou du Rhodium) en début de marquage pour l'analyse de la viabilité : le Cisplatine forme des liaisons sulfhydrile avec les protéines de membrane nucléophiles ; ainsi, les cellules mortes ou en voie de mort sont positives pour ce marqueur.
- Ajout d'un intercalant d'acide nucléique conjugué à l'iridium en fin de marquage, ce qui permet d'analyser la teneur en ADN : la cellule étant désintégrée en nuage ionique, la détection de la cellule est faite par son contenu en ADN via l'Iridium.
- Les étapes de marquage restent identiques à celles de la cytométrie en flux. On commence par le marquage de la membrane avant de procéder au marquage intracellulaire. Cependant, les indicateurs isotopiques ne sont pas sujets à des modifications par les produits chimiques utilisés dans les tampons comme c'est le cas en cytométrie en flux (les protéines fluorescentes sont par exemple dégradées par le méthanol).

ii. Le cytomètre de masse

a. Introduction de l'échantillon et ionisation

Lors d'une expérience de cytométrie de masse, les cellules d'intérêt sont d'abord marquées avec un cocktail d'anticorps conjugués à des isotopes de métaux lourds purifiés et stables (Lou X., et al., 2007, Ornatsky O.I., et al., 2008). Ces sondes se lient à leurs cibles d'intérêt que ce soit de façon membranaire ou intracellulaire, permettant aux ions de servir de rapporteurs pour le niveau d'expression de la cible. L'échantillon cellulaire fixé puis mis en suspension dans l'eau est chargé dans une chambre remplie d'argon, fournissant la pression requise pour lui permettre de passer du tube vers le nébuliseur. Les cellules vont passer dans un nébuliseur permettant l'individualisation cellulaire en plaçant les cellules dans des gouttelettes pour l'introduction dans le cytomètre de masse. L'eau de l'échantillon sera ainsi éliminée tout d'abord par aérosolisation afin qu'il puisse être efficacement ionisé. Ensuite, l'échantillon sera administré dans la chambre de pulvérisation chauffée à 200 degrés, permettant l'évaporation partielle des gouttelettes. En entrant dans l'instrument, les cellules traversent un plasma d'argon, dans lequel les liaisons covalentes sont rompues pour produire des atomes libres, qui se chargent dans le processus. Ces gouttelettes d'aérosols monocellulaires sont ainsi vaporisées, atomisées et ionisées pour une analyse de masse.

Chaque cellule formera en sortie de plasma un nuage d'ions contenant les marqueurs métalliques ionisés.

b. Interface sous vide et purifications des ions

Le nuage ionique qui est généré traverse alors une interface sous vide, le but de celle-ci étant de transporter efficacement les ions du plasma vers la chambre de vol. Le cytomètre de masse utilise une interface à 3 cônes (en nickel et refroidi à l'eau) pour transporter le faisceau d'ions dans un vide à basse pression. Les ions qui émergent des cônes sont accélérés et déviés par un champ électrostatique vers la chambre de vol.

Le nuage sortant de l'interface sous vide est dominé par des ions de faible masse qui n'ont aucun intérêt analytique et qui sont d'une abondance si élevée qu'ils peuvent rapidement endommager le détecteur. Pour éliminer ces ions, le faisceau est focalisé et dirigé dans un quadripôle qui permettra l'élimination des éléments biologiques communs de faible masse (inférieures à 80Da) et enrichissant par conséquence les ions rapporteurs de métaux lourds qui sont guidés à travers cette voie.

c. Séparation des ions et acquisition

Les nuages sortant du quadripôle se composent d'un mélange d'ions de haut poids moléculaire. Ces ions sont envoyés dans l'analyseur de masse/temps de vol (TOF), qui sépare les ions sur la base du rapport masse-charge. Le faisceau sortant pénètre dans la chambre d'accélérateur de l'analyseur TOF. A des intervalles de 13µs, une impulsion de plusieurs centaines de volts est appliquée à une plaque de poussée, accélérant le paquet d'ions vers le réflecteur, qui redirige les ions vers le détecteur. Les champs électriques dans l'accélérateur et le réflecteur sont configurés pour focaliser les ions indépendamment de la position initiale. Chaque paquet d'ions se résout en une série de bandes, les ions les plus légers atteignent le détecteur en premier et chaque masse successivement plus lourde atteint celui-ci à un moment ultérieur. Chaque bande d'ions de masse M est séparée de son voisin M + 1 de 20ns.

La gamme de données collectées évalue les impulsions et l'intensité du nuage ionique pour chaque canal. Les données pour chaque poussée de 13µs sont numérisées séquentiellement et intégrées pour obtenir des comptes d'ions pour les canaux choisis dans l'analyse. Ces données sont sauvegardées en format standard de cytométrie de flux pour une analyse des données dans des logiciels compatibles.

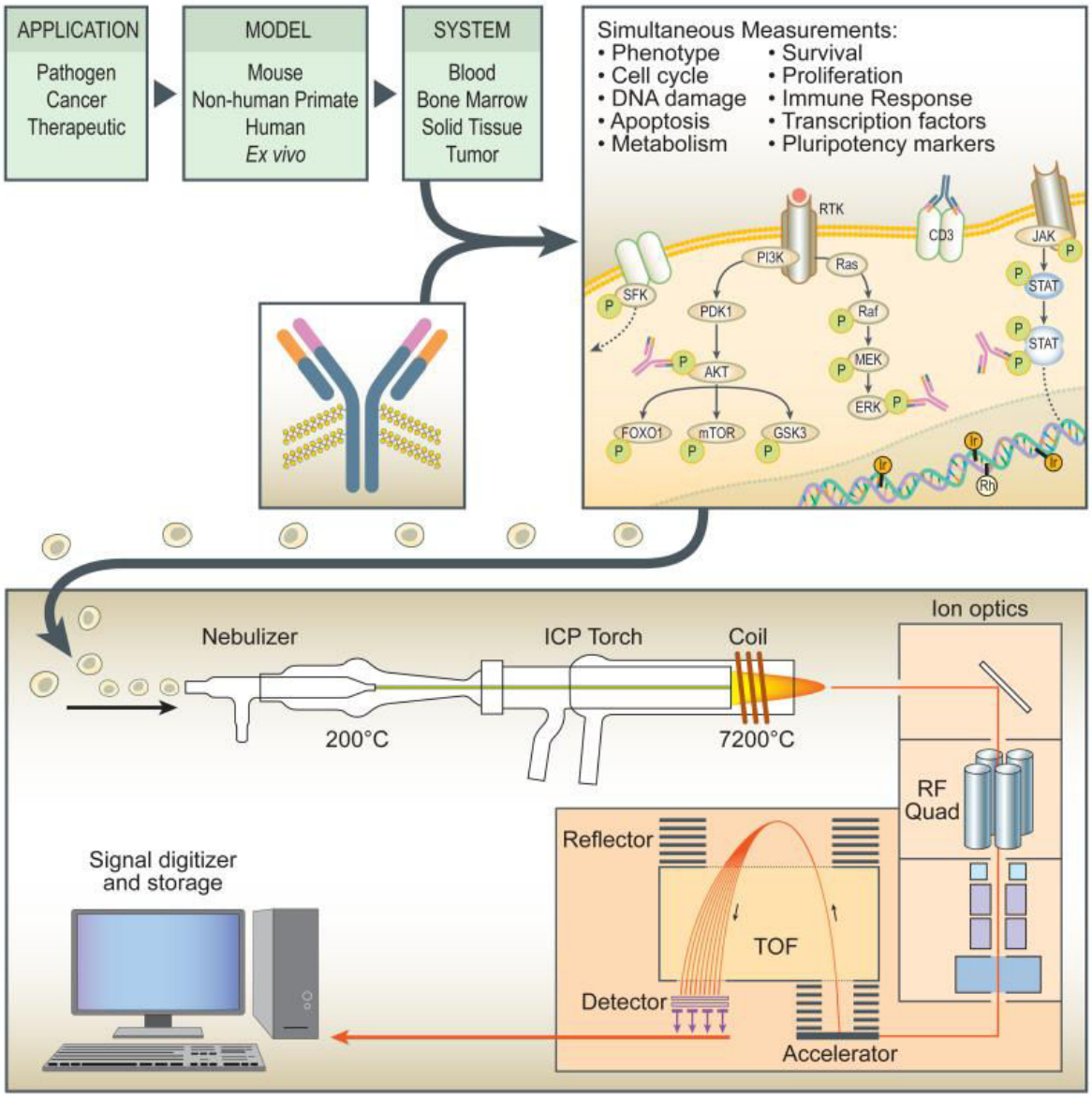


Figure 16 : Schéma synthétique de la conception d'un projet de cytométrie de masse jusqu'au passage de l'échantillon

Tiré de : Bjornson et al., 2013

iii. Limitations

Alors qu'une profusion de processus cellulaires peut être étudiée simultanément en cytométrie de masse, cette technologie présente certaines limites importantes à prendre en considération lors de la conception d'une expérience :

- Parce que les cellules sont atomisées et ionisées, il est impossible de récupérer les cellules vivantes après l'analyse. De plus, l'information taille et granularité n'existe plus.
- En raison de la dynamique du vol d'ions dans le spectromètre de masse, le débit de la cytométrie de masse (entre 250 et 500 évènements/seconde) est inférieur à celui

des instruments basés sur la fluorescence (il est possible d'atteindre 50000 événements/secondes, soit 100 fois plus).

- La sensibilité des isotopes est parfois moins importante que celles de certains fluorochromes, qui ont de forts rendement quantiques (tel que la phycoérythrine), ce qui peut rendre plus difficile la mesure des caractéristiques moléculaires qui sont exprimées à des niveaux très bas en cytométrie de masse. Toutefois, la gamme de sensibilité des ions dans la gamme de masse est de 3 à 4 fois différente, tandis que pour les la cytométrie en flux il faut composer avec une vaste gamme (jusqu'à 50 fois) auquel s'ajoute les problèmes de chevauchement spectral.

- Comme pour toutes les nouvelles technologies, des normes sont établies pour la comparaison des données entre laboratoires et instruments. Une étude à laquelle le laboratoire a participé a comparé l'efficacité de l'ionisation à travers différents cytomètres de masse CyTOF-2, démontrant que les comparaisons quantitatives entre les instruments sont significativement améliorées par la normalisation (Tricot S. et al., 2015). Comme chaque instrument a un profil d'efficacité caractéristique, la comparaison des données provenant du même instrument ne peut être réalisée qu'en incorporant des billes de polystyrène pour la normalisation des données (Finck R., et al., 2013). Lors de cette première étude, il a été conclu qu'un autre réactif de normalisation contenant tous les ions rapporteurs mesurés faciliterait des comparaisons inter-instruments.

- Certains médiateurs du comportement cellulaire, tels que les métabolites, sont difficiles, voire impossibles, à mesurer par CyTOF, car il n'y a pas d'approche technique qui maintienne ces petites molécules associées à la cellule. Alors que certains attributs cellulaires peuvent être mesurés (comme le pH ou la concentration ionique) avec des produits chimiques sensibles à l'environnement ou des protéines de fluorescence modifiées, le développement d'analogues en cytométrie de masse à de telles fins est plus difficile à envisager. Ainsi, les rapporteurs fluorescents pour le flux calcique, la perméabilisation mitochondriale ou la division cellulaire (CFSE) n'ont pas d'équivalents métalliques. Cependant une étude de Jaracz-Ros A. en 2018 a permis d'évaluer l'expression et la quantification des canaux ioniques impliqué dans le flux calcique (Jaracz-Roz A. et al., 2018).

- Des réactifs de haute qualité avec une réactivité croisée minimale sont requis, d'où l'utilisation d'anticorps validés et disponibles dans le commerce. Ces produits de qualité amènent un coût pour la cytométrie de masse par cellule relativement élevé, qui reste malgré tout très acceptable par rapport à d'autres analyses monocellulaires. Des études ont

montré que le coût des réactifs, des consommables et de l'acquisition des données est d'environ 0,005 centime par cellule lorsqu'elle est acquise par cytométrie de masse. En revanche, la valeur estimée pour les cellules mesurées par séquençage d'ARN unicellulaire en utilisant le système Fluidigm C1 se situe à 22 $ par cellule (GenomeWeb ,2014).

Au-delà des limitations présentées, il est maintenant possible de concevoir une expérience approfondie pour évaluer les attributs cellulaires ou ses fonctionnalités dans des millions de cellules individualisées pour chaque échantillon d'intérêt. Cependant, décider quelle approche analytique utiliser pour tirer le meilleur parti de la signification biologique reste une étape clé nécessitant des logiciels adaptés. On retrouve des logiciels de cytométrie classique mais aussi d'autres logiciels plus complexes pour une analyse multiparamétrique efficace. La mise au point d'outils d'analyse des données en cytométrie, du fait du nombre croissant des données acquises, est en plein essor actuellement. Le prochain défi pour la cytométrie de masse est par conséquent la mise au point de logiciels performants et accessibles permettant l'interprétation complète de l'ensembles des données complexes acquises sur les cytomètres de masse.

3. Une nouvelle approche pour analyser des données

Le terme «la malédiction de la multi-dimensionnalité » est utilisé dans de nombreux contextes et fait référence aux difficultés liées à l'augmentation exponentielle du nombre de dimensions considérées (Bellman R., 1957). Dans l'analyse des données en cytométrie, ce problème est évident et commence par l'impossibilité de générer des graphiques avec plus de trois axes. L'utilisation par des logiciels de cytométrie classique fournit une solution partielle à ce problème en tenant compte de deux dimensions à la fois par le fenêtrage sur des cellules avec des caractéristiques définies. Cependant, à mesure que le nombre de dimensions augmente, l'analyse cellulaire devient exponentielle, et il est extrêmement difficile de prendre en compte l'intégralité des cellules de l'échantillon. Par exemple, pour inspecter toutes les marqueurs deux par deux avec neuf marqueurs (Bendall S.C., et al, 2012), un scientifique a besoin de 36 graphiques, et avec 40 marqueurs, il en a besoin de 780 ! Si en plus, chaque cellule est considérée comme positive ou négative pour chaque marqueur, avec neuf paramètres on retrouve 512 combinaisons possibles, et avec quarante paramètres, ce nombre dépasse le trillion.

Ainsi, l'utilisation de la cytométrie de masse pour quantifier 30 à 40 protéines sur une seule cellule a accéléré le développement de nouvelles stratégies d'analyse pour la visualisation et la quantification de l'hétérogénéité cellulaire. Le grand nombre de paramètres fournis par la cytométrie de masse a ainsi mis en évidence l'insuffisance du fenêtrage basé sur des axes bidimensionnels, qui est une analyse supervisée par l'analyste. Des nouvelles approches peuvent être catégorisées de différentes manières, telles que l'analyse non-supervisée ou la réduction par clusters.

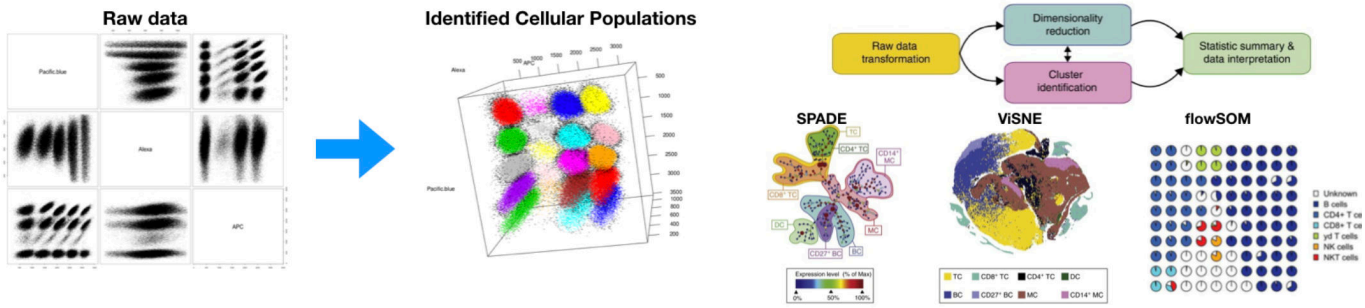


Figure 17 : Représentation schématique des principales méthodes d'analyses,

A gauche représentation en dot plot, puis au centre identification hiérarchique supervisée en dot-plot 3D, à droite représentation d'algorithmes d'analyse multiparamétrique, automatique non supervisée (SPADE, viSNE et flowSOM)

Tiré de : altrabio.com

i. Analyse par clusters

Le but des algorithmes de clustering tels que SPADE, CITRUS, FLOW-MAP ou Scaffold map, est de placer chaque cellule dans des ensembles distincts ("clusters") qui peuvent aussi être décrits dans leur ensemble, en regroupant les populations. Bien que les algorithmes de clusterisation fournissent un moyen objectif de générer des données de grande dimension, il existe également un élément de subjectivité inhérent à ces algorithmes qui provient des paramètres prédéfinis qui définissent ou influencent le nombre de clusters qui seront identifiés. Les résultats des regroupements peuvent également être problématiques car la résolution à l'échelle de la cellule unique est perdue. Autre difficulté, il n'est pas toujours possible de déterminer la raison des séparations entre les groupes. Par exemple, toutes les cellules d'un cluster sont-elles homogènes et clairement différentes de toutes les cellules des groupes voisins, ou les groupes sont-ils dans un continuum phénotypique cellulaire ?

SPADE (Spanning Tree Progression of Density Normalized Events) a été l'une des premières méthodes utilisées pour l'analyse visuelle des données de hautes dimensions. Bendall a utilisé cette approche analytique pour étudier la réponse immunitaire des cellules souches hématopoïétiques (Bendall et al., 2011). SPADE est un algorithme de regroupement cellulaire par densité normalisée qui visualise les changements d'expression de marqueur des données cellulaires (Qiu et al., 2011). Sa méthode dérivée, Citrus (Bruggner et al., 2014), a amélioré l'analyse d'échantillons multiples (> 10 échantillons). Il identifie des clusters cellulaires qui varient au niveau des marqueurs biologiques définis en fonction des conditions expérimentales (sains/malades, témoins/vaccinés…) à l'aide d'une analyse de régression. Par exemple, Citrus a identifié un groupe de LTCD8+ naïfs (CD27hiCD28hiCCR7hiCD45ROlo) inversement associé au risque de survie chez les patients infectés par le VIH (Bruggner et al., 2014). Ce phénotype de LT déjà identifié en 2010 a été réalisé en analyse traditionnelle par cytométrie de flux (Ganesan et al., 2010).

SPADE et Citrus créent donc des groupes de densité uniforme en sous-échantillonnant les données de cytométrie pour visualiser les relations cellulaires de hautes dimensions. Bien qu'elle s'avère extrêmement utile, cette analyse perd sa résolution monocellulaire et est sensible aux variations inter-machines et de protocole.

ii. Analyse par réductions de dimensions

Il existe également des méthodes de réduction de dimension qui ne créent pas de cluster et qui ont pour but de visualiser des données de grande dimension dans des graphiques en une, deux ou trois dimensions, telles que les algorithmes PCA (analyse en composantes

principales), t-SNE, ou Wanderlust (Diggins K.E., et al. 2015 ; Haghverdi L., et al. 2015 ; Maaten L. and Hinton G., 2008). Wanderlust est utile pour décrire des changements phénotypiques qui modélisent une trajectoire unique hypothétique de la progression cellulaire. PCA et t-SNE sont, quant à eux, utilisés pour faciliter la quantification et l'interprétation des données à dimension réduite. Des algorithmes de clustering peuvent également être couplés à ces méthodes de réduction de dimension. En particulier, ACCENSE permet d'appliquer un algorithme de clustering sur les données analysées par t-SNE (Diggins K.E., et al. 2015 ; Becher B., et al., 2014). Parmi ces approches, PCA a été le premier algorithme du genre (Hotelling, 1933). La PCA transforme les données cellulaires de grande dimension par des variables de substitution faciles à gérer (composantes principales) de façon linéaire, de telle sorte que le premier et deuxième composants principaux contiennent la plus grande variance possible, permettent de séparer les populations de leur parenté. Plusieurs études ont appliqué la PCA, comme par exemple l'analyse des LT CD8+ humains. Cela a permis de montrer la grande ampleur de l'hétérogénéité des LT dans un continuum de différenciation cellulaire et de polyfonctionnalité (Newell E.W., et al., 2012).

La PCA est limitée par sa nature de transformation linéaire. A l'inverse t-SNE présente une approche non linéaire de calcul (Maaten L. and Hinton G., 2008). Il s'agit d'un calcul sur la distribution des distances par paires cellulaires dans un espace de haute dimension, donnant une valeur de similarité et de dissemblance, puis intègre les cellules par rapport aux distances sur une carte bidimensionnelle. C'est une méthode particulièrement populaire pour l'analyse des données en cytométrie (Diggins K.E., et al. 2015). Cette méthode cartographie les données pour permettre de lier de façon optimale les événements présentant le plus grand degré de similarité les uns par rapport aux autres. De cette manière, il est moins restreint que les méthodes linéaires de réduction de la dimensionnalité telles que l'analyse en composante principale. De plus, les résultats de cette analyse sont souvent spectaculaires et permettent une visualisation facile et pratique des ensembles de données complexes. Cependant, l'interprétation peut être difficile : premièrement, les axes des graphiques t-SNE n'ont pas de signification, seules les positions relatives de chaque point comptent. Deuxièmement, l'utilisation d'un point de départ aléatoire pour l'algorithme aboutit à une analyse finale du même calcul qui peut donner des tracés très différents les uns des autres lorsque l'on refait plusieurs fois l'analyse des mêmes résultats. La dernière difficulté avec l'analyse de t-SNE provient de sa force à détecter des différences même subtiles dans les phénotypes globaux des cellules et le risque associé d'identifier les différences qui sont causées par des artefacts techniques. Par exemple, si des variations techniques provoquent des résultats variables

impactés par la machine, les réactifs ou le manipulateur, ceux-ci peuvent être détectés dans l'analyse finale du t-SNE. Ces effets peuvent être minimisés grâce la normalisation de l'échantillon en utilisant des billes de calibration internes (Bodenmiller B., et al., 2012 ; Diggins K.E., et al. 2015). Indépendamment de ces considérations, la capacité de ces méthodes facilite la distinction des cellules même subtilement différentes, mettant en évidence la puissance de l'analyse cellulaire multiparamétrique.

1. L'apport de la cytométrie de masse pour la caractérisation des réservoirs cellulaires

Actuellement, avec la possibilité de regarder un grand nombre de marqueurs et avec ces méthodes d'analyse permettant la prise en compte simultanée de ceux-ci, il est possible d'identifier globalement tous les sous-ensembles cellulaires significatifs dans différentes conditions. En outre, la capacité à prendre en compte les différences qualitatives dans l'expression de nombreux marqueurs, y compris ceux qui ne sont généralement pas utilisés pour la délimitation des sous-ensembles cellulaires, permet de distinguer des différences mêmes mineures dans les phénotypes cellulaires. Par exemple, dans une analyse de cellules myéloïdes de souris, l'analyse de t-SNE a permis la séparation distincte de plusieurs populations de cellules dont les différences étaient jusqu'alors peu claires. En effet, il y a peu d'accord dans la classification des cellules myéloïdes, ce qui contribue grandement aux controverses concernant la fonction des cellules myéloïdes et l'ontogenèse. Cette analyse non biaisée du compartiment myéloïde dans les tissus primaires, secondaires et non lymphoïdes manquait jusqu'à présent et fournit un paysage global de cellules myéloïdes à l'état d'équilibre. Il est montré que les mDC, les pDC, les monocytes et les granulocytes se sont regroupés en grande partie, tandis que les macrophages tissulaires présentaient des caractéristiques plus distantes et uniques en fonction des différents tissus testés. Enfin, les neutrophiles présentaient une gamme relativement large de profils phénotypiques, en particulier dans la moelle osseuse à l'inverse des pDC qui étaient conservés à travers les tissus. (Becher B., et al., 2014). Ces observations indiquent que ces méthodes, qui peuvent simultanément prendre en compte de nombreux paramètres, sont capables de définir beaucoup plus précisément les identités cellulaires. C'est cette caractéristique de l'analyse cellulaire de haute dimension qui la rend particulièrement intéressante pour les applications nécessitant une vision large de populations cellulaires mal définies, comme les conditions inflammatoires, dans lesquelles les marqueurs des sous-ensembles cellulaires couramment utilisés peuvent être considérablement affectés.

Ainsi, les progrès dans les méthodologies d'analyse cellulaire et les méthodes computationnelles utilisées pour traiter les données ont vu des progrès remarquables ces dernières années.

À l'aide d'algorithmes bio-informatiques innovants analysant des ensembles de données de grande dimension, la cytométrie de masse a été utilisée pour étudier la diversité

des cellules immunitaires (Bendall S.C., et al., 2011). L'analyse de haute dimension de l'hétérogénéité cellulaire fournit une compréhension plus large et impartiale qui libère des murs imposés par des stratégies prédéterminées (analyse supervisée). Cela oblige à prendre en compte tous les types cellulaires et met en lumière les distinctions entre les « sous-ensembles » de cellules qui sont souvent décrits comme des longs continuums de diversité phénotypique.

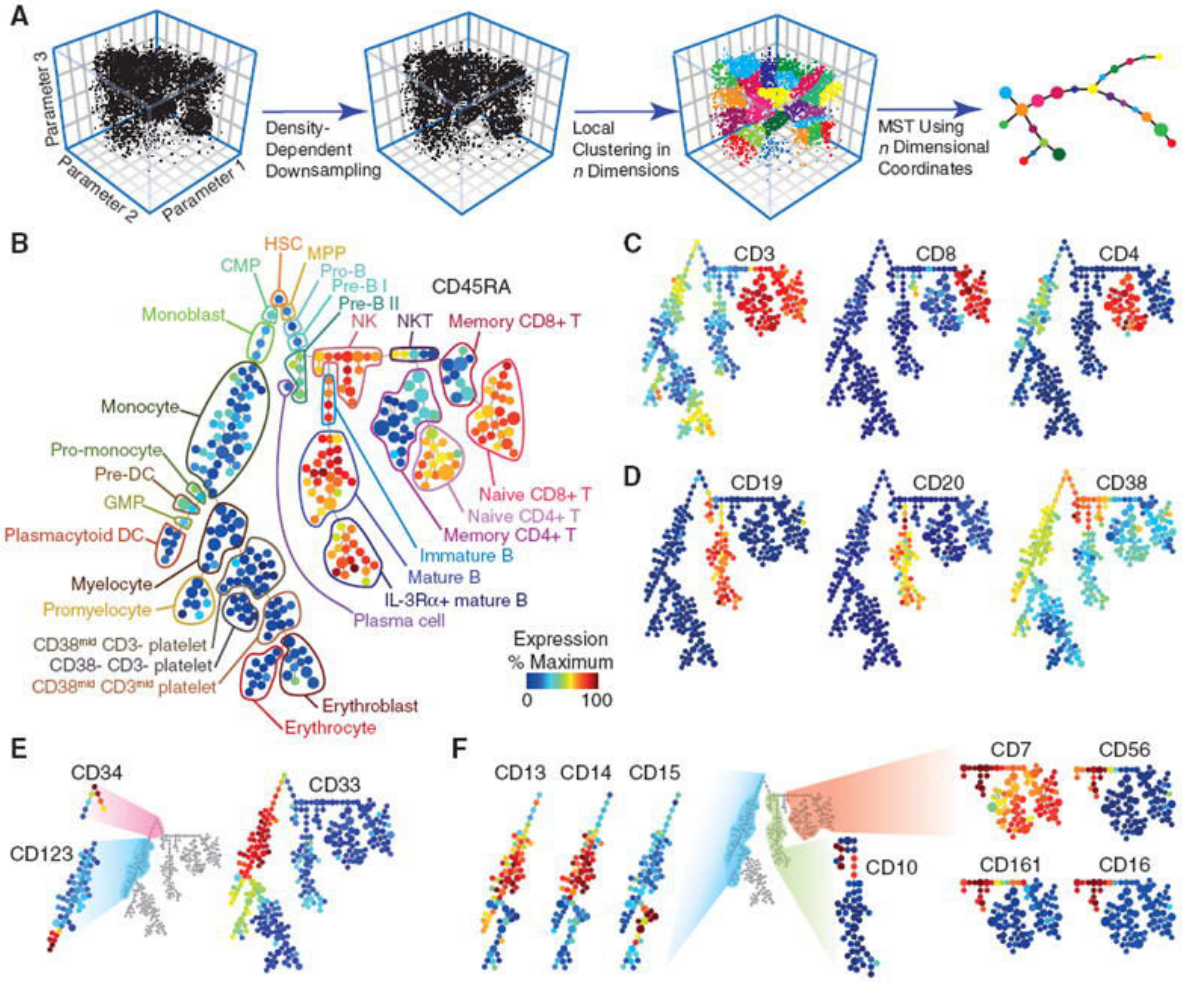


Figure 18 : Représentation SPADE montrant le programme de différenciation hématopoïétique dans la moelle osseuse humaine d'un donneur sain

Tiré de : Bendall S.C. et al., 2011

Par exemple, en s'intéressant aux LT CD8+ avec un panel composé de 25 marqueurs exprimés chez l'homme, on retrouve des relations complexes entre le phénotype cellulaire, la spécificité antigénique et la capacité à exprimer une large gamme de molécules effectrices (Newell E.W., et al., 2012). De même, l'équipe de Newell a été en mesure d'évaluer simultanément le trafic de LT dans huit tissus humains différents et de révéler des signatures immunitaires spécifiques aux tissus (Wong M.T., et al., 2016).

La cytométrie de masse occupe une place de plus en plus importante dans le paysage de l'analyse de la cellule individuelle, permettant ainsi l'étude efficace et approfondie de divers sous-ensembles de cellules immunitaires avec une possibilité de zoomer sur les compartiments myéloïdes ou lymphoïdes dans divers tissus dans des conditions physiologiques ou lors de pathologies.

Dans le contexte de l'infection VIH, l'identification de cellules réservoirs est une des clés de voute pour son éradication. Bien qu'aucun marqueur spécifique de ces cellules n'ait été identifié actuellement, un faisceau d'indices permet de s'approcher études après études de leurs caractérisations. La cytométrie de masse permet de combiner toutes ses informations afin de s'approcher au maximum de cette identification.

2. Apport de la cytométrie de masse dans la caractérisation du cycle cellulaire (Bhebehani G.K., et al., 2012)

Jusqu'à récemment, la combinaison des mesures du cycle cellulaire avec une caractérisation immuno-phénotypique n'était pas techniquement faisable en cytométrie en flux, principalement en raison des restrictions sur le nombre de paramètres qui peuvent être mesurés par cette technique, mais aussi en raison du protocole de perméabilisation (par le méthanol/éthanol) dégradant les protéines fluorescentes. Une approche innovante pour délimiter les étapes du cycle cellulaire en utilisant l'iododésoxyuridine (IdU) pour marquer les cellules en phase S, simultanément avec des anticorps contre la cycline B1, la cycline A et l'histone phosphorylée H3 (S28), nommé pH3, qui caractérisent les autres phases du cycle cellulaire (G1 à G2 pour les cyclines et les cellules en phase M avec le pH3) a été mise en place par Bhebehani G.K. et al. en 2012. Afin d'évaluer la phase G0, l'association avec l'anticorps anti-phospho-Rétinoblastome (S807 / S811), nommé pRb, a été utilisé, en se basant sur une étude montrant que la phosphorylation du pRb aux sérines 807 et 811 est Rb augmentée pendant la transition de G0 à G1 (Ren S, et al., 2004).

L'objectif de ce projet était d'évaluer le cycle cellulaire dans diverses lignées cellulaires tumorales humaines et murines, mais aussi dans des lignées de LT cultivées (dérivées de PBMC humaines et de rate de souris) et sur une moelle osseuse humaine fraîche provenant d'un donneur sain.

Dans un premier temps, l'étude en cytométrie de masse a été comparée à la cytométrie en flux et a fourni des résultats équivalents (Figure 19).

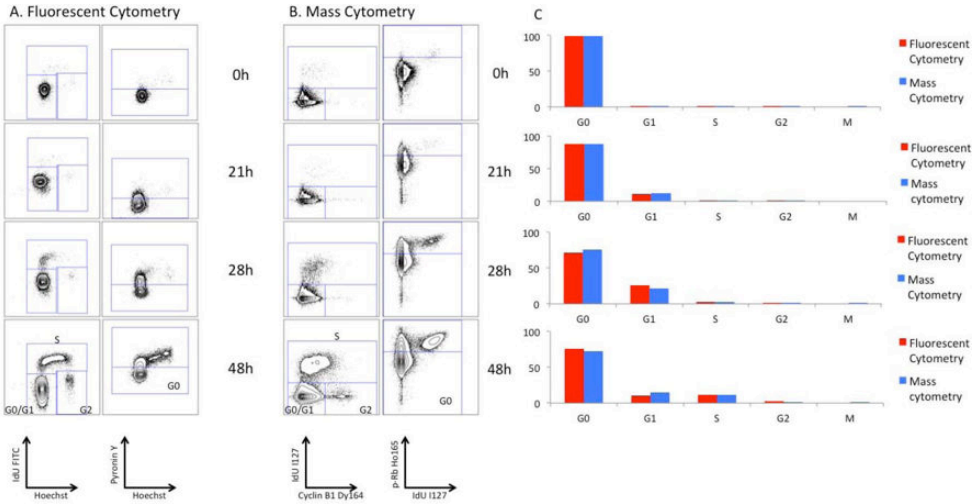


Figure 19 : Validation de la mesure du cycle cellulaire en cytométrie de masse sur des LT issus de PBMC et stimulés par PMA ionomycine, A) représentation de l'analyse en cytométrie en flux ; B) représentation de l'analyse en cytométrie de masse, ; C) comparaison des deux techniques

Afin d'évaluer la preuve de concept dans un échantillon « complexe », un panel composé de sept anticorps contre toutes les phases du cycle cellulaire combinés à 24 anticorps contre des protéines de surface délimitant des sous-populations cellulaires appropriées a été mis en place sur une moelle osseuse de donneur sain. Grâce à cette combinaison, un profilage de toutes les phases du cycle cellulaire dans une variété de types cellulaire majeurs du spectre de l'hématopoïèse humaine a pu être réalisé (Figure 20). Ces données de cytométrie de masse ont condensé les fréquences relatives des populations cellulaires immatures et différenciées au cours du programme de différenciation hématopoïétique dans la moelle osseuse humaine fraîche, comme décrit (Chao M.P., et al., 2008). Ces données préliminaires mesuraient le niveau du cycle cellulaire dans les lignées lymphocytaire, érythrocytaire et myéloïde.

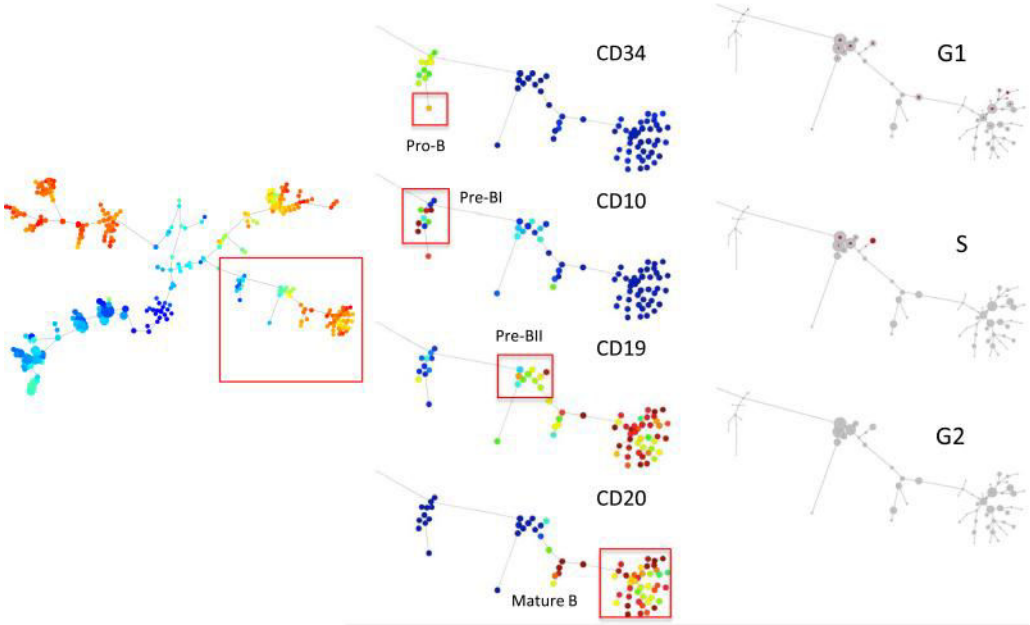


Figure 20 : Caractérisation des sous populations et analyse du cycle cellulaire dans la moelle osseuse, représentation de la lignée B

Ainsi, grâce à cette première étude, la cytométrie de masse s'est révélée suffisamment sensible pour permettre des déterminations quantitatives du cycle cellulaire à travers des sous-populations cellulaires finement caractérisées dans des échantillons simples et complexes. Compte tenu du rôle de la phase du cycle cellulaire dans l'analyse du VIH (réservoir latent et productif), ce type d'analyse peut fournir une meilleure compréhension de l'état de quiescence spécifique des cellules potentiellement infectées. Cependant cette étude montre quelques limites, principalement dans la séparation entre les phases G0 et G1 (le pRb n'est pas un marqueur sensible de séparation entre ces 2 phases), pourtant essentielle afin d'isoler les « vraies » cellules en cycle de celles qui ne le sont pas.

3. Apport de la cytométrie de masse dans la caractérisation du réservoir VIH

i. Entrée, réplication et remodelage du VIH dans les lymphocytes T CD4+ amygdaliens (Cavrois M., et al., 2017)

Une étude de 2017 a été réalisée sur le VIH, afin de caractériser la susceptibilité à l'infection par le VIH. Pour cela, des LT amygdaliens ont été infectés *in vitro* afin d'obtenir des cartes complètes d'identification des sous-ensembles de LTCD4+ par cytométrie de masse. Un panel de 38 paramètres a été conçu. Il couvre les marqueurs d'activation, de différenciation et de polarisation, et permet de créer un atlas des sous-populations de LTCD4+ issus des amygdales, et qui soutiennent l'entrée du VIH, mais aussi les cellules qui supportent l'infection productive.

La caractérisation phénotypique des cellules infectées par un virus est difficile à identifier. En effet, le virus peut entrer et se répliquer sélectivement dans des sous-groupes cellulaires tout en modifiant en même temps le phénotype de ces cellules infectées. Pour distinguer ces processus, une analyse des phases précoces et tardives de l'infection par le VIH a été réalisée et a permis de réaliser une caractérisation fine du remodelage induit par le virus. La phase précoce de l'infection par le VIH a été observée après 2h d'incubation virale. Une augmentation des toutes les populations de LT mémoires : TCM, TTM, Tfh et Treg, est observé, mais également une augmentation des sous-ensembles Th1, Th2 et Th17 (Figure 21).

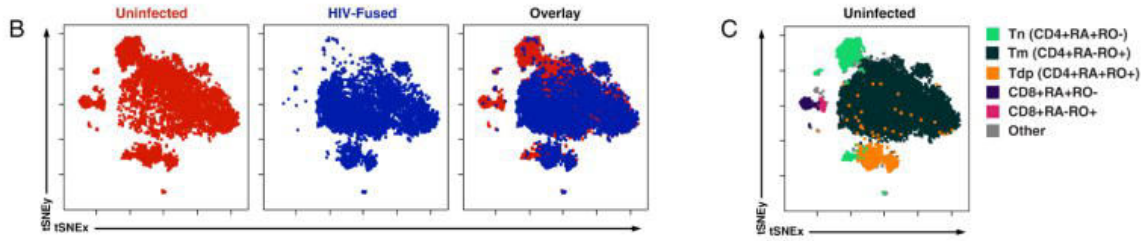


Figure 21 : (B) Représentation des cellules non-infectées et fusionnées par le VIH par t-SNE basé sur l'expression de 35 marqueurs de surface. On retrouve, en rouge, les LT amygdaliens non infectés ou, en bleu, fusionnés avec le VIH. (C) Identification des principaux sous-ensembles de LT.

L'analyse de l'infection productive (4jours de co-culture VIH + LTCD4+) nécessite des approches plus complexes afin de discerner les effets de la réplication sélective et des changements induits par le virus. Afin de limiter la contribution des changements induits par le virus dans l'analyse, les marqueurs qui sont modulés au cours de l'infection n'ont pas été pris en compte, tel que le CD4, le CCR5, le CD62L et le CD28. Cette approche a permis de montrer que les Tm productivement infectés sont hétérogènes en ce qui concerne l'état d'activation, comprenant donc des cellules permissives au VIH.

Pour identifier d'autres marqueurs modulés par le VIH, l'application d'un algorithme (SLIDE) permet de comparer directement tout marqueur donné sur une cellule infectée à son précurseur prédit. En utilisant cette méthode, il a été montré que la plupart des marqueurs exprimés à différents niveaux sur les cellules infectées par rapport aux cellules non infectées (comme le marqueur d'activation CD69) étaient exprimés à des niveaux similaires entre les cellules précurseurs infectées et prédites, indiquant une infection préférentielle de ces cellules. Par ailleurs, OX40, un membre de la famille des récepteurs du TNF, a été identifié comme un récepteur remodelé par le VIH, bien que les voies moléculaires impliquées dans ce remodelage restent inconnues.

En comparant les différents groupes de cellules (non-infectées, fusionnées, infectées productrices), un sous-ensemble de LT CD4+ a été identifié. Ce sous-ensemble semble permettre l'entrée du VIH mais pas l'expression virale. Ces LT mémoires expriment des taux élevés de CD127, le récepteur de l'IL-7. Comme cela a été indiqué plus haut, l'IL-7 est une cytokine qui stimule la prolifération homéostatique des cellules par CD127 et entraîne la persistance de cellules latentes (Chomont et al., 2009). Par ailleurs, chez les patients infectés par le VIH, les cellules exprimant le CD127 se localisent préférentiellement dans les régions lymphoïdes extra-folliculaires avec une réplication virale limitée. Ainsi, la caractérisation phénotypique basée sur le CyTOF, combinée à des approches analytiques pour distinguer l'infection sélective et la modulation du récepteur par le virus, peut être utilisée comme un outil de découverte.

ii. Lymphocytes T CD4+, CD32a et VIH

Le CD32a a été proposé comme marqueur spécifique des LTCD4+ infectés par le VIH par l'equipe de Moncef Benkirane. Cependant, CD32a s'est avéré être exprimé sur des LTCD4+ de donneurs sains, ce qui a conduit à une controverse sur la pertinence de ce marqueur dans la persistance du VIH. Dans l'étude de Coindre S. et al. publiée en 2018, la cytométrie de masse a été utilisée afin de caractériser le paysage et la variation de l'abondance des LTCD4+ CD32a+ au cours de l'infection par le VIH. Cette étude a été réalisée sur des patients infectés par le VIH avant et après ART et chez des donneurs sains. Il a été montré que les LTCD4+CD32a+ comprennent des sous-ensembles hétérogènes affectés différemment par l'infection virale. Entre autres, des groupes cellulaires de TN, TCM, TE et Tm CD32a+ co-exprimant les récepteurs activateurs LILRA2 et CD64 étaient plus abondants au cours de l'infection primaire par le VIH. Inversement, les groupes LILRA2-LTCD4+CD32a des TN, TCM et TE étaient plus abondants chez les individus sains. Enfin,

un groupe de cellules LTCD4+CD32a TE activés, co-exprimant LILRA2, CD57 et NKG2C, était plus abondant dans tous les stades du VIH, en particulier pendant l'infection primaire. Dans l'ensemble, ces données montrent que des modifications multiples de l'abondance des sous-populations de LTCD4+CD32+ surviennent dans la phase précoce de l'infection par le VIH, et que certaines d'entre elles sont conservées même après une ART efficace. D'autres études corroborent également ce papier, en effet, Abdel-Mohsen et al., ont montré que les LTCD32+CD4+ semblent exprimer plusieurs marqueurs d'activation et ne semblent pas enrichis en ADN viral (Abdel-Mohsen M, et al., 2018). Dans le même ordre d'idée, une étude réalisée là encore sur des prélèvements sanguins par Martin et al. a également échoué à montrer l'enrichissement des cellules T CD4 infectées par le VIH dans les cellules CD32+(Martin G.E. et al., 2018).

4. Rationnel de l'étude

Lors de la primo-infection par le VIH, une destruction des lymphocytes T CD4, mais aussi une activation immunitaire massive et l'établissement de réservoirs viraux productifs ou latents est observée. Bien que les traitements antirétroviraux actuels permettent de contrôler l'infection par le VIH, celle-ci n'est néanmoins pas éradiquée. Même si la réduction des taux d'ARN du VIH à moins de 20 copies mL^{-1} est fréquemment atteinte, les tests ultrasensibles détectent la persistance de la virémie chez environ 80% des patients sous ART pendant des périodes supérieures à 7 ans. Les stratégies antivirales ne suffiront jamais, à elles seules, à éliminer l'infection par le VIH.

Cette persistance vient des différents réservoirs qui s'établissent lors de la primo-infection. Ceux-ci peuvent être cellulaires et tissulaires, sont riches en cellules cibles, majoritairement quiescentes, contre lesquels le système immunitaire ne peut rien faire. Leurs longues durées de vie, leurs proliférations à bas bruit, et l'impossibilité des antirétroviraux à atteindre ces cellules infectées latentes, aboutissent à la persistance virale sur le long terme du VIH. La source et la dynamique de cette virémie persistante sont actuellement à l'étude.

Depuis l'avènement de la cytométrie multiparamétrique, à l'aide de la cytométrie de masse, la puissance d'analyse unicellulaire a explosé, passant d'une dizaine de paramètres étudiés à plus de 35. Grâce à cet outil de haute technologie, la caractérisation phénotypique précise des cellules à l'état de quiescences et des cellules infectées par le VIH est devenue possible. Depuis quelques années plusieurs études ont commencé à utiliser la CMM afin de permettre la caractérisation des cellules infectées par le VIH et/ou la réponse immunitaire associée.

L'objectif de cette étude, était de caractériser finement à l'aide de la CMM les cellules mononuclées sanguines (PBMC) d'un groupe de patients infectés par le VIH sous traitement antirétroviral, puis ayant suivi un arrêt thérapeutique de traitement, afin de déterminer des marqueurs de ces réservoirs latents et productifs du VIH. Dans une première partie de mon travail de thèse, l'analyse du cycle cellulaire a ainsi pu être corrélée aux marqueurs phénotypiques, d'activation et d'immune-checkpoints afin de mieux définir les cellules véritablement quiescentes dans lesquelles pourraient se développer le réservoir latent. Un second projet a permis de caractériser finement les LTCD4+CD32+, afin d'évaluer leur phénotype, l'état de d'activation et de cycle cellulaire de ces cellules. Enfin l'identification de cellules productrices *in vivo* de VIH à l'aide d'un anticorps spécifique de l'enveloppe : l'anti-p24 a été également réalisée.

SECONDE PARTIE : RESULTATS

Comprehensive Mass Cytometry Analysis of Cell Cycle, Activation, and Coinhibitory Receptors Expression in CD4 T Cells from Healthy and HIV-Infected Individuals.

Aurélien Corneau, Antonio Cosma, Sophie Even, Christine Katlama, Roger Le Grand, Véronique Frachet, Catherine Blanc and Brigitte Autran

Article publié dans le journal Cytometry PartB. Janvier 2017 ; 92(1) :21-32.

Poster présenté à l'ANRS, Octobre 2016, New Technologies to Advance HIV Research

Présentation orale, AFC, Février 2017, Journée thématique cytométrie de masse

1. Résumé

i. Contexte et objectif :

La définition de stratégies thérapeutiques orientées vers la guérison du VIH nécessite une définition appropriée des réservoirs du virus dans lequel celui-ci persiste indéfiniment. La latence est considérée comme résultant de la combinaison d'absence de signaux d'activation et de facteurs inhibiteurs, le tout étant fortement influencé par l'état d'activation et de différenciation des cellules hôtes ainsi que par l'expression de signaux négatifs médiés par les molécules d'épuisement. Jusqu'à présent, l'étalon-or pour étudier les réservoirs latents du VIH était fondé sur l'exclusion des cellules T activées, définies par la co-expression de HLA-DR et CD25, CD38 ou CD69.

L'objectif de cette étude, en utilisant de la cytométrie de masse, était de réaliser une grande analyse multiparamétrique des stades du cycle cellulaire avec des marqueurs de différenciation, d'activation et d'épuisement, permettant une évaluation plus poussée de l'état de quiescence des lymphocytes T CD4 au repos.

ii. Matériel et méthodes

Les lymphocytes T CD4 du sang périphérique de 8 individus, 4 donneurs sains et 4 patients infectés par le VIH sous traitement antirétroviral ont été marqués avec 26 anticorps monoclonaux ciblant les marqueurs de différenciation, d'activation, d'épuisement et de cycle cellulaire. Les échantillons ont été acquis sur un CYTOF-2 et analysés par des outils d'analyses non supervisées automatique : de clustering (SPADE) et de réduction de dimension (viSNE), ainsi que par analyse conventionnelle, hiérarchique et supervisée manuelle (sur FlowJo).

iii. Résultats :

Les profils des lymphocytes T CD4 naïfs (TN) diffèrent fortement de tous les autres sous-ensembles comprenant les LT mémoire centraux (TCM), transitionnels mémoire (TTM), effecteurs mémoire (TEM) et des sous-ensembles différenciés (TEMRA). Les cellules souches mémoires (TSCM) et les cellules folliculaires-auxiliaires (Tfh) étaient proches phénotypiquement des cellules TCM et TTM. Les TEM et TEMRA ont été les plus altérés par l'infection par le VIH, avec une fréquence accrue de cellules activées et cycliques.

L'expression de CD38 prédominait sur les cellules à différenciation précoce. En revanche HLA-DR était presque absent des cellules naïves, mais exprimé par 10% des TSCM et Tfh, avec un gradient croissant sur les LTCD4 mémoire différentiés de 5% sur les TCM à 20% sur les TEMRA. L'expression des marqueurs d'épuisement (PD-1, Tim-3, TIGIT) était préférentiellement associée à une différenciation tardive (TEM, TEMRA), en particulier dans les échantillons infectés par le VIH par rapport aux patients donneurs sains.

Dans les LT CD4+ du sang périphérique, nous avons détecté une moyenne de 2,7 ± 0,6% de cellules en phase G1 et 0,06 ± 0,02% en phase S-G2-M. Les proportions de cellules en cycle variaient selon la différenciation cellulaire avec, entre autres, la plus grande proportion de cellules en G1 dans la sous-population TSCM (11%). Dans tous les échantillons VIH+, la proportion de cellules en phase G1 a augmenté en particulier dans les TSCM.

Les marqueurs d'activation différaient parmi les stades de cycle cellulaire. HLA-DR s'exprimait plus dans les cellules en cycle que CD25 et CD38. Cependant, Les cellules T CD4+HLA-DR-CD25 "au repos" contenaient des quantités similaires de cellules en phase G1 que les cellules activées HLA-DR+CD25+, mais contenaient des quantités trois fois plus basses dans les phases S-G2-M.

Concernant les immune check-points, l'entrée en phase G1 et S-G2-M était associée à une augmentation de l'expression de PD-1. L'expression de Tim3 semblait être plus restreinte aux cellules cycliques et prédominait en phase S-G2-M dans les TSCM et Tfh, représentant jusqu'à 20-25% des cellules. En revanche, l'expression de TIGIT, semblait plus indépendante du cycle cellulaire.

Dans l'ensemble, les cellules en phase G1 présentaient une expression accrue des points de contrôle immunologiques qui co-localisaient plus avec HLA-DR, tandis que TIGIT se co-localisait également avec CD25. Dans les cellules S-G2-M, les expressions PD1, TIGIT et Tim3 co-localisaient avec HLA-DR.

Il est également observé qu'un tiers des cellules TCM CD25-HLA-DR- en phase G0 et les deux tiers des cellules TTM en phase G0 affichaient au moins un de ces points de contrôle immunitaires, tandis que 75% des TCM activés (CD25+HLA-DR+) et 90% des TTM activés affichait l'un de ces marqueurs d'épuisement.

Enfin, la caractérisation des LT CD4 + « au repos » du sang périphérique définies comme HLA-DR- CD25-, présentaient des fréquences similaires de cellules en cycle par rapport à la fraction de cellules "activée" CD25+ et/ou HLA-DR+.

iv. Conclusion :

Cette large analyse de cytométrie de masse multiplex démontre que l'absence de marqueurs d'activation CD25, HLA-DR et même CD38 couramment utilisés pour définir les cellules T CD4 au repos dans les études de réservoirs n'est pas appropriée car ces cellules contiennent des proportions significatives de LT Ki67+ ou en phase G1/S, ouvrant de nouvelles voies pour une redéfinition des cellules T CD4 du sang périphérique au repos et la caractérisation des réservoirs latents et productifs du VIH.

Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 92B:21–32 (2017)

Review Article

Comprehensive Mass Cytometry Analysis of Cell Cycle, Activation, and Coinhibitory Receptors Expression in CD4 T Cells from Healthy and HIV-Infected Individuals

Aurélien Corneau,[1,2,3] Antonio Cosma,[4] Sophie Even,[1] Christine Katlama,[5,6] Roger Le Grand,[4] Véronique Frachet,[3] Catherine Blanc,[2] and Brigitte Autran[1,2,7]*

[1]Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, U1135, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris, UMRS 1135), Paris F-75013, France

[2]UPMC Univ Paris 06, Plateforme de Cytométrie (CyPS), UMS30–LUMIC, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Site Pitié-Salpêtrière, Paris F-75013, France

[3]EPHE, PSL Research University, Institute for Advanced Biosciences, INSERM U1209, CNRS UMR5309, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France

[4]Commissariat de l'Energie Atomique (CEA) INSERM, Paris Sud University, UMR 1184, IDMIT Infrastructures, Fontenay aux Roses, F-92265, France

[5]AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Paris F-75013, France

[6]Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, U1136, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique (IPLESP UMRS 1136), Paris F-75013, France

[7]Département d'Immunologie, AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris F-75013, France

Rationale: Mass cytometry allows large multiplex analysis of cell cycle stages together with differentiation, activation, and exhaustion markers, allowing further assessment of the quiescence status of resting CD4 T cells.

Methods: Peripheral blood CD4 T lymphocytes from 8 individuals, 4 healthy donors, and 4 HIV-infected on antiretroviral treatment (T) were stained with the same 26 monoclonal antibodies and dyes targeting surface and intracellular markers of differentiation, activation, exhaustion, and cell cycle stages. Samples were run on a CYTOF-2.

Results: Patterns of naïve [TN] CD4 T cells strongly differed from all other memory subsets central-memory (CM), transitional-memory (TM), effector-memory (EM), and terminally differentiated RA-expressing (TEMRA) subsets, while stem-cell memory (SCM) and T follicular-helper cells (TfH) were close to CM and TM cells with the highest percentages in cell cycle. EM and TEMRA were the most altered by HIV infection, with an increased frequency of activated and cycling cells. Activation markers and coinhibitory receptor expression differed among cell cycle stages, with HLA-DR fitting better than CD25 or CD38 with cycle, and opposite PD-1 gradients along differentiation and cell cycle. "Resting" DR-CD25- CD4+ T cells contained similar amounts of cells in G1 than the activated DR ± CD25± ones but three fold lower cells in S-G2-M.

Conclusion: This broad multiplex mass cytometry analysis demonstrates some subsets of the so-called "resting" CD25-DR- CD4+ T cells contain noticeable amounts of cells into cycle or expressing coinhibitory receptors, opening new avenues for a redefinition of resting peripheral blood CD4 T cells harboring the HIV reservoirs. **© 2016 International Clinical Cytometry Society**

Key terms: mass cytometry; HIV; cell cycle; activation; coinhibitory receptors; CD4 T cells; resting cells

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

*Correspondence to: Pr. Brigitte Autran, Département d'Immunologie, Hôpitaux Universitaires Pitié Salpêtrière – Charles Foix, 83 Boulevard de l'Hôpital, bâtiment CERVI, 75013 Paris, France Email: brigitte.autran@aphp.fr

Grant sponsor: ANRS.
Grant sponsor: Fondation d'entreprise SCOR pour la Science, France.
Grant sponsor: Fondation pour la Recherche Médicale (FRM).
Received 23 August 2016; Revised 7 December 2016; Accepted 9 December 2016
Published online 20 December 2016 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).
DOI: 10.1002/cyto.b.21502

© 2016 International Clinical Cytometry Society

How to cite this article: Corneau A, Cosma A, Even S, Katlama C, Legrand R, Frachet V, Blanc C and Autran B. Comprehensive Mass Cytometry Analysis of Cell Cycle, Activation, and Coinhibitory Receptors Expression in CD4 T Cells from Healthy and HIV-Infected Individuals. Cytometry Part B 2017; 92B: 21–32.

Mass cytometry has opened the way for a very fine tuning of the definition of cell differentiation, activation or functions together with the cell cycle stages, the metabolic or even the genomic status by allowing large multiplex analyses, thus providing a unique opportunity to study simultaneously at the single cell level the coexpression of all these parameters (1,2). Furthermore, by getting rid of the endless problem of fluorescence compensation, mass cytometry allows a precise multiplex definition of cell cycle stages (3) in combination to any other surface or intracellular markers and therefore helps further define the question of cellular quiescence. This highly advanced broad multiplex technology has many applications in cell biology and particularly in immunology. Beyond the delineation of highly heterogeneous populations of immune cells and the discovery of so far unknown small subsets, it allows to precisely define the status of lymphocyte populations with regards to their activation and entry in cell cycle.

Indeed the heterogeneity in cell activation and turnover among the CD4 or the CD8 T cell subpopulations is tightly linked to their differentiation status and their interplay with antigen stimulation and cell homeostasis. For decades several cellular markers have been used to define activation such as the cell surface CD25 and CD122 (the alpha and beta chains of the IL-2 receptor), CD71 (the transferrin receptor), CD69 (an early T cell activation marker belonging to the calcium dependent lectin superfamily of type II transmembrane receptors which may play a role in proliferation), or CD38 (an ecto-enzyme that hydrolyzes cyclic adenosine 5′-diphosphate-ribose). These molecules induce potent intra-cellular signaling events and are involved in cell energy supplies (4,5). Another widely used activation marker is the MHC class II molecule, HLA-DR, displayed on T cell surface upon activation, which can trigger some activation signals and which in turn allows those cells to present processed antigenic peptides. The intra-cellular Ki67marker, a nuclear protein that is associated with and may be necessary for cellular proliferation, is broadly used to define cell cycle although most Ki67+ cells are in G1 and only a few in the S, G2, and M mitotic stages of the cell cycle (6). The combination of those markers is usually proposed to distinguish activated versus resting cells. Several evidences suggest however this definition is not accurate, as shown by micro-array analysis of so-called "resting" primary CD4 T cell subsets displaying typical signatures of activated TCR signaling pathways (7,8). Furthermore, the cell surface expression of co-inhibitory receptors on T cells such as PD-1 or Tim-3 or LAG-3, or TIGIT, is enriched along differentiation as a result of iterative cell activation, particularly during chronic viral infections or in tumor infiltrating cells (9–13). These molecules induce T cell exhaustion or anergy, thus interfering with the definition of cell activation and quiescence. So far, none of these definitions of cell activation or exhaustion integrated the cell cycle stages however. Indeed classical flow cytometry approaches were limited by the necessity to combine dyes detecting RNA and DNA but with extremely broad fluorescence spectrum, or to use antibodies against IdU, phosphorylated cyclins or histones in cell subsets with complex definition (14–16).

This question is particularly accurate for the characterization of the CD4 T cells harboring the reservoirs of the Human Immunodeficiency Virus (HIV). Indeed cell quiescence plays a major role in the persistence of the integrated provirus in latently infected cells, while virus replication strictly depends on key cell signaling events induced by antigen and cytokine stimuli or homeostatic proliferation, and modulated by levels of immune check points (17–20). Thus defining the quiescence and activation characteristics of primary CD4 T cells is critical for better understanding the mechanisms of life-long persistence of the HIV reservoirs. The complexity of the CD4+ cells harboring the reservoirs has been addressed so far by focusing either on total CD4 T cells subsets from treated patients (21) or on so-called "resting" CD4 T cell subsets defined by the lack of co-expression of CD25, CD69 and HLA-DR during treatment (8) or in various models of functional cure (22–24) or even in viremic individuals (25). In those studies, the HIV reservoirs were shown to predominate among two major, supposedly resting, memory CD4 T cell subsets, that is, the central-memory (CM) and transitional-memory (TM) CD4 T cells. Other small subsets are also important reservoirs, such as the stem cell memory (SCM) (26,27) and the T follicular helper T cells (TfH) (28), the characteristics of which in terms of activation and quiescence are much less defined. The activation or so-called resting status is a key factor in determining frequencies of infected cells which can be 10 fold higher among CD4 T cells classically defined as activated on the basis of the CD25 + CD69 + HLA-DR+ co-expression than in so-called "resting" CD25-CD69-HLA-DR- CD4 T cells, while most assays measure inducible proviruses in so-called "resting" T cells defined by the lack of HLA-DR expression (22).

Therefore, there is a need to unravel the definition at the single cell level of resting, quiescent, and activated CD4+ T cells and to define markers distinguishing primary T cells supposed to be in a resting quiescent state, from functional or exhausted activated CD4 T cells. Only a large multiplex analysis at the single cell level, as

allowed by mass cytometry, can provide better definitions of what is a resting or an activated CD4 T cell. To that aim we took advantage of a recently described mass cytometry analysis of cell cycle combining phospho-Rb and IdU, which separates G0- and S-phase cells, respectively, together with cyclins A and B1 to distinguish G1 from G2 cells, while the detection of phospho-Histone-3 identified cells in the M phase (3). We conducted a broad mass cytometry multiplex analysis of major and minor subsets from the peripheral blood CD4 T cell compartment, combining classical markers of cell activation, markers of cell cycle and immune check points to the differentiation analysis and focused our attention on how these various markers combine with the classical definition of HLA-DR-CD25- "resting" CD4 T cells.

MATERIALS AND METHODS

Donor Peripheral Blood Samples

Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) samples from 4 healthy blood donors and 4 HIV-infected patient samples were studied. Healthy human peripheral blood was obtained from the French Blood Agency (EFS) Pitié-Salpétrière Blood Bank according to an approved protocol. The HIV+ samples were obtained from the baseline blood sampling of the Manon-02 clinical trial, a randomized placebo controlled therapeutic vaccine trial, before any vaccine injection (29). Briefly all HIV+ patients had been treated for a median 7 years with a plasma viral load below 200 HIV RNA copies/mL and median CD4 counts of 650/mm^3, with a CD4 nadir of 220 cells/mm^3. The HIV reservoirs as assessed by quantification of total cell-associated HIV-DNA copies in PBMCs were above 2 log copies per million PBMCs in each sample. All donors and patients had given an informed signed consent. All HIV-negative and HIV-infected blood samples had been Ficoll-purified and cryopreserved in DMSO and 90% Fetal Calf Serum (FCS) within 2 h after harvest, then stored within 24 h in liquid nitrogen until use.

Antibodies

The series of 26 monoclonal antibody clones used for labeling cells is listed in Supporting Information Table 1. Primary antibody transition metal-conjugates were prepared in 200 μg lots with the MaxPAR antibody conjugation kit (Fluidigm) using the manufacturers recommended protocol. Following conjugation, antibodies were diluted to 100× working concentration in Candor PBS Antibody Stabilization solution (Candor Bioscience GmbH) and stored at 4°C.

Preparation of Cells

For each sample, 10 million PBMCs were thawed rapidly, washed with RPMI media, and then rested for 1 h at 37°C in RPMI media. All studied samples were thawed and used only when >85% viability was observed. Afterwards, cells were incubated with 50 μM (final concentration) 127-IdU Cell-ID™ (Fluidigm) for 25 min at 37°C, followed by the addition of 2.5 uM Cisplatin Cell- ID™ (Fluidigm) for 5 min at 37°C. Cells were washed once with SB. Cells were then stained with surface directed antibodies in 100 μL of Staining Buffer (SB: 1xPBS with 0.5% bovine serum albumin and 0.02% sodium azide) for 30 min at room temperature. Cells were washed once with SB. Cells were fixed for 15 min with Paraformaldehyde (PFA, Sigma Aldrich) at a final concentration of 2%, permeabilized with methanol (Sigma Aldrich) at 4°C for 10 min and processed for mass cytometry intracellular staining performed in 100 μL of SB for 60 min at room temperature. Cells were washed twice with SB and then incubated overnight in 2% PFA with 1:4000 the iridium intercalator (pentamethylcyclopentadienyl-Ir(III)-dipyridophenazine; Fluidigm) at 4°C. The next day the cells were pelleted and washed once, by resuspension, in SB and twice in distilled-deionized water. Cells were then resuspended in distilled-deionized water at ~1 million cells per mL and mixed with 4-Element EQ Beads (Fluidigm) and passed through a cell strainer cap with 35 mm pores (BD Biosciences) immediately before acquisition.

INSTRUMENT ACQUISITION DETAILS

Cell events were acquired on the CyTOF-2 mass cytometer (Fludigm) and CyTOF software version 6.0.626 (Fluidigm) at the "Plateforme de Cytométrie de la Pitié-Salpetriere (CyPS)." Dual count calibration, noise reduction, cell length threshold between 10 and 150 pushes, and a lower convolution threshold equal to 10 were applied during acquistion. Flow cytometry standard files produced by the CyTOF-2 were normalized with the MatLab Compiler software normalizer using the signal from the 4-Element EQ beads (Fluidigm) as recommended by the software developers.

Data Analysis

Conventional gating on bivariate dot plots was performed using FlowJo v10.1r5 (Tristar). At first, we gated intact cells on the basis of the DNA staining of the iridium intercalator, and then we selected singlets on a Ir191 versus cell length plot. Live cells were selected before cell subset-specific gating. For SPADE analysis (Cytobank), mass cytometry data were first singlet gated in Cytobank using a cell length by DNA (Ir intercalator) gate, and CD3 + CD4+. SPADE analysis was performed with the default configuration (10% of down-sampling and 200 target nodes; Supporting Information Figure 1A). Clustering was performed on the following markers: CD127, CD25, CD28, CD27, CD45RA, CD95, CCR7, and CXCR5. Cell immunophenotype identification was performed manually based on the median expression of all markers in the individual clusters. For analysis of the cell cycle, we used the viSNE (Cytobank) mapping integrating a total of 3,000 cells sampled and analyzed for each cycle stage and from each FCS file. Parameter viSNE maps were created for the following markers: CD122, CD127, CD25, CD27, CD28, CD38, CD45RA, CD95, CCR7, CTLA4, CXCR5, HLA-DR, LAG3, PD-1, TIGIT, and Tim-3. For the cell cycle analysis, we used the Behbehani's method (3). Briefly, to delineate

cell cycle stages utilizing iododeoxyuridine (IdU) to mark cells in S phase, simultaneously with antibodies against phosphorylated retinoblastoma protein (pRb) to separate cells in G0 and G1 phases, cyclin B1 to mark cells in G2 phase, and phosphorylated histone H3 (S28) that characterize cells in M phases. Analysis of the distinct cell cycle stages was performed using the dot plot display with FlowJo. Because of the low numbers of peripheral blood cells in S or G2 or M we regrouped together these three cycle stages and therefore distinguished the G0, the G1 and the S-G2-M stages. The viSNE map was generated on 3000 randomly extracted events per samples. Dimensionality reduction was performed on the following markers: CD122, CD127, CD25, CD27, CD28, CD38, CD45RA, CD95, CCR7, CTLA4, CXCR5, HLA-DR, LAG3, PD-1, TIGIT, and Tim-3. The results are presented as means for the 12 samples. All multiplex analysis included at least 25 events per cell fraction studied.

All data generated were then analyzed using the Tableau (Tableau desktop) and Prism (GraphPad) softwares. The Mann-Whitney *U* test was used to compare immunological parameters from HIV patients with healthy subjects. *P* values of <0.05 were considered as statistically significant.

RESULTS

Distribution of Activation Markers on Peripheral Blood CD4 T Cell Subsets

The same broad multiplex mass cytometry analysis was performed on all blood samples, whether HIV-negative or HIV-positive. Spade analysis of the CD4 T cell differentiation status shows the distribution of the major CD4 T cell subsets within the CD4 cell compartment, i.e. the naive (N: CD45RA + CCR7 + CD27+), the memory CD4 T cells including the CM (CD45RA-CCR7 + CD27+), TM (CD45RA-CCR7-CD27+) and effector-memory (EM CD45RA-CCR7-CD27-) cells, as well as the terminally-differentiated effector cells (TEMRA:CD45RA + CCR7-CD27-) close to EM cells (Fig. 1A, Supporting Information Figure 1B and 1D). It illustrates particularly well how two minor subsets relate to two major ones, that is, the SCM subset issued from TN (SCM: defined as CD45RA + CCR7 + CD27+ CD95 + CD28 + CD127+) and the TfH cells (defined by the CXCR5 + PD1+ coexpression) close to the CM subset. Proportions of those subsets are given in Supporting Information Figure 2. The SPADE analysis also shows the distinct patterns associated with the CD38, CD25, and HLA-DR activation markers among

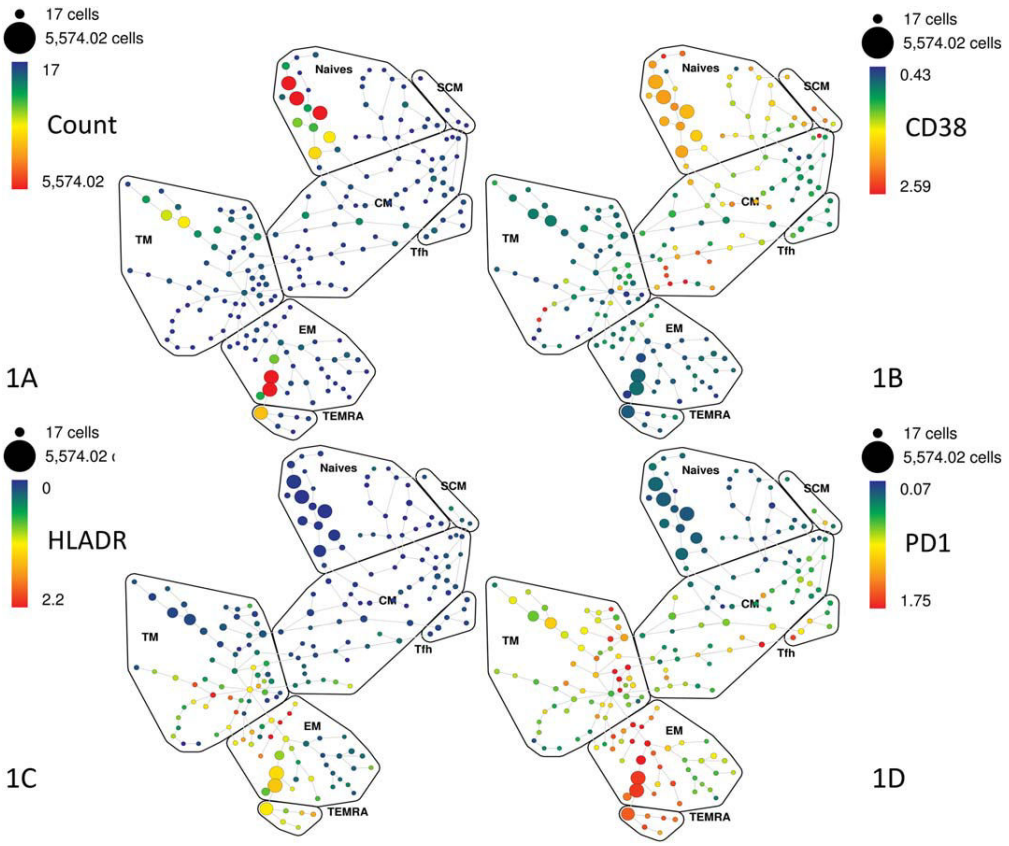


FIG. 1. Distribution of subsets and key markers in the peripheral blood CD4 compartment. SPADE from a representative HIV+ untreated donor representing: (**A**) cell counts, (**B**) CD38 cell expression, (**C**) HLA-DR cell expression, and (**D**) PD-1 cell expression.

those various subsets, with opposed expressions for CD38 and HLA-DR (Fig. 1B and 1C). The CD38 expression predominated on early differentiated cells, that is, mostly TN and SCM cells, some CM and a few TM but was almost not expressed on EM, TfH, and TEMRA cells. In contrast HLA-DR was almost absent from N, but was expressed by 10% SCM and TfH, with an increasing gradient on memory and late differentiated CD4 T cells from 5% on CM to 20% on TEMRA. The HLA-DR and CD25 displayed more overlapping expressions with two inverse gradients, that is, an increasing HLA-DR and a decreasing CD25 expression along differentiation (Supporting Information Figure 3A). The HLA-DR+ EM and TEMRA cells were predominantly CD25- while 50% to 60% of the CD25+ CM and TM, as well as SCM and TfH, were HLA-DR negative.

The consequences of the HIV infection after long-term treatment were limited in terms of subset dysbalance, and were essentially affecting the highly differentiated EM and TEMRA subsets, the results showed a significant difference between EM of HIV patients and control group healthy donors (HD; $P = 0.0286$; Supporting Information Figure 2A and 2B2). Interestingly the typical, though moderate, increase in HLA-DR expression observed in those HIV-positive samples from treated patients, did not randomly affect all CD4 T cell subsets and was not observed in N, SCM, CM or Tfh with even a decrease on SCM and TfH from both treated and untreated HIV+ patients. In contrast the HLA-DR expression massively affected the CD25− highly differentiated EM and TEMRA cells, while a milder increase was observed on both the CD25+ and CD25− expanded TM subsets from untreated patients only (Supporting Information Figure 3B).

Distribution of Cell Cycle Stages among Peripheral Blood CD4 T Cell Subsets in Relationship with Activation

To better define the activation status of the peripheral blood CD4 subsets, the mass cytometry allowed us to investigate the stages of cell cycle according to the Behbehani's method (3) in parallel to all these markers. In these peripheral blood CD4+ T lymphocytes we detected a mean of $2.7 \pm 0.6\%$ cells in G1 (Fig. 2A and Supporting Information Figure 1C). The proportions of cycling cells in G1 varied according to cell differentiation with the highest proportion of cells in G1 in the SCM subset (11%), with 5, 4, and 3% in TfH, CM and in TN, respectively, 2.4% in TEMRA and Tregs, 2.3 and 1.73% in TM and EM respectively (Fig. 2B). As very few peripheral blood cells were in more advanced stages of cell cycle we regrouped together the S, G2, and M stages and detected $0.06 \pm 0.02\%$ cells of total CD4 T cells in S-G2-M. When analyzing according to differentiation, the highest proportions of cells in S-G2-M were in TEMRA and Tregs (0.28% each) and in TfH (0.23%) followed by SCM (0.12%; Fig. 2B), while other subsets contained <0.1% cells in S-G2-M. In all HIV+ samples the proportion of cells in G1 increased in all subsets, particularly in SCM with 12% cells in G1, although nonsignificantly. In contrast the proportion of cells in S-G2-M showed a 5-fold decrease in HIV+ TfH compared with HDs with a significant difference between ($P = 0.0286$; Supporting Information Figure 3C). Unfortunately, the limitation of the subset size did not allow the combined analysis of cell cycle and activation markers in each subset for each donor and patient subgroup.

The subset distribution among these three cell cycle stages is presented in the sunburst diagrams (Fig. 2A). The TN peaked in G0 and G1, representing 46.2 and 43.5% of G0 and G1 cells and decreased to 17.8% in S-G2-M. The proportions of CM peaked in G1 and S-G2-M, with 36.3 and 30.5% of cells, respectively, but represented only a quarter of cells in G0. Noteworthy, the SCM, TfH, and TEMRA cells distributions along cell cycle stages roughly followed the CM pattern. The TM and EM cells reached their highest proportions in S-G2-M (21.7 and 19% respectively), representing two-fold more TM and 5 fold more EM than in G0 or G1.

The visNE analysis confirmed those subsets distributions along cell cycle stages considering all donors and patients cells together (Fig. 3A). Furthermore, this mass cytometry analysis allowed us to analyze in more details the coexpression of Ki67, the classical marker of cell cycle, together with the activation markers (CD25, CD122, CD38, and HLA-DR) according to the G0, G1, and S-G2-M cycle stages. First Ki67 expression was confirmed to be limited to cycling cells, mostly in the S-G2-M stages, but was not detected in G0 (Fig. 3B). The visNE analysis also illustrates the duality of the CD38 expression in relationship with cycle. Indeed CD38 colocalized with Ki67 in the S-G2-M stages mostly on Treg cells and at a lesser degree on TfH, CM, TM, and EM. In contrast, CD38 was also expressed by non cycling G0 Ki67− early differentiated cells, mostly N, but also SCM and CM. The HLA-DR expression colocalized with Ki67 in the S-G2-M stages mostly on TM and EM cells, though also displayed by rare G0, Ki67-TM, and EM cells, and thus better coincided than CD38 or even CD25 with entry in cycle of antigen-experienced subsets, (Fig. 3A and 3B). Finally, the beta chain of the IL-2 receptor (CD122) also coincided better with cell cycle than the alpha chain (CD25) the latter being expressed by G0 cells, mostly Tregs.

Finally, the coexpression of CD25, CD38, and HLA-DR as a function of cell cycle among the various subsets is summarized in Figure 4. Two distinct profiles were observed, clearly distinguishing TN from SCM and all other antigen-experienced subsets. A unique profile of four patterns of CD38 and CD25 coexpression characterized TN cells, that did not vary much with cycle: triple negative cells represented half cells in G0, but only a third in G1 or S-G2-M, followed by CD38+ single positive cells, CD25 single positive and CD25 + 38+ double positive cells in all stages. It is only in the rare G1 and S-G2-M that very few TN cells displayed HLA-DR combined to CD38. The SCM profile strongly differed from TN, by adding four supplementary patterns. Half SCM in G0 were CD25+ single positive, followed by a large proportion of CD25 + 38+ double positive and a few triple

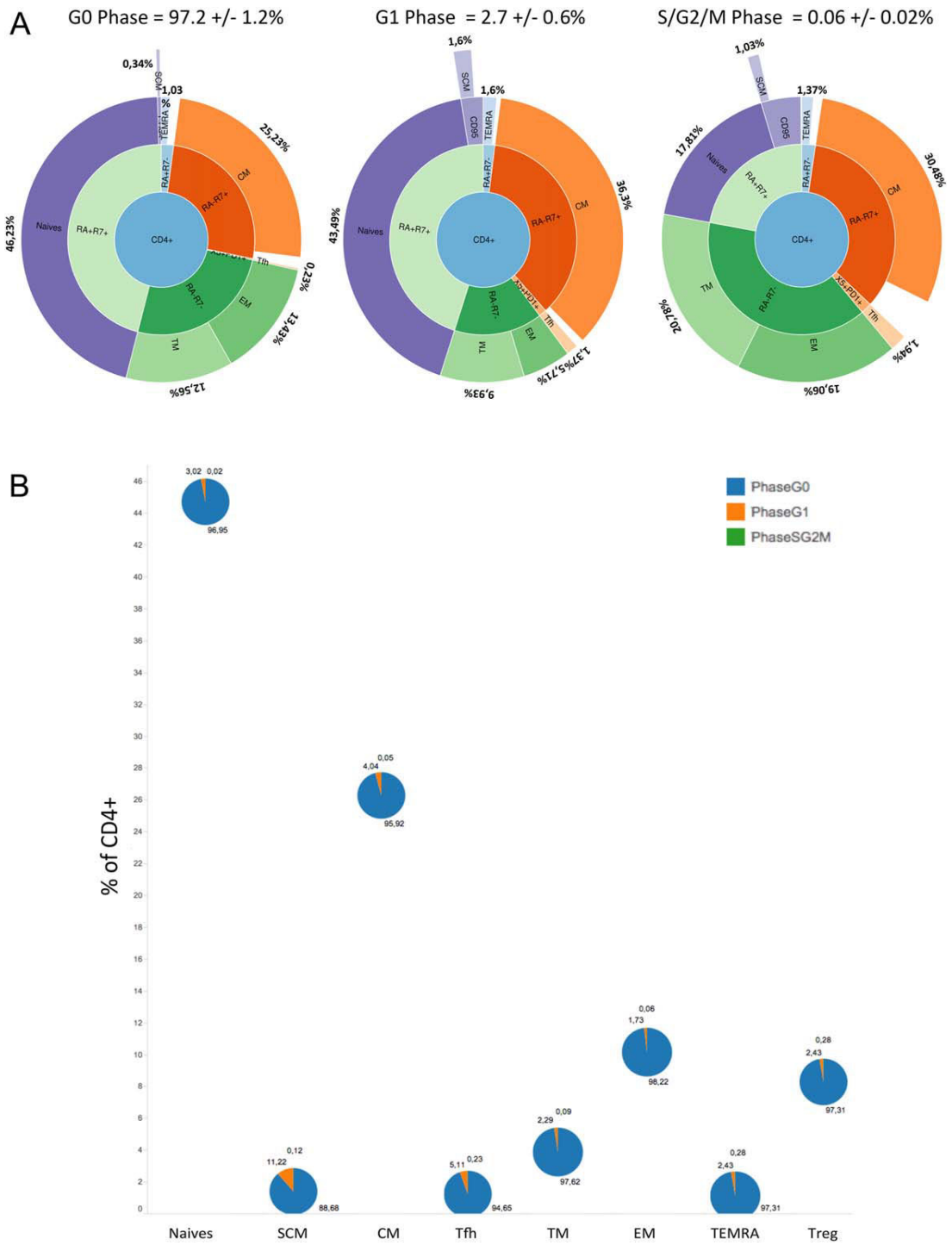


Fig. 2. Distribution of cell cycle stages in peripheral blood CD4 subsets. **A**: Sun-burst representation of the distribution and frequencies of the various CD4+ T cell subsets among the cell cycle stages. Results expressed as medians with IQR in parenthesis. **B**: Frequency of cells entered in the G1 (orange) or S - G2 - M stages (green) stages of the cell cycle.

negative or CD38 single positive cells. In addition four HLA-DR+ SCM profiles appeared with cycle, half S-G2-M SCM cells being HLA-DR+ with CD38 + DR+ double positive cells in G1 and S-G2-M DR+ single positive, CD25 + DR+ double positive and triple positive cells mostly in S-G2-M. The same eight patterns were observed all along differentiation in CM, TM, and TfH, the latter almost lacking CD25+ single expression when

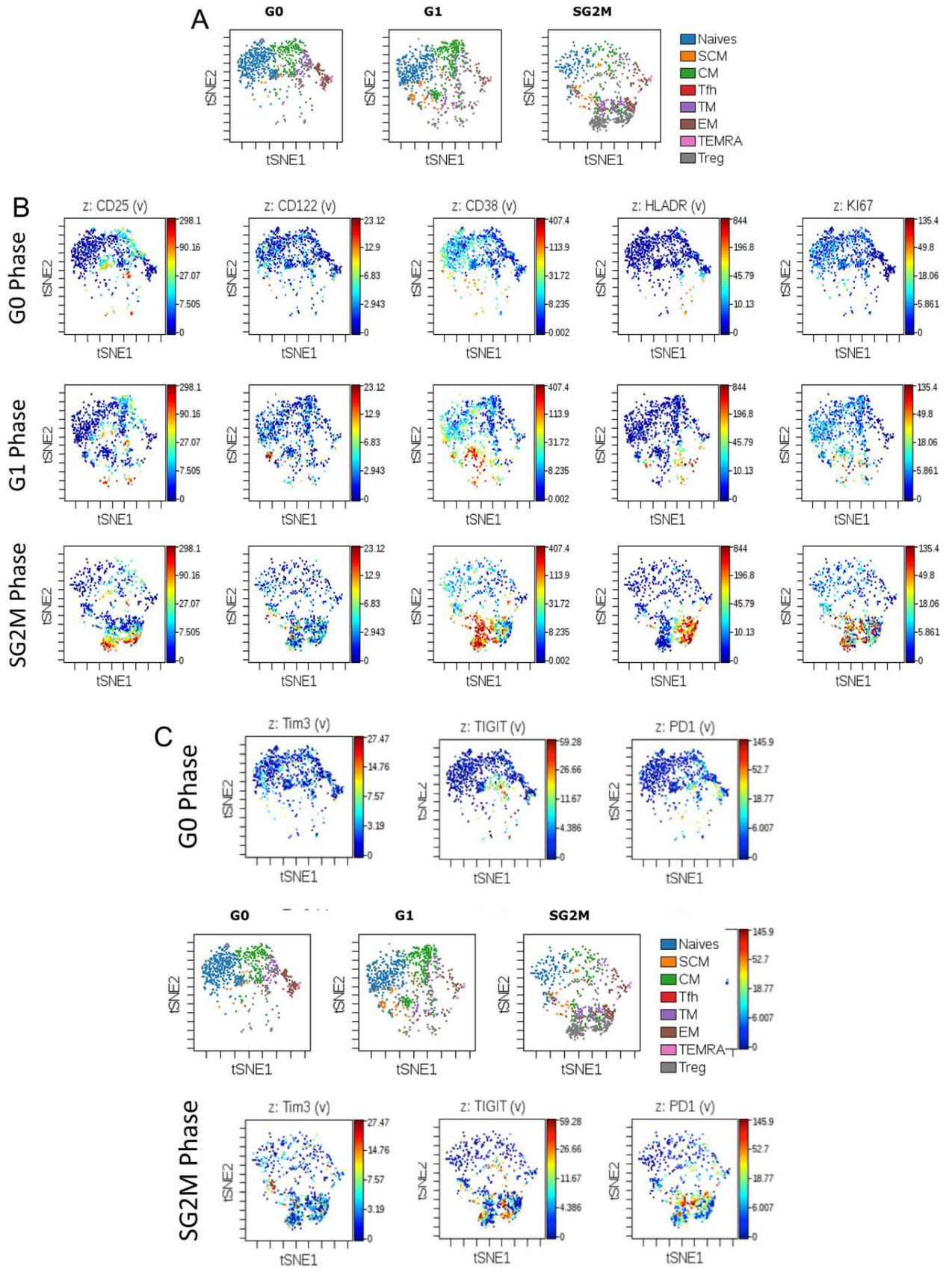


Fig. 3. Distribution of activation and exhaustion markers along cell cycle stages of peripheral blood CD4 T. visNE analysis showing: **(A)** the distribution of the various subsets among the G0, G1, and S-G2-M stages, the pattern of expression according to the G0, G1, and S-G2-M cell cycle stages of: **(B)** Activation markers and **(C)** immune check points. Each cell is represented as a point in high-dimensional space.

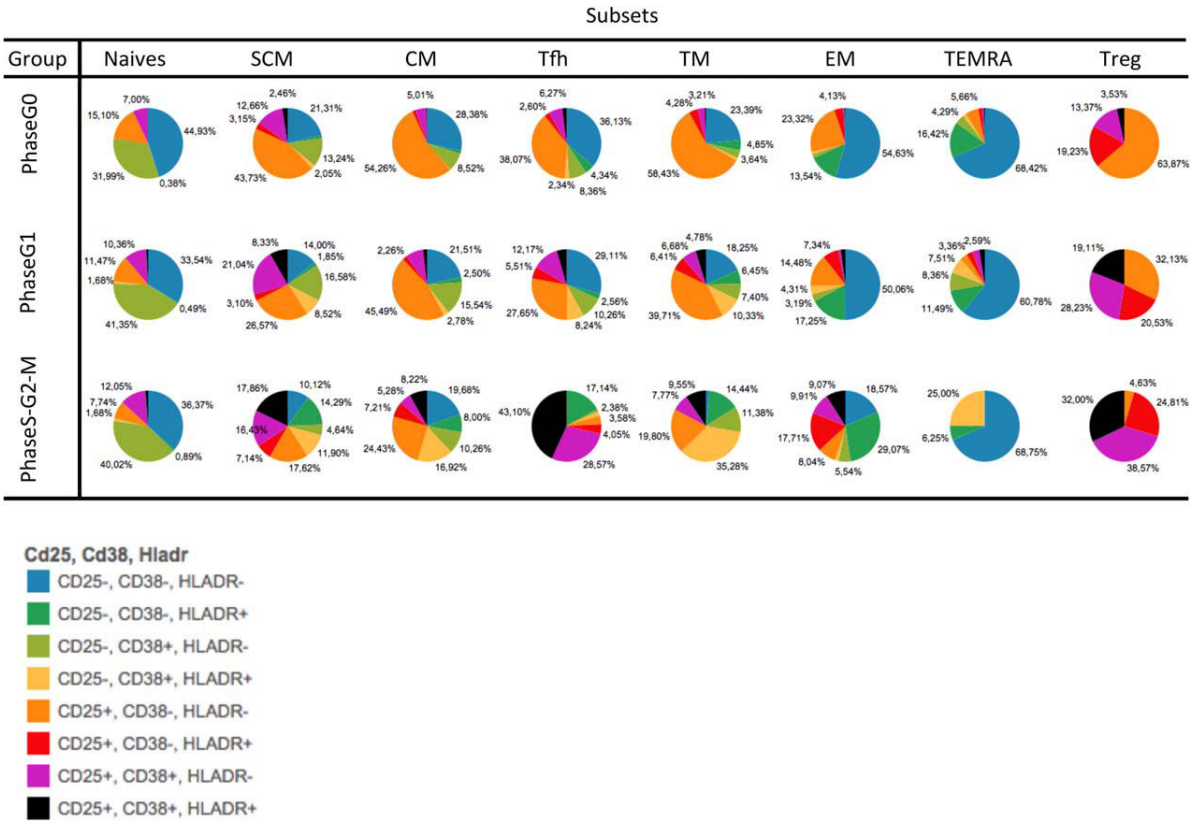


FIG. 4. Coexpression of the CD25, CD38, and HLA-DR activation markers on the various peripheral blood CD4 T cell subsets according to cell cycle stage.

in S-G2-M. The two highly differentiated EM and TEMRA subsets showed much less CD25+ cells and mainly triple negative cells in G0 and G1 while their S-G2-M profiles strongly differed from the TEMRA one containing only triple negative, CD38 + DR+ double positive and triple positive cells. Finally, the Treg cells displayed an opposite profiling with predominance of single CD25+ positive cells in G0 and G1, a progressive increase of CD25 + 38+ and CD25 + DR+ double positive with cycle and a predominance of triple positive cells in S-G2-M.

Distribution of Coinhibitory Receptors on Peripheral Blood CD4 T Cell Subsets in Relationship with Activation and Cell Cycle

We first confirmed the increasing expression of the PD1 immune check point along with CD4+ T cell differentiation and activation as shown on the SPADE analysis, with a lack of expression on TN and SCM, a limited expression on CM, TfH and TM and a predominance on EM and TEMRA cells (Fig. 1D and Supporting Information Figure 4A). In addition we report here-in the distribution according to the CD4 subsets cell cycle stages of PD1 and two other immune check points, Tim3, known to be expressed on IFN-g producing Th1 cells and Tregs, and LAG3 known to be expressed on activated CD4 effectors and Tregs (12), as well as of TIGIT, known to be expressed on activated T cells, memory T cells, Tregs and TfH. The rare G0 cells expressing PD1 in the viSNE diagram (Fig. 3C), are shown in Supporting Information Figure 4A to include mostly TfH, TM, EM and a few SCM, CM, TEMRA or Tregs. Entry into G1 and S-G2-M was associated with increasing PD1 expression along the same gradient, culminating on TM, followed by EM and CM with a lower expression on SCM cells. The Tim3 expression appeared to be more restricted to cycling cells and predominated in S-G2-M in SCM and TfH, representing up to 20–25%, and in CM cells (10%). All other subsets displayed lower levels of Tim3 either in G1 such as TEMRA or in S-G2-M such as N, CM, EM cells (Supporting Information Figure 4B). A similar trend was observed for LAG3, at a lower level, with a predominant expression on TfH cells in S-G2-M (Supporting Information Figure 4C).

In contrast, the TIGIT, as the PD1, expression was more independent of the cell cycle except on naïve T cells, though following an inverse polarization compared to PD1. The TIGIT+ cells represented about 70% TfH and Treg cells whatever the cell cycle stage (Supporting Information Figure 4D). TIGIT expression predominated

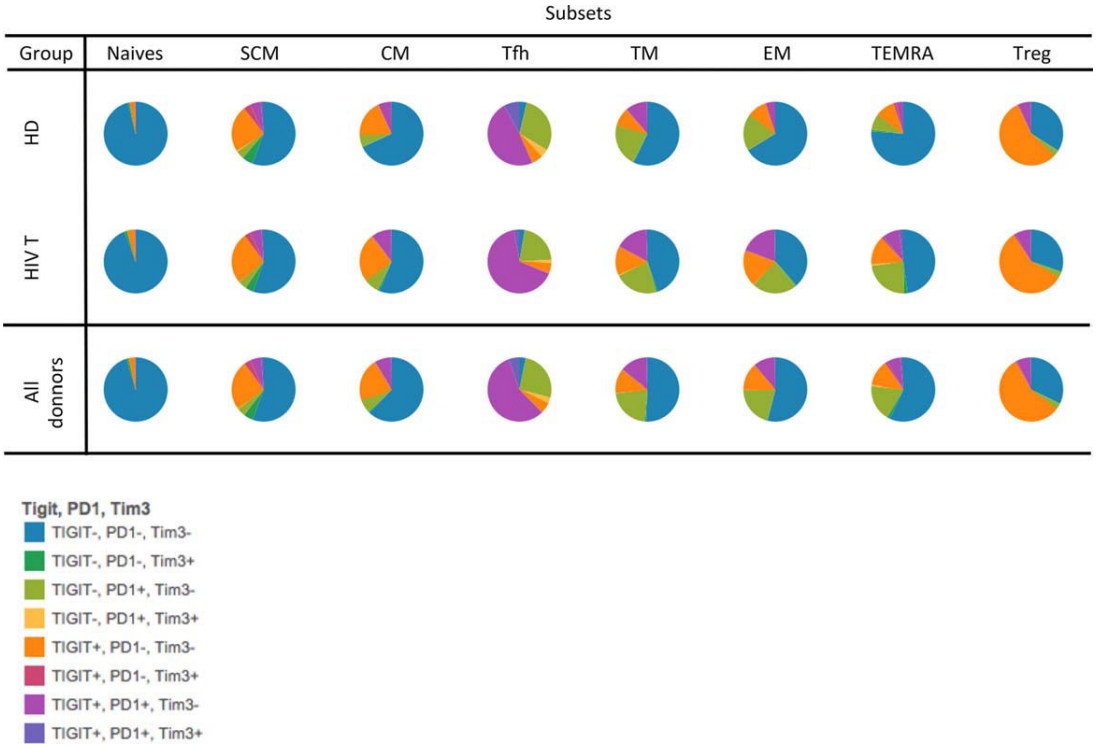


FIG. 5. Coexpression of the coinhibitory receptors on the various peripheral blood CD4 T cell subsets, on the whole study group and in each study group.

on SCM, CM, and TM cells and to a lesser degree on EM and TEMRA, in which it slightly increased with cell cycle. Overall cells in G1 displayed increased expression of all immune check points that colocalized more with HLA-DR than with CD38, while TIGIT also colocalized with CD25. In S-G2-M cells the PD1, TIGIT and Tim3 expression colocalized with Ki67 and HLA-DR, with up to 40 and 70% PD1+ and TIGIT+ cells in Ki67+ CM and TM respectively, almost two-fold higher than in their Ki67- counterparts. The PD1+ and TIGIT+ cells decreased among EM and TEMRA cells to levels below the CM ones in HDs while remaining high in HIV-positive individuals, treated or not (data not shown).

Analyzing coexpression of all coinhibitory receptors together among those subsets, Figure 5A shows that almost all TN but only half the other subsets, except TfH, were triple negative PD1-Tim3-LAG3-. The PD1 and TIGIT coexpression was the most frequent one, with an increasing gradient from SCM to EM, despite their inverse polarization. These patterns were roughly conserved when delineating per sub-group of HDs and HIV+ individuals, with however increasing PD-1 + TIGIT+ double positivity in TM and EM and increased PD1 expression on late differentiated cells, independently of treatment, illustrating again that HIV effects predominate on the late CD4 T cell differentiation stages (Fig. 5A and 5B).

The « Resting » HLA-DR and CD25 Double Negative CD4+ T Cells Contain Cells in Cycle or Displaying Coinhibitory Receptors

Finally, the mass cytometry analysis allowed us to better characterize the so-called "resting" peripheral blood CD4+ T cells defined as double negative for HLA-DR and CD25, by analyzing together the cell cycle stages and immune check points expression. Unexpectedly this DR-CD25- fraction contained similar frequencies of cycling cells than the "activated" CD25+ or HLA-DR+ cell fraction. "Resting" cells differed from the activated ones by 3–4 fold lower proportions of S-G2-M cells, representing 0.03% in "resting" and 0.11% in "activated" cells, while proportions of G1 cells were similar in both fractions (2.3% in "resting" and 2.6% in "activated") (Fig. 6A). In all cases the "resting" cells were composed by a vast majority of naïve T cells while the cycling "resting" or activated cells shared two common patterns of memory cells enrichment, with the early differentiated SCM and CM cells increasing in G1, and the more differentiated TM and EM cells increasing in S-G2-M. Interestingly the "resting" TfH followed the latter pattern with a predominance in S-G2-M stages. A distinct distribution was observed in the activated cells, as expected, with the predominance of highly differentiated antigen-experienced cells and Treg cells, the latter representing half the activated cells in S-G2-M. In addition the

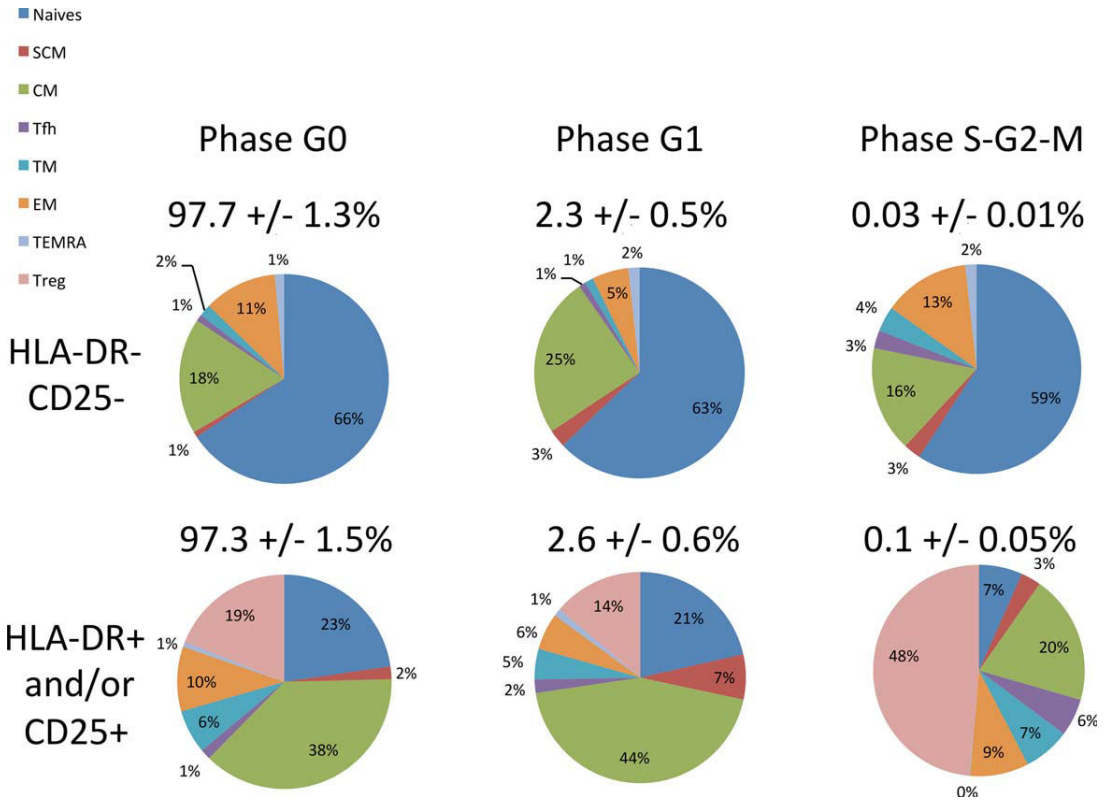


Fig. 6. Characterization of "resting" and "activated" CD4 T cells: Distribution of CD4 subsets among cell cycle stages in "resting" (CD25-HLA-DR-) and "activated" (CD25+ or− and HLA-DR+ or −) CD4 T cells.

proportions of SCM were the highest (7%) in the activated cells in G1 while proportions of TfH, though low, predominated in the activated cells in S-G2-M (6%), as in the "resting" fractions.

A pattern of coinhibitory receptors coexpression was also similar among "resting" and "activated" cells (not shown) while a strongly differentiating PD1 effect was observed in both fractions. A decreased CD38 and an increased TIGIT expression characterized the PD1+ «resting» memory cells compared to the PD1- fraction. The few "resting" and "activated" highly differentiated TEMRA cells displayed similar profiles.

DISCUSSION

The key advantage of mass cytometry was to allow an extremely large multiplex analysis in order to provide an accurate definition at the single cell level of "resting" peripheral blood CD4 T cells related to their cell cycle status combined with markers of differentiation, activation and cell exhaustion, an advantage not accessible in a single tube with conventional flow cytometry. This opportunity allowed us to provide new insights into the definition of "activated" and "resting" peripheral blood CD4 T cells from healthy and HIV-infected individuals. The big picture of this complex broad multiplex analysis is that the so-called "resting" CD25-DR- double negative CD4+ T cells are not truly resting and contain noticeable amounts of cycling cells. In addition, their immune profiling in terms of co-inhibitory receptors expression does not differ from the "activated" one.

This large multiplex mass cytometry analysis also allowed to better characterize some recently discovered subsets such as SCM and circulating TfH. Our study was limited however by the low performances of some antibodies that did not provide appropriate staining, such as FoxP3 or anti-CTLA4. Thus, our Treg cells definition could only the combination of CD25 positivity and CD127 negativity providing nevertheless a reasonable definition of those cells. For that reason, we decided to focus mainly our analysis on the other subsets of N, SCM, TfH, all memory CM, TM, EM subsets, and of terminally differentiated TEMRA cells. The SCM cells which had been initially described as part of the TN subset (26), is the most entered in cell cycle of all subsets and display a combined profile of cell cycle and activation markers that followed more the CM pattern than the TN one. Our study also showed the proximity of the Tfh and CM cells is true for cells in G0 and G1 but not for cells in S-G2-M where TfH are closer to EM cells. Altogether, the multiplex TfH profiling followed more the TM or the EM than the CM one, thus illustrating the peculiarities of these small intermediate subsets. In addition, the very distinct cycle and activation profile of the antigen-experienced CD4 T cells suggest the

intermediate TM subset, which shares the lack of CCR7 expression with EM, is closer to the CM subset than to the EM one.

The unique opportunity of mass cytometry to combine cell cycle and activation markers together with subsets definition allowed us to define opposite patterns for the three classical markers of activation, that is, CD25, HLA-DR, and CD38. Both CD25 and CD38 are strongly expressed in G0 by HLA-DR- cells from early differentiated subsets. In contrast, both appear on Ki67+ activated cells in G1 or S-G2-M from antigen-experienced subsets, that is, TfH, CM, and TM and at a lesser degree on EM cells. This dichotomy is particularly true for CD38, an ecto-enzyme involved in the ATP metabolism and energetic production, suggesting CD38 + DR- TN cells, though in G0 and deprived of specific defense activities, have an active metabolism similar to the one requested in memory or effector cells entered in cell cycle. Our mass cytometry analysis also reveals that SCM have the highest cycling activity, even when CD25- and HLA-DR- and apparently "resting," and share with antigen-experienced T cells CM, TfH and TM, but not with TN, four patterns of HLA-DR expression among many other characteristics. As the HLA-DR expression on T cells is more characteristic of antigen-driven activation these data suggest SCM cells might not only respond to homeostatic signals as initially proposed but also to antigenic stimuli.

The mass cytometry analysis also illustrates very well the gradient of expression and of coexpression, along differentiation, but it also reveals distinct profiles of those immune check points. We had to focus on the PD-1, Tim-3, LAG-3, and TIGIT analysis as the CTLA-4 staining did not perform well enough in our study, thus limiting the analysis. Nevertheless, distinct gradients of expression were shown with cycle. The most striking information is that Tim3 appears to be strongly linked to cell cycle both in "resting" and "activated" CD4 T cells subsets, particularly in SCM and TfH. In contrast, entry in cycle does not affect the PD-1 expression in highly differentiated EM and RA cells but only in early differentiated cells, SCM, CM, and TM. Similarly, entry in cycle does not affect TIGIT expression on early differentiated cells but is the driving force leading to Tim-3 and LAG-3 expression on SCM, CM and TfH cells. Therefore, the coinhibitory receptors and immune check points profiling associated with differentiation and cell cycle analysis also revealed novel insights in the definition of the small SCM and TfH subsets. Of note, the good status of the long term treated HIV+ patients included did not allow us to detect substantial increases in coinhibitory receptors expression when compared to healthy individuals, but is relevant for reservoir studies (12). Our study shows Tim-3 is upregulated in cycling cells, particularly SCM and TfH, both in healthy and HIV+ donors. This novel result extends to healthy HIV-negative donors and to HIV infected patients the previous observation that Tim-3 expression on Tregs is positively correlated with their Ki67 expression in chronic HIV infection (11,13). In addition, the pattern of PD-1, Tim-3, and TIGIT coexpression illustrates again the proximity of the SCM and CM subsets while very distinct patterns characterize the TN, TfH, and Tregs subsets. In contrast to what observed for the activation markers this immune check-points profiling underlines the proximity of the peculiar TM subset with the highly differentiated EM and TEMRA subsets.

Finally, thanks to the Behbehani's method to analyze the cell cycle (3), our detailed mass cytometry analysis revealed that about 2.5% of the so-called "resting" CD25- and HLA-DR double negative total peripheral blood CD4+ T cells were entered in cell cycle, mostly in G1, and therefore are not fully quiescent. Our study might have underestimated the proportion of cycling cells since performed on cryopreserved cells. Even if this proportion of cycling cells, is somewhat limited it is coherent with Ki67 expression and confirms that this fraction cannot be considered as fully quiescent. This information is of importance for studies of the latent HIV reservoirs considering that the majority of studies investigate the so-called latently infected cells in the HLA-DR single negative or in the CD25-DR- double negative cells, as this small proportion of G1 or S-G2-M "resting" cells might be sufficient to carry substantial numbers of HIV provirus copies that might not be truly latent in these infected cells (21–25). Therefore a correct analysis of the latently infected cells requires a redefinition of appropriate cell surface markers allowing sorting of truly "resting" cells if one wants to analyze further the molecular mechanisms at play in those cells to maintain virus latency and the future tools requested to disrupt such a viral latency.

Another key information is that the "resting" and activated" subsets profiling does not differ much in terms of immune check points expression. As expression of co-inhibitory molecules is considered to be induced by activation signals it is of interest to show those molecules can persist on cell surfaces when lymphocytes are back to "true" quiescence in G0. The small size of cell samples and study patients numbers, did not allow us analyzing in depth the effects of HIV on cell cycle and activation or immune check-point expression. The characteristics of our long term treated HIV+ study sample was that HIV effects in terms of increased activation or expression of immune check points, predominate on the late CD4 T cell differentiation stages in these patients.

Altogether this large multiplex analysis of the activation and cell cycle status of peripheral blood CD4 T cells from HDs and HIV infected patients underlines the interest of mass cytometry to delineate the multiparameter characteristics of lymphocyte subsets and their positioning along cell differentiation. Moreover it provides new evidences demonstrating the current definition of so-called "resting" and "activated" T cells based on usage of some activation markers such as HLA-DR or CD25 is not accurate since not correctly overlapping the cell cycle status. This point is particularly interesting in the context of HIV Cure research since it should help at better distinguishing the truly quiescent cells that might act as a reservoir of latent provirus, from activated ones that, when infected,

should allow virus production and therefore should not be considered as "latently"-infected cells. As demonstrated in other applications (30–34), only mass cytometry can provide large enough multiplex analysis allowing an appropriate definition or redefinition of resting and activated of cellular compartments.

LITERATURE CITED

1. Bendall SC, Simonds EF, Qiu P, Amir el AD, Krutzik PO, Finck R, Bruggner RV, Melamed R, Trejo A, Ornatsky OI, et al. Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. Science 2011;332:687–696.
2. Bendall SC, Nolan GP. From single cells to deep phenotypes in cancer. Nat Biotechnol 2012;30:639–647.
3. Behbehani GK, Bendall SC, Clutter MR, Fantl WJ, Nolan GP. Single-cell mass cytometry adapted to measurements of the cell cycle. Cytometry Part A 2012;81A:552–566.
4. Ben-Sasson SZ, Gerstel R, Hu-Li J, Paul WE. Cell division is not a "clock" measuring acquisition of competence to produce IFN- or IL-4. J Immunol 2001;166:112–120.
5. Bird JJ, Brown DR, Mullen AC, Moskowitz NH, Mahowald MA, Sider JR, Gajewski TF, Wang CR, Reiner SL. Helper T-cell differentiation is controlled by the cell cycle. Immunity 1998;9:229–237.
6. Combadière B, Combadiere B, Blanc C, Li T, Carcelain G, Delaugerre C, Calvez V, Tubiana R, Debré P, Katlama C, et al. CD4+Ki67+ lymphocytes in HIV-infected patients are effector T cells accumulated in the G1 phase of the cell cycle. Eur J Immunol 2000;30:3598–3603.
7. de Masson A, Kirilovsky A, Zoorob R, Avettand-Fenoel V, Morin V, Oudin A, Descours B, Rouzioux C, Autran B. Blimp-1 overexpression is associated with low HIV-1 reservoir and transcription levels in central memory CD4+ T cells from elite controllers. **AIDS** 2014 Jul 17;28(11):1567–77. doi: 10.1097/QAD.0000000000000295.
8. Pogliaghi M, Lambert S, Assoumou L, Zoorob R, Papagno L, Lecardonnel F, Calvez V, Katlama C, Autran B, and the Eramune-01 study group. HIV reservoir changes in resting CD4 subsets in the IL7 plus ART intensification Eramune 01 study. Conference on Retroviruses and Opportunistic infections, 2014, Seattle USA. Abstract: # 977.
9. Pauken KE, Wherry EJ. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. Trends Immunol 2015;36:265–276.
10. Attanasio J, Wherry EJ. Costimulatory and Coinhibitory Receptor Pathways in Infectious Disease. Immunity 2016;44:1052–1068.
11. Chew GM, Fujita T, Webb GM, Burwitz BJ, Wu HL, Reed JS, Hammond KB, Clayton KL, Ishii N, Abdel-Mohsen M, 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:e1005349.
12. Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. Immunity 2016;44:989–1004.
13. Moorman JP, Wang JM, Zhang Y, Ji XJ, Ma CJ, Wu XY, Jia ZS, Wang KS, Yao ZQ. Tim-3 Pathway Controls Regulatory and Effector T Cell Balance during Hepatitis C Virus Infection. J Immunol 2012;189: 755–766.
14. Darzynkiewicz Z, Gong J, Juan G, Ardelt B, Traganos F. Cytometry of cyclin proteins. Cytometry 1996;25:1–13.
15. Jacobberger JW, Sramkoski RM, Stefan T. Multiparameter cell cycle analysis. Methods Mol Biol 2011;699:229–249.
16. Darzynkiewicz Z, Crissman H, Jacobberger JW. Cytometry of the cell cycle: Cycling through history. Cytometry Part A 2004;58A: 21–32.
17. Richman DD, Margolis DM, Delaney M, Greene WC, Hazuda D, Pomerantz RJ. The challenge of finding a cure for HIV infection. Science 2009;323:1304–1307.
18. Towards an HIV cure: a global scientific strategy. International AIDS Society Scientific Working Group on HIV Cure, Deeks SG, Autran B, Berkhout B, Benkirane M, Cairns S, Chomont N, Chun TW, Churchill M, Di Mascio M, et al. Nat Rev Immunol 2012;12:607–614.
19. Katlama C, Deeks SG, Autran B, Martinez-Picado J, van Lunzen J, Rouzioux C, Miller M, Vella S, Schmitz JE, Ahlers J, et al. Barriers to a cure for HIV: New ways to target and eradicate HIV-1 reservoirs. Lancet 2013;381:2109–2117.
20. Maldarelli F, Wu X, Su L, Simonetti FR, Shao W, Hill S, Spindler J, Ferris AL, Mellors JW, Kearney MF, et al. HIV latency Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells. Science 2014;345:179–183.
21. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, Boucher G, Boulassel MR, Ghattas G, Brenchley JM, et al. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. Nat Med 2009;15:893–900.
22. Siliciano RF, Greene WC. HIV latency. Cold Spring Harb Perspect Med 2011;1:a007096.
23. Descours B, Avettand-Fenoel V, Blanc C, Samri A, Mélard A, Supervie V, Theodorou I, Carcelain G, Rouzioux C, Autran B, et al. Immune responses driven by protective human leukocyte antigen alleles from long-term nonprogressors are associated with low HIV reservoir in central memory CD4 T cells. Clin Infect Dis 2012;54: 1495–1503.
24. Sáez-Cirión A, Bacchus C, Hocqueloux L, Avettand-Fenoel V, Girault I, Lecuroux C, Potard V, Versmisse P, Melard A, Prazuck T, et al. Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study. PLoS Pathog 2013;9:e1003211.
25. Bacchus C, Cheret A, Avettand-Fenoël V, Nembot G, Mélard A, Blanc C, Lascoux-Combe C, Slama L, Allegre T, Allavena C, et al. A single HIV-1 cluster and a skewed immune homeostasis drive the early spread of HIV among resting CD4+ cell subsets within one month post-infection. PLoS One 2013;8:e64219.
26. Lugli E, Gattinoni L, Roberto A, Mavilio D, Price DA, Restifo NP, Roederer M. Identification, isolation and in vitro expansion of human and nonhuman primate T stem cell memory cells. Nat Protoc 2013;8:33–42. doi: 10.1038/nprot.2012.143. Epub 2012 Dec 6.
27. Buzon MJ, Sun H, Li C, Shaw A, Seiss K, Ouyang Z, Martin-Gayo E, Leng J, Henrich TJ, Li JZ, Pereyra F, Zurakowski R, Walker BD, Rosenberg ES, Yu XG, Lichterfeld M, HIV-1 persistence in CD4+ T cells with stem cell-like properties. Nat Med 2014;20:139–142.
28. Perreau M, Savoye AL, De Crignis E, Corpataux JM, Cubas R, Haddad EK, De Leval L, Graziosi C, Pantaleo G. Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. J Exp Med 2013;210:143–156.
29. Autran B, Murphy R, Costagliola D, Tubiana R, Clotet B, Gatell J, Staszewski S, Assoumou L, El-Habib R, Calvez V, et al. Greater viral rebound & reduced time to resume antretroviral therapy after therapeutic immunization with the ALVAC-HIV vaccine (vCP1452). AIDS 2008;22:1313–1322.
30. Cosma A, Nolan G, Gaudilliere B. Mass Cytometry: the time to settle down. Cytometry A 2017;91A:12–13.
31. Strauss-Albee D, Liang E, Ranganath T, Aziz N, Blish C. The newborn human NK cell repertoire is phenotypically formed but functionally reduced. Cytometry B Clin Cytom 2017;92B:33–41.
32. Abraham Y, Gerrits B, Rebhan M, Ludwig M-G, Gubser Keller C. Exploring glucocorticoid receptor agonists mechanism of action through mass cytometry and radial visualizations. Cytometry B Clin Cytom 2017;92B:42–56.
33. Vendrame E, Fukuyama J, Strauss-Albee D, Holmes S, Blish C. Mass cytometry analytical approaches reveal cytokine-induced changes in natural killer cells. Cytometry B Clin Cytom 2017;92B:57–67.
34. Leelatian N, Doxie DB, Greenplate AR, Mobley BC, Lehman JM, Sinnaeve J, Kauffmann RM, Werkhaven JA, Mistry AM, Weaver KD, et al. Single cell analysis of human tissues and solid tumors with mass cytometry. Cytometry B Clin Cytom 2017;92B:68–78.

Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 92B:236–237 (2017)

Erratum

Comprehensive Mass Cytometry Analysis of Cell Cycle, Activation and Co-Inhibitory Receptors Expression in CD4 T Cells from Healthy and HIV-Infected Individuals

Aurélien Corneau[1,2,3], Antonio Cosma[4], Sophie Even[1], Christine Katlama[5,6], Roger Le Grand[4], Véronique Frachet[3], Catherine Blanc[2], and Brigitte Autran[1,2,7]*

In the article published in Volume 92, Issue 1

January 2017, pages 21–32

[DOI:10.1002/cyto.b.21502], the incorrect version of Figure 3 was inadvertently used.

The correct version of Figure 3 is herein displayed with its original legend.

Published online 20 December 2016 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).
DOI: 10.1002/cyto.b.21502

*Correspondence to: Pr. Brigitte Autran, Departement d'Immunologie, Hôpitaux Universitaires Pitie Salpetriere – Charles Foix, 83, Boulevard de l'Hopital, batiment CERVI, 75013 Paris, France, Email: brigitte.autran@aphp.fr

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).
DOI: 10.1002/cyto.b.21525

© 2017 International Clinical Cytometry Society

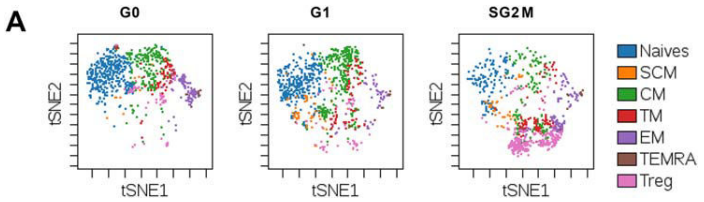
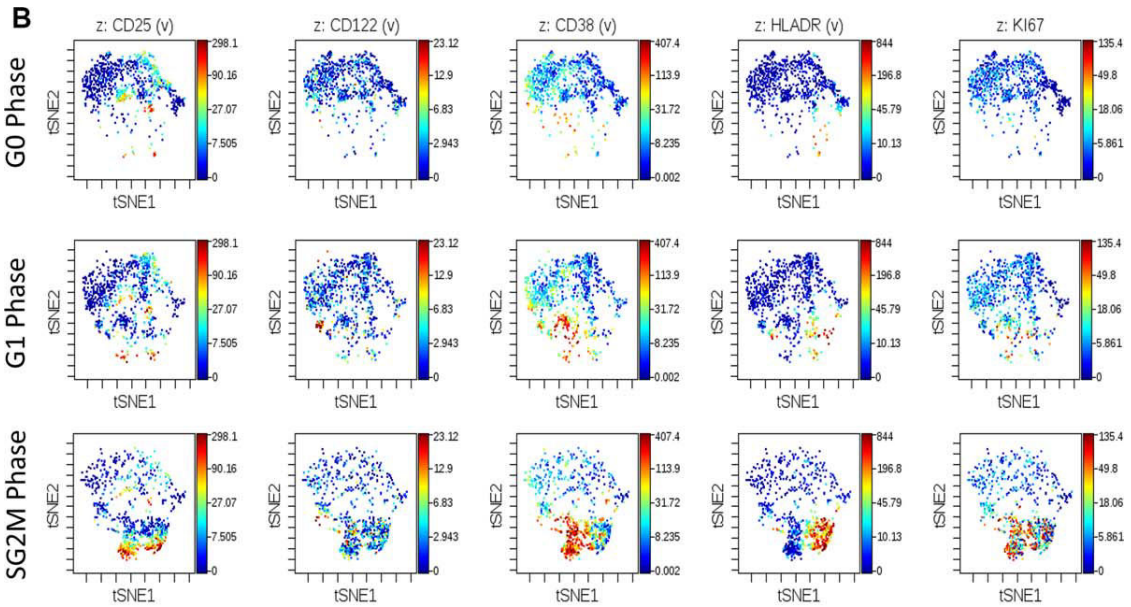


Fig. 3. Distribution of activation and exhaustion markers along cell cycle stages of peripheral blood CD4 T. visNE analysis showing: **3A)** the distribution of the various subsets among the G0, G1 and S-G2-M stages, the pattern of expression according to the G0, G1 and S-G2-M cell cycle stages of: **3B)** Activation markers, **3C)** immune check points. Each cell is represented as a point in high-dimensional space.



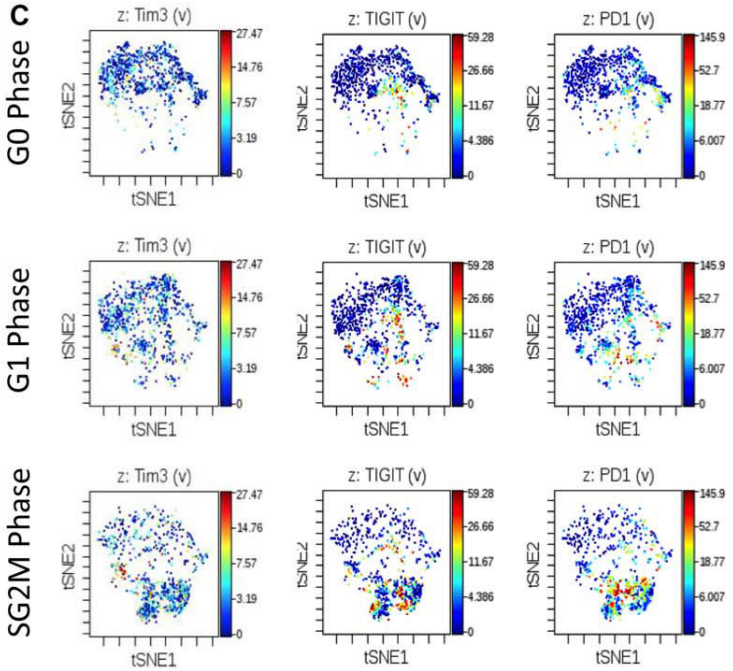
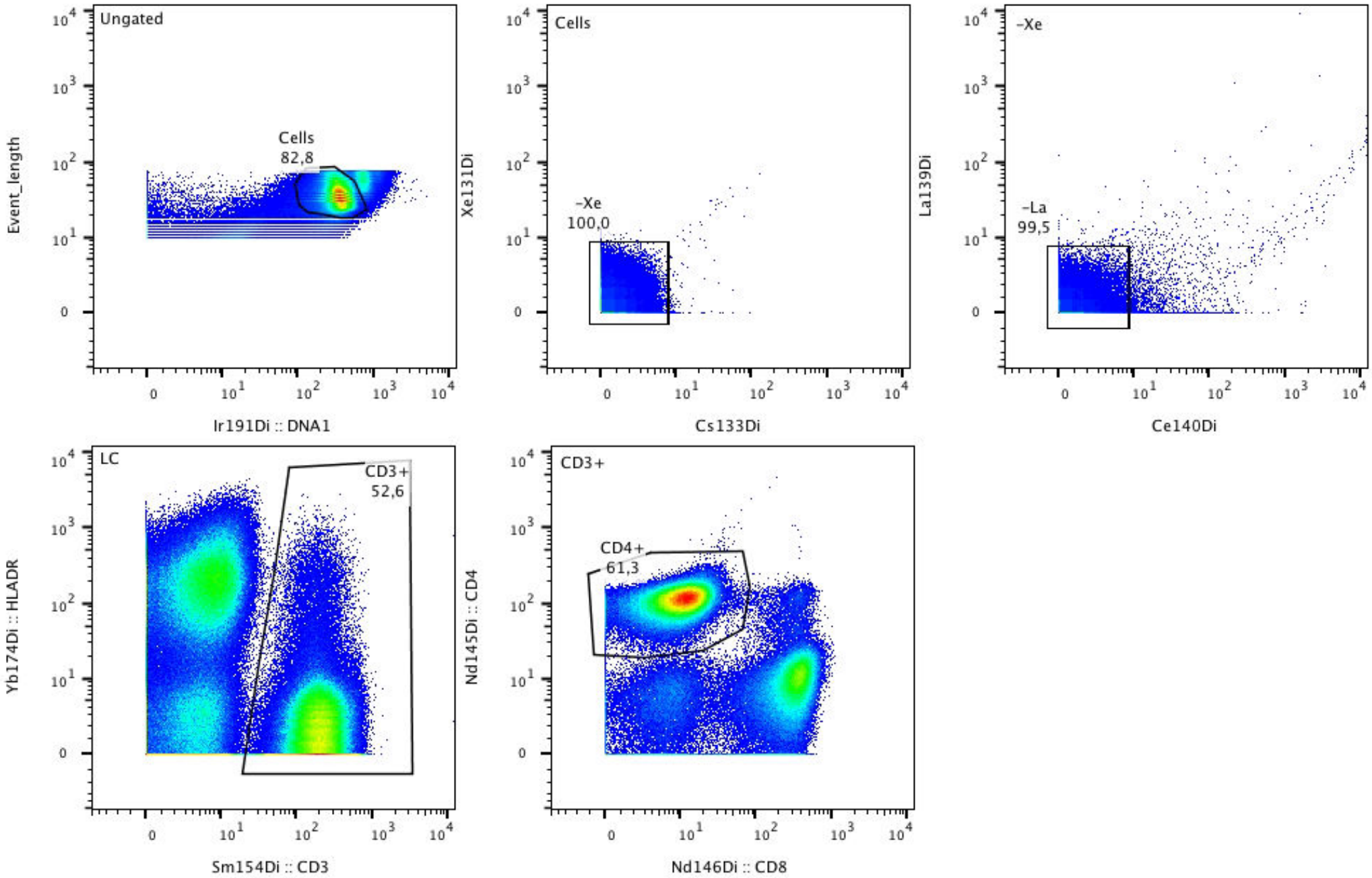


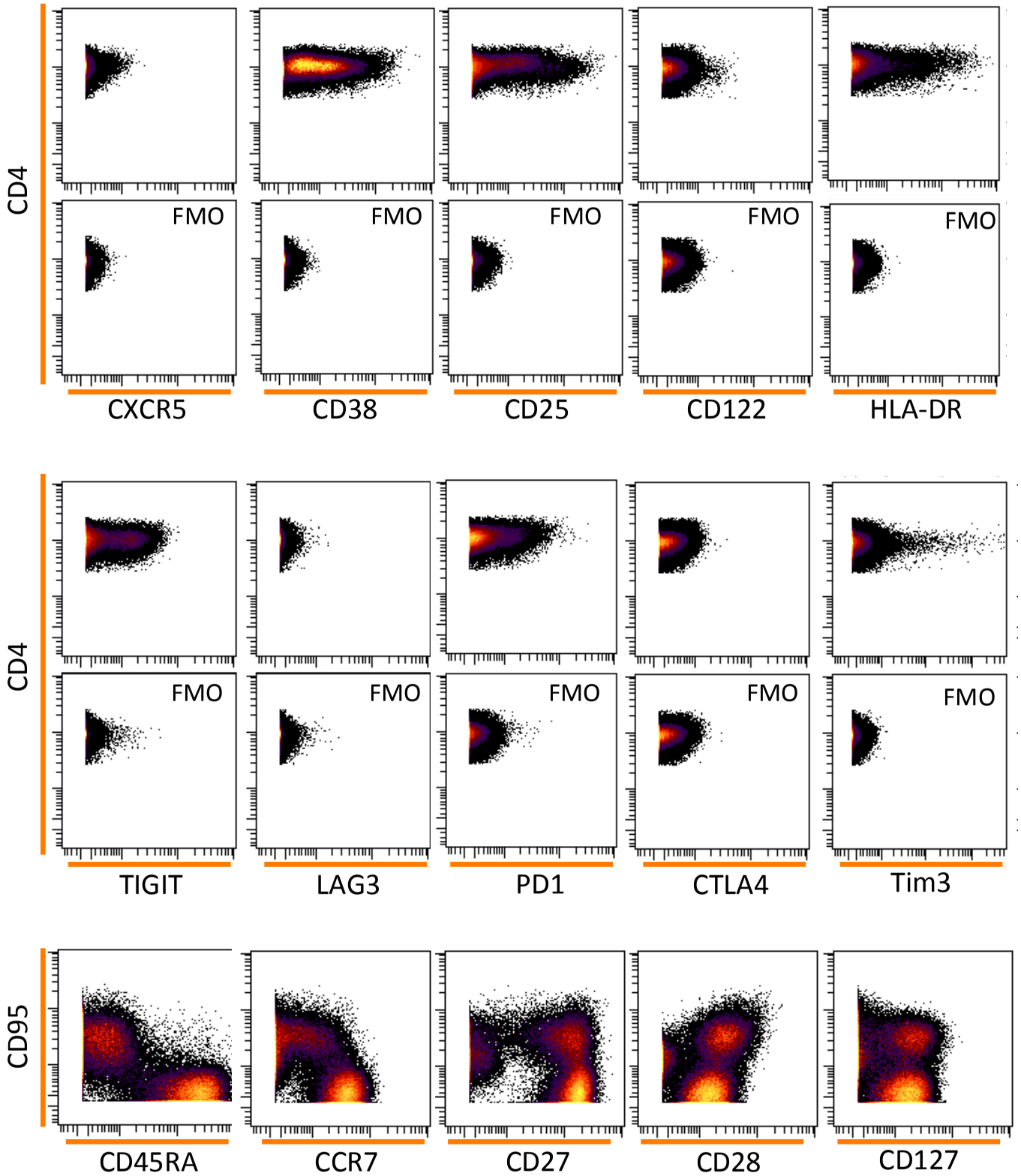
Fig. 3. Continued

Supplementary Table 1: List of Monoclonal antibodies used in this Mass cytometry analysis

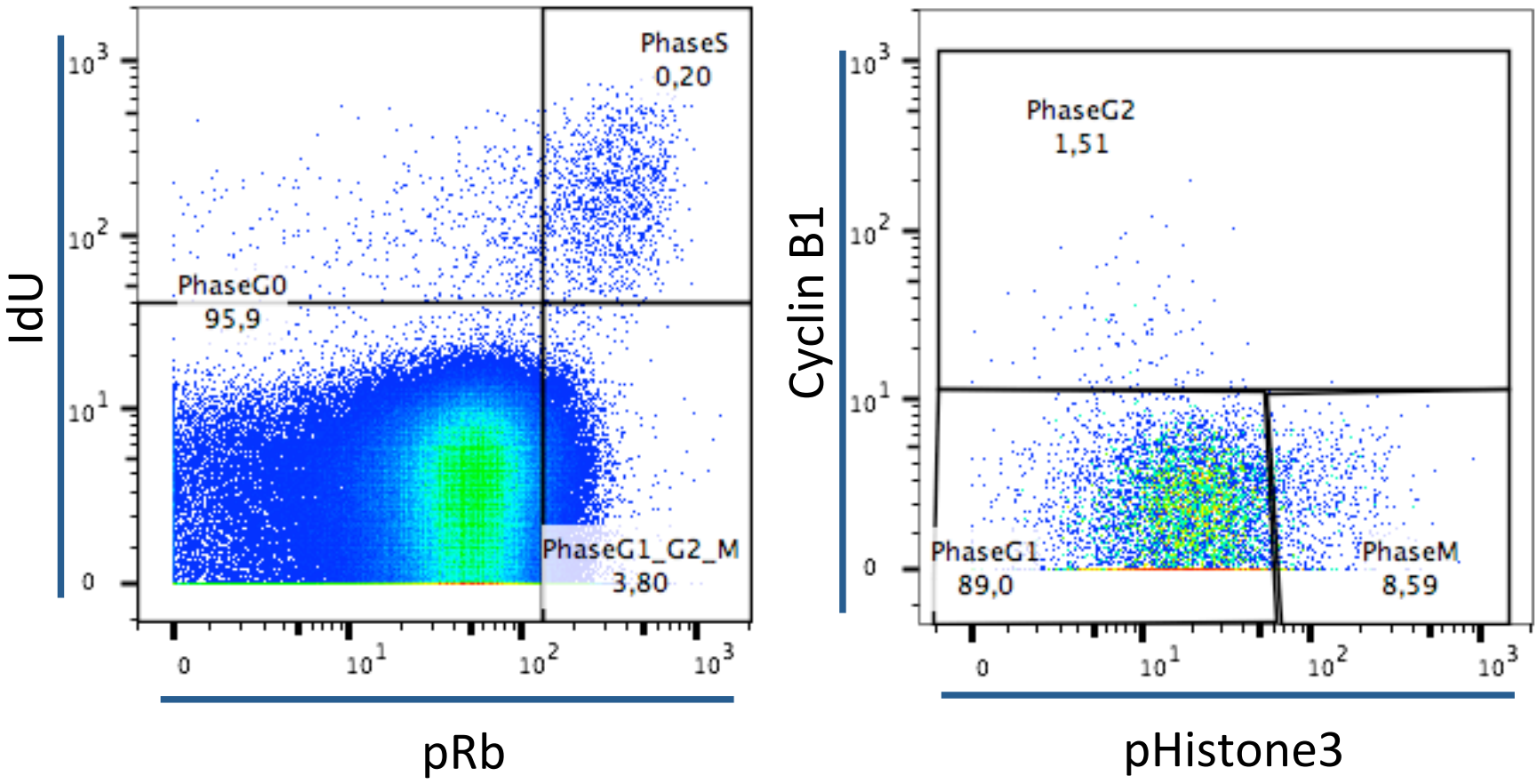
Specificity	Metal label	Reference	Clone
CyclineB1	164Dy	3164010A, DVS fluidigm	GNS-1
pH3	175Lu	3175012A, DVS fluidigm	Ser28 (HTA28)
Ki67	168Er	3168001B, DVS fluidigm	Ki-67
pRB	166 Er	3166011A, DVS fluidigm	Ser807/811 (J112-906)
CD3	154Sm	3154003B, DVS fluidigm	UCHT1
CD4	145Nd	3145001B, DVS fluidigm	RPA-T4
CD8a	146Nd	3146001B, DVS fluidigm	RPA-T8
CD14	151Eu	3151009B, DVS fluidigm	M5E2
CD19	142Nd	3142001B, DVS fluidigm	HIB19
CD25	149 Sm	3149010B, DVS fluidigm	2A3
CD27	167Er	3167006B 3167002C	L128
CD28	160Gd	3160003B, DVS fluidigm	CD28,2
CD38	144Nd	3144014B, DVS fluidigm	HIT2
CD45	156Gd	3156010B, DVS fluidigm	HI30
CD45RA	169Tm	3169008B, DVS fluidigm	HI100
CCR7	159Tb	3159003A, DVS fluidigm	G043H7
HLADR	174Yb	3174001B, DVS fluidigm	L243
CD122	170Er	3170004C, DVS fluidigm	Tu27
CD127	143Nd	3143012C, DVS fluidigm	A019D5
CD95	147Sm	555670, BD	DX2
PD1	155Gd	3155009B, DVS fluidigm	EH12.2H7
Tim3	172Yb	BLE345019, BioLegend	F38-2E2
TIGIT	153Eu	3153019B, DVS fluidigm	MBSA43
LAG3	165Ho	3165028B, DVS fluidigm	874501
CTLA4	161Dy	3161004B, DVS fluidigm	14D3
CXCR5	171Yb	3171006B, DVS fluidigm	51505



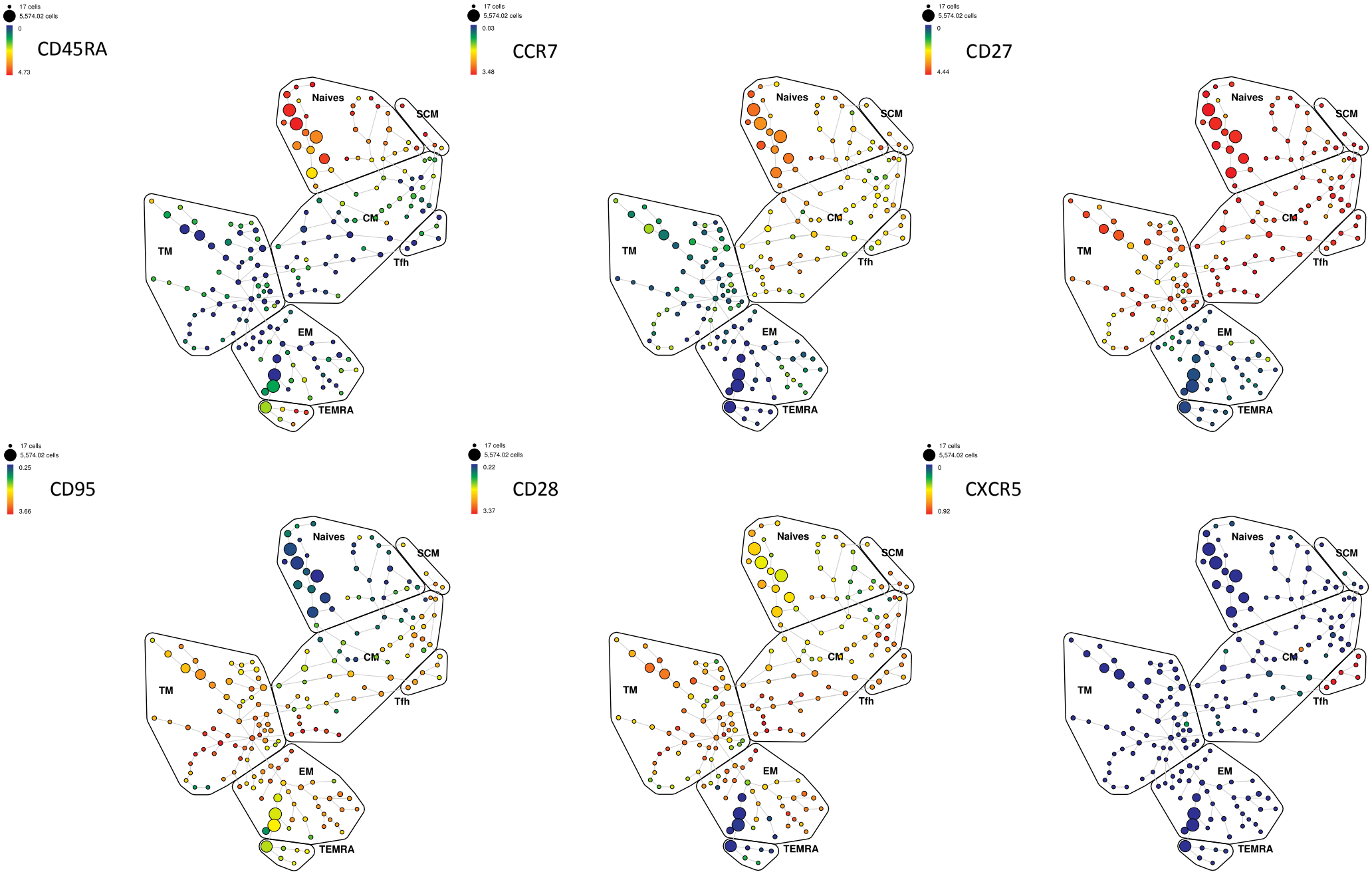
Supplementary Figure 1A



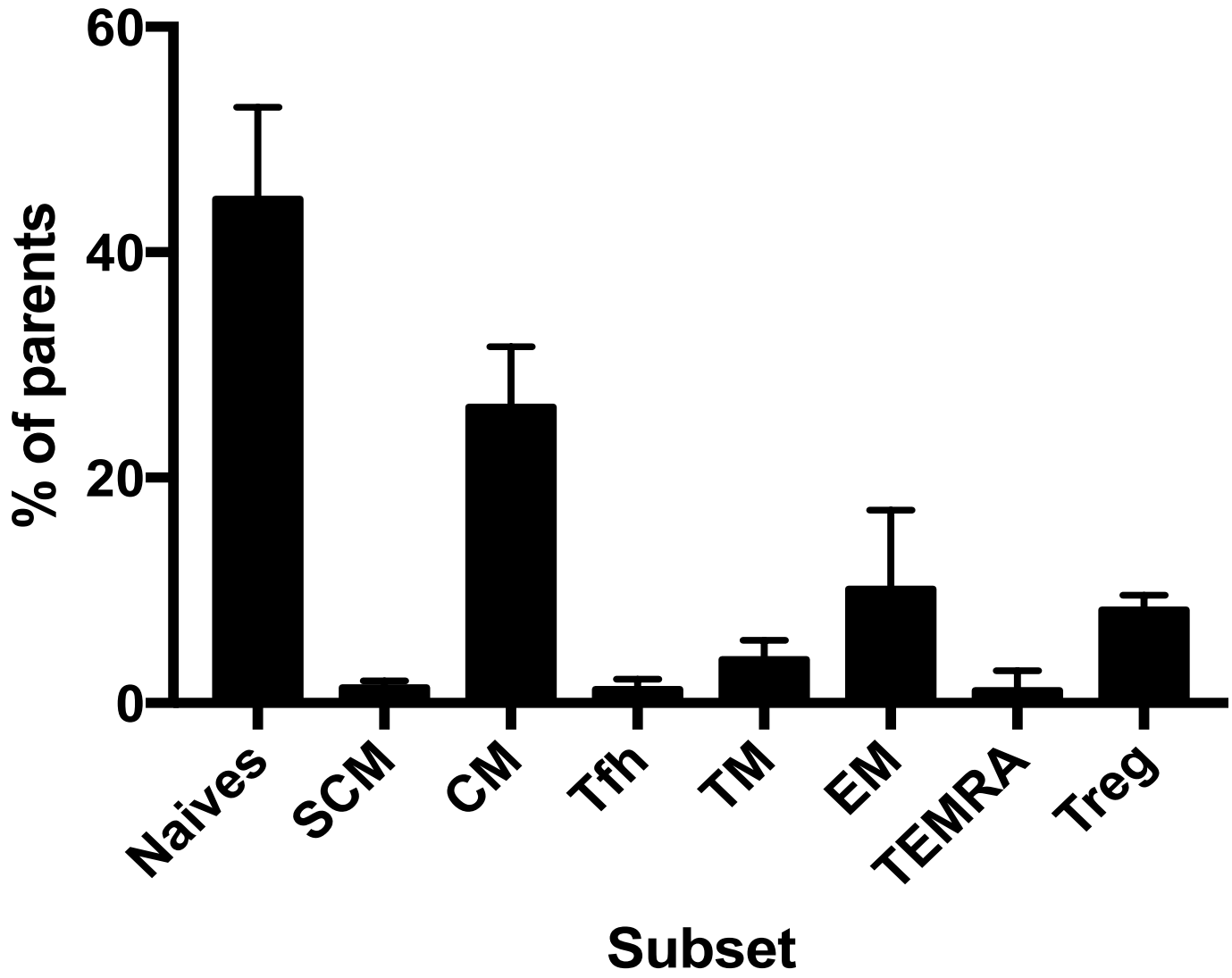
Supplementary Figure 1B



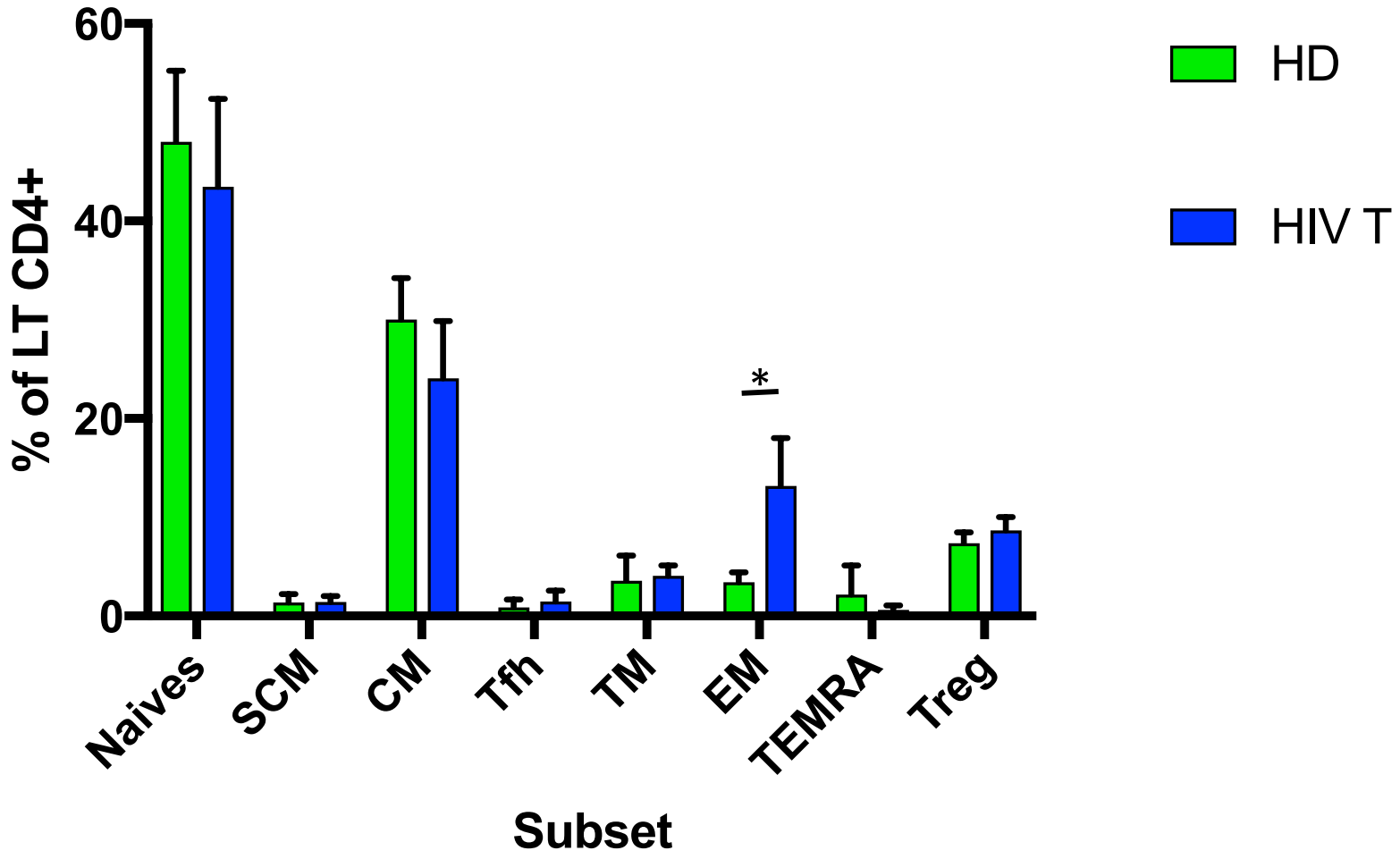
Supplementary Figure 1C



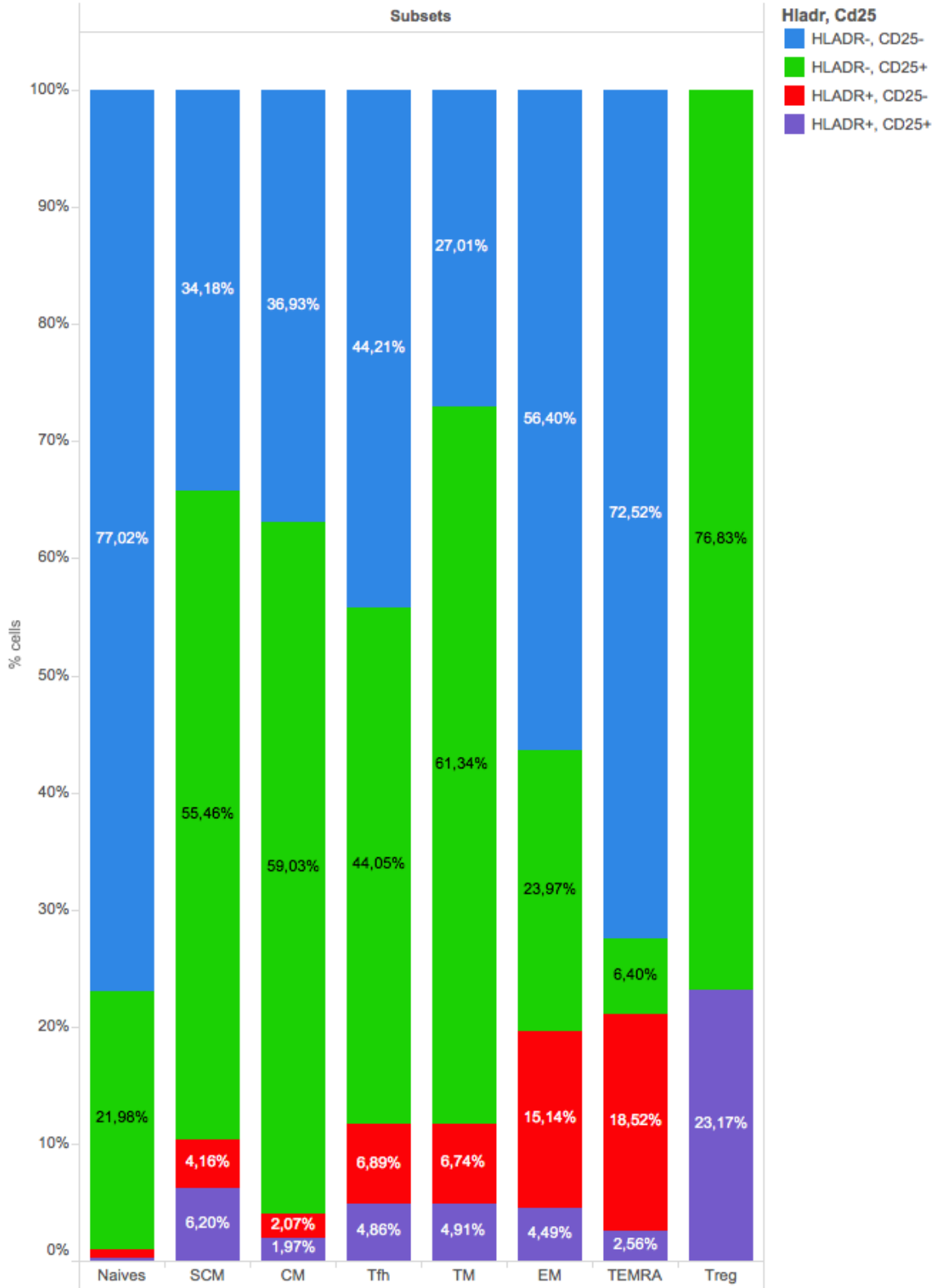
Supplementary Figure 1D



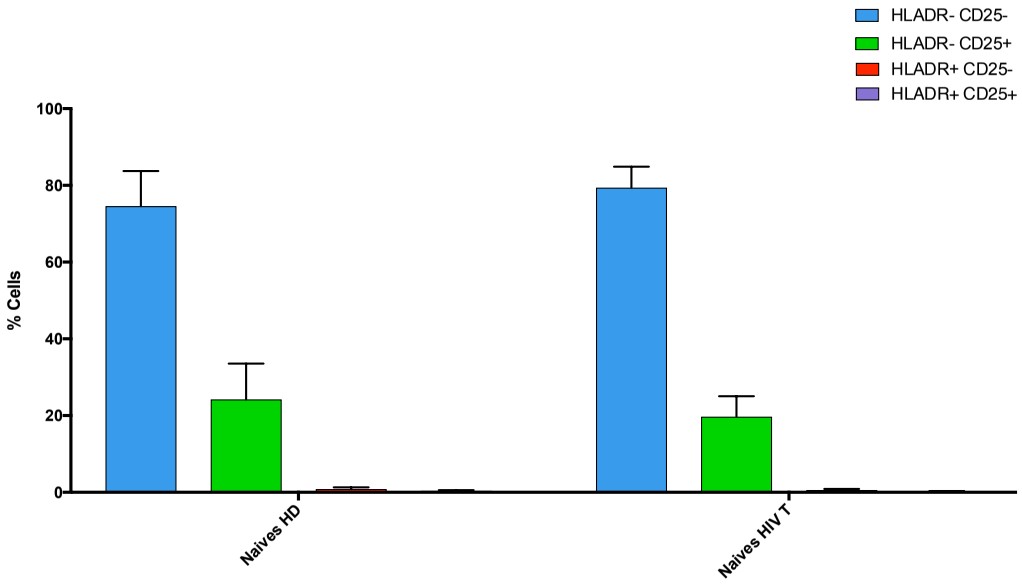
Supplementary Figure 2A

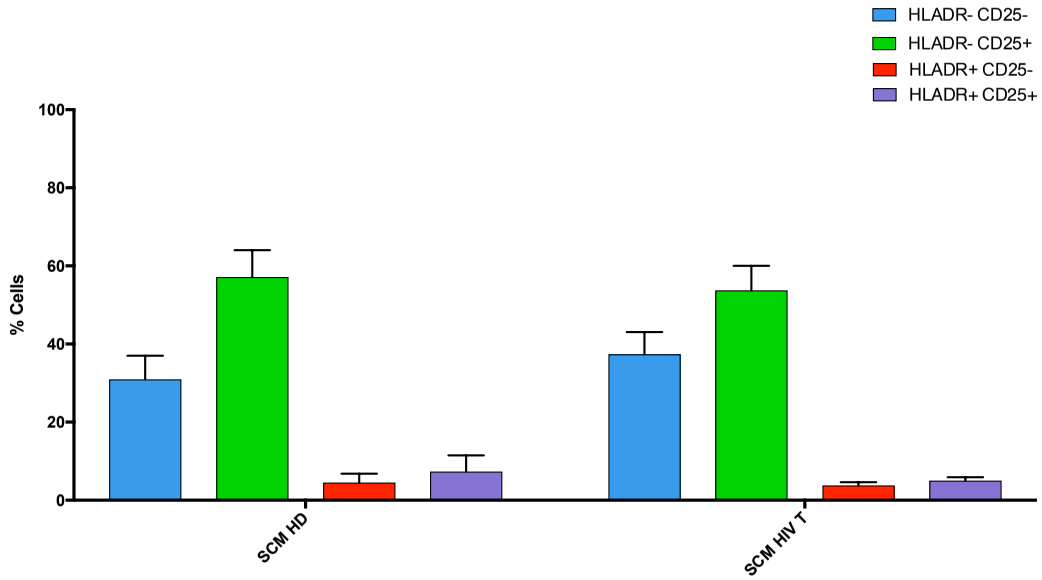


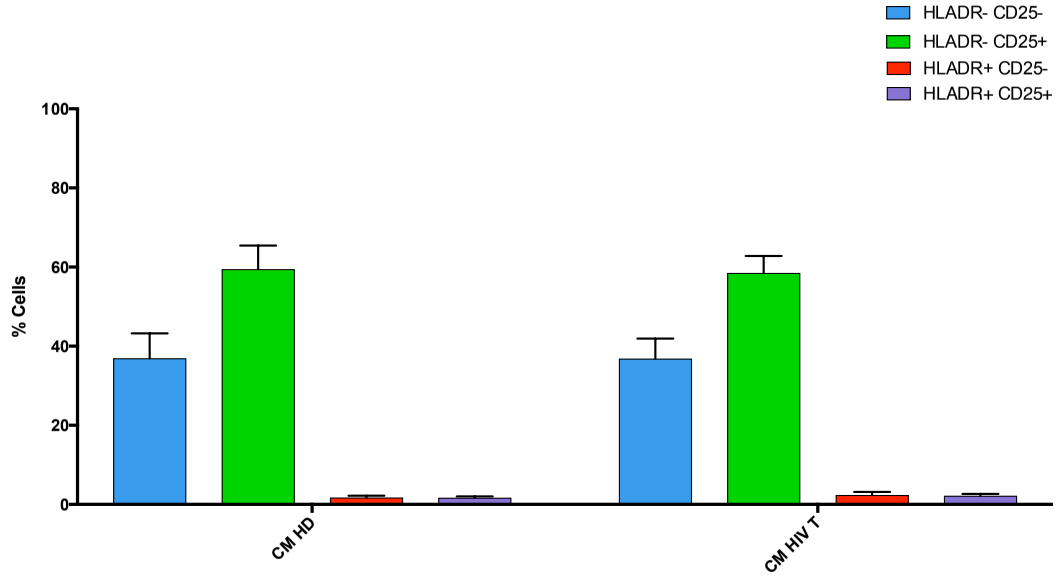
Supplementary Figure 2B

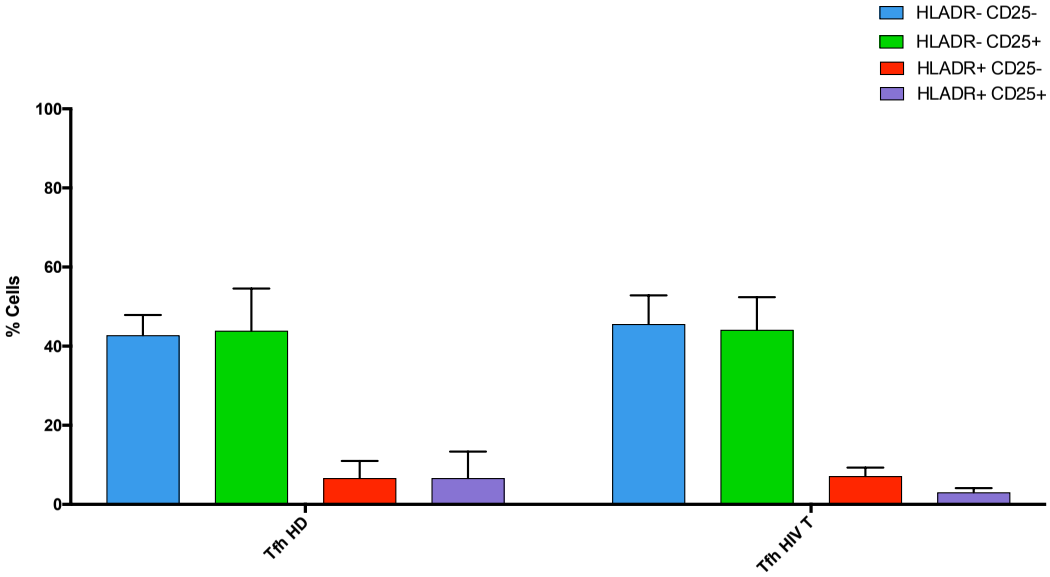


Supplementary Figure 3A

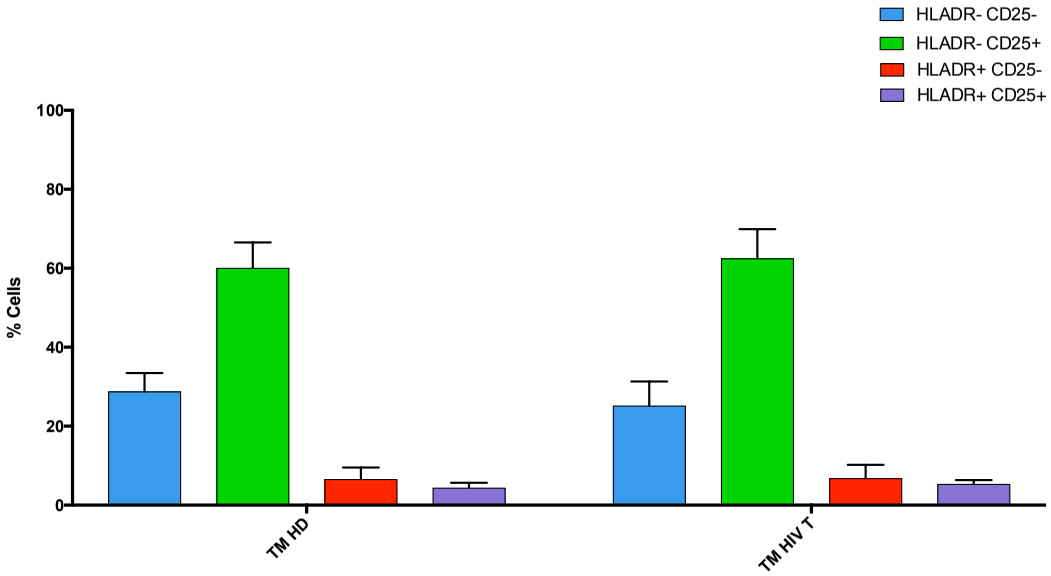


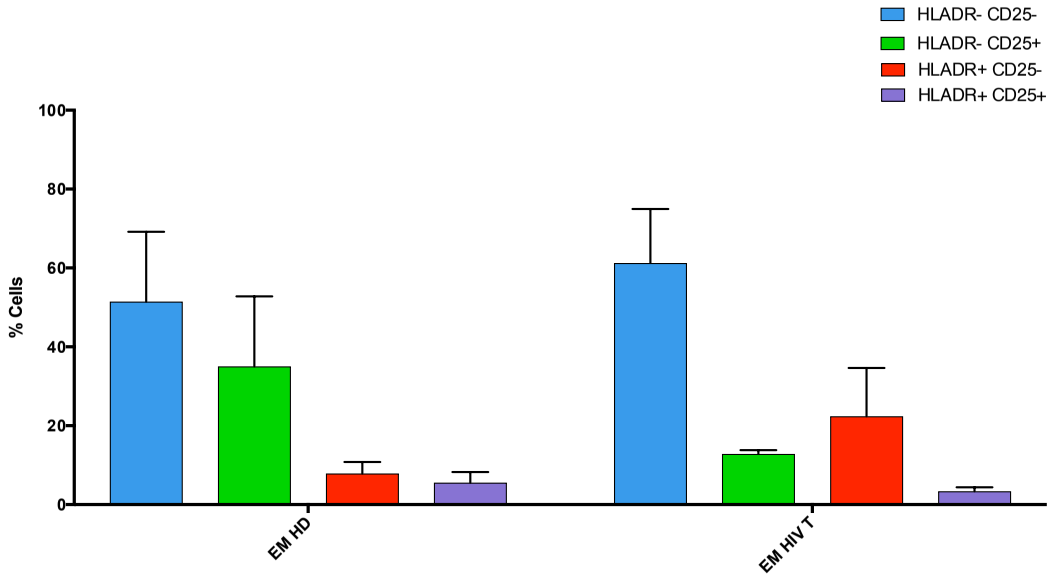


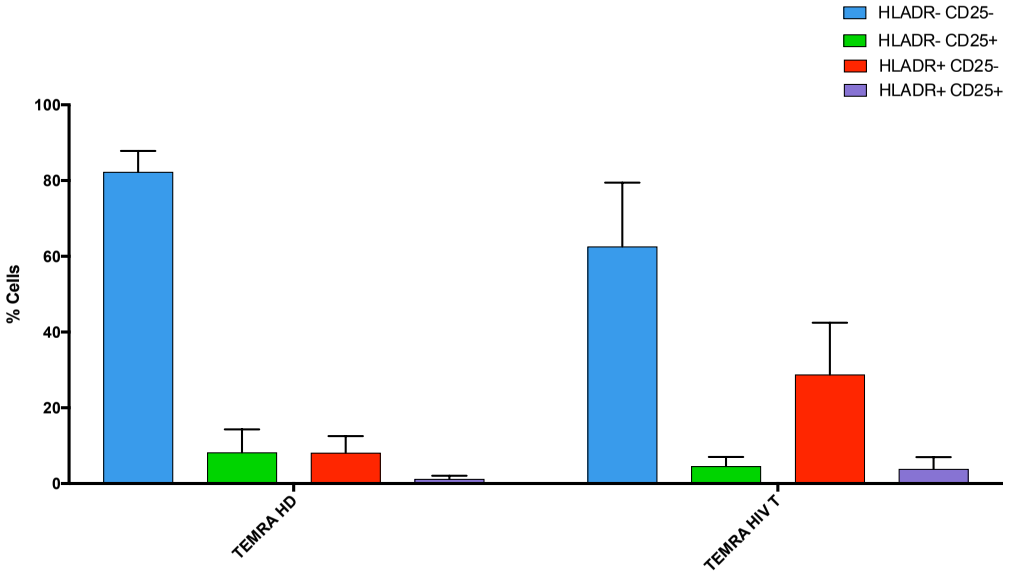


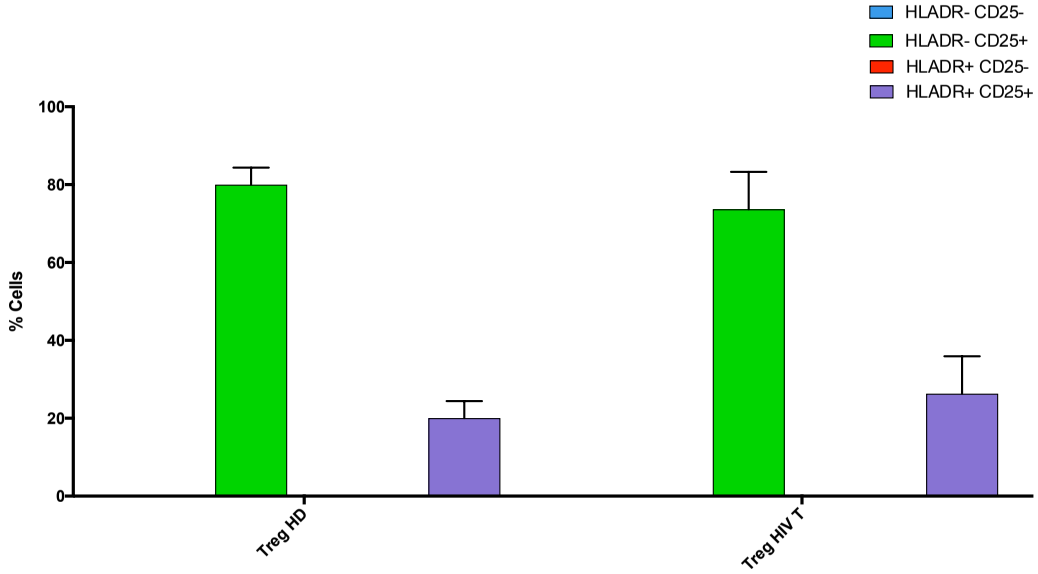


Supplementary Figure 3B

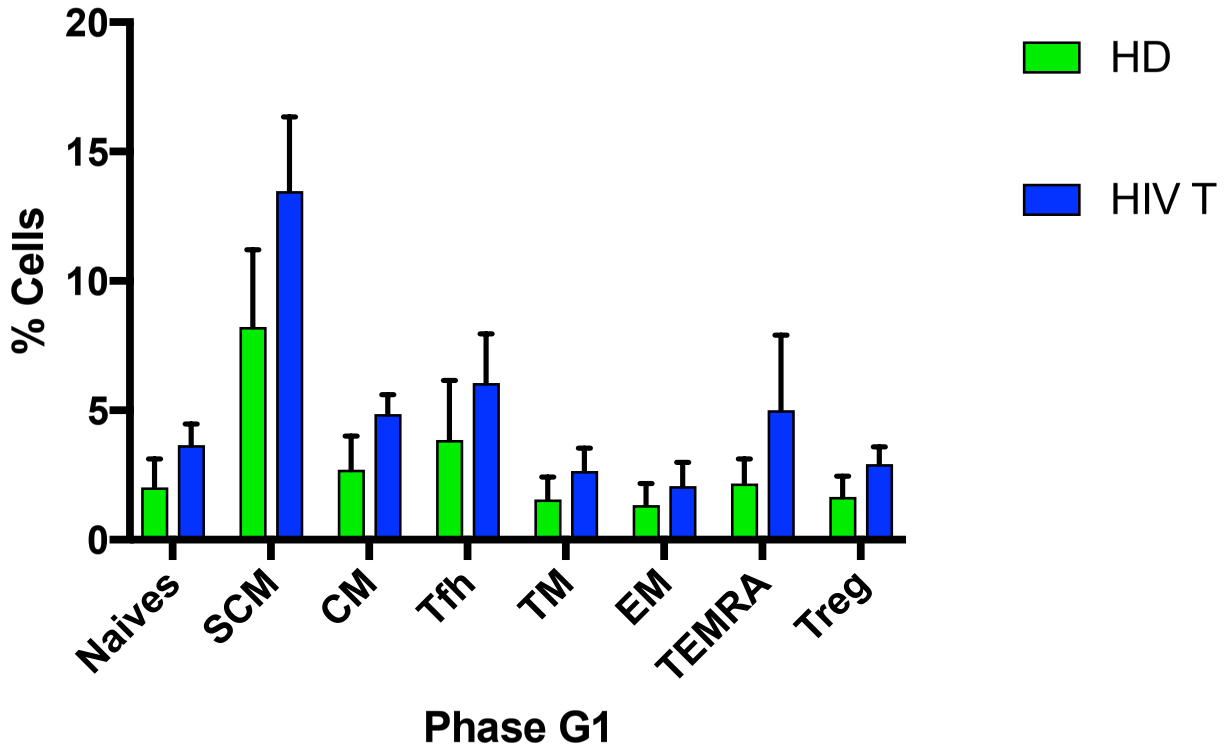


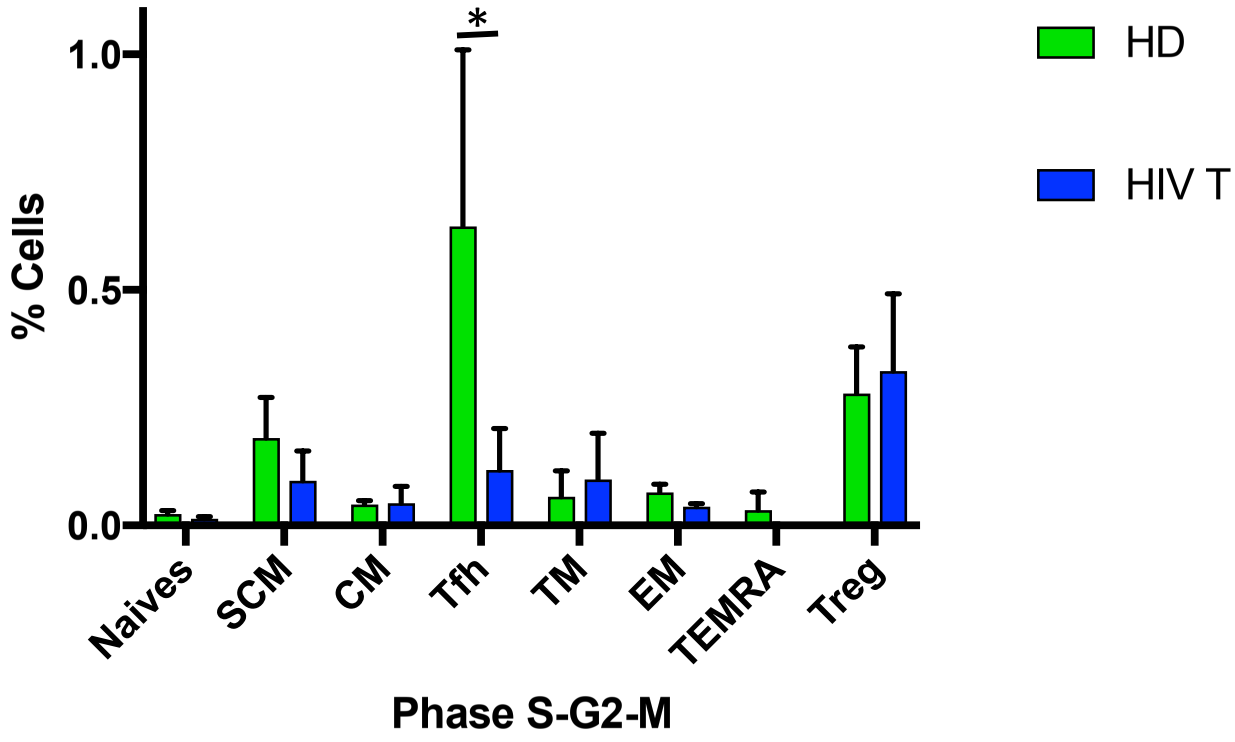




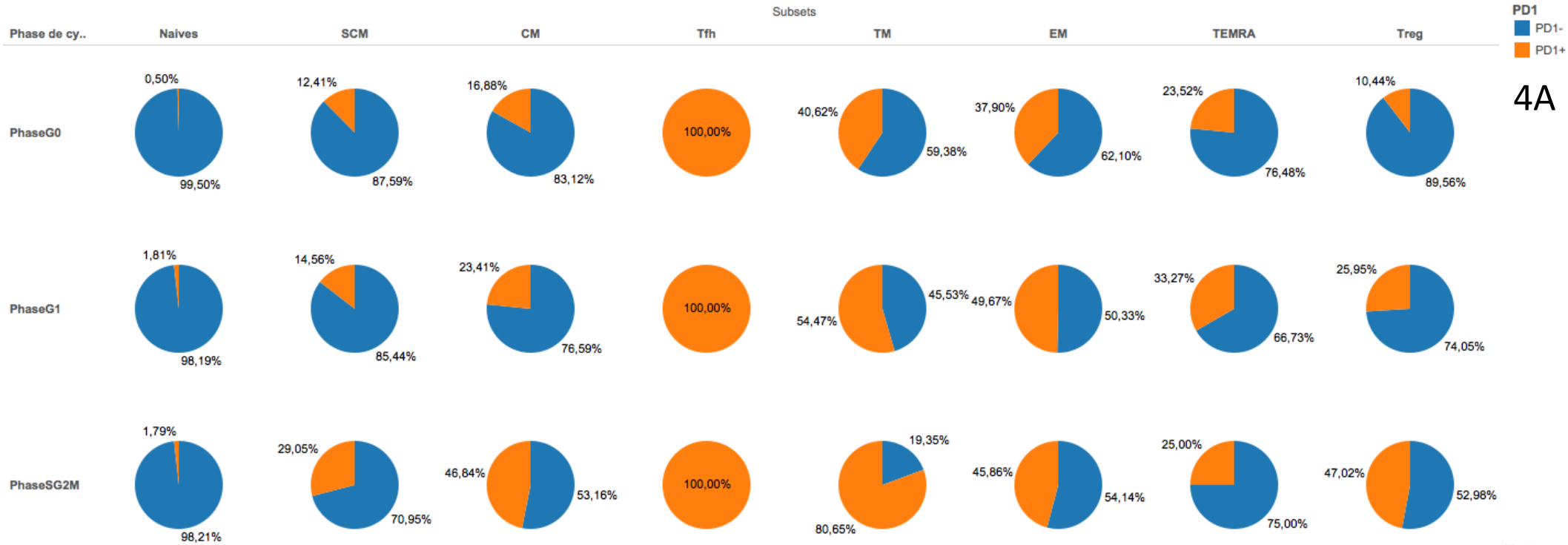


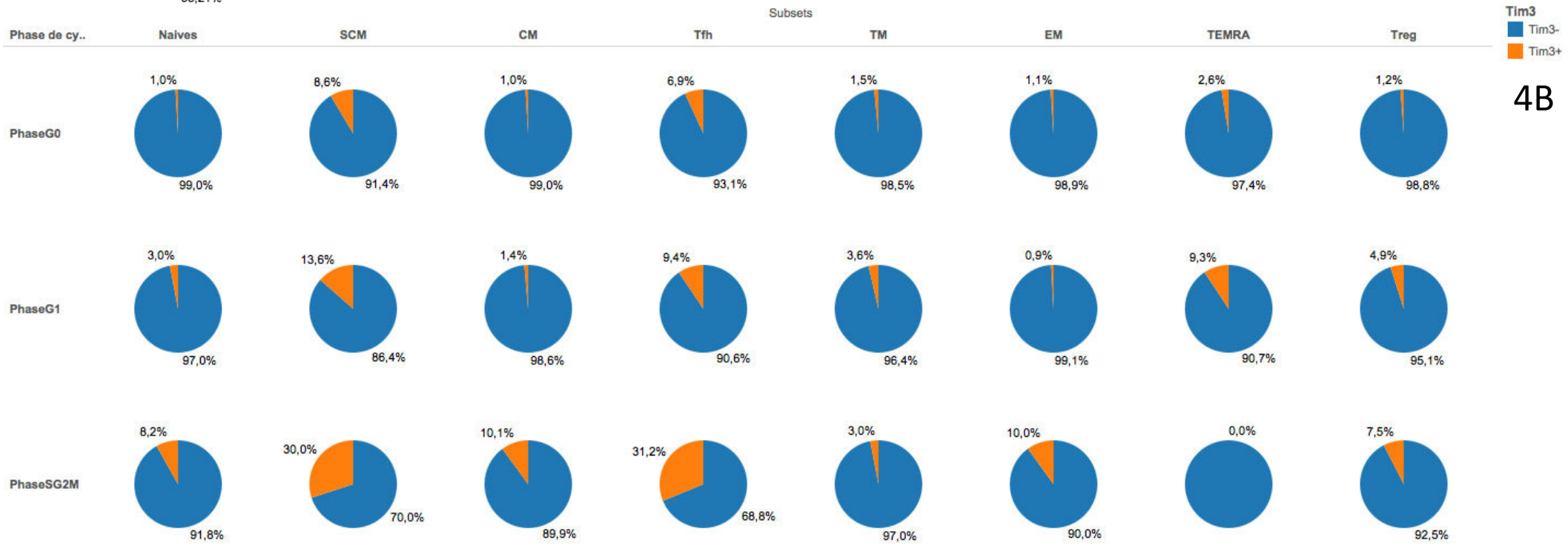
Supplementary Figure 3B



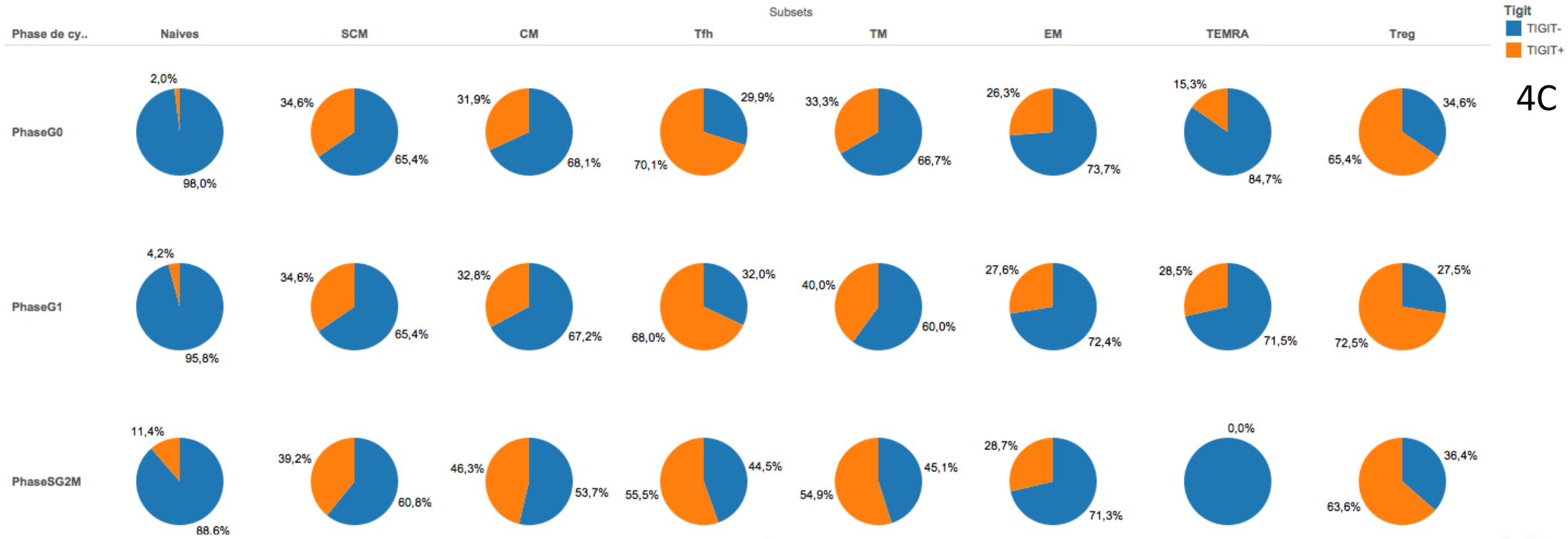


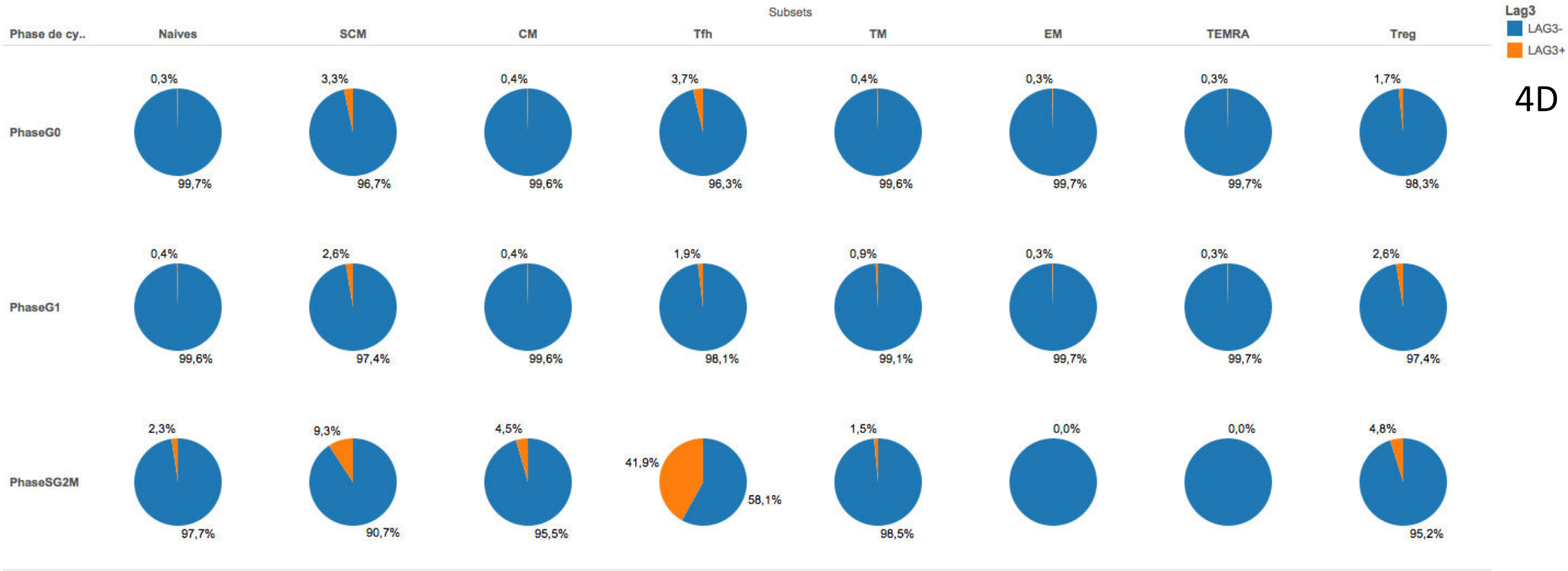
Supplementary Figure 3C





Supplementary Figure 4





Supplementary Figure 4

Fine characterization of host cells of latent and productive reservoirs of HIV-1 by an innovative multiplex approach

Aurélien Corneau, Elyes Ben Salah, Antonio Cosma, Sophie Even, Pauline Aigrain, Julien Verdier, Arnaud Moris, Christine Katlama, Roger Le Grand, Véronique Frachet, Catherine Blanc and Brigitte Autran

Article en cours d'écriture - version préliminaire

Poster présenté à l'AFC, Octobre 2017, 2ème Journée technologique de cytométrie de masse

Présentation orale, AFC, Octobre 2017, 22ème congrès annuel de l'AFC

1. Résumé

i. Contexte et objectif :

La définition de stratégies thérapeutiques orientées vers la guérison du VIH nécessite d'abord une définition appropriée des réservoirs du VIH latent dans lequel le virus persiste indéfiniment. Jusqu'à présent, l'étalon-or pour étudier les réservoirs latents du VIH était fondé sur l'exclusion des cellules T activées, définies par la co-expression de HLA-DR et CD25, CD38 ou CD69. Cependant, nos résultats précédents ont montré dans ces cellules HLA-DR-CD25-, soi-disant au repos, la présence de cellules en cycle et de signatures des voies de signalisation, démontrant que ces définitions de cellules au repos ne sont pas correctes. Des études récentes réalisées dans le sang périphérique de patients infectés par le virus ont également montré qu'une série de marqueurs tels que PD-1, LAG-3, HLA-DR et TIGIT aide à définir les populations de cellules T CD4 infectées par le VIH (Gosselin A., et al., 2017 ; Fromentin R., 2016).

L'existence de lymphocytes T CD4 mémoire quiescents infectés par le VIH et ayant une longue durée de vie, représente un obstacle majeur à l'éradication de l'infection. Plusieurs études ont contribué à la caractérisation de différentes populations de lymphocytes T CD4 réservoirs. Les cellules CD4+ TCM (CD45RA-CCR7+CD27+) et TTM (CD45RA-CCR7-CD27+) sont considérées comme les principaux réservoirs de virus latent dans le sang périphérique (Chomont N. et al., 2009). Deux petits groupes cellulaires : les TSCM (CD45RA+CCR7+CD27+CD95+CD28+) et les Tfh exprimant le PD-1 sont, elles, considérées comme réservoir mineur (Buzon M.J., et al., 2014 ; Banga R., et al., 2016). Cependant, toutes ces populations ont reçu plusieurs signaux d'activation et ne peuvent pas répondre à la définition de "cellules au repos". Par conséquent, la redéfinition des cellules abritant les réservoirs latents est essentielle pour définir les signaux et les médicaments appropriés qui pourraient aider à purger les réservoirs du VIH.

Une étude récente réalisée sur des échantillons de sang a suggéré que des LT CD4+ au repos et exprimant le marqueur CD32a seraient infectés par le VIH, décrivant alors pour la première fois un marqueur de réservoir latent jusqu'à présent insaisissable (Descours B., et al., 2017). Des études remettent actuellement ce résultat en question. D'après Abdel-Mohsen et al., les lymphocytes T CD32+CD4+ semblent exprimer plusieurs marqueurs d'activation et ne semblent pas enrichis en ADN viral (Abdel-Mohsen M, et al., 2018). Dans le même ordre d'idée, une étude réalisée là encore sur des

prélèvements sanguins par Martin et al. a également échoué à montrer l'enrichissement des cellules T CD4 infectées par le VIH dans les cellules CD32+(Martin G.E. et al., 2018).

Une définition précise des réservoirs du VIH nécessite une approche capable d'analyser simultanément au niveau unicellulaire un très grand nombre de paramètres. La CMM apparaît donc comme un outil de choix pour ce type d'études. Le premier article présenté dans ce manuscrit suggère une nouvelle définition plus restreinte des cellules au repos et activées, permettant ainsi de caractériser les populations réservoirs hautement enrichies en cellules infectées ou productrices de VIH. Sur la base de ces résultats, l'objectif de ce second article est de définir à un niveau de précision beaucoup plus élevé les cellules hébergeant le réservoir latent et actif caractérisé par la présence d'ADN-VIH. Ainsi, ce projet vise à fournir une caractérisation et une distinction entre les réservoirs de cellules infectées par le VIH latent des cellules de réservoirs activés, dans les cellules T CD3+CD8- primaires provenant de patients VIH-1 traités et non traités.

Sur la base de l'étude portant sur CD32 et de nos travaux précédents sur la relation cycle cellulaire et marqueurs d'activation et d'épuisement, nous avons soulevé plusieurs problématiques : quelle est la distribution phénotypique des différentes sous populations de lymphocytes T CD3+CD8-CD32+ dans le sang périphérique ? Quel est l'état d'activation, d'épuisement et de cycle de ces cellules ? Quelles sont les caractéristiques des cellules productrices de VIH dans le sang périphérique ? Et, existe-t-il une signature cellulaire qui permettrait d'enrichir les cellules productrices de virus ?

ii. Matériel et méthodes

Les lymphocytes T CD4 du sang périphérique de 20 individus : 10 donneurs sains, et 10 patients infectés par le VIH sous traitement antirétroviral puis ayant suivi une interruption thérapeutique, ont été marqués avec 33 anticorps monoclonaux ciblant les marqueurs de différenciation, d'activation, d'épuisement, de cycle cellulaire mais également le nouveau marqueur « réservoir » des LTCD4 : le CD32, ainsi que la p24 (afin d'identifier les cellules productrices de virus) et enfin Stat5 phosphorylé (pStat5), qui a été montré comme intervenant dans la réponse homéostatique à la déplétion des lymphocytes T CD4 (Catalfamo M. et al., 2008). Les échantillons ont été acquis sur un HELIOS et analysés par des outils d'analyses non supervisées automatiques de clustering (SPADE) et de réduction de dimension (viSNE), ainsi que par analyse conventionnelle, hiérarchique et supervisée manuelle (sur FlowJo).

iii. Résultats :

L'état de différenciation des principales sous-populations de lymphocytes T CD4 du sang périphérique présentait une baisse significative des TN et une augmentation des TEM et TEMRA/TE dans les groupes de patients infectés montrant, en accord avec la littérature, une différenciation importante des cellules T CD4 au détriment des cellules naïves.

Le statut d'activation des sous-populations CD4 confirme les résultats du travail précédent, avec une augmentation de l'expression des marqueurs HLA-DR et CD38 dans les cellules différenciées (TTM, TEM et TE/TEMRA) corrélée à une augmentation des immune-checkpoints PD-1, TIGIT et CTLA-4. Par ailleurs, les cellules en cycle étaient majoritairement localisées dans le même sous-ensemble de cellules hyper-activées et différenciées. Il est à noter qu'un petit groupe de cellules, correspondant majoritairement à des TSCM, exprimaient le Ki67 et également Tim-3, suggérant que Tim-3 est un marqueur lié au cycle dans cette sous population. Les patients infectés, et particulièrement les patients ayant une charge virale détectable lors de l'arrêt thérapeutique, exprimaient plus de marqueurs d'activation et d'immune-checkpoints dans les différents sous-groupes, à l'exception du CD25. En particulier, Tim-3, CD38 et le marqueur de cycle Ki67 sont clairement surexprimés dans un contexte d'infection virale productive par rapport aux patients sous traitement dans tous les groupes cellulaires à l'exception des cellules naïves. Par contre TIGIT, HLADR, PD-1 et CTLA-4 étaient augmentés de manière quasi-similaire dans les 2 groupes de patients.

L'étude du cycle a montré une baisse significative des cellules en phase G0 des patients VIH+ non traités par rapport aux donneurs sains et patients VIH+ traités, compensée par une augmentation significative de toutes les phases de cycle à l'exception de la phase M.

La caractérisation phénotypique des cellules CD32+CD3+CD8-, définies comme cellules potentiellement réservoirs d'après la publication de Descours B. montrait clairement trois niveaux d'expression : CD32-, CD32 low et CD32 high. Dans la population CD32high, une diminution de la MMI du CD4 a été mise en évidence entre les patients VIH-non traités par rapport au groupe de donneurs sains. Cette diminution d'expression est particulièrement intéressante, car les cellules infectées de façon productive par le VIH ainsi que les cellules ayant reçu un signal d'activation TCR

internalisent et sous-expriment le récepteur CD4. L'analyse phénotypique multiplex montrait une augmentation importante de cellules CD32h différentiées (TEM et TE/TEMRA) dans le groupe de patients infectés par le virus sans traitement. En s'intéressant à chaque niveau d'expression du CD32, on remarque que les cellules CD32- sont majoritairement des cellules TN et TCM, quel que soit le groupe de patients, alors que les cellules CD32low et CD32high sont des cellules à des stades plus avancés de la différenciation. Une augmentation très nette et significative des cellules TSCM a été mise en évidence dans la population CD32high. Cependant, cet accroissement à tendance à être limité dans le groupe de patients VIH-UT. De plus, les cellules CD32+ exprimaient beaucoup plus les marqueurs d'activation que les cellules CD32-, avec une amplification de l'activation dans les cellules CD32high par rapport aux cellules CD32low, quelle que soit la sous-population cellulaire. En revanche, aucune différence n'a été mise en évidence concernant les marqueurs d'épuisement. Enfin, une augmentation des cellules Ki67+ a été observée dans les cellules CD32+ de patients non traités, avec une expression importante des cellules Ki67 dans la fraction CD32low. Concernant pStat5, de façon surprenante, les cellules CD32high exprimaient, quasiment exclusivement, ce facteur de signalisation cytokinique ; par ailleurs, ces cellules présentent dans la majorité des cas au moins un des récepteurs aux cytokines à chaine beta CD25, CD122 et/ou CD127.

Nous avons au final caractérisé les cellules infectées VIH+ à l'aide du marqueur p24. Seuls 3 patients VIH+ non traités, ayant une charge virale détectable, présentaient des cellules p24+ détectables au-dessus des bruits de fond sur les 16 prélèvements testés (3 donneurs sains, 6 patients infectés non traités et 7 patients infectés sous traitement). Nous nous sommes alors intéressés aux phénotypes des cellules p24+ positives de ces 3 patients. Les cellules infectées étaient enrichies d'un facteur moyen de 5 en TSCM et d'un facteur 2 en Tfh, alors qu'elles étaient diminuées d'un facteur 4 pour les naïves (10% des cellules p24+ étaient des TSCM et 7% des Tfh). Pour le marqueur CD32, les cellules sont enrichies d'un facteur 20. Cependant seuls 11% des cellules productrices de virus étaient CD32+, comprenant les CD32low et CD32high. Concernant le cycle cellulaire, les cellules p24+ étaient enrichies d'un facteur 950 pour les cellules en phase G2, et plus globalement étaient enrichies dans toutes les phases du cycle, excepté pour la phase M. En s'intéressant aux marqueurs d'épuisement, on remarque que 19,69% en moyenne des cellules p24+ exprimaient CTLA-4 alors que ce marqueur n'était exprimé qu'à hauteur de 0,83% dans la population CD3+CD8-. De même, PD-1,

TIGIT et Tim3 présentaient une augmentation de leur expression dans les cellules identifiées comme p24+. De plus, les cellules p24+ exprimaient les 4 immune-checkpoints (CTLA-4, PD-1, Tim3 et TIGIT) simultanément, représentant 11% des cellules p24+, soit un ratio de 725 par rapport aux cellules p24-. Enfin, concernant les marqueurs d'activation, 17,62% des cellules p24+ exprimaient les 3 marqueurs d'activation (CD38, CD25 et HLA-DR) contre 0,63% des cellules p24-, soit une augmentation de 52 fois.

A partir de ces signatures cellulaires, nous avons cherché les cellules p24 dans ces sous-populations. On remarque qu'en moyenne, 2,46% des cellules en phase G2 expriment la p24 et 2,27% exprimaient les 4 immune-checkpoints. En comparaison, seul 0,004% des cellules exprimaient la p24 dans la population CD3+CD8-, soit un enrichissement d'un facteur 500 environ.

iv. Discussion-Conclusion :

Nos résultats sont cohérents avec la littérature actuelle : l'infection virale provoque une augmentation des populations mémoires au détriment des populations naïves. De même, une augmentation des marqueurs d'activation CD38 et HLADR et des marqueurs d'épuisement TIGIT, CTLA-4, Tim3 et PD-1, est mise en évidence dans une majorité des sous populations mémoires. De plus, l'évaluation du cycle cellulaire entre les 3 groupes indique que les patients infectés non traités ont une augmentation significative du nombre de cellules en cycle, excepté pour la proportion de cellules en phase M. Cet arrêt de prolifération en phase M est attendu. En effet, le VIH entraîne un arrêt du cycle cellulaire à la phase G2 et s'accompagne d'une destruction des LT CD4+ (Kurapati K.R. et al, 2015).

L'analyse des sous populations CD32a+ présente deux niveaux d'expression : high et low. D'après le papier de Descours et al., les cellules CD32a correspondent au marquage CD32high, tandis que les cellules CD32low représentent principalement des cellules activées CD32b. Ainsi, pour, 3 populations ont été identifiées : les CD32-, les CD32low et les CD32high dans les 3 groupes de patients. Une augmentation des TSCM dans les CD32low et CD32high (principalement), quel que soit le groupe de patients, une augmentation forte des TEM et une baisse des cellules naïves pour les patients infectés (avec ou sans traitement) est mise en évidence. De même, une corrélation entre le CD32 et les marqueurs d'activation a été observée : plus le CD32 est exprimé, plus les cellules

sont activées. Or, si ce marqueur est un marqueur de réservoir latent comme il a pu être présenté, ces cellules ne devraient pas présenter de marqueurs d'activation. Par ailleurs, aucune corrélation n'est faite pour les marqueurs d'épuisement, ce qui est, là encore, à l'encontre de la littérature actuelle, explicitant que les cellules réservoirs présenteraient plus d'immune-checkpoints (Chomont N. et al., 2009). Enfin, l'augmentation des cellules en cycle dans les CD32+, mais surtout de la phosphorylation de Stat5 dans les cellules CD32high, suggèrent là encore que ces cellules CD32high ne sont pas en état de latence mais au contraire fortement activées.

Le dernier point de l'analyse nous focalise sur la recherche et la caractérisation des cellules exprimant la protéine p24. L'analyse de ces cellules montre qu'elles sont enrichies en TSCM et en Tfh, sont beaucoup plus en cycle et présentent plus de marqueurs d'activation et d'épuisement.

Ainsi, outre la remise en cause possible du marqueur CD32 en tant que marqueur de réservoir latent, une signature cellulaire des cellules infectées par le virus a pu être caractérisée, principalement avec les marqueurs d'épuisement et de cycle. Ces résultats apportent de nouvelles indications afin d'évaluer de façon plus cohérente les réservoirs du VIH et une meilleure caractérisation de molécules capables de réactiver les réservoirs latents.

2. article : Fine characterization of host cells of latent and productive reservoirs of HIV-1 by an innovative multiplex approach (en cours d'écriture)

Fine characterization of host cells of latent and productive reservoirs of HIV-1 by an innovative multiplex approach

Aurélien Corneau[1,2,3], Elyes Ben Salah[1], Antonio Cosma[4], Sophie Even[1], Pauline Aigrain[1], Julien Verdier[5], Arnaud Moris,[1] Christine Katlama[6,7], Roger Le Grand[4], Véronique Frachet[3], Catherine Blanc[2] and Brigitte Autran[1,2,8]

[1] Sorbonne Universités, UPMC Univ Par is 06, INSERM, U1135, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris, UMRS 1135), Paris F-75013, France

[2] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Plateforme de Cytométrie (CyPS), UMS30–LUMIC,Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Site Pitié-Salpêtrière, Paris F-75013, France

[3] EPHE, PSL Research University, Institute for Advanced Biosciences, INSERM U1209, CNRS UMR5309,Université Grenoble Alpes, Grenoble, France

[4] Commissariat de l'Energie Atomique (CEA) INSERM, Paris Sud University, UMR 1184, IDMIT Infrastructures, Fontenay aux Roses, F-92265, France

[5] AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Paris F-75013, France

[6] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, U1136, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique (IPLESP UMRS 1136), Paris F-75013, France

[7] Département d'Immunologie, AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris F-75013, France

Grant Sponsor : ANRS

---

i. Introduction

Defining therapeutic strategies for HIV cure requires an appropriate definition of latent HIV reservoirs in which the virus persists indefinitely. Until now, the gold standard for studying latent reservoirs of HIV was based on the exclusion of activated T cells, defined by the co-expression of HLA-DR and CD25, CD38 or CD69. However, our previous results showed in these HLA-DR-CD25- cells, supposedly quiescent, the presence of cells entered in cell cycle and signalling pathway signatures, demonstrating that these resting cell definitions are not correct. Recent studies in the peripheral blood of patients infected with the virus have also shown that a series of markers such as PD-1,

LAG-3, HLA-DR and TIGIT help defining CD4 T HIV infected cell populations (Gosselin A., et al., 2017, Fromentin R., 2016).

The existence of quiescent memory CD4 T lymphocytes infected with HIV and having a long life-span, represents a major obstacle to the eradication of the infection. Several studies have contributed to the characterization of different CD4 T cell populations. TCM (CD45RA-CCR7 + CD27 +) and TTM (CD45RA-CCR7-CD27 +) CD4 T cells are considered the main reservoir of latent virus in peripheral blood (Gosselin A., et al., 2017, Fromentin R., 2016). Two small cell groups: TSCM (CD45RA + CCR7 + CD27 + CD95 + CD28 +) and Tfh expressing PD-1 are considered to be minor reservoirs (Buzon M.J. et al., 2014, Banga R. et al., 2016). However, all these populations have received several activation signals and can't match the definition of "resting cells". Therefore, redefining cells sheltering latent reservoirs is essential for defining appropriate signals and medications that could help purge HIV reservoirs.

A recent study of blood samples suggested that resting CD4+ T cells expressing the CD32a marker would be infected with HIV, describing for the first time until now elusive latent reservoir marker (Descours B., and al., 2017). Studies are currently questioning this result. According to Abdel-Mohsen et al., CD32a+CD4+ T lymphocytes appear to express several activation markers and do not appear to be enriched in viral DNA (Abdel-Mohsen M, et al., 2019). Another study failed to show the enrichment of HIV-infected CD4 + T cells in CD32 + cells. (Martin G.E. et al., 2018).

A precise definition of HIV reservoirs requires an approach able of simultaneously analyse a very large number of parameters at the single-cell level. The mass cytometry appears as a tool of choice for this type of study. In a previous article, we presented a new brief definition of resting and activated cells, thus allowing characterization of highly enriched reservoir populations infected or HIV-producing cells (Corneau A. et al., 2017). Based on these results, the aim of this new project is to define at a much higher level of precision the cells sheltering the latent and active reservoir characterized by the presence of HIV-DNA. In this way, this project aims to provide a characterization and distinction between latent HIV cell reservoirs of activated reservoir cells, in primary CD3 + CD8-T cells coming from treated and untreated HIV-1 patients.

We raised several issues: what is the phenotypic distribution of the different subpopulations of CD3 + T CD8-CD32 + T lymphocytes in the peripheral blood? What is

the state of activation, exhaustion and cycle of these cells? What are the characteristics of HIV-producing cells in peripheral blood? And, is there a cell signature that would enrich the virus-producing cells?

ii. Materials and methods

a. Study Subjects

A total of 22 samples of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells were obtained from ten patients who had participated to the previously published Manon-02 therapeutic vaccine trial (Autran B. et al., 2008) and which were still available. This placebo-controlled study had included two phases: a 24 weeks immunization phase on suppressive cART followed by an analytical treatment interruption (ATI). Inclusion criteria into the trial were a suppressive cART for ≥6 months with the same regimen for ≥2 months, CD4 count ≥350 cells/mm^3 for ≥1 year and a plasma viral load (plVL) <400 HIV-RNA copies/ml for ≥ 6 months. Among the 10 study patients, 7 had been included in the immunization arms and 3 in the placebo arm. At baseline median duration of cART was 7.6 years, median plasma viral load was below 200 copies/mL with median 2.76 HIV-DNA copies/million leukocytes and median CD4 counts were 654/mm3 with a median nadir of 237/mm3. During ATI median plasma viral loads were 110 000 copies/mL and CD4 counts were 461/mm3. All patients had provided a written informed consent. Study samples had been collected at baseline or during the first 6 weeks when on cART, and during the first 4 to 12 weeks of ATI and at 24 weeks of ATI. Cells had been cryopreserved in viable conditions during the trial and stored in liquid nitrogen until use with a more than 80% viability after thawing (Table 1).

b. Antibodies

Twenty-nine metal-conjugated antibodies were obtained from Fluidigm (Les Ulis, France). Four purified monoclonal antibodies targeting CD95, CD32, Tim-3 and p24 (HIV core) were obtained from BD Bioscience (Le pont-de-Claix, France), Biotechne (Lille, France), Ozyme (Montigny-Le-Bretonneaux, France) and Beckman Coulter (Villepinte, France) and conjugated to their respective metal tags as previously described. Briefly, primary antibody transition metal-conjugates were prepared in 200 µg lots with the MaxPAR antibody conjugation kit (Fluidigm, Les Ulis, France) following the manufacturer's recommendations. After conjugation, antibodies were diluted to a

working concentration of 100X in Candor PBS Antibody Stabilization solution (Candor Bioscience GmbH, Le pont Claix, France) and stored at 4°C. The list of antibodies used and their corresponding concentrations are found in Table 2

c. Preparation of Cells

For each sample, 50 million PBMCs were thawed rapidly, washed with RPMI media, and then rested for 1 h at 37°C in RPMI media. All studied samples were thawed and used only when >85% viability was observed. Afterwards, cells were incubated with 50 µM (final concentration) 127-IdU Cell-ID™ (Fluidigm, Les Ulis, France) for 25 min at 37°C, followed by the addition of 2.5 µM Cisplatin Cell- ID™ (Fluidigm, Les Ulis, France) for 5 min at 37°C. Cells were washed once with SB. Cells were then stained with surface directed antibodies in 100 µL of Staining Buffer (SB: 1xPBS with 0.5% bovine serum albumin and 0.02% sodium azide) for 30 min at room temperature. Cells were washed once with SB. Cells were fixed for 15 min with Paraformaldehyde (PFA, Sigma Aldrich, Lyon, France) at a final concentration of 2%, permeabilized with methanol (Sigma Aldrich, Lyon, France) at 4°C for 10 min and processed for mass cytometry intracellular staining performed in 100 µL of SB for 60 min at room temperature. Cells were washed twice with SB and then incubated overnight in 2% PFA with 1:8000 the iridium intercalator (pentamethylcyclopentadienyl-Ir (III)-dipyridophenazine; Fluidigm, Les Ulis, France) at 4°C. The next day the cells were pelleted and washed once, by resuspension, in SB and twice in distilled-deionized water. Cells were then resuspended in distilled-deionized water at ~1 million cells per mL and mixed with 4-Element EQ Beads (Fluidigm, Les Ulis, France) and passed through a cell strainer cap with 35 mm pores (BD Biosciences, Le pont-de-Claix, France) immediately before acquisition.

d. Instrument acquisition details

Cell events were acquired on the HELIOS mass cytometer (Fluidigm) and CyTOF software version 6.7.1014 (Fluidigm, Les Ulis, France) at the "Plateforme de Cytométrie de la Pitié-Salpetriere (CyPS)." An average of 6,919,790 events was acquired per sample.

Dual count calibration, noise reduction, cell length threshold between 10 and 150 pushes, and a lower convolution threshold equal to 10 were applied during acquisition. Mass cytometry standard files produced by the HELIOS were normalized with the

MATLAB Compiler software normalizer using the signal from the 4-Element EQ beads (Fluidigm, Les Ulis, France) as recommended by the software developers.

e. Data Analysis

Conventional gating on bivariate dot plots was performed using FlowJo v10.1r5 (Tristar). At first, Beads were gated out using the following gates: 140/142Ce, 151/153Eu, 165Ho and 175/176 Lu. Then, we gated intact cells on the basis of the DNA staining of the iridium intercalator, and then we selected singlets on an Ir191 versus cell length plot. CD45+ events were selected for the analysis of different cell populations, and finally, live cells were selected before cell subset-specific gating.

For SPADE analysis (Cytobank), mass cytometry data were first singlet gated in Cytobank using a cell length by DNA (Ir intercalator) gate, and CD3 + CD8-. SPADE analysis was performed with configuration: 15% of down-sampling and 150 target nodes. Clustering was performed on the following markers: CD27, CD28, CD45RA, CD95, CCR7, and CXCR5. Cell immunophenotyped identification was performed manually based on the median expression of all markers in the individual clusters.

For viSNE analysis (Cytobank), mapping integrating a total of 100000 cells sampled and analysed for each group FCS file. Parameter viSNE maps were created for the following markers: CD122, CD127, CD25, CD27, CD28, CD38, CD45RA, CD95, CCR7, CTLA4, CXCR5, HLA-DR, Ki-67, PD-1, pStat5, TIGIT, and Tim-3. The settings used for the viSNE run were as follow: iterations (4000), perplexity (50) and theta (0.5). The results are presented as means for 30 samples.

For the cell cycle analysis, we used the Behbehani's method. Briefly, to delineate cell cycle stages utilizing iododeoxyuridine (IdU) to mark cells in S phase, simultaneously with antibodies against Ki67 to separate cells in G0 and G1 phases, cyclin B1 to mark cells in G2 phase, and phosphorylated histone H3 (S28) that characterize cells in M phases. Analysis of the distinct cell cycle stages was performed using the dot plot display with FlowJo.

The viSNE map for CD32 was generated on 5767 randomly extracted events per samples. Dimensionality reduction was performed on the following markers: CD122, CD127, CD25, CD27, CD28, CD38, CD45RA, CD95, CCR7, CTLA4, CXCR5, HLA-DR, Ki-67, PD-1, pStat5, TIGIT, and Tim-3. The settings used for the viSNE run were as follow:

iterations (7500), perplexity (20) and theta (0.5). The results are presented as means for 17 samples.

All data generated were then analysed using the Tableau (Tableau desktop) and Prism (GraphPad) softwares. The Mann-Whitney *U* test was used to compare immunological parameters from HIV patients with healthy subjects. *P* values of <0.05 were considered as statistically significant.

iii. Results

a. Distribution of CD4 T cell subpopulations of peripheral blood

The same analysis by multiplex mass cytometry was performed on all blood samples, whether HIV-negative, HIV-positive under treatment or HIV-positive after therapeutic interruption. The SPADE analysis of the CD4 T cell differentiation state shows the distribution of the main CD4 T cells subsets in the CD4 cell compartment, that is to say, naive (TN: CD45RA+CCR7+CD27+), memory CD4 T cells including TCM (CD45RA-CCR7+CD27+), TTM (CD45RA-CCR7-CD27+) and memory effector (TEM CD45RA-CCR7-CD27-), as well as terminally-differentiated effector cells TEMRA/TE (CD45RA+CCR7-) (Figure 1A). It illustrates particularly well how the subset of TSCMs derived from TN (SCM: defined as CD45RA+CCR7+CD27+CD95+CD28+CD127+) and of Tfh cells (defined by CXCR5 +) that are close to the TCM subset. The proportions of these subsets are given in Figure 1B showing a significant decrease of TN and an increase of TEM and TEMRA/TE in the infected patient groups. These variations are consistent with the scientific literature in the context of HIV infection showing significant differentiation of CD4 T cells at the expense of naïve cells.

b. Co-expression of markers of activation, cycling and cell depletion in the different peripheral blood TCD4 + subpopulations

In order to properly define the activation status of peripheral blood CD4 subsets, mass cytometry allowed us to evaluate in more details the co-expression of Ki67, the classical cell cycle marker, with the activation markers (CD25, CD38 and HLA-DR) and immune-checkpoints (CTLA-4, PD-1, TIGIT and Tim3) depending on the patient group. The viSNE analysis (FIG. 2A) illustrates the increase in the expression of the HLA-DR and CD38 markers in the differentiated cells (TTM, TEM and TEMRA/TE): this increase in expression is correlated, in this population, with an increase of immune checkpoints PD-1, TIGIT and CTLA-4. Moreover, the cells in cycle are mainly localized in the same subset of hyper-activated and differentiated cells. In contrast, a small group of cells, predominantly TSCM co-expressed Ki67 and Tim-3, in accordance with our previous paper data, suggesting that Tim-3 is a cycle-bound marker in this subpopulation. Figure 2B shows that the cells in the HIV+ infected patient groups, and particularly those in the therapeutic shutdown, express more activation markers and immune-checkpoints in the

different subgroups, with the exception of CD25. In particular: Tim-3, CD38 and the Ki67 cycle marker, are clearly overexpressed in a context of productive viral infection compared to patients undergoing treatment in all cell groups with the exception of naive cells. TIGIT, HLA-DR, PD-1 and CTLA-4 are increased almost identically in both groups.

Finally, a conventional analysis allowed us to evaluate the cell cycle according to the different groups of patients. A significant decrease in G0 phase cells between HD and HIV-T vs. HIV-UT patients is observed, with a significant increase in all cycle phases except for phase M (Figure 2C).

c. Phenotypic characterization of CD32 cells

A phenotypic characterization of the CD32+CD3+CD8- cells was carried out, in order to define these potentially reservoir cells according to the publication of Descours B. First of all, 3 regions were determined: the CD32-, CD32 low and CD32 high cells. (Figure 3A). A decrease in CD4 MMI was demonstrated between HIV-UT patients compared to HD groups. This decrease was also observed, to a lesser extent, in the group of HIV-T patients (Figure 3B). This decrease in expression is particularly interesting because both TCR-activated and HIV-infected cells down-modulate the CD4 receptor.

In order to characterize these cells, we focused on the number of CD32-high cells in each subpopulation. A significant increase in differentiated CD32-high cells (TEM and TEMRA/TE) was demonstrated in the group of patients infected with the virus without treatment (Figure 3C).

The viSNE analysis then accurately assessed the subset distributions according to CD32 expression by considering, in groups, all donors and patient cells together (Figure 3D). This analysis showed that in CD32- cells we find mostly TN and TCM cells, regardless the group of patients, whereas CD32-low and CD32-high cells are cells at more advanced stages of differentiation. A very clear and significant increase in TSCM cells is shown in the CD32-high population, however this increase tends to be limited in the HIV-UT patient group. TEM cells also increase significantly in the CD32-high population but only for the untreated group of infected patients (Figure 3E).

Regarding activation, CD32+ cells express activation markers much more than CD32- cells, with increased activation levels in CD32-high cells compared to CD32 low cells regardless of cell subpopulation. Regarding cell exhaustion, however, no difference was found (Figure 3F).

Figures 4C, 4D, 4E and 4F show the representation of KI67+ and pStat5+ cells as a function of CD32 expression: an increase of Ki67+ cells is observed in untreated cells, with significant expression of Ki67 cells in the CD32-low fraction. Surprisingly the CD32-high cells expressed the cytokine signalling factor pStat5 almost exclusively; moreover, these cells expressed in the majority of cases at least one of the gamma-chain cytokine receptors of the panel: CD25, CD122 and / or CD127.

d. Cell characterization of infected cells

Identification of p24+ cells was then performed. To that end, we performed a manual "gating" of p24+cells in the entire CD3+CD8- cells of patients. The control of the background noise was defined on the CD3-CD56NK+ cells- (FIG. 4). The sample is considered positive when the difference between the p24+CD3+CD8- cells and the p24+ NK+ cells was greater than the sensitivity threshold, defined as the total mean plus 2 standard deviations of the p24+NK+ cells of the samples. Some p24+ cells were thus significantly observed in 3 patients: HIV12, HIV14 and HIV15, these 3 patients were all infected with a detectable viral load (Table 1). In none of the HD subjects nor treated subjects did we detect a p24 signal above this threshold in all CD3+CD8- cells.

We then became interested in phenotypes of p24+ positive cells in these 3 patients. Infected cells were enriched by an average factor of 5,8 in TSCM and a factor 2 in Tfh, whereas they were decreased by 4 for naive patients (10% of p24 + cells were TSCM and 7% of Tfh) (Table 3 - Subsets). For the CD32 marker, the cells were enriched by a factor of 18,8 however only 11% of the virus-producing cells were CD32+ (including CD32low and CD32high) (Table 3 – CD32 expression).

Concerning the cell cycle, the p24+ cells were enriched in all phases of the cycle (by a factor 9 for the G1 phase, and by a factor of 17 for phase S) except for phase M; they were even enriched by a factor of 958,59 for the G2 phase cells (Table 5 – Cell cycle). This data is consistent with the current literature since it has been shown that the virus blocks the infected cell in G2 phase, the latter never reaching the M phase. Concerning the activation markers, 17.62% of the p24 + cells expressed the 3 activation markers (CD38, CD25 and HLA-DR) against 0.63% of the p24- cells, which represents an increase of 52 times. (Table 5 – Activation markers)

Finally, by focusing on exhaustion markers, we observed that an average of 19.69% of p24+ cells expressed CTLA-4, whereas this marker was only expressed at

0.83% in the CD3+CD8- population. Similarly, PD-1, TIGIT and Tim3 showed an increase in their expression in the identified p24+ cells respectively of 68.13% against 22%, 48.8% against 26.73% and 26.81 against 2.18%. In addition, the p24+ cells expressing the 4 immune-checkpoints (CTLA-4+PD-1+Tim3+TIGIT) simultaneously represented 11% of the p24+ cells, with a ratio of 725 in comparison with the p24- cells. (Table 5 – Immune-Checkpoints markers).

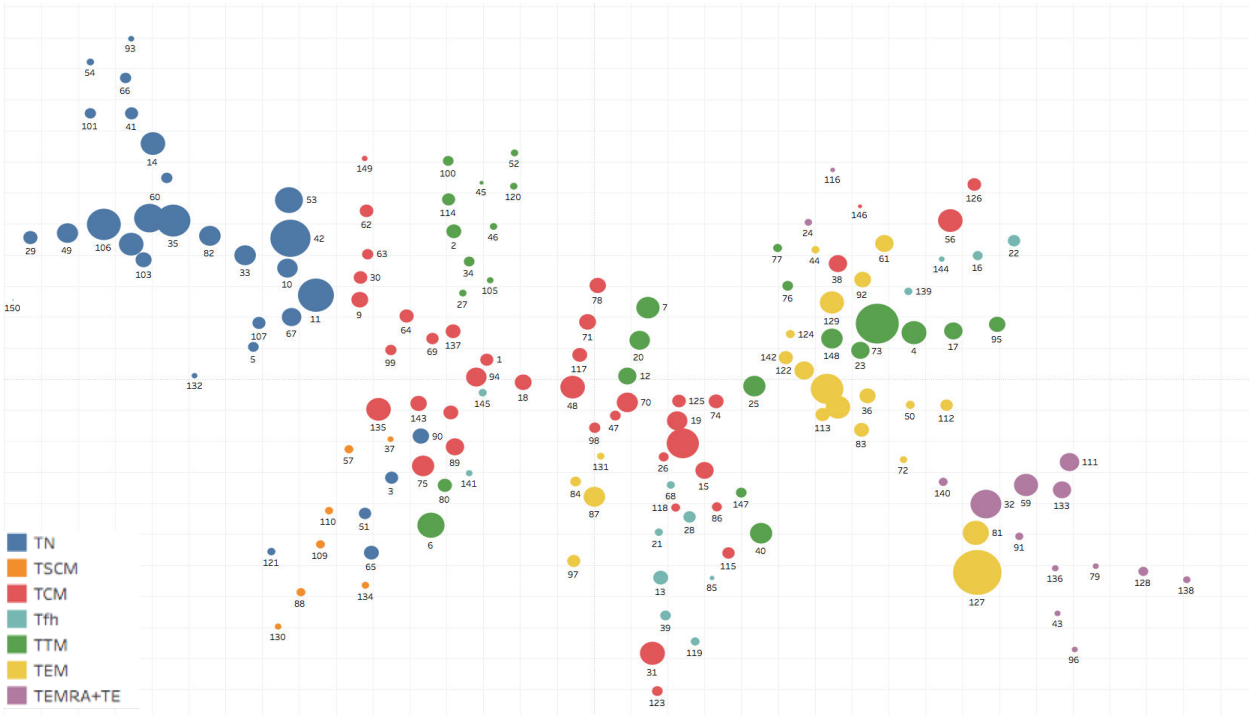


Figure 1A

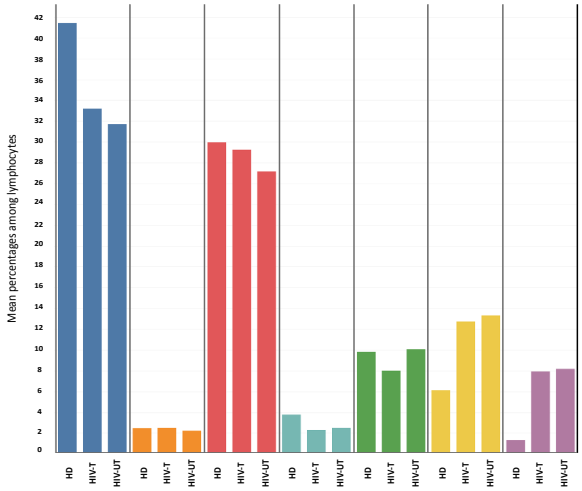
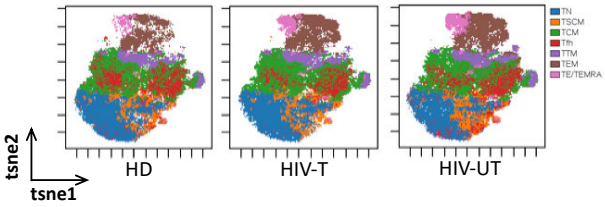


Figure 1B

Figure 1 Distribution of subsets in the peripheral blood CD4 compartment: 1A) SPADE tree was built using all samples (all patients and all treatments)., only the topology of the tree is displayed. SPADE clusters were annotated and colored with respect to the expression of markers as follows: TN: CD45RA+CCR7+CD27+, TCM: CD45RA-CCR7+CD27+, TTM: CD45RA-CCR7-CD27-, TEM: CD45RA-CCR7-CD27-, TEMRA/TE: CD45RA+CCR7-, TSCM: CD45RA+CCR7+CD27+CD95+CD27+ and Tfh: CXCR5+ **1B)** Distribution of the various subsets among patient groups (HD: Healthy donors , HIV-T: HIV+ patients under treatment and HIV-UT: HIV+ patients untreated-)



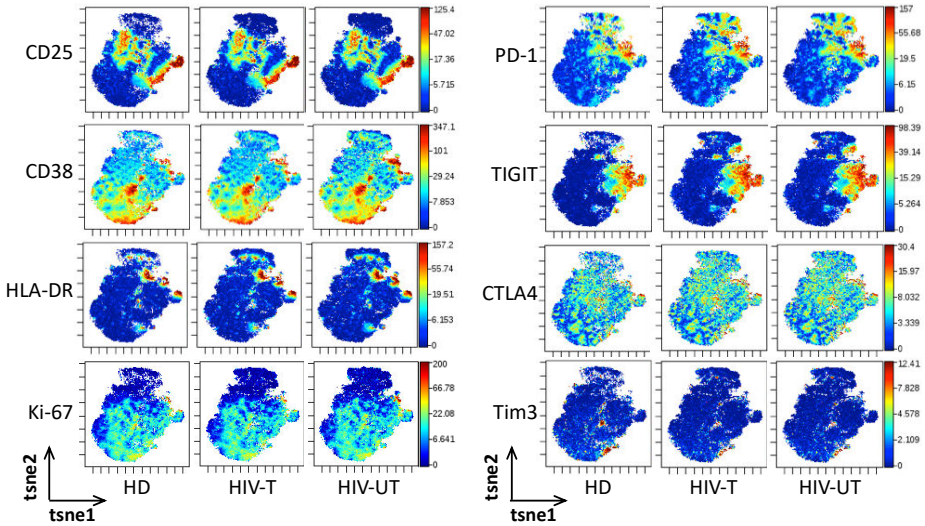


Figure 2A

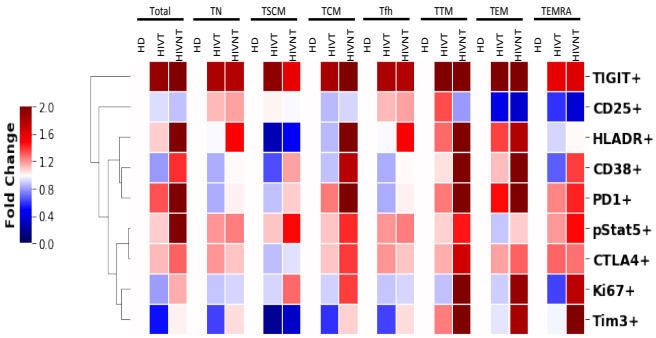


Figure 2B

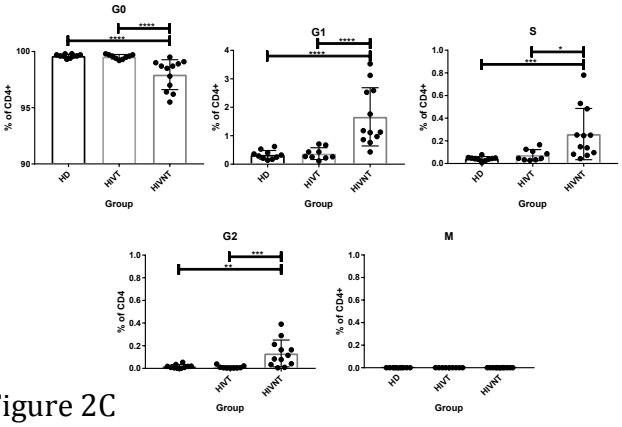


Figure 2C

Figure 2: Distribution of activation, exhaustion and cell cycle markers along patient groups of peripheral blood CD4 T 2A) viSNE analysis showing the distribution of the various subsets among the patient groups (HD, HIV-T and HIV-UT), the pattern of expression according to: Activation markers, (CD25, CD38 and HLA-DR), immune check points (PD-1, TIGIT, CTLA-4 and Tim-3) and cell cycle marker (Ki67). Each cell is represented as a point in high-dimensional space. **2B)** Heatmap for the fold change median marker expression visualization of activation, exhaustion and cell cycle marker expression in patient groups. The blue and red colours indicate higher and lower fold change in the marker expression, respectively, than healthy donor CD4 T cells. **2C)** The frequency of cells in each stage of the cell cycle (G0 phase: Ki67-, G1 phase: KI67+, S phase: Ki67+IdU+, G2 phase: Ki67+CyclinB1+and M phase: Ki67+pH3+, manually gated) depending on the patient group. Error bars indicate standard errors of the means.

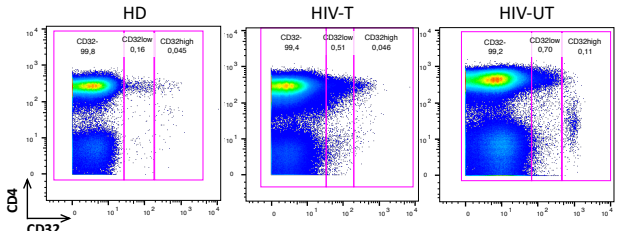


Figure 3A

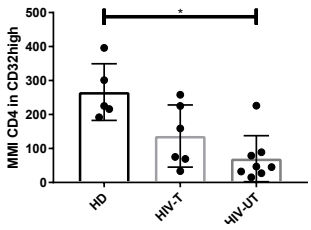
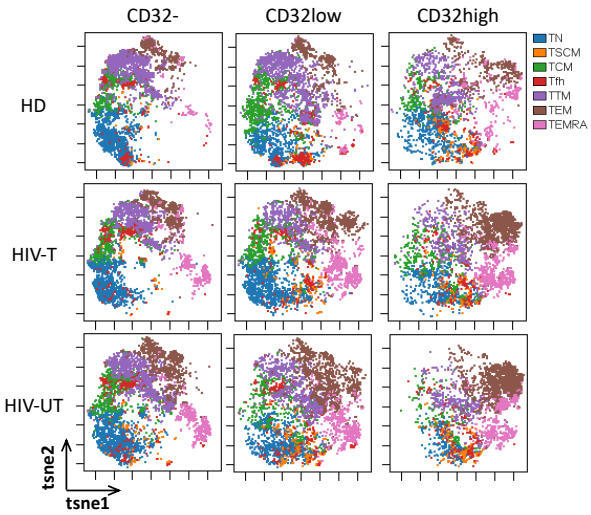


Figure 3B



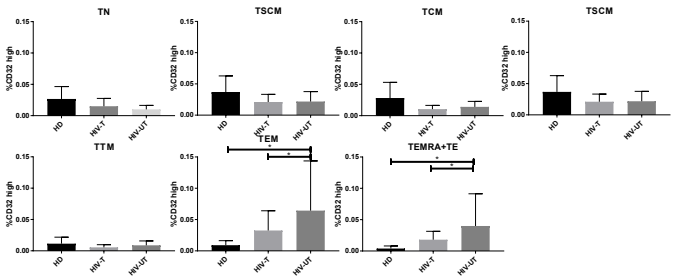
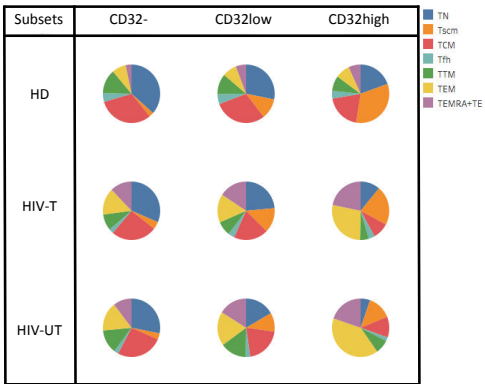


Figure 3C

Figure 3D



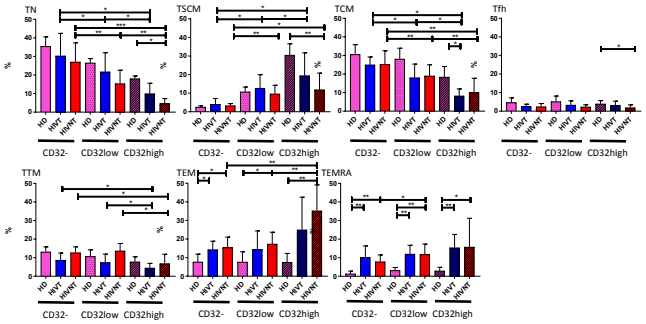


Figure 3E

Figure 3F

Figure 3: Phenotypic differentiation of CD32+CD3+CD8- cells 3A) Typical example of cytometry analysis CD32 from a representative HD, HIV-T and HIV-UT patient, **3B)** Mean metal intensity (MMI) of CD4 foci in CD32high cells according to each patient group. Bars represent the mean values and the corresponding standard error of the mean (SEM). Significance: *p ≤ 0.05, **3C)** CD32high expression of CD4 cells according to each patient group. Bars represent the percentage values and the corresponding standard error of the mean (SEM). Significance: *p ≤ 0.05, **3D)** viSNE analysis showing the distribution of the various subsets among the patient groups (HD, HIV-T and HIV-UT) and expression of CD32 (negative, low and high), **3E)** Distribution of CD4 subsets among patient group and CD32 expression, **3F)** Representation of the proportion of CD8- T cell subsets in CD32-, low and high for each patient group, Bars represent the percentage values and the corresponding standard error of the mean (SEM). Significance: *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001

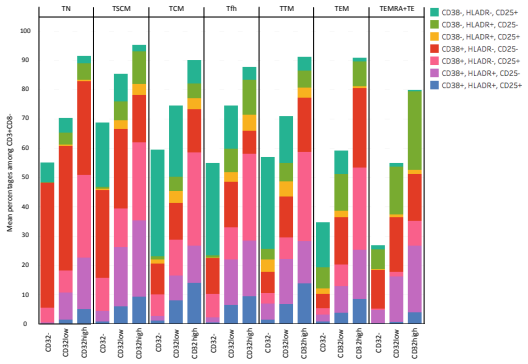


Figure 4A

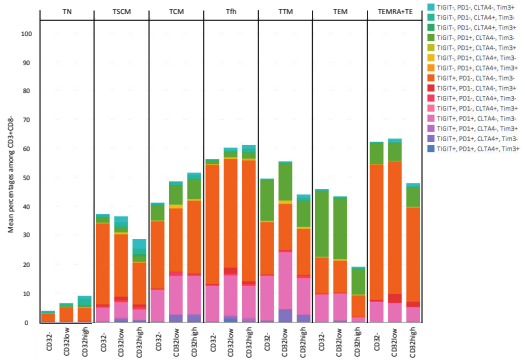


Figure 4B

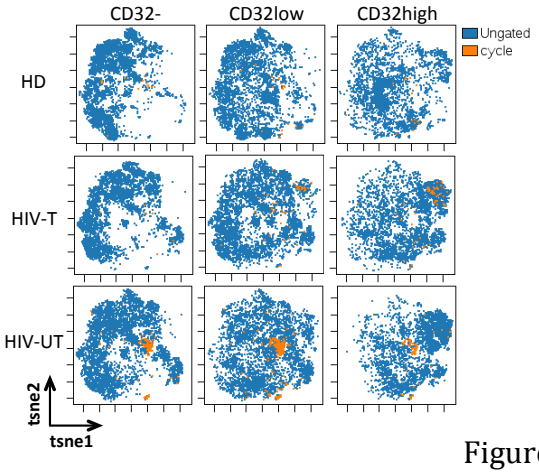


Figure 4C

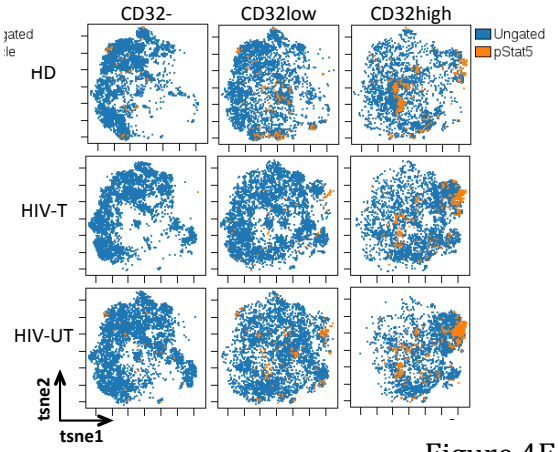


Figure 4E

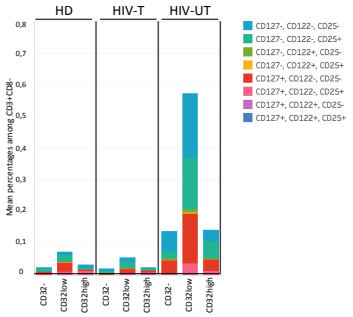


Figure 4D

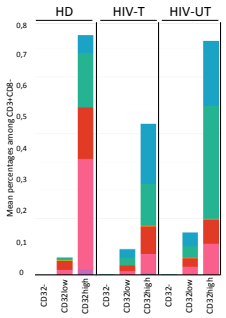


Figure 4F

Figure 4: Expression of activation, coinhibitory, cycle and transcription factor pStat5 markers in CD32+CD3+CD8- cells 4A) Distribution of activation markers and CD32 expression among the CD4 subsets, **4B)** Distribution of exhaustion markers and CD32 expression among the CD4 subsets **4C)** Overlaid viSNE maps showing concatenated patients from each group according to CD32 expression for Ki67- (blue) or Ki67+ (orange), **4D)** Mean Ki67 expression of CD3+CD8- cells among patient groups according to CD32 expression, inside each bar of the histogram is represented the co-expression of cytokine receptors (CD25, CD122 and CD127) **4E)** Overlaid viSNE maps showing concatenated patients from each group according to CD32 expression for pStat5- (blue) or pStat5+ (orange)., **4F)** Mean pStat5 expression of CD3+CD8- cells among patient groups according to CD32 expression, inside each bar of the histogram is represented the co-expression of cytokine receptors (CD25, CD122 and CD127).

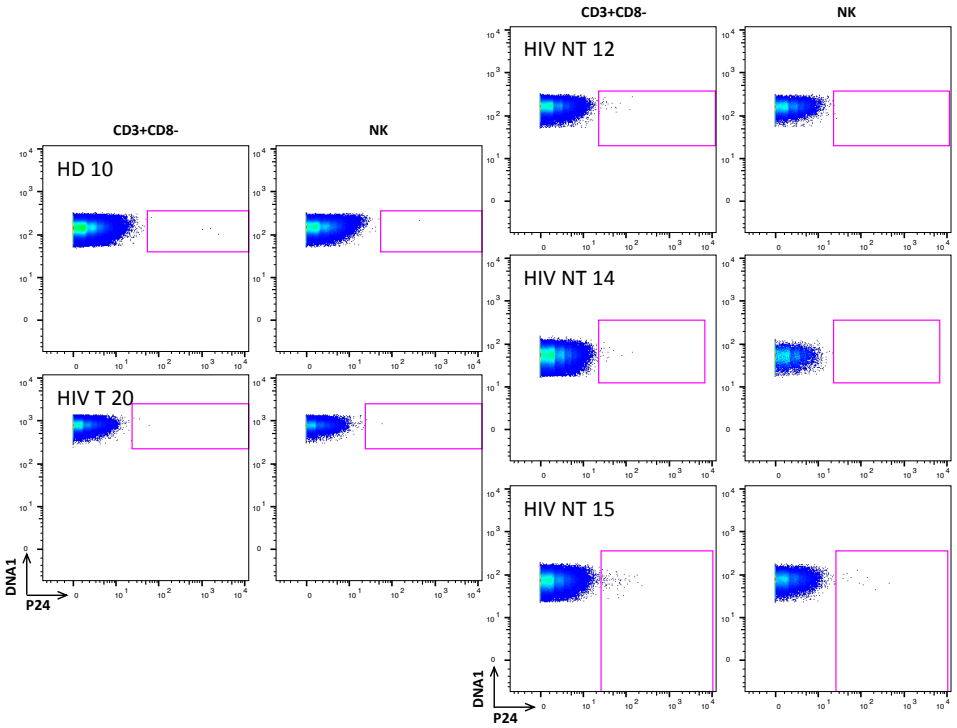


Figure 5

Figure 5: Cell characterization of infected cells p24+ Typical example of cytometry analysis p24 from a representative HD, HIV-T and all HIV-UT patients positive for p24 expression (patients HIV-12, HIV-14 and HIV-15)

Table 1 : List of patients

Patients	CYTOF CODE	ART		study arm	ATI	pIVL	CD4 counts	HIV-DNA	CD4 nadir
1	25	YES	D0			200	550	2,46	95
	15	NO			W28	414000	353		
2	20	YES	W-3	I		200,00	696	3,21	217
	4	YES	W6			200	523		
	14	NO			W28*	79400	421		
	14	NO			W32*	269000	381		
	21	NO			W48	196000			
6	9	NO			W36	231000	425	3,05	158
8	22	YES	W-3			200	557	2,56	330
	10	NO			W32	40300	425		
	23	NO			W48	78300	461		
9	24	YES	D0			200	681	2,79	195
	1	NO			W28*	204000	379		
	1	NO			W32*	288000	459		
17	2	NO			W28*	32400	737	2,05	354
	2	NO			W32*	40200	658		
18	16	YES	W4			200	627	2,66	294
	11	NO			W32	11300	465		
	17	NO			W48	26100	624		
21	5	YES	W6			200	768	2,88	256
	12	NO			W28*	285000	552		
	12	NO			W36*	57500	383		
22	6	YES	W6			200,00	542	2,89	178
	3	NO			W28	200,00	797		
	7	NO			W36	585000,00	532		
30	18	YES	W0			200,00	891	2,73	300
	13	NO			W28	143000,00	462		
	13	NO			W32	110000,00	559		
	19	NO			W48	90100,00	421		

Table 2 : List of antibodies

Anticorps	Métal	Référence DVS	Clone	Lot
Cell surface Markers				
CD3	154Sm	3154003B, DVS fluidigm	UCHT1	1351723
CCR7 (CD197)	159Tb	3159003A, DVS fluidigm	G043H7	3131004
CD122	170Er	3170004B, DVS fluidigm	Tu27	1691505
CD127	143Nd	3143012B, DVS fluidigm	A019D5	3261604
CD14	151Eu	3151009B, DVS fluidigm	M5E2	2351604
CD19	142Nd	3142001B, DVS fluidigm	HIB19	2221601
CD25	149 Sm	3149010B, DVS fluidigm	2A3	1271502
CD27	167Er	3167006B 3167002C	L128	3501404
CD28	160Gd	3160003B, DVS fluidigm	CD28,2	3131608
CD32a	156Gd	AF1875, Bio-techne (R&D systems)	Polyclonal	06/2017
CD38	144Nd	3144014B, DVS fluidigm	HIT2	1691511
CD4	145Nd	3145001B, DVS fluidigm	RPA-T4	1931719
CD45	89Y	3089003B, DVS fluidigm	HI30	0471704
CD45RA	169Tm	3169008B, DVS fluidigm	HI100	1501616
CD56	176Yb	3176008C, DVS fluidigm	NCAM16.2	1121516
CD8a	146Nd	3146001B, DVS fluidigm	RPA-T8	1671719
CD95	147Sm	555670, BD	DX2	01/2017
CTLA4	161Dy	3161004B, DVS fluidigm	14D3	1501706 + 3401602
CXCR5	171Yb	3171006B, DVS fluidigm	51505	1141316
HLADR	174Yb	3174001B, DVS fluidigm	L243	41719
LAG3	165Ho	3165028B, DVS fluidigm	874501	2171509
PD1	155Gd	3155009B, DVS fluidigm	EH12.2H7	3141607
TIGIT	153Eu	3153019B, DVS fluidigm	MBSA43	3421613
Tim3	172Yb	BLE345019, Ozyme	F38-2E2	01/2017
Intracellular Markers				
pStat5	150Nd	3150005A, DVS fluidigm	pY694 (47)	3271608
CTLA4	161Dy	3161004B, DVS fluidigm	14D3	1501706 + 3401602
CyclineB1	164Dy	3164010A, DVS fluidigm	GNS-1	0361505
Ki67	168Er	3168001B, DVS fluidigm	Ki-67	1691515
P24	158Gd	IMBULK1	KC57	05/2017
pAkt	152Sm	3152005A, DVS fluidigm	pS473 (D9E)	3261605
pH3	175Lu	3175012A, DVS fluidigm	Ser28 (HTA28)	2781602

Table 3 : Distribution of different : subsets, cell cycle phases, CD32 expression, immune-checkpoint expression (CTLA-4, PD-1, TIGIT and Tim3), and expression of activation markers (CD25, CD38 and HLA-DR) among p24- and p24 + cells

p24		p24+			p24-			Ratio
Patient		HIV15_NT	HIV14_NT	HIV12_NT	HIV15_NT	HIV14_NT	HIV12_NT	
Number of cells		72	23	24	699000	475000	614000	
Subsets	TN	9,72	4,40	8,33	27,60	20,70	49,00	0,24
	TSCM	5,56	13,00	12,50	3,44	1,31	2,12	5,81
	TCM	27,80	21,70	16,70	20,00	28,00	15,00	1,09
	Tfh	4,17	13,00	4,17	3,89	4,09	2,31	2,02
	TTM	25,00	21,70	25,00	14,80	21,20	8,73	1,86
	TEM	16,70	8,70	4,17	18,10	13,40	15,00	0,62
	TEMRA+TE	8,33	13,00	4,17	9,91	7,97	4,83	1,11
CD32 expression	CD32+ total	5,56	28,60	0,00	0,62	0,60	0,28	18,88
	CD32high	1,39	7,14	0,00	0,36	0,12	0,15	21,12
Cell cycle	PhaseG0	86,10	57,10	62,50	95,90	97,30	99,00	0,71
	PhaseG1	8,33	28,60	8,33	3,18	2,12	0,74	9,12
	PhaseS	1,39	7,14	4,17	0,73	0,36	0,14	17,17
	PhaseG2	2,78	7,14	20,80	0,03	0,01	0,01	958,59
	PhaseM	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Activation markers	CD25+	25,00	56,50	41,70	19,00	33,00	23,80	1,59
	CD38+	36,10	65,20	20,80	19,80	7,92	4,66	4,84
	HLADR+	43,10	91,30	25,00	22,30	6,54	7,31	6,44
Co-expression of activation markers	Triple positive	5,56	34,80	12,50	1,32	0,37	0,21	52,60
	Double positive	26,43	47,80	25,03	10,88	4,34	3,56	6,82
	single positive	34,74	13,05	54,13	35,40	37,74	28,04	1,09
	Triple negative	33,30	4,35	8,33	52,40	57,60	68,20	0,28
Immune-Checkpoint inhiibiteur	CTLA4+	4,17	17,40	37,50	1,63	0,60	0,25	60,52
	PD1+	59,70	73,90	70,80	29,00	23,40	13,90	3,44
	TIGIT+	48,60	47,80	50,00	41,70	21,10	17,40	2,10
	Tim3+	8,33	30,40	41,70	2,19	2,22	2,14	12,33
Co-expression of Immune-Checkpoint inhibitors	Quadruple positive	1,39	13,00	20,80	0,14	0,02	0,01	725,05
	Triple positive	4,17	8,70	16,67	1,35	0,47	0,41	20,64
	Double positive	37,47	34,80	20,84	19,74	10,97	6,34	2,79
	single positive	27,82	21,70	25,04	30,42	23,80	19,70	1,03
	Quadruple negative	29,20	21,70	16,70	48,40	64,70	73,50	0,39

iv. Discussion

This study is based on 3 groups of patients: healthy individuals, infected individuals with detectable viral load and infected individuals with ART with undetectable viral load.

The first part of the study presents the results of HIV infection in the CD4 T cells. Our results are consistent with current literature: the viral infection shows an increase in memory populations at the expense of naive populations. Similarly, an increase in CD38 and HLADR activation markers and TIGIT, CTLA-4, Tim3 and PD-1 immune-checkpoint markers are highlighted in a majority of the memory subsets. In addition, the evaluation of the cell cycle between the 3 groups indicates that untreated infected patients have a significant increase of the cells in cycle, except for the M phase. We expect that the proliferation stops in M phase. Indeed, HIV causes a cell cycle cessation at G2 phase which is accompanied by the elimination of CD4 + LT (Kurapati K.R. et al, 2015).

The second part of the study presents the analysis of the CD32+ in CD4 T cells subsets. Two levels of protein expression are observable: high and low. According to Descours et al., CD32a cells correspond to CD32high labelling, while CD32low cells mainly represent CD32b-activated cells. An increase of number of TSCM in CD32low and CD32high (mainly), regardless of the group of patients, and a strong increase of amount of TEM for infected patients (with or without treatment) are observed. In addition, a decrease of TN and TCM cells is demonstrated, mainly in infected patients. Then, a correlation between the intensity of CD32 and activation markers is also observed: the more CD32 is expressed, the more the cells are activated, and if this marker is a latent reservoir marker as it may have been presented, these cells should not have activation markers. Indeed, the previous study shows that the cells in the state of latency express less activation markers. Moreover, no correlation is made for the markers of exhaustion, which is, again, against the current literature explaining that the reservoir cells have more immune-checkpoint (Chomont N. et al., 2009). Finally, two points should be noted: the increase of cells in the CD32high cycle but also the phosphorylation of Stat5. Stat5 proteins are involved in cytosolic signalling and in the mediation of gene expression; they are activated by a cytokine signal. These two remarks suggest once more that these CD32high cells are not in a state of latency.

Finally, the comparative analysis of the expression of the p24 antigen carried out between the NK cells and the CD3 + CD8 + cells shows 3 patients having a significant number of p24 + cells in vivo in the CD3 + CD8 + cells. These cells are enriched in TSCM and Tfh, respectively by 4 and 2 times relative to the p24- cells. Likewise, these cells have a phenotype of CD38 + HLADR + CD25 + activated cells 38 times higher than p24- cells. But the most significant analysis remains the one on markers of exhaustion and on the assessment of the cell cycle: the CTLA-4 + PD-1 + TIGIT + Tim-3 + cells show a level of enrichment of this fraction of 200-fold and more than 500-fold enrichment of cells in G2 phase.

Thus, a signature of these infected cells has been carried out, showing that:

- in TSCM cells, one in 10,000 p24 + cells are identifiable.
- in the CD25 + CD38 + HLA-DR + activated cells, 3 × p24 + cells are identifiable,
- in the cells presenting the 4 immune-checkpoint markers CTLA-4 + TIGIT + Tim-3 + PD-1, 2 p24 + cells out of 100 are identifiable
- in G2 phase cells: 2 p24 + cells out of 100 are identifiable.

Hence, in addition to the questioning of the CD32 as a latent reservoir marker, a cell signature of the virus-infected cells could be characterized, mainly with immune-checkpoint and cycle markers. Based on the results obtained, sorting the fresh cells from the “signature cells” of non-viremic patients and looking for an integrated provirus or a productive virus could confirm and refine these results.

v. References

Banga R, Procopio FA, Noto A, Pollakis G, Cavassini M, Ohmiti K, Corpataux JM, de Leval L, Pantaleo G, Perreau M. 2016. PD-1(+) and follicular helper T cells are responsible for persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals. Nat Med 22:754-61.

Buzon MJ, Sun H, Li C, Shaw A, Seiss K, Ouyang Z, Martin-Gayo E, Leng J, Henrich TJ, Li JZ, Pereyra F, Zurakowski R, Walker BD, Rosenberg ES, Yu XG, Lichterfeld M. 2014. HIV-1 persistence in CD4+ T cells with stem cell-like properties. Nat Med 20:139-42

Corneau, A., Cosma, A., Even, S., Katlama, C., Le Grand, R., Frachet, V., ... & Autran, B. (2017). Comprehensive Mass Cytometry Analysis of Cell Cycle, Activation, and Coinhibitory Receptors Expression in CD4 T Cells from Healthy and HIV‐Infected Individuals. Cytometry Part B: Clinical Cytometry, 92(1), 21-32.

Descours, Benjamin; Petitjean, Gaël; López-Zaragoza, José-Luis; Bruel, Timothée; Raffel, Raoul; Psomas, Christina; Reynes, Jacques; Lacabaratz, Christine; Levy, Yves; Schwartz, Olivier; ,CD32a is a marker of a CD4 T-cell HIV reservoir harbouring replication-competent proviruses,Nature,543,7646,564,2017,Nature Publishing Group

Fromentin, R., Bakeman, W., Lawani, M. B., Khoury, G., Hartogensis, W., DaFonseca, S., ... & Hecht, F. M. (2016). CD4+ T cells expressing PD-1, TIGIT and LAG-3 contribute to HIV persistence during ART. PLoS pathogens, 12(7), e1005761.

Gosselin A, Wiche Salinas TR, Planas D, Wacleche VS, Zhang Y, Fromentin R, Chomont N, Cohen EA, Shacklett B, Mehraj V, Ghali MP, Routy JP, Ancuta P. 2017. HIV persists in CCR6+CD4+ T cells from colon and blood during antiretroviral therapy. Aids 31:35-48.,

Martin GE, Pace M, Thornhill JP, Phetsouphanh C, Meyerowitz J, Gossez M, Brown H, Olejniczak N, Lwanga J, Ramjee G, Kaleebu P, Porter K, Willberg CB, Klenerman P, Nwokolo N, Fox J, Fidler S, Frater J. 2018. CD32-Expressing CD4 T Cells Are Phenotypically Diverse and Can Contain Proviral HIV DNA. Frontiers in Immunology 9.

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. L'apport de la cytométrie de masse dans l'analyse des réservoirs du VIH

L'objectif de ce travail a été de caractériser au plus proche de la réalité les cellules réservoirs latentes et productrices de VIH en utilisant une nouvelle technologie : la cytométrie de masse.

La cytométrie de masse, cousine de la cytométrie en flux, présente de nombreux avantages : l'utilisation de métaux lourds évite le problème des chevauchements spectraux et rend ainsi possible de multiplier le nombre de marqueurs pouvant être analysés simultanément (à ce jour 41). De plus, la cytométrie de masse permet de s'affranchir de l'auto-fluorescence cellulaire et limite ainsi le bruit de fond. Ces différents atouts ont permis la mise en place de différentes études, jusqu'alors impossibles à réaliser en cytométrie en flux. Par exemple, l'étude du cycle cellulaire corrélé aux marqueurs membranaires était limitée en cytométrie de flux, de par le nombre restreint de sondes. Or, dans le cadre de ce projet, la caractérisation du cycle est essentielle afin d'identifier les cellules latentes, et donc au repos.

De même, la caractérisation des différentes sous populations en association avec différents marqueurs d'activation et d'épuisement n'est possible, à l'heure actuelle, qu'en cytométrie de masse, car sa large capacité de détection en fait la seule technique permettant de réaliser un phénotypage précis et complet.

C'est grâce à tous ces avantages qu'il est devenu profitable de se tourner vers la CMM, afin de contourner les écueils de la CMF et d'aboutir à une analyse des cellules infectées VIH+, en corrélation avec les marqueurs de différenciation cellulaire, les immune-checkpoints, les marqueurs d'activation et de cycle cellulaire. Ces travaux avaient également pour objectif d'identifier une signature de cellules réservoirs latentes et productrices du VIH. La CMM nous a permis d'évaluer au plus près de la réalité les cellules productrices du virus, malgré la faible quantité de cellules positives.

2. La relation cycle cellulaire et marqueurs phénotypiques

La première partie de ce travail de thèse consistait à donner une définition précise, au niveau cellulaire, des LTCD4+ du sang périphérique au repos. Pour ce faire, une analyse multiplexe du statut cellulaire du cycle, combinée à des marqueurs de différenciation, d'activation et d'épuisement dans un contexte d'infection par le VIH a été réalisée.

Cette étude a permis de mieux caractériser les sous-ensembles de lymphocytes T CD4+ : naïfs (TN) et mémoires (TSCM, TCM, Tfh, TTM, TEM et TEMRA), avec une attention particulière sur l'analyse des deux sous populations découvertes récemment : les TSCM et les Tfh. Initialement, les TSCM ont été décrits comme un sous ensemble de cellules naïves ; néanmoins, ces cellules présentent des caractéristiques plus proches en termes d'activation des TCM, et sont les cellules qui cyclent le plus parmi tous les autres sous-types.

Par ailleurs, cette étude montre une véritable proximité phénotypique des cellules Tfh et TCM en phase G0 et G1 ; cependant, les Tfh en phase S-G2-M sont plus proches des cellules TEM. Au final, les Tfh présentent des caractéristiques transversales entre les TCM, TTM et TEM en fonction de leur état d'activation et de leur cycle.

Ensuite, une analyse combinée des 3 marqueurs d'activation de l'étude (CD25, CD38 et HLADR) avec le cycle cellulaire nous a permis de définir des sous-ensembles en fonction de l'expression différentielle de chacun d'eux. CD25 et CD38 sont fortement exprimés dans les cellules en phase G0 dans les sous populations les moins différenciées. En revanche, ces deux marqueurs sont également exprimés dans les cellules en cycle (G1-S-G2-M), dans des sous-ensembles mémoires ayant rencontré l'antigène (Tfh, TCM, TTM et TEM). Comme cela a été exposé précédemment, les TSCM présentent l'activité cyclique la plus importante des sous-populations, même lorsque CD25 et HLADR ne sont pas exprimés, ce que l'on retrouve également dans les sous-ensembles TCM, Tfh et TTM. Sachant que HLADR sur le LT est caractéristique de l'activation dirigée contre le pathogène, ces données suggèrent que les TSCM pourraient non seulement répondre aux signaux homéostatiques, mais également aux stimuli antigéniques.

Ce travail s'est également focalisé sur différents marqueurs d'épuisement : PD-1, Lag-3, Tim-3 et TIGIT. L'information la plus intéressante est que Tim-3 semble être fortement lié au cycle cellulaire dans tous les sous-ensembles de LTCD4. A l'inverse, l'entrée en cycle n'affecte pas l'expression de PD-1 dans les cellules hautement

différenciées (TEM et TEMRA), mais seulement dans les TSCM, TCM et TTM. De même, l'expression de TIGIT n'est pas affectée par l'entrée en cycle. En conséquence, les profils de ces marqueurs inhibiteurs associés au cycle cellulaire révèlent de nouvelles perspectives dans la définition des sous-ensemble T. Cependant, aucune détection de l'expression de ces marqueurs n'a pu être mise en évidence entre les patients VIH+ traités et les individus sains. Néanmoins, cette analyse reste pertinente pour l'identification de cellules réservoirs. En effet, le fait que Tim-3 soit augmenté dans les cellules en cycle ouvre des voies pour l'analyse de ces cellules, notamment avec le tri de cellules Tim-3+ de patients VIH+ traités ou non afin de voir si elles sont enrichies en virus et si ce virus est latent ou productif.

Pour conclure, 2,5% des LTCD4+CD25-HLADR- sont en cycle, principalement en phase G1, et il n'est donc pas pertinent de dire que ces cellules sont en état de quiescence. Cette information est importante pour les études sur les réservoirs latents du VIH, étant donné que la majorité des études évaluent ces cellules latentes comme CD25-HLADR- et que cette petite proportion de cellules pourrait être suffisante pour transporter un nombre substantiel de copies du VIH. Par conséquent, l'analyse des cellules infectées nécessite une redéfinition des marqueurs de surface, pour permettre une sélection des vraies cellules au repos, si l'on veut ensuite analyser finement et efficacement les mécanismes moléculaires qui entrent en jeu pour le maintien de la latence virale et l'évaluation des futurs outils pour traiter l'infection.

Dans ce premier projet, l'analyse complexe de l'activation, du cycle et des immune-checkpoint des LTCD4+ d'individus sains et de patients sous ART souligne l'intérêt de la CMM pour délimiter les caractéristiques multiparamétriques des sous-ensembles lymphocytaires et leur positionnement dans la différenciation cellulaire. Nos résultats démontrent que seule une analyse en CMM peut fournir une redéfinition appropriée des compartiments cellulaire au repos et activés.

Plusieurs points sont néanmoins à souligner : tout d'abord, le choix du protocole nous a empêché de pouvoir évaluer les Treg en utilisant le facteur de transcription approprié FoxP3. En effet, l'analyse de ce marqueur n'est pas possible avec l'utilisation du méthanol pour la perméabilisation cellulaire, celui-ci induisant une dégradation de sa structure. Ensuite, la taille de l'échantillon cellulaire de l'étude ne nous a pas permis d'évaluer en profondeur les effets du VIH sur le cycle cellulaire et l'activation. Le fait de ne marquer que 5 millions de cellules reste limitant pour une analyse du cycle cellulaire

des sous populations les plus faiblement représentées. Enfin, notre étude pourrait avoir sous-estimé la proportion de cellules en cycle : d'une part, le travail s'est fait sur des PBMC décongelés, induisant une potentielle destruction des cellules les plus fragiles, mais également car l'analyse pour séparer les cellules en phase G0/G1 est difficile à réaliser. En effet, pour pouvoir séparer les cellules en phase G0/G1, l'utilisation de l'anticorps anti-pRb reste le marqueur de choix. Toutefois, ce marqueur présente un continuum difficile à délimiter.

3. Le réservoir viral : Étude du CD32 et des réservoirs productifs

Le second travail de cette thèse avait pour objectif de s'intéresser à deux points clés de l'infection virale : l'analyse d'un marqueur considéré comme « marqueur de réservoir latent », le CD32a et l'évaluation de cellules productrices de VIH (Descours B., et al., 2017).

Cette étude s'est basée sur 3 groupes de patients : des individus sains, des individus infectés avec une charge virale détectable et des individus infectés sous ART avec charge virale indétectable.

La première partie de l'étude présente les résultats de l'infection VIH dans la population CD3+CD8- (l'infection par le VIH induit une diminution de l'expression de la protéine CD4). Nos résultats sont cohérents avec la littérature actuelle : l'infection virale montre une augmentation des populations mémoires au détriment des populations naïves. De même, une augmentation des marqueurs d'activation CD38 et HLADR et des marqueurs d'épuisement TIGIT, CTLA-4, Tim3 et PD-1 est mise en évidence dans une majorité des sous populations mémoires. De plus, l'évaluation du cycle cellulaire entre les 3 groupes indique que les patients infectés non traités ont une augmentation significative des cellules en cycle, excepté pour la phase M. Cet arrêt de prolifération en phase M est attendu. En effet, le VIH entraîne un arrêt du cycle cellulaire à la phase G2 et s'accompagne d'une destruction des LT CD4+ (Kurapati K.R. et al, 2015).

La seconde partie de l'étude présente l'analyse des sous populations CD32a+. Dans un premier temps, en évaluant le CD32a sur PBMC humains d'individus sains, il s'est avéré que ce marqueur était identifiable sur les monocytes, les lymphocytes B et une fraction des lymphocytes T. Or, CD32a n'est pas exprimé sur les LB, mais uniquement sur les cellules myéloïdes et sur les LT. En effet, les anti-CD32 humains disponibles présentent une réactivité croisée avec les deux isoformes de CD32 (a et b), qui possèdent une homologie de 96% dans leur région extracellulaire. Afin d'identifier de manière spécifique les cellules CD32a et CD32b positives lors de l'analyse, on peut se baser sur l'intensité de marquage. En effet, deux niveaux sont observables : high et low. D'après le papier de Descours et al., les cellules CD32a correspondent au marquage CD32high, tandis que les cellules CD32low représentent principalement des cellules activées CD32b. Ainsi, pour ce travail, 3 populations ont été identifiées : les CD32-, les CD32low et les CD32high dans les 3 groupes de patients. En croisant toutes les informations à l'aide d'une analyse non supervisée et automatique viSNE, une

cartographie de toutes les populations de ces 3 groupes a été effectuée. Au niveau des marqueurs de différenciation, une augmentation des TSCM dans les CD32low et CD32high (principalement), quel que soit le groupe de patients, et une augmentation forte des TEM pour les patients infectés (avec ou sans traitement) sont observées. Par ailleurs, une diminution des cellules naïves et TCM est mise en évidence, principalement chez les patients infectés. Ensuite, une corrélation entre l'intensité de CD32 et les marqueurs d'activation a été observée : plus le CD32 est exprimé, plus les cellules sont activées, or, si ce marqueur est un marqueur de réservoir latent comme il a pu être présenté, ces cellules ne devraient pas présenter de marqueur d'activation. En effet, l'étude précédente montre que les cellules à l'état de latence expriment moins de marqueurs d'activation. Par ailleurs, aucune corrélation n'est faite pour les marqueurs d'épuisement, ce qui est, là encore, à l'encontre de la littérature actuelle explicitant que les cellules réservoirs présenteraient plus d'immune-checkpoint (Chomont N. et al., 2009). Enfin, 2 points sont à souligner : l'augmentation des cellules en cycle dans les CD32high mais également de la phosphorylation de Stat5. Les protéines Stat5 sont impliquées dans la signalisation cytosolique et dans la médiation de l'expression génique ; elles sont activées par un signal cytokinique. Ces deux remarques suggèrent là encore que ces cellules CD32high ne sont pas en état de latence.

Le dernier point de l'analyse nous focalise sur la recherche et la caractérisation des cellules exprimant la protéine p24. L'analyse comparative de l'expression de l'antigène p24 a été réalisée sur les cellules NK et sur les cellules CD3+CD8-. L'identification des cellules NK+p24+ permet de déterminer le bruit de fond (ces cellules ne sont pas infectées par le virus) et de mettre en évidence 3 patients présentant des cellules p24+ *in vivo* dans les cellules CD3+CD8-. L'analyse classique bi-paramétrique de ces cellules montre qu'elles sont enrichies en TSCM et en Tfh, respectivement de 4 et 2 fois par rapport aux cellules p24-. De même, ces cellules ont un phénotype de cellules activées CD38+HLADR+CD25+ 38 fois supérieur aux cellules p24-. Mais l'analyse la plus significative reste celle sur les marqueurs d'épuisement et sur l'évaluation du cycle cellulaire : les cellules CTLA-4+PD-1+TIGIT+Tim-3+ montrent un niveau d'enrichissement de cette fraction de 200 fois et un enrichissement de plus de 500 fois de cellules en phase G2. Ainsi, une signature de ces cellules infectées a été réalisée, montrant que :

- dans les cellules TSCM, une cellule p24+ sur 10000 est identifiable,

- dans les cellules activées CD25+CD38+HLA-DR+, 3 cellules p24+ sur 10000 sont identifiables,
- dans les cellules présentant les 4 marqueurs d'épuisement CTLA-4+TIGIT+Tim-3+PD-1, 2 cellules p24+ sur 100 sont identifiables
- dans les cellules en phase G2 : 2 cellules p24+ sur 100 sont identifiables.

Plusieurs points sont également à noter : tout d'abord, l'analyse de Lag3 n'a pu être réalisée, il s'agit d'un marqueur très faiblement exprimé qui n'a pas été observé sur les fractions des cellules CD3+CD8-, malgré un grand nombre de cellules acquises (en moyenne 6 millions d'évènements ont été acquis par échantillon). De plus, afin de contourner le bruit de fond de l'anti-p24, le choix du seuil de spécificité a été déterminé sur la population NK. Ce seuil sous-estime peut-être la quantité de cellules p24 identifiées. Enfin, l'analyse n'a pas pu détecter les cellules infectées productrices de virus ayant souffert de la cytopathogénicité virale. On ne peut donc pas totalement exclure que ces cellules aient disparu en particulier du fait que l'analyse a porté sur cellules congelées.

Ainsi, outre la remise en cause possible du marqueur CD32 en tant que marqueur de réservoir latent, une signature cellulaire des cellules infectées par le virus a pu être caractérisée, principalement avec les marqueurs d'épuisement et de cycle. Sur la base des résultats obtenus, le tri de cellules fraiches de patients non virémiques de ces cellules « signatures » afin d'y chercher un provirus intégré ou un virus productif permettrait de confirmer et d'affiner ces résultats.

4. L'analyse de données

La cytométrie de masse a révolutionné l'étude de la diversité cellulaire, en augmentant de manière significative le nombre de caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles qui peuvent être mesurées au niveau unicellulaire. Cette technologie permet une analyse multidimensionnelle mais qui nécessite le développement de nouvelles approches analytiques pour pouvoir être pleinement exploitée. L'analyse des données de CMM nécessite un changement majeur dans la façon d'aborder les données, passant des stratégies booléennes définies par l'expérimentateur à l'identification automatisée des clusters et des phénotypes cellulaires. Bien que la connaissance biologique demeure essentielle pour interpréter ces données de grande dimension, la compréhension des outils à utiliser pour aborder des questions biologiques spécifiques reste un obstacle majeur. De plus, le grand nombre d'algorithmes qui ont été développés ces dernières années, ainsi qu'un manque de consensus sur les meilleures pratiques analytiques, soulèvent plusieurs questions : quel algorithme est le meilleur pour répondre à la question scientifique posée ? Comment les différents algorithmes se comparent-ils ? Comment peut-on aller au-delà de la visualisation de données pour acquérir de nouvelles connaissances biologiques ?

Les travaux que j'ai réalisés au cours de ma thèse permettent de répondre à un large éventail de questions scientifiques, qui vont de l'analyse phénotypique complexe des différents sous-ensembles cellulaires spécifiques, à la cartographie de l'hétérogénéité cellulaire. Ces données contiennent une abondance d'informations : abondance cellulaire et profils d'expression, identification, évolution et quantification de la diversité cellulaire. Bien que les algorithmes conventionnels de cytométrie de flux et de synchronisation booléenne puissent donner un aperçu de certaines de ces données (telles que l'abondance et l'expression cellulaires), une analyse de données plus approfondie est souvent inaccessible avec plus de 20 marqueurs.

i. L'analyse non supervisée automatique par clustering : utilisation de SPADE

La première question à se poser au niveau du choix de l'analyse et de l'algorithme est de savoir si les cellules sont présentées dans un continuum de phénotypes et/ou associées en sous-populations, pour caractériser la structure de la population. En effet, la différenciation cellulaire est identifiable par des algorithmes qui accumulent les

événements en famille. Le choix d'un algorithme de clusterisation comme SPADE nous permet cela, sous-échantillonnant dans un premier temps les données pour identifier des populations rares puis hiérarchisant les cellules phénotypiquement similaires en « nœuds », triant l'intégralité des données dans ces nœuds, puis représentant ces nœuds et les relations entre eux sous la forme d'un arbre. Le nombre de nœuds, le pourcentage de sous-échantillonnage, la sélection de la population et la sélection des paramètres (par exemple, quels marqueurs phénotypiques doivent être utilisés pour l'analyse de regroupement) sont à prendre en compte dans cette analyse. L'arborescence SPADE résultante contient une série de nœuds interconnectés, avec un nombre de cellules indiquant la taille de nœud et une couleur de nœud quantifiant le paramètre d'intérêt.

Plusieurs considérations importantes dans l'utilisation de SPADE sont à prendre en compte :

- La décision du nombre de nœuds qui doivent être présents dans l'arborescence. Par exemple, lorsque l'algorithme SPADE est appliqué aux données en choisissant trop de nœuds (par exemple 1000 dans notre cas), l'aboutissement du SPADE serait la création de nombreux nœuds qui ne contiennent plus qu'un seul événement, suggérant une sur-fragmentation des données. A l'inverse, en ne choisissant pas assez de nœuds, l'aboutissement du SPADE serait une sous-fragmentation des données, regroupant les cellules les plus rares dans des nœuds, induisant des nœuds non homogènes.
- Un autre point clé lors de l'utilisation de cet algorithme est le nombre de paramètres inclus dans l'analyse. Dans cette étude, nous avons fait le choix de se calquer sur les marqueurs de différenciation afin d'avoir le meilleur clustering possible sur l'analyse des différentes sous population de LTCD4+ (CCR7, CD27, CD28, CD45RA, CD95, CD127, CXCR5).

Une fois qu'un arbre SPADE est généré, l'objectif suivant est de définir quelles cellules sont présentes dans quel nœud. Étant donné que les branches de l'arbre SPADE sont communes aux différents échantillons et que les nœuds varient en intensité et en taille, cette approche permet une inspection rapide des individus et des phénotypes. Ainsi, une évaluation rapide de l'identité cellulaire des différents nœuds est faite, et la reproductibilité et la variabilité interindividuelle sont faciles à analyser. Cet algorithme est un puissant outil de visualisation, permettant d'obtenir rapidement des indices sur les différences potentielles entre les groupes.

Cependant, il est important de vérifier la fréquence des événements dans tous les nœuds. Dans ce cas, une évaluation visuelle reste insuffisante. Ces données soulignent l'intérêt d'intégrer des analyses quantitatives et visuelles pour explorer pleinement une analyse SPADE. De plus, une limitation majeure de SPADE reste le fait qu'il n'y ait pas de mesure de contrôle qualité pour identifier les analyses optimales par rapport aux analyses sous-optimales.

Afin d'évaluer au mieux les résultats fournis par SPADE, l'utilisation de SPADEVizR (Gautreau G. et al., 2017) a été testée. Il s'agit d'un package R permettant d'obtenir des contrôles qualité sur la quantification et la visualisation des résultats du clustering. La clusterisation des cellules est évaluée à l'aide de "heatmaps" fournissant des précisions sur l'homogénéité d'expression des marqueurs dans chaque nœud. Les clusters ayant des phénotypes uniformes sont quantifiés par des tests statistiques (le Dip test, qui évalue la multi-modalité d'un échantillon, et par l'écart interquartile, qui mesure la dispersion de l'échantillon). Les clusters uniformes sont définis comme des clusters ayant des distributions d'expression uni-modale pour chaque paramètre inclus dans l'analyse et ayant une faible diffusion des expressions pour tous les marqueurs de clustering.

ii. L'analyse non supervisée automatique par réduction de dimensions : utilisation de viSNE

La seconde question est de s'interroger avec plus de précision sur les co-expressions des marqueurs d'activation et d'immune-checkpoint. Pour ce faire, l'utilisation de viSNE a été essentielle. viSNE est un outil d'analyse qui utilise l'algorithme « t-distributed stochastic neighbor embedding » (tSNE) pour analyser et afficher des données de grandes dimensions sur une carte bidimensionnelle. L'image résultante montre un continuum de phénotypes cellulaires avec des cellules apparentées phénotypiquement regroupées, se manifestant souvent par des "îlots" phénotypiques, répartis par les paramètres tSNE1 et tSNE2, avec des cellules colorées de différentes intensités en fonction de l'expression d'un paramètre choisi. Pour viSNE, trois paramètres sont à définir : la sélection des échantillons à analyser, la sélection des paramètres et l'échantillonnage. L'un des premiers objectifs de l'interprétation d'une analyse viSNE est de définir où les différents types cellulaires sont situés. Ceci est défini par les connaissances biologiques (ici : TN : CCR7+CD27+CD28+CD45RA+CD95-CXCR5-,

TSCM : CCR7+CD27+CD28+CD45RA+CD95+CXCR5, TCM : CCR7+CD27+CD28+ CD45RA-CD95+CXCR5-, Tfh : CXCR5+, TTM : CCR7-CD27+CD28CD45RA-CD95+CXCR5-, TEM : CCR7-CD27-CD28-CD45RA-CD95+CXCR5- et TE/TEMRA : CCR7-CD28-CD45RA+CD95-CXCR5-). Cela permet l'identification rapide de phénotypes cellulaires à travers différents « îlots », permettant d'obtenir un aperçu des populations et des phénotypes cellulaires qui changent entre les groupes expérimentaux. Cette approche garantit que tous les événements sont tracés en fonction d'une échelle commune. C'est à dire qu'un écart dans la distribution des îlots entre deux conditions peut indiquer un type cellulaire modifié. Dans l'analyse en réalisant un overlay (à l'aide d'une analyse manuelle hiérarchique) des viSNE en fonction de l'expression de CD32, de multiples changements dans la distribution des îlots phénotypiques sont identifiables. En analysant les images viSNE sur les paramètres d'activations et d'immune-checkpoint et en recherchant les niveaux d'expression modifiés, les cellules CD32high présentent une expression plus élevée des marqueurs d'activation, et les cellules des patients VIH+ présentent une augmentation des immune-checkpoint. Ces résultats ont été corroborés en réalisant les analyses booléennes des groupes dans FlowJo, un logiciel d'analyse de cytométrie de flux classique, permettant de quantifier l'analyse visuelle réalisée avec viSNE.

iii. L'analyse des populations rares

Ces deux algorithmes sont particulièrement pertinents pour l'analyse de populations générales ; cependant, l'objectif du travail était également d'analyser des populations extrêmement rares (population en cycle et cellules infectées par le VIH). Ces approches ne permettent pas de "clusteriser" ou de regrouper efficacement ces cellules. Dans le papier de Weber et Robinson, l'efficacité de différents algorithmes pour l'identification de populations rares à l'aide du score F1 est évaluée. Ce score qui fournit une valeur comprise entre 1 et 0 (1 : correspond à une reproduction parfaite de la population sélectionnée par analyse manuelle conventionnelle). Plus de la moitié des algorithmes testés présentent un score F1 très bas pour l'identification de populations rares. Un algorithme se détache en revanche : x-shift. Ainsi, pour pouvoir caractériser ces populations, l'utilisation d'x-shift semblait la plus pertinente. Cependant, le temps d'exécution de celui-ci et le faible nombre de cellules qu'il est possible d'inclure dans le calcul n'a pas permis d'obtenir de résultats satisfaisants. À ce jour, l'identification de ces populations très rares (de l'ordre de 0,001%) avec des algorithmes analytiques n'est pas

efficace. Le choix de se tourner vers l'analyse conventionnelle bi-paramétrique et l'analyse en booléenne a été la solution la plus appropriée pour caractériser ces populations (Weber L.M. and Robinson M.D., 2016).

Pour conclure, l'avènement de la cytométrie de masse a transformé l'analyse de données afin de permettre une meilleure compréhension de l'hétérogénéité cellulaire, que ce soit au niveau moléculaire ou phénotypique. Pour un nouvel utilisateur, en plus de l'aspect technique de la mise en place d'un projet en cytométrie de masse, s'ajoute un défi complexe, celui de l'analyse des données, avec le développement d'un nombre incalculable de nouveaux algorithmes, induisant inexorablement la difficulté de savoir par où commencer. L'objectif de ce projet, en plus de son aspect scientifique, a été de proposer un pipeline d'analyse en utilisant 2 algorithmes faciles d'accès sur la plateforme Cytobank, afin de répondre à des questions complexes. Ainsi, le choix de l'analyse SPADE fournit un aspect simplifié en une seule image de la structure du phénotype cellulaire, suivie de l'analyse viSNE qui rend compte des continuums phénotypiques et permet d'identifier des variations subtiles. Cependant, sans contrôle, ces algorithmes peuvent aboutir à une interprétation erronée des données. Afin de confirmer les résultats de l'analyse non supervisée, il reste essentiel de ne pas s'affranchir de l'analyse conventionnelle, qui permet de vérifier qu'ils ne sont pas dus à un artefact algorithmique mais bien à un résultat réel et validé.

5. Perspectives

Ces études de caractérisation des LTCD4+ en relation avec le cycle cellulaire et l'infection VIH, nous ont permis de soulever des questions sur la définition du réservoir viral composé de sous-populations CD4+ à localisation hétérogène, quiescentes et avec une forte longévité ou capacité de renouvellement pour le réservoir latent, activées pour le réservoir productif. Diverses protéines cellulaires peuvent être présentes ou régulées à la hausse dans ces cellules. Bien qu'il soit peu probable que le CD32a soit un marqueur spécifique et unique du réservoir, cette découverte à néanmoins permis de s'interroger sur la définition du réservoir, suscitant de nombreuses controverses avec des résultats divergents probablement dus à des définitions différentes du réservoir viral, à des problèmes techniques et à l'utilisation de divers systèmes expérimentaux pour l'infection ex vivo de cellules quiescentes ou la préparation et la purification des échantillons de patients. Nos résultats comme ceux de nombreuses autres équipes montrent clairement que les cellules CD32+high sont massivement activées et nous montrons qu'elles ont reçu un signal cytokinique récent. Il reste donc essentiel de continuer à caractériser les différents sous-ensembles de LTCD4+ contribuant à la persistance et à la réactivation virale, afin de comprendre la physiopathologie de l'infection par le VIH et de définir des nouvelles stratégies de guérison.

Ce travail de thèse, en proposant l'analyse largement multiparamétrique par cytométrie de masse du cycle cellulaire en relation avec l'infection virale dans les LTCD4+, propose de distinguer les cellules hôtes du réservoir viral latent et productif. De plus, nos résultats confirment que des cellules T CD4+ présentant l'expression simultanée des 4 immune-Checkpoints inhibiteurs (CTLA4, Tim3, PD1 et TIGIT) à la surface cellulaire peuvent être des réservoirs mais essentiellement productifs puisque la protéine p24 y est présente.

Afin de confirmer cela, nous avons prévu des tris de LTCD4+ de patients infectés par le VIH présentant ces 4 immune-Checkpoints, suivi d'une recherche des transcrits du VIH dans cette population par séquençage des ARNm par microfluidique en cas de faibles nombres de cellules ou par RT-PCR quantitative classique Si le nombre de cellules le permet. Une stratégie complémentaire de l'identification des cellules productrices de VIH en CMM pourrait être possible en identifiant directement les transcrits ARN du virus en utilisant la méthode de RT-PCR intra-cellulaire PLAYR

(ProximityLigationAssay for RNA) développé en 2016 par Frei et al. (Frei A.P. et al., 2016) et permettrait de sortir du bruit de fond lié à l'identification de la protéine p24.

Néanmoins ces approches nous permettent une meilleure identification du réservoir productif, mais ne permettent pas encore d'identifier le réservoir latent à priori présent dans des cellules quiescentes. Ainsi, une stratégie complémentaire d'identification des cellules en phase G0 n'exprimant pas de marqueurs d'activation mais exprimant les 4 immune-checkpoints inhibiteurs que nous avons identifiés comme spécifiques du réservoir ou d'autres non encore identifiés, pourrait permettre d'affiner notre connaissance du réservoir latent et d'ouvrir une voie nouvelle pour son identification. Si ces manipulations confirment notre découverte, cela pourrait ouvrir la voie vers l'éradication d'une partie du réservoir. En effet, l'immunothérapie par anticorps monoclonaux dirigés contre les molécules PD1, TIGIT, CTLA-4 et Tim3, pourrait cibler les cellules du réservoir productif élément déterminant de la persistance virale

ANNEXES

Que la lumière soit. Et si ce n'était plus seulement vrai !

- Évolution de la cytométrie : du conventionnel à la masse (en passant par le spectre) -

Thierry Idziorek[1,4], Julie Cazareth[2], Catherine Blanc[3], Nathalie Jouy[1,4],Pierre Bourdely[2], Aurélien Corneau[3]

1 Université de Lille, JPArc, UMR-S1172, bâtiment IRCL (Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille), 1, place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France.

2 Université Côte d'Azur, CNRS, IPMC, 660, route des Lucioles, 06560 Valbonne, France.

3 Plateforme de Cytométrie (CyPS), UMS30 – LUMIC, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, 105 boulevard de l'hôpital, 75013 Paris, France

4 Université de Lille, BioImaging Center of Lille, plateau de cytométrie, bâtiment IRCL (Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille), 1, place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France.

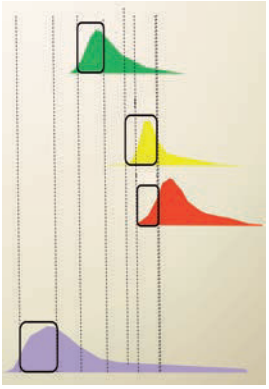
médecine/sciences 2018 ; 34 : 440-8

Que la lumière soit. Et si ce n'était plus seulement vrai !

Évolution de la cytométrie : du conventionnel à la masse (en passant par le spectre)

Thierry Idziorek[1,4], Julie Cazareth[2], Catherine Blanc[3], Nathalie Jouy[1,4], Pierre Bourdely[2], Aurélien Corneau[3]

> Ces dernières années ont vu une progression importante des capacités des nouveaux appareils de cytométrie. Deux sauts technologiques ont été récemment franchis avec la cytométrie couplée à la spectrométrie de masse, dans laquelle les fluorochromes ont été remplacés par des métaux rares non radioactifs de la famille des lanthanides et la cytométrie spectrale qui collecte les photons sur le spectre visible. Dans cette revue, nous décrivons schématiquement la cytométrie en flux conventionnelle et ces deux technologies ainsi que leurs avantages et adaptabilités et leurs inconvénients. <



[1]Université de Lille, JPArc, Inserm UMR-S1172, bâtiment IRCL (Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille), 1, place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France.
[2]Université Côte d'Azur, CNRS, IPMC, 660, route des Lucioles, 06560 Valbonne, France.
[3]Plateforme de cytométrie - CyPS, UMS30 - LUMIC, site Pitié-Salpêtrière, 105, boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France.
[4]Université de Lille, BioImaging Center of Lille, plateau de cytométrie, bâtiment IRCL (Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille), 1, place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France.
thierry.idziorek@inserm.fr)
cazareth@ipmc.cnrs.fr
catherine.blanc@sorbonne-universite.fr

La cytométrie, déjà connue dans les années 1930, ne prend réellement son essor que vers la fin des années 1960 avec les travaux de Kamentsky, en 1965 et 1967 [1, 2]. Les progrès dans la détection et le traitement du signal lumineux ont alors permis à l'équipe d'Herzenberg (1931-2013) de développer le premier cytomètre ayant une fonction de tri permettant la séparation de cellules d'intérêt grâce à un système de formation de gouttelettes reprenant le même principe que l'imprimante à jet d'encre [3]. C'est ce principe qui a été appliqué avec de nombreuses améliorations ces dernières décennies.

La cytométrie en flux, dont le nom en grec signifie « mesure de cellules » en flux, est une technique biologique qui permet l'étude multiparamétrique précise, quantitative et qualitative, de particules isolées en suspension entraînées par un flux liquide. Son expansion et son succès sont indissociables de la production d'anticorps monoclonaux, découverte par Köhler et Milstein en 1975 [4], et de la possibilité d'y fixer de façon covalente différentes molécules fluorescentes, comme l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) dès 1950 [5], auxquelles il faut leur adjoindre de nombreuses sondes fonctionnelles synthétisées notamment sous l'égide de R. Haughland [6]. La cytométrie en flux est aujourd'hui omniprésente, aussi bien utilisée dans les laboratoires d'analyses médicales que dans les laboratoires de recherche. On la retrouve également embarquée sur des navires, voire des bouées, pour des études de biologie marine dans lesquelles les pigments naturels des micro-organismes sont les principaux critères d'identification et quantification des populations.

Ces dernières années ont vu une progression importante des capacités des nouveaux appareils. La cytométrie en flux actuelle permet une collection plus importante de données et donc, des analyses plus fines et parfois plus rapides. Un saut technologique a été récemment franchi avec la cytométrie couplée à la spectrométrie de masse, dans laquelle les fluorochromes ont été remplacés par des métaux rares de la famille des lanthanides qui possède de nombreux isotopes non radioactifs de masse moléculaire différente, élargissant ainsi considérablement les possibilités de détections simultanées. Dans cette revue, nous décrirons schématiquement la cytométrie en flux conventionnelle ainsi que deux des technologies récemment développées : l'analyse spectrale et la cytométrie de masse.

Que la lumière soit : la cytométrie en flux conventionnelle

La cytométrie conventionnelle regroupe (1) un système fluidique entraînant des particules monodispersées, comme des cellules, une

m/s n° 5, vol. 34, mai 2018
https://doi.org/10.1051/medsci/20183405018

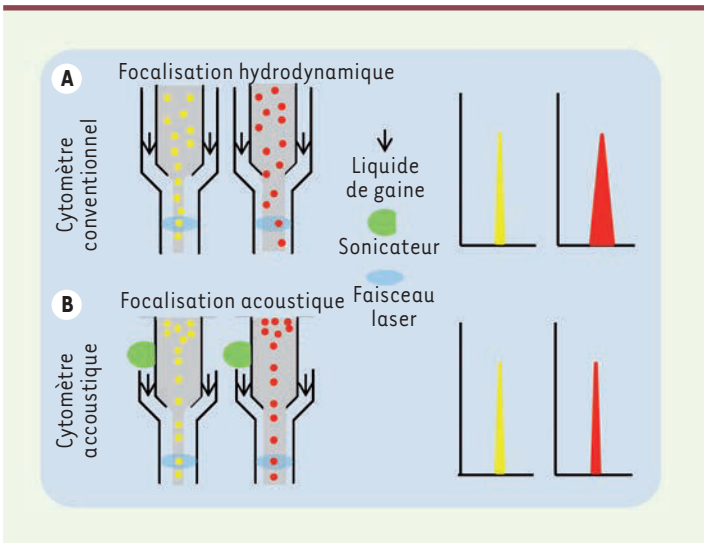


Figure 1. Système fluidique. Comparaison des focalisations hydrodynamique ***(A)*** et acoustique ***(B)***. Le différentiel de pression entre le liquide de gaine et le liquide d'échantillon forme un jet plus ou moins large qui entraîne les particules vers le faisceau laser. Lorsque la vitesse, et donc la pression appliquée à l'échantillon, est faible, le jet est étroit (cellules jaunes). Il s'élargit lorsque la pression augmente (cellules rouges). Les histogrammes montrent les résultats obtenus dans chaque condition : l'étroitesse du pic reflète la qualité de la mesure du signal.

à une jusqu'à une, ou des, source(s) d'excitation, (2) un système de collection de la lumière émise (fluorescence), (3) une digitalisation du signal, et (4) un logiciel d'analyse permettant d'interpréter les données. Deux systèmes fluidiques existent. Ils reposent sur la circulation d'un liquide de gaine entraînant les particules jusqu'au site où elles seront analysées (la cuvette d'analyse) *(Figure 1)*. Dans le cas de la focalisation hydrodynamique, une pression légèrement supérieure à celle du liquide de gaine est appliquée à l'échantillon pour permettre la pénétration des particules dans le flux. Cette stratégie favorise l'alignement des particules, les unes derrière les autres, à l'entrée de la chambre d'analyse. Cependant, lorsque la pression appliquée sur l'échantillon est augmentée pour accélérer la vitesse d'analyse, le flux de particules s'élargit. Celles-ci se distribuent alors plus aléatoirement dans le cœur du fluide, ce qui affecte l'homogénéité de l'excitation et de la collecte des signaux. Cela peut également permettre à plusieurs particules de traverser le faisceau laser au même moment *(Figure 1A)*. Une variation de signal, qui dégrade la qualité de l'analyse, est alors observée. Ce problème a été résolu avec la focalisation acoustique (*Attune NxT Flow cytometer,* développé par *ThermoFischer scientific*). Grâce à une sonde de sonication adjointe à l'entrée de la cuvette d'analyse *(Figure 1B)*, le flux devient indépendant de la pression exercée et les particules s'alignent sur le cœur du fluide, recevant alors la même excitation par les faisceaux lasers. Cette amélioration autorise des vitesses de passage de cellules beaucoup plus importantes, de l'ordre de 5 à 10 fois par rapport à la focalisation hydrodynamique (50 000 évènements par seconde) et sans perte de qualité du signal.

Les sources d'excitation ont aussi grandement évolué : les lampes à arc initialement utilisées ont été remplacées par des lasers à gaz, puis des lasers solides, et plus récemment, des diodes lasers. Aujourd'hui, les sources les plus communes sont les lasers violet (405 nm), bleu (laser argon, 488 nm) et rouge (633nm), ainsi que les lasers jaune/vert (561 nm) et ultraviolet (355 nm).

Une particule traversant le faisceau laser diffuse la lumière de ce faisceau. Ses propriétés de diffusion, selon l'axe du laser et à 90°, permettent d'évaluer sa taille et sa structure. La mesure des intensités de fluorescences émises à la suite de l'excitation par la particule repose sur des composants optiques. L'enchaînement de miroirs dichroïques et de filtres permet de morceler le spectre de la lumière émise, en fonction des maximums des pics d'émission des différentes molécules fluorescentes de l'échantillon *(Figure 2A)*. Cette approche permet de collecter, sur un détecteur spécifique, le maximum d'émission d'une fluorescence *(Figure 2C)*. Ainsi, suite à une excitation par le laser à 488 nm, un miroir dichroïque passe-haut 560 nm réfléchira les longueurs d'ondes inférieures à 560 nm, et transmettra celles qui sont supérieures. Des filtres passe-bandes (BP) sont également positionnés devant chaque détecteur et collectent la lumière entre deux longueurs d'ondes. Par exemple, un filtre BP 530/30 transmettra la lumière entre 515 et 545 nm, spécifique de l'émission du fluorochrome FITC exité à 488 nm, sur le détecteur A *(Figure 2B et C)*. Une perte de photons peut apparaître selon la largeur de la bande et l'efficacité de transmission spécifique à chaque filtre. Les détecteurs sont principalement des tubes photomultiplicateurs très sensibles qui transforment les photons collectés en un signal électrique amplifié. Dans le cas où deux fluorochromes ont des spectres d'émission qui se chevauchent, un tube photomultiplicateur détectera les photons émis par deux molécules. Ces photons parasites induisent un biais d'analyse. Il est donc indispensable de corriger cette fuite spectrale afin de pouvoir mesurer la fluorescence spécifique de la molécule d'intérêt. Dans ce cas, une soustraction mathématique est possible grâce à l'utilisation de matrices de compensation, aujourd'hui automatisable. Cette étape indispensable et cruciale dans le réglage du cytomètre requiert des échantillons contrôles adaptés, appelés « mono-marqués », qui permettent d'évaluer cette fuite spectrale sur chaque détecteur. Les signaux électriques recueillis sont ensuite digitalisés. Les données obtenues peuvent être analysées avec des logiciels dédiés.

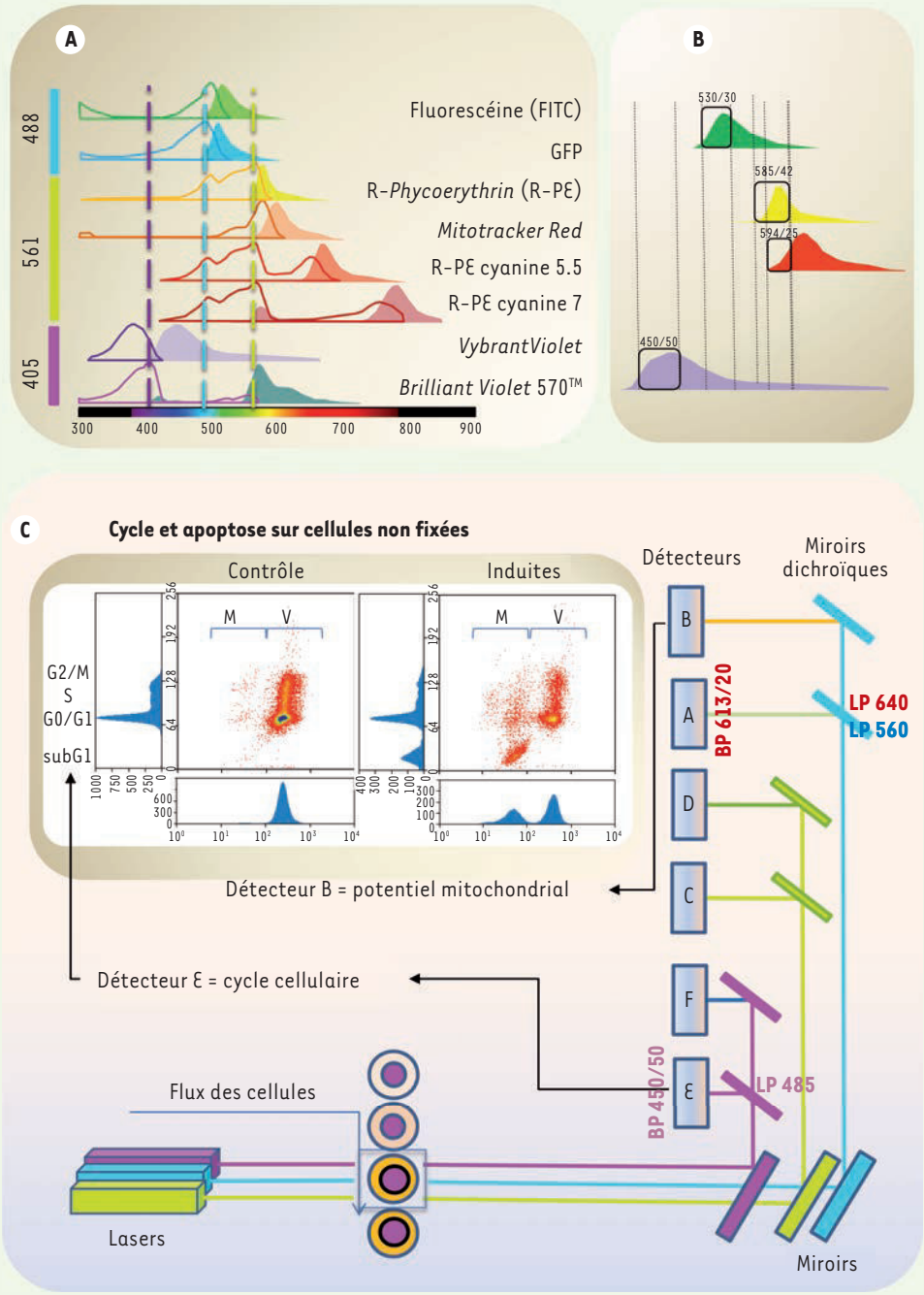


Figure 2. ***Cytométrie conventionnelle.*** ***A.*** Schéma des spectres d'excitation (lignes) et des spectres d'émission (aires) de plusieurs fluorochromes entre 300 et 800 nm en fonction des lasers bleu (488 nm), vert/jaune (561 nm) et violet (405 nm). ***B.*** Comparaison des spectres d'émission de 4 fluorochromes. Les rectangles représentent la fenêtre de longueurs d'ondes des différents filtres bande-passe utilisés classiquement sur les cytomètres pour collecter les photons émis par chaque sonde sur son détecteur spécifique. Les traits en pointillés verticaux représentent les possibilités des contaminations croisées des différents fluorochromes sur chacun des autres détecteurs. ***C.*** Schéma simplifié d'un cytomètre. Le schéma montre un cytomètre possédant 3 lasers (violet, bleu et vert/jaune) décalés dans l'espace dont les faisceaux rencontrent un flux de cellules marquées par des fluorochromes différents. Plusieurs jeux de miroirs et de filtres dichroïques permettent d'adresser les fluorescences émises sur les détecteurs dédiés. Les graphiques montrent le cas d'une étude de cycle et d'apoptose sur des cellules non fixées en l'absence (panneau de gauche) ou en présence (panneau de droite) d'un inducteur de mort cellulaire (V : cellules vivantes ; M : cellules mortes ou en apoptose).

Les avantages de la cytométrie conventionnelle

L'optique

Les développements technologiques récents ont permis d'améliorer grandement la conception des cytomètres. L'apparition de lasers solides, de fibres optiques et de nouveaux bancs optiques (Trigones et Octogones ; *BD Bisociences*) ont permis de rendre les cytomètres plus compacts et plus performants *(Figure 2)*. Les détecteurs de type photodiode d'avalanche améliorent la détection dans le rouge et le proche infrarouge (Cytoflex ; *Beckman Coulter*). L'utilisation conjointe de caméras CCD (*charge coupled device*) et d'objectifs à fort grossissement ont transformé un cytomètre en imageur en flux (ImageStream X ; *Merck Millipore*). Des images sont collectées pour chaque particule. On peut donc suivre, par exemple, l'activation cellulaire et le passage du cytoplasme au noyau de facteurs de transcription, faire des études morphologiques couplées à un phénotypage, ou encore détecter des anomalies génétiques par hybridation fluorescente *in situ* (FISH).
Toutes ces technologies ont permis d'étendre le nombre de molécules fluorescentes pouvant être analysées simultanément. Ainsi en 4 à 5 ans, ce nombre est passé de 20 à 50.

Les fluorochromes

L'explosion chromatique a été possible grâce au développement de nombreuses molécules fluorescentes qui peuvent être couplées à des anticorps, notamment celles excitées par le laser violet (405 nm) et proches de l'ultraviolet (UV).
L'une des particularités de la cytométrie en flux conventionnelle est la possibilité de travailler sur du matériel vivant en utilisant de nombreuses sondes qui permettent d'explorer les fonctions de l'échantillon analysé. À titre d'exemple, citons l'étude simultanée du cycle cellulaire et de l'apoptose *(Figure 2C)*. Le cycle et la viabilité des cellules peuvent être déterminés grâce à un intercalant de l'ADN et par une sonde spécifique de l'activité mitochondriale, excités respectivement par les lasers violet et bleu.

Le tri cellulaire

La cytométrie en flux conventionnelle permet le tri simultané d'une ou plusieurs populations (jusqu'à 6 aujourd'hui) de cellules monodispersées au cours d'une seule et même analyse. Elle a néanmoins évolué. Elle propose désormais la possibilité d'analyser et de trier de petits organismes (*Caenorhabditis elegans*, embryons de drosophile ou de poisson zèbre), voire d'amas cellulaires, comme les îlots de Langerhans par exemple.

Les inconvénients de la cytométrie conventionnelle

Les fluorochromes utilisés en cytométrie conventionnelle ont des spectres d'émission souvent larges avec des recouvrements qui peuvent être importants. Le choix des fluorochromes pour effectuer un phénotypage multiple sur une même cellule est donc crucial et détermine la stratégie d'analyse. Le spectre d'émission de fluorescence étant segmenté, avec des miroirs dichroïques et des filtres passe-bande, la lumière recueillie par le détecteur ne représente en fait qu'une fraction de la lumière émise.

La cytométrie spectrale : pouvoir analyser tout le spectre lumineux

Recueillir l'ensemble du spectre émis par un fluorochrome lors de son passage devant le faisceau laser a été une problématique complexe et longue à résoudre. Elle a débouché sur la cytométrie spectrale, qui permet un échantillonnage du spectre à haute résolution. En 2012, Grégori *et al.* ont proposé un prototype de cytomètre spectral dans lequel la fluorescence émise était divisée en deux afin d'être soit analysée classiquement, soit dispersée par différents systèmes optiques avant d'être dirigée vers un tube photomultiplicateur multianode mesurant l'ensemble du spectre de fluorescence [7].

Principe de la cytométrie spectrale

Le premier cytomètre en flux utilisant la technologie d'analyse spectrale a été commercialisé en 2014 (sous le nom de SP6800 par *SONY Biotechnologies*). Un schéma descriptif de ce cytomètre est présenté dans la *Figure 3A*. Dans la chambre d'analyse *(Figure 3C)*, les cellules sont soumises séquentiellement à un laser 488 nm puis à la combinaison de deux lasers 405 et 638 nm. L'optique de séparation spectrale est composée de dix prismes. Ils étalent la fluorescence émise entre 500 et 800 nm et la dirige vers une série de lentilles qui concentrent la lumière sur un photomultiplicateur. Une meilleure résolution des émissions de nombreuses sondes et protéines fluorescentes, qui émettent dans le bleu et le vert, peut être obtenue en augmentant le nombre de canaux dans ces longueurs d'ondes *(Figure 3B)*. Deux photomultiplicateurs détectent les fluorescences émises entre 420-440 nm (FL1) et 450-469 nm (FL2) pour les sondes excitables à 405 nm. Les propriétés optiques de diffusion (taille et structure) sont collectées sur des photodiodes *(Figure 3A)*. Des graphiques qui représentent l'intensité du signal en fonction de la longueur d'onde d'émission pour chaque série de laser permettent de visualiser les spectres de fluorescences. Un filtre bloque la lumière du laser rouge *(Figure 3D, flèches rouges)* et crée un « trou » dans le spectre autour de 638 nm.
Si un échantillon cellulaire est marqué par deux anticorps, l'un étant couplé au FITC (vert) et l'autre à la PE (*phycoérythrine*, rouge), pour identifier deux populations distinctes, le signal mesuré *(Figure 3F, courbe S(λ) en pointillés bleus)* se résumera en la somme de la fluorescence émise par les anticorps couplés au FITC *(Figure 3F, courbe verte)*, au PE *(Figure 3F, courbe orange)*, et au bruit de fond, provenant des cellules elles-mêmes *(Figure 3F, courbe violette)*. Un algorithme

mathématique de décomposition linéaire permet de déduire l'abondance de chacune des sondes à partir de l'empreinte spectrale de l'échantillon multi-marqué *(Figure 3F, graphique de gauche)* et des spectres de référence de chacune des molécules fluorescentes utilisées (FITC et PE dans notre exemple, *Figure 3G*, *graphiques au centre*). Une fois appliqué aux données brutes, une intensité de fluorescence est attribuée à chaque marqueur pour chaque cellule *(Figure 3G, les deux nuages de points à droite)* [8]. Ainsi, après l'acquisition des échantillons, puis application de la décomposition spectrale, les données obtenues peuvent être analysées.

Les avantages de la cytométrie spectrale

Une meilleure gestion de l'autofluorescence

De nombreux constituants de la cellule émettent une fluorescence (comme le NADH [nicotinamide adénine dinucléotide réduit], les riboflavines, les pigments photo-synthétiques, etc.) et engendrent un signal basal élevé : l'autofluorescence (AF). L'intensité de cette AF émise sur tout le spectre dépend de la cellule et de la nature de l'échantillon. Dans un cytomètre conventionnel, elle est détectée par tous les photomultiplicateurs (PMT) et est à l'origine d'une diminution du rapport entre le signal et le bruit, ce qui peut rendre difficile l'interprétation de certaines données. En cytométrie spectrale, l'AF peut être traitée comme une donnée de fluorescence propre, avec un spectre d'émission spécifique aux cellules de l'échantillon non marquées *(Figure 3G)*. Un (ou plusieurs) paramètre(s) supplémentaire(s) d'identification et de caractérisation des populations cellulaires seront ainsi générés lors de la décomposition spectrale. Ce type d'analyse trouve son avantage dans l'étude de certains types cellulaires, comme les macrophages alvéolaires du poumon [9], les lymphocytes infiltrant le tissu épithélial de l'intestin, ou encore les cardiomyocytes [10], ou pour les études pharmacologiques de prodrogues et de composés de synthèse.

Des combinaisons de sondes inédites

Le développement de nouvelles sondes fluorescentes, en permettant de multiplier les marqueurs biologiques, étend les possibilités d'exploration fonctionnelle. Cependant, l'augmentation des recouvrements spectraux et la difficulté d'appliquer des compensations correctes qui en résultent, rendent leur utilisation difficile. En effet, certaines de ces nouvelles sondes, plus brillantes (comme le BB515™ ou le BV421™), émettent dans le même canal que le FITC ou le Pacific Blue™ ; elles ne peuvent donc être combinées dans un même échantillon en cytométrie conventionnelle. L'approche spectrale permet de différencier les émissions de sondes dont le maximum du pic n'est décalé que de 10 nm, ou dont la forme globale varie [11]. Des combinaisons de sondes innovantes inédites sont donc désormais possibles [10].

Une détection des événements rares optimisée

La détection des événements rares correspond à la révélation de populations cellulaires dont la proportion est inférieure à 0,01 %. Grâce au nombre important d'événements qu'il est possible d'analyser pour un même échantillon, la cytométrie en flux représente une technique de choix. Une limitation de la cytométrie conventionnelle dans cette application est l'impossibilité de différencier ces événements rares d'un artéfact dû à la combinaison de sondes utilisée et/ou à l'autofluorescence de l'échantillon. Par la gestion de l'AF qu'elle permet et les graphiques de visualisation des spectres, la cytométrie spectrale est donc devenue un outil pertinent pour la validation de la détection des événements rares.

Les inconvénients de la cytométrie spectrale

La constitution de l'ensemble des fluorochromes utilisés lors d'une expérience (*panel*) reste un point critique de la cytométrie, qu'elle soit spectrale ou conventionnelle. Affranchie du problème de recouvrement de spectres, la décomposition spectrale tient compte de l'abondance de chaque fluorescence émise. L'intensité des marquages doit donc être minutieusement évaluée afin « qu'un spectre ne cache pas l'autre ».

Les optiques de collection des signaux de diffusion de la lumière du laser d'un cytomètre spectral sont différentes de celles d'un cytomètre conventionnel. Les profils obtenus sont donc également différents, ce qui peut être limitant pour l'identification de populations cellulaires selon ces critères.

Comme dans toute expérience de cytométrie, il est indispensable de s'assurer de la qualité des réactifs et des échantillons contrôles afin de garantir une bonne matrice de décomposition spectrale et/ou l'utilisation d'une matrice calculée lors d'une expérience précédente (un tandem de fluorochromes mal conservé peut en effet se découpler dans le temps, la forme de son spectre sera alors modifiée).

Enfin, l'indisponibilité d'un trieur de cellules utilisant la technologie spectrale reste un frein à son implantation dans les laboratoires de recherche.

Oublier la lumière : la cytométrie de masse

À la différence de la cytométrie en flux conventionnelle ou spectrale, qui reposent sur la fluorescence, la cytométrie de masse (CMM), qui a émergé dans les années 2010 [12, 13], repose sur une analyse de la masse atomique des molécules [14] (➜).

(➜) Voir la Nouvelle de A. Cosma et R. Le Grand, *m/s* n° 12, décembre 2011, page 1072

Les sondes utilisées sont des anticorps, non plus couplés à des fluorochromes, mais à des isotopes de métaux non radioactifs de la famille des lanthanides[1]. Ces isotopes étant absents

[1] Nom générique des éléments des terres rares, de propriétés chimiques très voisines, et dont le premier est le lanthane.

des systèmes biologiques, leur détection révèle la fixation de l'anticorps à l'antigène recherché.

Principe de la cytométrie de masse

Cent trente-cinq canaux de détection de masse atomique allant de 75 à 209 daltons peuvent être attribués. Il est donc possible d'engendrer des profils phénotypiques et fonctionnels complexes. Seuls 47 isotopes ont été purifiés à l'heure actuelle. Cette gamme devrait s'étendre dans l'avenir, permettant d'accroître les performances de cette technologie. Lors de la conception d'un *panel* de cytométrie de masse, plusieurs facteurs sont à considérer : l'abondance de l'antigène, la sensibilité du système aux isotopes, les sources de bruit de fond et l'oxydation possible des ions. Le choix des isotopes est également fonction de la sensibilité du cytomètre de masse sur lequel les échantillons seront acquis [15]. Les sources principales de bruit de fond proviennent de l'environnement. En effet, certains métaux lourds peuvent être présents dans des produits utilisés lors de la préparation des échantillons, par exemple le baryum (130-138 Da) et ses oxydes. Le baryum est l'un des éléments les plus abondants de la croûte terrestre. Il peut contaminer les échantillons exposés dans l'environnement d'un laboratoire (retombées de poussières) et les savons, le verre de laboratoire, les flacons de réactifs peuvent également présenter des niveaux élevés de baryum.

Méthode

Les étapes de préparation cellulaire et de marquage sont identiques à celles de la cytométrie en flux conventionnelle avec quelques nuances. Du cisplatine (ou du rhodium) est utilisé pour évaluer la viabilité des cellules[2]. Un intercalant d'acide nucléique conjugué à l'iridium permet d'analyser la teneur en ADN[3]. L'échantillon, fixé en suspension dans l'eau, est introduit dans une chambre remplie d'argon qui fournit la pression nécessaire pour le transférer au nébuliseur. L'eau sera ainsi éliminée par aérosolisation afin que l'échantillon soit ionisé dans le plasma. L'évaporation partielle des gouttelettes d'aérosols monocellulaires sera ensuite réalisée à travers une chambre de pulvérisation chauffée à 200 degrés. Les gouttelettes sortant de la chambre sont vaporisées, atomisées et ionisées pour une analyse de masse. Chaque cellule forme un nuage d'ions contenant les marqueurs métalliques ionisés. Les nuages sont envoyés dans l'analyseur de masse/temps de vol (TOF), qui sépare les ions sur la base du rapport masse-charge. Le faisceau sortant pénètre dans une chambre d'accélérateur d'analyseur TOF. L'analyse des données nécessite des logiciels qui ont initialement été adaptés à partir de la cytométrie classique, mais aussi des applications qui ont été développées pour de l'analyse en *clustering* [16] en raison du nombre croissant de données acquises *(Figure 4)*.

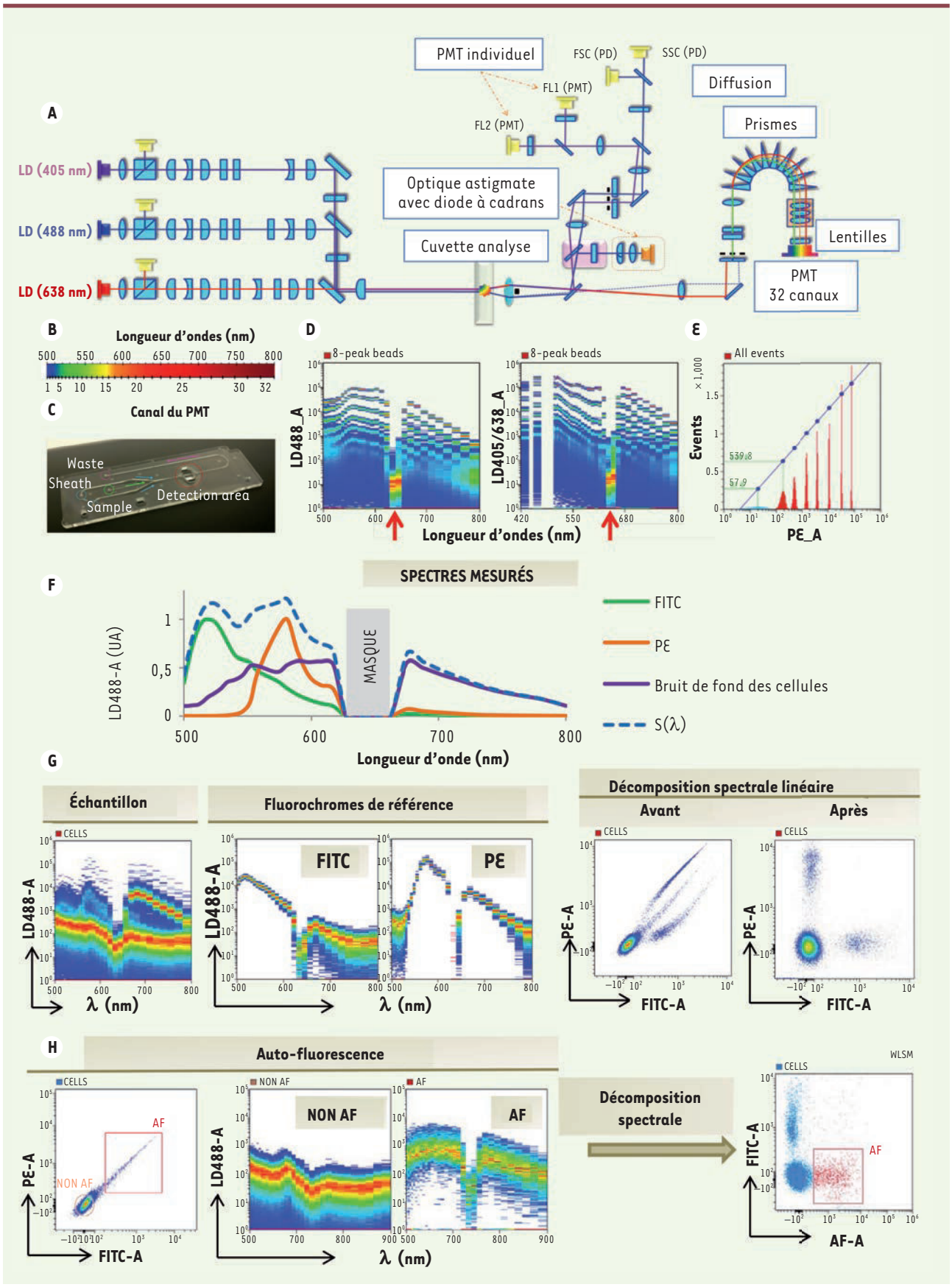
Les avantages de la cytométrie de masse

Les principaux avantages de la cytométrie de masse sont la disponibilité d'un grand nombre d'éléments qui peuvent être utilisés pour marquer les anticorps, une diversité qui permet de créer de larges *panels* de marqueurs ; l'absence de recouvrement de masse entre les isotopes élémentaires utilisés, permettant de mesurer plus de 50 paramètres simultanément, sans besoin de compensation ; l'absence d'autofluorescence ; la sensibilité moindre des métaux lourds à une dégradation liée aux tampons de perméabilisation, ce qui rend possible une exploration approfondie d'antigènes cellulaires de la membrane au cytoplasme et au noyau. Il est ainsi possible d'analyser simultanément la co-expression d'antigènes membranaires, intra-cytoplasmiques et nucléaires ainsi que le cycle cellulaire. Ce fort potentiel analytique permet l'analyse des événements rares (< 0,01 %). L'introduction dans chaque échantillon de standards internes contenant des billes couplées à des isotopes avec une abondance précise et connue permet de normaliser les acquisitions entre elles.

[2] Le Cisplatine forme des liaisons sulfhydryles avec les protéines de membrane nucléophiles, ainsi les cellules mortes ou en voie de mort sont positives pour ce marqueur.

[3] La cellule étant désintégrée en nuage ionique, sa détection est réalisée grâce à son contenu en ADN *via* un intercalant conjugués à l'iridium.

Figure 3. Cytométrie spectrale. Les spectres présentés sont obtenus pour une excitation à 488 nm, excepté lorsque cela est précisé. ***A.*** Schéma optique d'un cytomètre spectral (*SONY SP6800*). ***B.*** Longueurs d'ondes détectées par chacun des canaux du photomultiplicateur (PMT) 32 canaux. ***C.*** Chambre de détection. ***D.*** Spectres de billes fluorescentes excitées par le laser 488 nm (gauche) et 405/ 638 nm (droite). L'axe des abscisses correspond aux longueurs d'ondes, l'ordonnée à l'intensité de fluorescence. La couleur indique la quantité de fluorescence dans chaque canal (rouge, forte ; vert, moyenne ; bleue, faible). Les flèches rouges indiquent le filtre qui masque la lumière du laser 638 nm. ***E.*** Filtre virtuel phycoérythrine (PE) appliqué aux billes. ***F.*** Empreinte spectrale de l'échantillon (S[5λ]) et spectres individuels mesurés (fluorescéine [FITC] en vert, PE en orange et bruit de fond des cellules en violet). Le rectangle gris représente le masque obstruant la lumière du laser 638 nm. ***G.*** Graphiques de gauche : spectres des cellules marquées avec le mélange des anticorps couplés au FITC et au PE. Spectres de références individuels, du FITC et PE, qui seront utilisés par l'algorithme pour la décomposition spectrale. Graphiques de droite : Visualisation des cellules en nuages de points de densité avant et après application de l'algorithme de décomposition spectrale. ***H.*** Identification des cellules auto-fluorescentes à partir de l'échantillon non marqué. Spectres des cellules non auto-fluorescentes (NON AF) et auto-fluorescentes (AF). Utilisation de l'auto-fluorescence comme un paramètre après décomposition spectrale (d'après [11], avec l'autorisation de *SONY Biotechnologies Inc*).


A
LD (405 nm)
LD (488 nm)
LD (638 nm)
PMT individuel
FSC (PD)
SSC (PD)
FL1 (PMT)
FL2 (PMT)
Diffusion
Prismes
Optique astigmate avec diode à cadrans
Cuvette analyse
Lentilles
PMT 32 canaux
B
Longueur d'ondes (nm)
C
Canal du PMT
Waste
Sheath
Sample
Detection area
D
8-peak beads
LD488_A
LD405/638_A
Longueur d'ondes (nm)
E
All events
Events
PE_A
F
SPECTRES MESURÉS
LD488-A (UA)
MASQUE
Longueur d'onde (nm)
FITC
PE
Bruit de fond des cellules
S(λ)
G
Échantillon
Fluorochromes de référence
Décomposition spectrale linéaire
Avant
Après
CELLS
LD488-A
λ (nm)
FITC
PE
PE-A
FITC-A
H
Auto-fluorescence
NON AF
AF
Décomposition spectrale
WLSM
AF-A

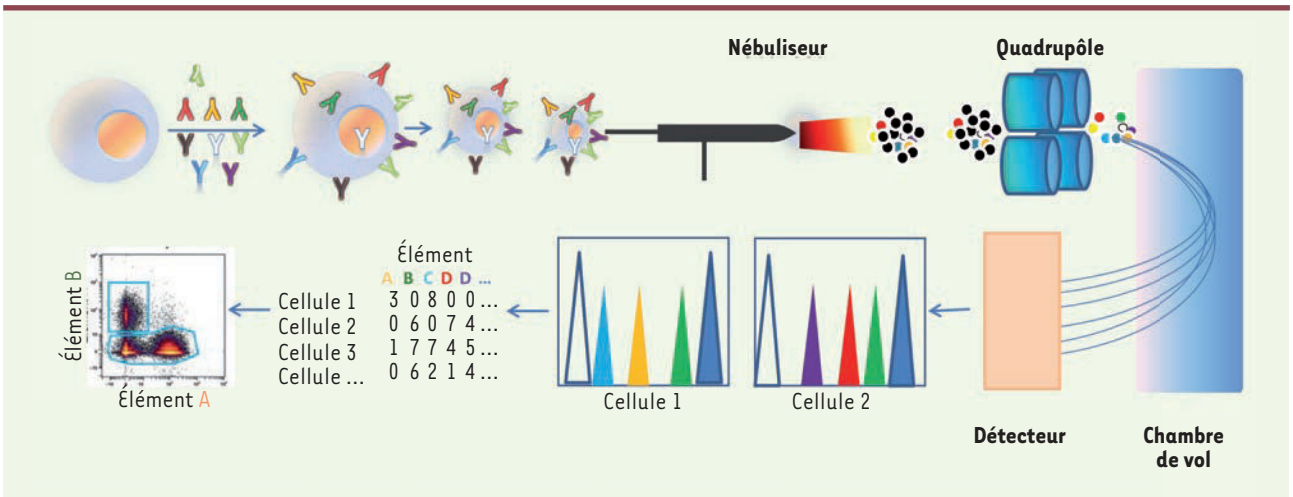


Figure 4. ***Principe de la cytométrie de masse.*** Les cellules monodispersées sont marquées avec les anticorps ainsi qu'un intercalant de l'ADN conjugué à l'iridium. L'échantillon est introduit dans le nébuliseur, puis la chambre à plasma où il est vaporisé, atomisé et ionisé. Chaque nuage d'ions, correspondant à une cellule, est envoyé dans la chambre de vol pour la séparation des marqueurs métalliques en fonction de leur masse. Les ions sont détectés, puis analysés.

Les inconvénients de la cytométrie de masse

Les principaux inconvénients de la cytométrie de masse sont (1) sa lenteur d'acquisition : entre 250 et 500 événements par seconde contre près de 50 000) en cytométrie en flux, soit 100 fois moins ; (2) la taille et la granularité des échantillons ne peuvent être évaluées ; (3) certains rapporteurs fluorescents qui permettent de mettre en évidence le flux calcique, la perméabilisation mitochondriale et la division cellulaire, n'ont pas d'équivalent métallique ; (4) enfin, le tri cellulaire est, et restera, impossible puisque les cellules sont désintégrées.

Conclusion

Le « *big bang* » représenté par le développement de la masse en cytométrie a forcé les *fabricants de lumières* à se remettre sur la table à dessin et à revoir leurs palettes de couleurs. On ne peut que se réjouir de ces avancées en cytométrie conventionnelle, notamment en ce qui concerne la miniaturisation des appareils, grâce à l'utilisation de lasers solides, de fibres optiques, et de nouveaux détecteurs, et la synthèse de nouveaux fluorochromes. Cette technologie permet d'explorer le monde du vivant, des anomalies génétiques aux petits organismes, des microparticules aux organelles, en passant par la transduction du signal et l'activité enzymatique. Ces différentes approches que permet la cytométrie sont déjà et continueront d'être complémentaires *(Tableau I)*.

La cytométrie spectrale permet, quant à elle, la discrimination de sondes présentant un important recouvrement spectral, et la gestion de l'autofluorescence des particules analysées, augmentant ainsi la sensibilité de détection. L'empreinte spectrale de chaque cellule devient une donnée indispensable à la compréhension de l'échantillon, voire à l'interprétation des résultats, en particulier dans le cas de la détection d'évènements rares. Le champ d'application de cette technologie est vaste : immunologie, cancérologie, océanographie. Le tri cellulaire sur la base de l'analyse spectrale est la prochaine évolution de cette approche.

La cytométrie de masse a révolutionné la cytométrie en permettant d'analyser tous les compartiments cellulaires, de la membrane au contenu en ADN. Elle permet, par sa capacité analytique, de produire des données inégalables à toute autre technologie. Son absence d'autofluorescence est un immense avantage, permettant ainsi de mettre en évidence des événements rares. En revanche, la CMM ne peut, actuellement, utiliser des sondes fonctionnelles ou des substrats enzymatiques, et n'offre aucune possibilité de tri cellulaire. La CMM a permis le développement de logiciels de traitements de données qui peuvent désormais être utilisés par tous les cytométristes. L'évolution de la cytométrie de masse en analyse d'images va révolutionner la pertinence analytique des coupes tissulaires ; cette avancée technologique est très attendue dans le monde de la cancérologie [17].

Les années à venir devraient voir l'apparition de nouvelles technologies comme la microfluidique, qui permettraient d'explorer d'autres univers, comme les propriétés physiques des cellules. Il faut juste attendre qu'elles sortent de l'ombre [17]. ◊

SUMMARY

Fiat Lux. May be no more true in cytometry! Go to mass and spectrum but still stay classic

The last decade has been an era of accelerated technological progress for flow cytometry. New technologies have been developed such as mass cytometry in which standard fluorochromes have been replaced by lanthanide-based non-radioactive metals and by spectral

	Cytomètre		
	Conventionnel	**Spectral**	**Masse**
Analyse	Oui	Oui	Oui
Tri cellulaire	Oui	Non	Non
Rapidité	Oui	Oui	Non
Taille/structure	Oui	Oui	En développement
Sondes fonctionnelles	Oui	Oui	Non, mais contenu ADN
Multi phénotypage (paramètres)	Oui (50)	Oui (> 24)	Oui (135)
Autofluorescence (cellules, composés chimiques)	Oui, partiellement	Oui	Non
Traitement du signal brut	Oui	Oui	Oui

Tableau I. ***Possibilités techniques des appareils de cytométrie.***

cytometry that measures the complete fluorescence spectrum. In this review, we schematically describe conventional, mass and spectral cytometry and present the plus and minus of each technology. ◊

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Kamentsky LA, Melamed MR, Derman H. Spectrophotometer: new instrument for ultrarapid cell analysis. *Science* 1965 ; 150 : 630-1.
2. Kamentsky LA, Melamed MR. Spectrophotometric cell sorter. *Science* 1967 ; 156 : 1364-5.
3. Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG, Herzenberg LA. Fluorescence activated cell sorting. *Rev Sci Instrum* 1972 ; 43 : 404-9.
4. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975 ; 256 : 495-7.
5. Coons AH, Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J Exp Med* 1950 ; 91 : 1-13.
6. The molecular probes handbook. *A guide to fluorescent probes and labeling technologies*, 11th ed. Life Technologies Corporation, 2010.
7. Grégori G, Patsekin V, Rajwa B, *et al*. Hyperspectral cytometry at the single-cell level using a 32-channel photodetector. *Cytometry* 2012 ; 81A : 35-44.
8. Novo D, Grégori G, Rajwa B. Generalized unmixing model for multispectral flow cytometry utilizing nonsquare compensation matrices. *Cytometry* 2013 ; 83A : 508-20.
9. Pauly JL, Allison EM, Hurley EL, *et al*. (2005) Fluorescent human lung macrophages analyzed by spectral confocal laser scanning microscopy and multispectral cytometry. *Microsc Res Tech* 2005 ; 67 : 79-89.
10. Schmutz S, Valente M, Cumano A, Novault S. Spectral cytometry has unique properties allowing multicolor analysis of cell suspensions isolated from solid tissue. *PLoS One* 2016 ; 8 : 11.
11. Futamura K, Sekino M, Hata A, *et al*. Novel full-spectral flow cytometry with multiple spectrally-adjacent fluorescent proteins and fluorochromes and visualization of in vivo cellular movement. *Cytometry* 2015 ; 87 : 830-42.
12. Bendall SC, Simonds EF, Qiu P, *et al*. Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. *Science* 2011 ; 332 : 687-96.
13. Bendall SC, Nolan GP. From single cells to deep phenotypes in cancer. *Nat Biotechnol* 2012 ; 30 : 639-47.
14. Cosma A, Le Grand R. La couleur du métal, brève introduction à la cytométrie de masse. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 1072-4.
15. Tricot S, Meyrand M, Sammicheli C, *et al*. Evaluating the efficiency of isotope transmission for improved panel design and a comparison of the detection sensitivities of mass cytometer instruments. *Cytometry A* 2015 ; 87 : 357-68.
16. Anchang B, Hart TD, Bendall SC, *et al*. Visualization and cellular hierarchy inference of single-cell data using SPADE. *Nat Protoc* 2016 ; 11 : 1264-79.
17. Masaeli M, Gupta D, O'Byrne S, *et al*. Multiparameter mechanical and morphometric screening of cells. *Sci Rep* 2016 ; 6 : 37863.

TIRÉS À PART

T. Idziorek

Abonnez-vous à *médecine/sciences*

Bulletin d'abonnement page 490 dans ce numéro de *m/s*

Analysis of cell surface and intranuclear markers on non-stimulated human PBMC using mass cytometry

Gaëlle Dzangué-Tchoupou[1]*, Aurélien Corneau[2], Catherine Blanc[2], Olivier Benveniste[1,3], Yves Allenbach[1,3]

1 Centre of research in Myology, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, UMR974, Pitié-Salpêtrière University hospital, Paris, France

2 Plateforme de Cytométrie (CyPS), Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, UMR 1135, Paris, France

3 Department of Internal medicine and clinical immunology, Pitié-Salpêtrière University hospital, DHU I2B, AP-HP, INSERM, UMR 974, Paris, France

La cytométrie de masse est un outil puissant qui permet l'analyse simultanée de plus de 37 marqueurs au niveau de la cellule unique. La cytométrie de masse présente un intérêt particulier pour l'identification d'une grande variété de phénotypes cellulaires dans les maladies auto-immunes. Néanmoins, les immunologues sont souvent confrontés à un problème important concernant le choix des marqueurs à inclure dans un panel. Ce problème se pose en raison de l'incompatibilité des différents tampons utilisés pour la fixation et la perméabilisation des cellules avec divers épitopes de surface cellulaire. Dans cette étude, nous avons utilisé un panel de 27 marqueurs (19 marqueurs de surface et 8 marqueurs intranucléaires) afin d'évaluer les disparités dans la détection des antigènes de surface lors de l'utilisation de différents tampons pour marquer des PBMC non stimulés. Ces disparités montre des différences de fréquences de population parfois très importantes en fonction des tampons utilisés. Enfin, nous démontrons les effets délétères de la perméabilisation avant le barcoding sur la détection de certains antigènes de surface cellulaire. Ici, nous optimisons un protocole qui est approprié pour cibler un large panel comprenant à la fois des marqueurs de surface cellulaire et intranucléaires sur des PBMC non stimulées.

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Analysis of cell surface and intranuclear markers on non-stimulated human PBMC using mass cytometry

Gaëlle Dzangué-Tchoupou[1]*, Aurélien Corneau[2], Catherine Blanc[2], Olivier Benveniste[1,3], Yves Allenbach[1,3]

1 Centre of research in Myology, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, UMR 974, Pitié-Salpêtrière University hospital, Paris, France, **2** Plateforme de Cytométrie (CyPS), Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, UMR 1135, Paris, France, **3** Department of Internal medicine and clinical immunology, Pitié-Salpêtrière University hospital, DHU I2B, AP-HP, INSERM, UMR 974, Paris, France

* gaelle.dzangue@gmail.com

Abstract

Mass cytometry is a powerful tool that allows simultaneous analysis of more than 37 markers at the single cell level. Mass cytometry is of particular interest in the identification of a wide variety of cell phenotypes in autoimmune diseases. Moreover, cells can be labelled with palladium isotopes and pooled before staining (barcoding). Nevertheless, immunologists often face an important problem concerning the choice of markers to be included in a panel. This problem arises due to the incompatibility of different buffers used for the fixation and permeabilization of cells with various cell surface epitopes. In this study, we used a panel of 27 markers (19 surface markers and 8 intranuclear markers) to demonstrate disparities in the detection of cell surface antigens when comparing different buffers to stain unstimulated peripheral blood mononuclear cells. These disparities range from mild differences to very important differences in population frequencies depending on the buffers. Finally, we demonstrate the harmful effects of permeabilization prior to barcoding on the detection of some cell surface antigens. Here, we optimize a protocol that is suitable to use when targeting a large panel including both cell surface and intranuclear markers on unstimulated human peripheral blood mononuclear cells.

OPEN ACCESS

Citation: Dzangué-Tchoupou G, Corneau A, Blanc C, Benveniste O, Allenbach Y (2018) Analysis of cell surface and intranuclear markers on non-stimulated human PBMC using mass cytometry. PLoS ONE 13(3): e0194593. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194593

Editor: Yuntao Wu, George Mason University, UNITED STATES

Received: October 17, 2017

Accepted: March 6, 2018

Published: March 22, 2018

Copyright: © 2018 Dzangué-Tchoupou et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Mass cytometry is a powerful innovative cell profiling tool that is based on antigen detection using metal-conjugated antibodies. This approach allows for simultaneous detection of up to 40 markers at the single cell level [1–2]. Moreover, cells can be tagged with palladium isotopes and pooled before staining, thus reducing intra assay variability during the staining of cells and the acquisition of events [3]. The broad detection capacity of cellular targets using mass cytometry is of particular interest to clinical trials, deep phenotyping studies and cell population discovery in various cancers and auto-immune diseases [4]. One of the major challenges encountered when using cytometry is the simultaneous detection of cell surface markers and

intranuclear markers. This trouble often arises due to the partial loss of signal intensity of cell surface markers after permeabilization [5]. Consequently, some authors use panels comprised solely of cell surface markers and secreted cytokines [6–8]. Other researchers use permeabilization buffers for the detection of intranuclear markers, but very often this permeabilization is detrimental to cell surface epitopes [9–10]. Either approach ultimately leads to the loss of the complexity and innovative approaches of mass cytometry.

Barcoding samples using palladium isotopes require a quick fixation and permeabilization step. This step can also alter the detection of cell surface markers.

At present, a systematic comparison of the effect of different permeabilization protocols on the visualization of cell surface markers in mass cytometry has never been described. Our aim was to optimize a protocol which allows the detection of a broad panel of cell surface and intranuclear markers on human PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells).

Here, we used four permeabilization conditions to compare the effects of permeabilization on the detection of a broad panel comprised of cell surface and intranuclear markers using mass cytometry: an adapted BD cytofix/cytoperm protocol, eBioscience permeabilization buffer, MaxPar Nuclear Antigen Staining Buffer (NASB) and Methanol/Paraformaldehyde (PFA). Altogether, cells were labelled with 27 antibodies: 19 antibodies targeting cell surface markers and 8 antibodies targeting intranuclear markers.

Material and methods

Clinical samples and storage

Approval for this study was obtained from the *Comité Consultatif sur le Traitement de l'Information en matière de la Recherche dans le domaine de la Santé* (CCTIRS) France. Citrated blood donated by healthy adults was obtained from the Etablissement Français du sang (EFS) at the Pitié Salpêtrière University Hospital. Written informed consent was signed by all donors according to the declaration of Helsinki. Upon reception of blood samples, PBMC were isolated and stored at -80˚C in Foetal Bovine Serum (FBS, Life Technologies, Saint-Aubin, France, Catalog # 10270106) supplemented with 10% Dimethyl Sulfoxide. Twenty-four hours later, the cells were transferred to liquid nitrogen until time of use.

Antibodies and reagents

Twenty-four metal-conjugated antibodies were obtained from Fluidigm (Les Ulis, France). Four purified monoclonal antibodies targeting CD28, CD8, RORγT and Bcl6 were obtained from BD Bioscience (Le pont-de-Claix, France) and conjugated to their respective metal tags as previously described [11]. Briefly, primary antibody transition metal-conjugates were prepared in 200 μg lots with the MaxPAR antibody conjugation kit (Fluidigm, Les Ulis, France) following the manufacturer's recommendations. After conjugation, antibodies were diluted to a working concentration of 100X in Candor PBS Antibody Stabilization solution (Candor Bioscience GmbH, Le pont Claix, France) and stored at 4˚C. The list of antibodies used and their corresponding concentrations are found in **S1 Table**.

Viability and Iododeoxyuridine (IdU) staining

Cisplatin, IdU, PBS and staining buffer (SB) were obtained from Fluidigm (Les Ulis, France). All centrifugations were performed during 5 minutes at 300x g before permeabilization and at 800x g after permeabilization.

PBMC were rapidly thawed at 37˚C in a water bath then washed twice with 10 ml of RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Saint Quentin, France, Catalog # R8758) supplemented with 10% FBS in

50 ml polypropylene conical tubes (Dominique DUTSCHER, Issy-les-Moulineaux, France, Catalog # 352070). Next, the cells were washed in RPMI-1640 alone and stained with IdU (Catalog # 201127) and Cisplatin (Catalog # 201064) as previously described [11]. Briefly, 13 million PBMC were incubated at 37˚C for 25 minutes in PBS (Catalog # 201058) containing a final concentration of 50 μM IdU. The cells were washed once with PBS and stained with 5 μM of Cisplatin for 5 minutes at room temperature (RT). Cisplatin was quenched in SB (volume > 5 times the initial volume). Finally, the cells were centrifuged, suspended in 500 ml of SB (Catalog # 201068) and transferred to a 5-ml polypropylene conical tube (Dominique DUTSCHER, Issy-les-Moulineaux, France, Catalog # 2005457).

Cell surface staining

Five microliters of CCR7 and 7.5 μl of CXCR5 were added to PBMC in a final volume of 75 μl of SB for 15 minutes at RT. Next, 175 μl of a mix containing the other cell surface antibodies were added to the cells for 30 minutes at RT (5 μl of each antibody as well as 7.5 μl of HLADR, IgD, and CD38). Finally, the cells were washed twice with 2 ml of SB and separated into 5 groups for the following protocols:

Fixation and permeabilization protocols

Cell surface staining only. No fixation or permeabilization step was performed. In this manuscript, this experimental condition is termed "CS" in the figure legends.

Fixation and permeabilization using BD cytofix/cytoperm buffer (BD, France, Catalog # 554715). Cells were incubated at RT for 1 hour with BD Cytofix/Cytoperm buffer, then washed twice with BD wash/perm solution diluted 10X in distilled water. Antibodies targeting intranuclear markers were prepared at a final volume of 50 μl in a BD wash/perm solution (1 μl of each antibody, except 1.5 μl of FoxP3) and added to cells for 1 hour at RT. Finally, cells were washed once with 500 μl of the wash/perm solution BD and once with 500 μl of SB. In this manuscript, this experimental condition is termed "ICSb" for intracellular cytokine staining buffer in the figure legends.

Fixation and permeabilization using eBioscience Fixation/permeabilization buffer. Fixation/permeabilization buffer concentrate (Catalog #00-5123-43), Fixation/permeabilization buffer diluent (Catalog # 00-5223-56) and permeabilization buffer (Catalog # 00-8333-56) were obtained from eBioscience, Paris, France. The Fixation/permeabilization buffer concentrate was diluted 1:4 with the diluent, and 250 μl was added to cells for 45 minutes at RT. Cells were washed twice with permeabilization buffer diluted 10X in distilled water. Fifty microliters of the mix of antibodies targeting intranuclear nuclear antigens were prepared in permeabilization buffer (1 μl of each antibody, except 1.5 μl of FoxP3) and added to cells for 45 minutes at RT. Finally, the cells were washed twice with SB. In this manuscript, this experimental condition is termed "INSb 1" for intranuclear staining buffer 1 in the figure legends.

Fixation and permeabilization using Maxpar Nuclear Antigen Staining Buffer set (NASB) (Fluidigm, les Ulis, France Catalog # 201063). The cells were treated and stained according to the manufacturer's instructions. Briefly, Nuclear antigen staining buffer concentrate was diluted 4X in Nuclear antigen staining buffer diluent, and 1 ml was added to cells for 30 minutes at RT. The mix of antibodies targeting intranuclear antigens was prepared in "nuclear antigen staining perm" at a final volume of 50 μl (1 μl of each antibody, except 1.5 μl of FoxP3) and added to cells for 30 minutes at RT. Finally, the cells were washed twice with SB. In this manuscript, this experimental condition is termed "INSb 2" for intranuclear staining buffer 2 in the figure legends.

Fixation using Paraformaldehyde (PFA) (Sigma Aldrich, Saint Quentin, France) and permeabilization using and methanol (Sigma Aldrich, Saint Quentin-France). Two hundred and fifty microliters of 2% PFA were added to cells for 15 minutes at RT. The cells were washed in 1.5 ml of SB and placed on ice for 10 minutes. One millilitre of pre-cooled methanol was added to cells on ice for an additional 10 minutes. The cells were washed in 500 μl of SB, followed by the addition of a mix of 50 μl of antibodies targeting intranuclear markers in SB for 1 hour at RT (1 μl of each antibody, except for 1.5 μl of FoxP3). Two final washes were performed in SB. In this manuscript, this experimental condition is termed "INSb 3" for intranuclear staining buffer 3 in the figure legends.

Barcoding of samples

Cells from a healthy donor were thawed and stained with Cisplatin as described above. Next, the cells were split into 3 tubes containing 2 million cells each for the following conditions: no barcoding, barcoding before cell surface staining and barcoding after cell surface staining. The samples were labelled with antibodies targeting CD45, CD3, CD4, CD127 and CD25.

No barcoding. Antibodies targeting CD45, CD3, CD4, CD127 and CD25 were added to cells at a final volume of 50 μl in SB for 30 minutes at RT as described above.

Barcoding before cell surface staining. Cells were incubated in 1 ml of BD cytofix/cytoperm buffer for 10 minutes at RT. Next, cells were washed 2X with 1 ml of BD wash/perm buffer and suspended in 800 μl of BD wash/perm buffer. Palladium isotopes were suspended in 100 μl of each buffer BD wash/perm buffer and added to cells for 30 minutes at RT. Finally, the cells were washed 2X with SB and incubated in a mix of antibodies containing 1 μl of each antibody targeting CD45, CD3, CD4, CD127 and CD25 for 30 minutes at RT as described above.

Barcoding after cell surface staining. Cells were incubated in 50 μl of SB containing 1 μl of each antibody targeting CD45, CD3, CD4, CD127 and CD25 for 30 minutes at RT as described above. Next, the cells were incubated with either 1 ml of BD cytofix/cytoperm buffer for 10 minutes at RT. Next, the cells were washed 2X with 1 ml of BD wash/perm buffer and suspended in 800 μl of BD wash/perm buffer. Palladium isotopes were suspended in 100 μl of BD wash/perm buffer and added to cells for 30 minutes at RT. Finally, cells were washed 2X with SB.

Assessment of the loss of signal intensity of surface markers after barcoding

Cells from a healthy donor were thawed and incubated for 5 minutes in 5 μM Cisplatin as described above. Next, the cells were divided into 3 tubes containing 1 million cells each for no barcode/no permeabilization, permeabilization only/no barcode and permeabilization/barcode groups. Samples were incubated in a final volume of 50 μl SB containing 1 μl of each antibody targeting CD45, CD3, CD4, CD127 and CD25 for 30 minutes at RT as described above.

DNA staining

After the end of each experimental condition described above, DNA was labelled with Cell-ID Intercalator-Ir-125 μM (Fluidigm, les Ulis, France, Catalog # 201192A) diluted 1:1000 in Maxpar Fix and perm Buffer (Fluidigm, les Ulis, France, Catalog # 201067) overnight at 4˚C. Nevertheless, Cell-ID Intercalator-Ir-125 μM was diluted in 2% PFA for the Methanol/PFA permebilization conditions. The following day, the cells were washed once with staining buffer and once with PBS. Immediately before acquisition, cells were washed once with water, filtered and diluted with 4 element EQ beads (Fluidigm, les Ulis, France).

Mass cytometric data acquisition and analysis

Cellular events were acquired on the Helios, which is available at the "*Plateforme de Cytométrie de la Pitié-Salpêtrière*". Cells were acquired at a speed of 300 events per second, with a cell length threshold between 10 and 150 pushes. The 4 elements EQ beads were used to normalize files using the Matlab compiler software cell normalizer. Data files were obtained in the FCS file format and analysed using FlowJo software version 10 and Cytobank cloud based platform. Beads were gated out using the following gates: 140/142Ce, 151/153Eu, 165Ho and 175/176 Lu. CD45+ events were selected for the analysis of different cell populations. Cisplatin+ dead cells were gated out and we performed a viSNE (Stochastic Neighbor Embedding) analysis on CD45+ cells for auniform and non-biased separation of events. The settings used for the viSNE run were as follow: equal event sampling (20.000 events each), channels (CD19, CD4, IgD, CD16, CD14, CD8, CD56 and CD3), iterations (1000), perplexity (50) and theta (0.3).

Statistics

All the experiments were performed at least 3 times independently. Different indivuals were used for independent experiments. For the comparison of frequencies including cell surface markers, the "surface staining only" condition was used as the control. On the other hand, the "eBioscience permeabilization buffer" condition was used as the control for the comparison of intranuclear markers. Statistics were performed using the GraphPad Prism version 6 software. For multiple comparisons, we used one-way ANOVA with Bonferroni's multiple correction test (* if $p<0.05$, ** if $p<0.001$, *** if $p<0.0001$).

Results

Effects of different buffers on the detection of cell surface antigens

Our first aim was to compare the effects of different buffers on the detection of cell surface markers. We performed viSNE analyses to avoid bias issues with gating strategy. Strikingly, viSNE plots show variable intensities of surface markers such as CD19, CD56 and CD16 when the "cell surface staining only" conditions were compared to Maxpar NASB and eBioscience Permeabilization buffers (Fig 1). Additional viSNE plots showing the intensities of CD45, CD3, CD4, CD8 and IgD are available in S1 Fig**.** Interestingly, BD cytofix/cytoperm buffer and PFA/methanol allowed for detection of population frequencies very close to the "surface staining only" conditions. Greater variations of percentages were observed with eBioscience Permeabilization buffer and Maxpar NASB. For example, the median percentages of CD19 + events, CD16+ events and CD56+ events for all experiments (n = 3–5) is as follows: respectively 9%, 29% and 25% for the control condition, respectively 12%, 26% and 24% for BD cytofix/cytoperm buffer, respectively 8%, 17% and 14% for eBioscience permeabilization buffer, respectively 3%, 7% and 6% for MaxPar NASB and respectively 8%, 29% and 27% for methanol/PFA (Fig 2). We performed antibody titration assays, to rule out the possibility that antibodies were not used at saturating conditions S2 Fig.

Furthermore, variations in the frequencies of rare CD4+ populations, such as regulatory T cells (Treg)(CD3+CD4+CD25^{hi}CD127^{low}) and primed T cells (CD3+CD4+CXCR5+CCR7+) were observed with eBioscience Permeabilization buffer and Maxpar NASB (Fig 3). We also observed a particular distribution of CXCR5/CCR7 events in the PFA/methanol conditions. Finally, we compared the frequencies of rare B cell populations, such as transitional B cells (CD19+CD24^{hi}CD38^{hi}) and un-switched memory B cells (CD19+IgD+CD27+) among the different conditions (Fig 3). The most striking observation was the variation of transitional B cells within the various conditions tested. While the "surface staining only condition", BD

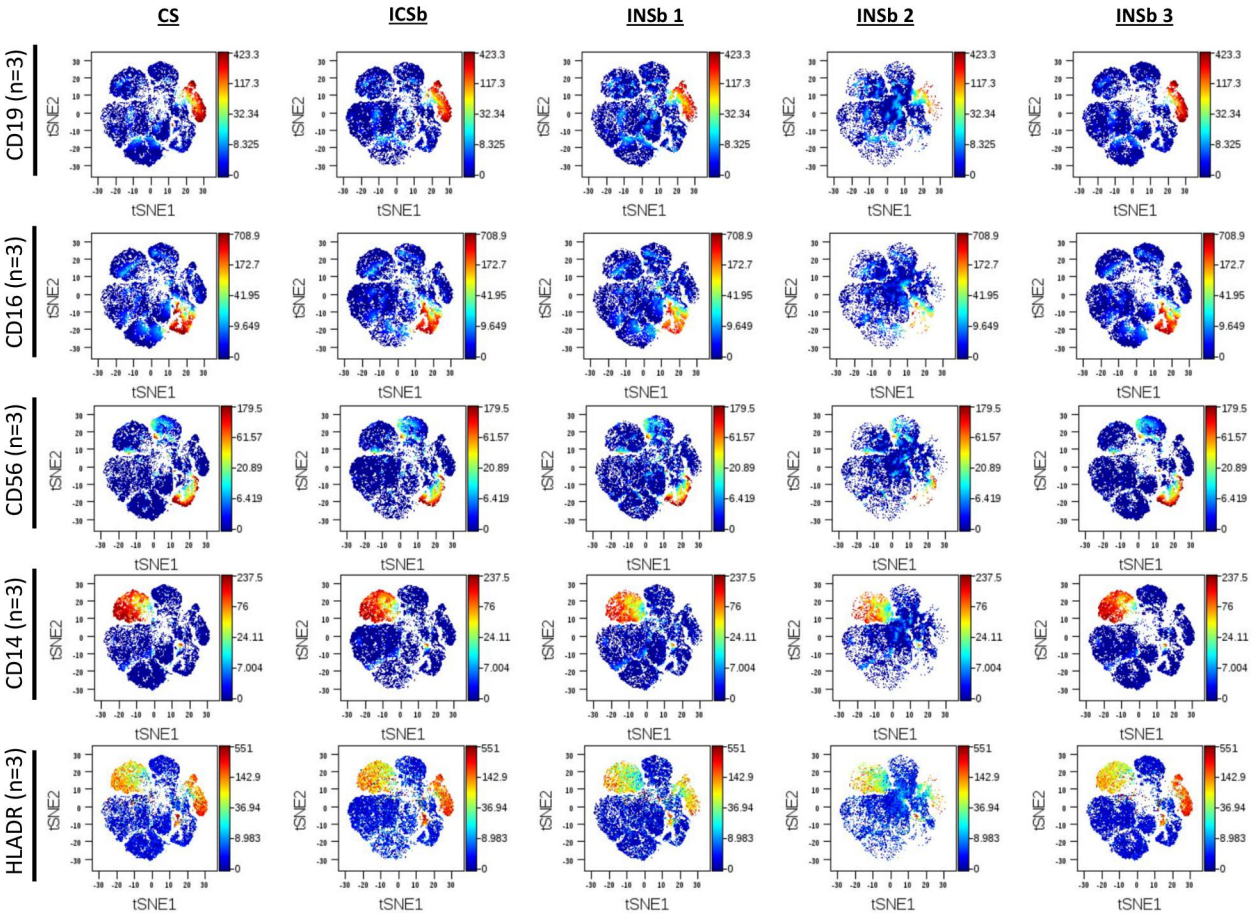


Fig 1. Visualization of the effects of different buffers on the intensity of cell surface markers. Cells from healthy donors were labeled with antibodies targeting both cell surface antigens and intranuclear antigens. Data show the distribution of CD45+ live cells on viSNE plots with the "cell surface staining" only condition (CS) and the different permeabilization conditions: ICSb (BD cytofix/cytoperm buffer), INSb 1 (eBioscience permeabilization buffer), INSb 2 (Maxpar NASB) and INSb 3 (Methanol/PFA). The intensity of CD19+, CD16+, CD56+, CD14+ and HLADR + events are shown. The concentrations of antibodies used for the detection of these markers are as follows: CD19 (0.5 mg/ml), CD16 (0.2 mg/ml), CD56 (0.1 mg/ml), CD14 (0.3 mg/ml) and HLADR (0.3 mg/ml). viSNE was performed using 1000 iterations, with a perplexity of 30 and theta = 0.3. The data shown are representative of an independent experiment and represent median with interquartile. Experiments were performed 3 times independently. Different healthy individuals were used for each independent experiment.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194593.g001

Cytofix/Cytoperm buffer and methanol/PFA conditions displayed a median percentage of 3%, 3% and 1.5% of transitional B cells, respectively, eBioscience Permeabilization buffer and Maxpar NASB displayed only 0.5% and 0.2% respectively (Fig 3). A comparison of the median percentages of naïve B cells (CD19+IgD+CD27-), switched memory B cells (CD19+IgD-CD27+) and other CD4+ T cell populations are available in **S3 Fig**. Histograms of all surface markers are available in **S4 Fig**.

Detection of intranuclear antigens using different buffers:

Our next aim was to compare the effects of the different buffers on the quantification of intranuclear markers. Here, we used different intranuclear markers to define T CD4+ lineages: regulatory T cells (Tregs) (CD3+CD4+CD25^{hi}FoxP3+), Th17 cells (CD3+CD4+RorgammaT+), follicular helper T cells (Tfh)(CD3+CD4+Bcl6+) and also CD8+Tbet+ cells. The most striking observation was the detection of intranuclear markers using the adapted BD cytofix/cytoperm protocol. We observed median percentages of 2.7%, 0.2%, 0.1% and 38% respectively for

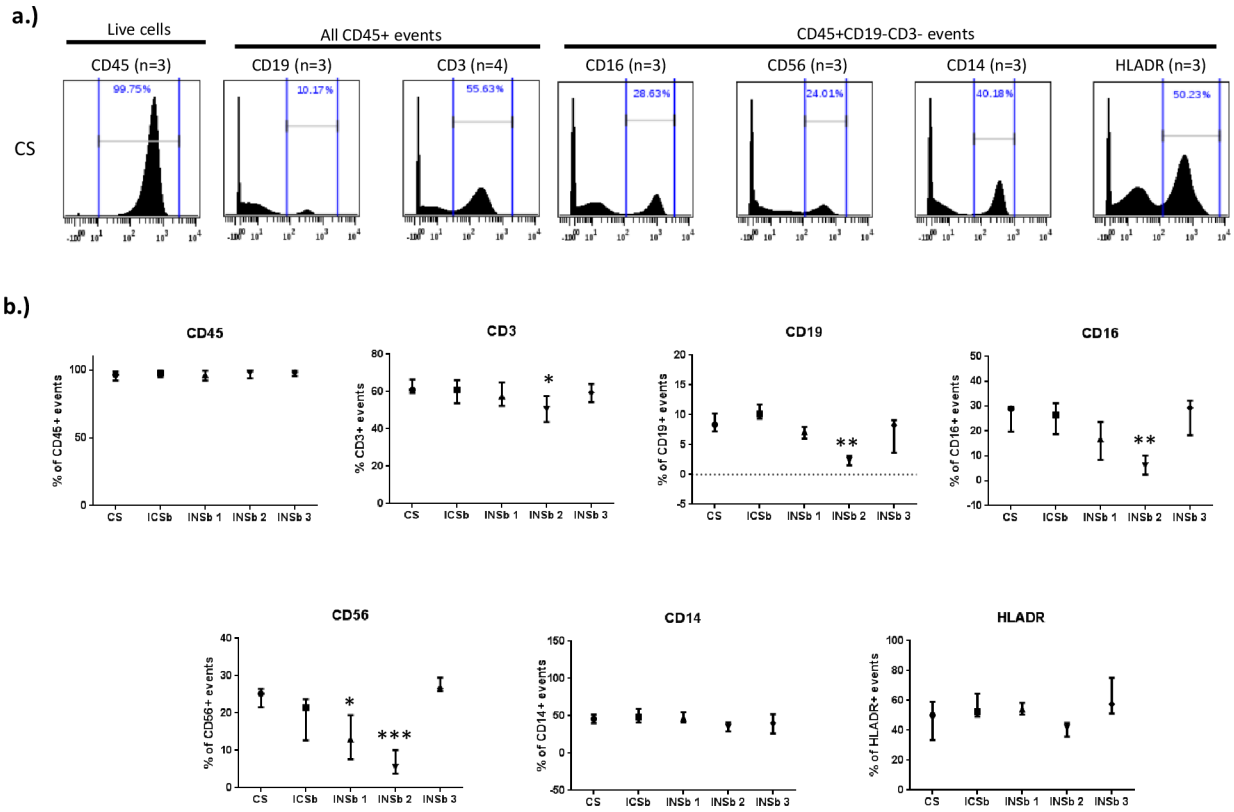


Fig 2. Effects of different buffers on the detection of cell surface markers. Cells from healthy donors were labelled with antibodies targeting both cell surface and intranuclear antigens. Different permeabilization conditions are compared to the cell surface staining only" (CS) condition: ICSb (BD cytofix/cytoperm buffer), INSb 1 (eBioscience permeabilization buffer), INSb 2 (Maxpar NASB) and INSb 3 (Methanol/PFA). Here, we show the effects of different permeabilization conditions on the frequency of various cell surface markers. a.) Histograms showing the frequency and distribution of CD45+, CD19+, CD3+, CD16+, CD56+, CD14+ and HLADR+ events in the CS condition. The concentrations of antibodies used were: CD45 (0.5 mg/ml), CD19 (0.5 mg/ml), CD3 (0.08 mg/ml), CD16 (0.2 mg/ml), CD56 (0.1 mg/ml), CD14 (0.3 mg/ml) and HLADR (0.3 mg/ml). b.) Comparison of the frequency of CD45+, CD19+, CD3+, CD16+, CD56+, CD14+ and HLADR+ events between the CS condition and the different permeabilization conditions. Statistics was performed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple test correction ($^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.001$, $^{***}p<0.0001$). The data shown are representative of an independent experiment and represent median with interquartile. Experiments were performed 3 times independently. Different healthy individuals were used for each independent experiment.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194593.g002

Tregs, Th17 cells, Tfh cells and CD8+Tbet+ cells with eBioscience Permeabilization buffer versus 2.2%, 0.2%, 0.05% and 30% respectively for BD cytofix/cytoperm buffer (Fig 4). In addition, the median percentages of Tregs, Th17 cells, Tfh cells and CD8+Tbet+ cells for the Maxpar NASB conditions were: respectively 2.1%, 0.1%, 0.2% and 29% versus 2.2%, 0.05%, 0.03% and 13% respectively for the PFA/Methanol conditions. The adapted protocol using BD cytofix/cytoperm buffer also allowed the detection of cell cycle markers S4 Fig.

Effects of permeabilization prior to barcoding on the detection of cell surface antigens

Finally, we assessed the effects of the fixation and permeabilization step prior to barcoding on the signal intensity of 5 surface antigens (CD45, CD3, CD4, CD127 and CD25). We observed a very weak signal intensity of CD127 and a loss of the $CD4^{intermediate}$ populations when barcoding was performed prior to cell surface staining. What remained unclear was whether the barcode or the permeabilization step was responsible for this weaker expression. Surprisingly, the weaker signal intensity of CD4 and CD127 was observed when BD permeabilization buffer

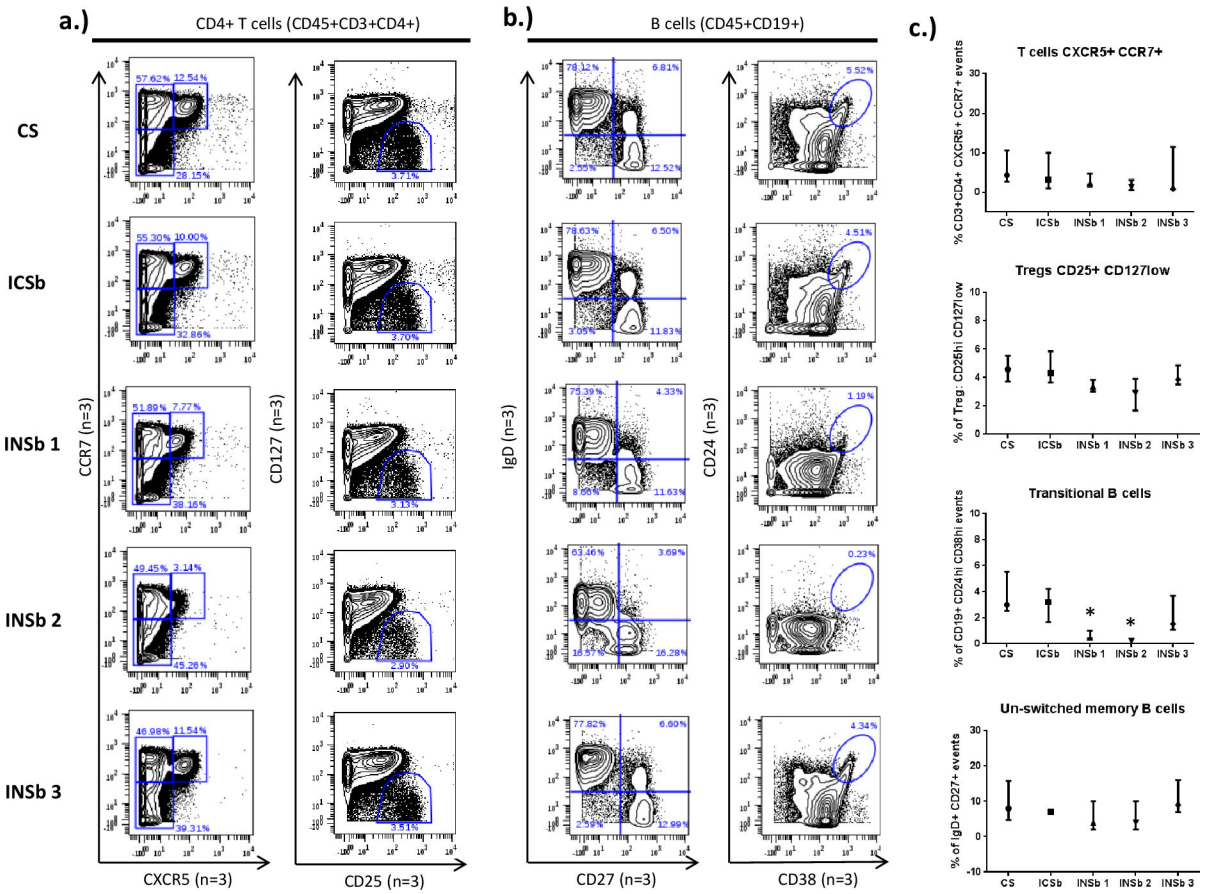


Fig 3. Effects of different buffers on the detection of rare populations. Cells from healthy donors were labelled with antibodies targeting both cell surface and intranuclear antigens. Different permeabilization conditions are compared to the cell surface staining only" (CS) condition: ICSb (BD cytofix/cytoperm buffer), INSb 1 (eBioscience permeabilization buffer), INSb 2 (Maxpar NASB) and INSb 3 (Methanol/PFA). This data compare the frequency of various CD45+ populations between the CS condition and the different permeabilization conditions. a.) Frequencies of rare CD4+ T cell populations: primed T cells (CXCR5+ CCR7+) and Treg cells ($CD25^{hi}$ $CD127^{low}$). b.) Frequencies of rare B cell populations such as transitional B cells ($CD24^{hi}CD38^{hi}$) and un-switched memory B cells (CD19+IgD+CD27+). c.) Statistics showing the comparison of the frequency of rare T and B cell populations within the different experimental conditions. The concentrations of antibodies used were: CXCR5 (0.04 mg/ml), CCR7 (0.5 mg/ml), CD25 (0.5 mg/ml), CD127 (0.5 mg/ml), CD24 (0.3 mg/ml), CD38 (0.3 mg/ml), IgD (0.25 mg/ml) and CD27 (0.1 mg/ml). Statistics was performed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple test correction ($^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.001$, $^{***}p<0.0001$). The data shown are representative of an independent experiment and represent median with interquartile. Experiments were performed 3 times independently. PBMC from different individuals were used for each independent experiment.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194593.g003

was used alone without any barcode (Fig 5). Increase concentrations of CD127 and CD4 antibodies were not sufficient to prevent the loss observed (S6 Fig).

Discussion

Mass cytometry is an innovative tool that allows for simultaneous detection of up to 40 markers at the single cell level. The broad detection capacity of mass cytometry is of particular interest when a wide range of cellular markers can be identified at the same time, which makes this tool a precious asset in clinical trials, deep phenotyping and cell population discovery [12–13]. Nevertheless, it is important to choose appropriate fixation and permeabilization conditions to clearly detect cell surface and intranuclear antigens. In this study, we assessed the effects of 4 permeabilization conditions on the detection of cell surface and intranuclear markers on non-

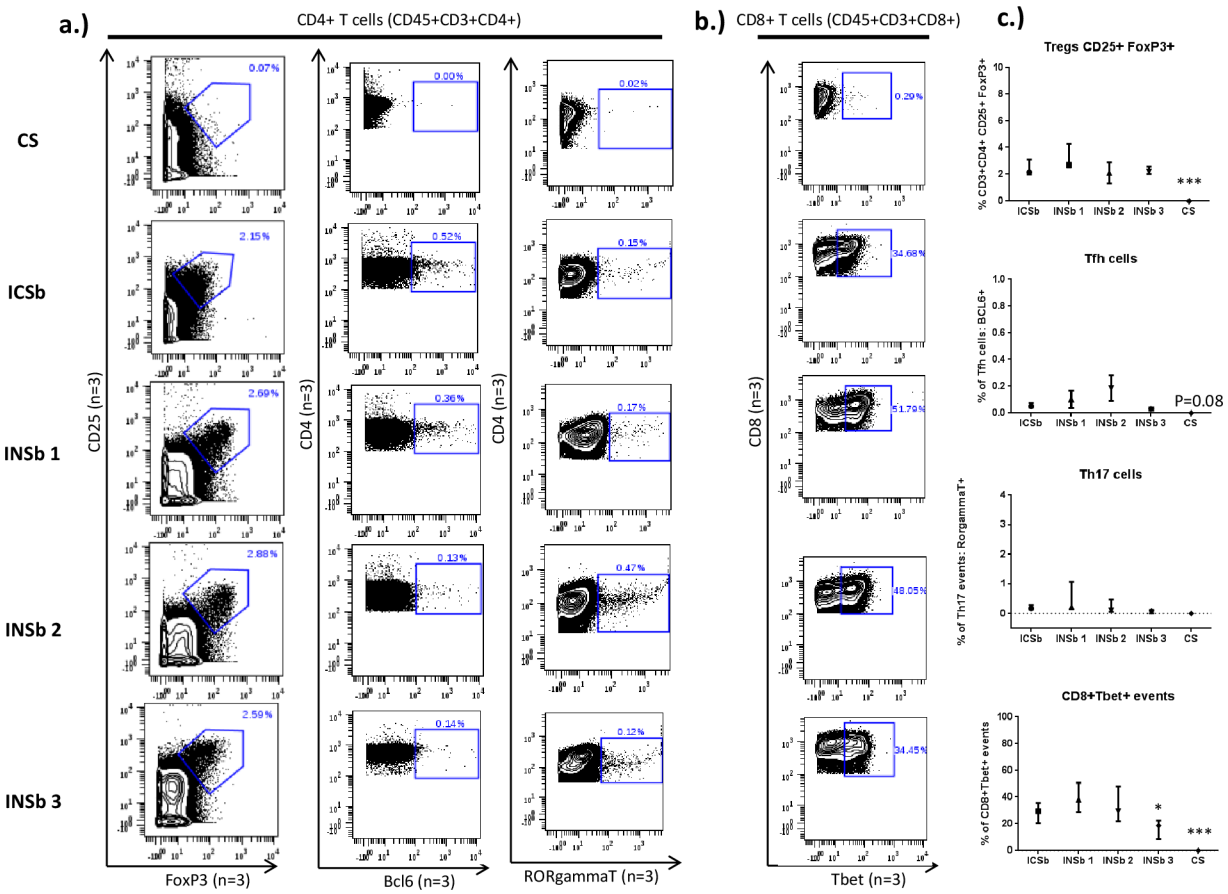


Fig 4. Detection of intranuclear markers using the adapted BD cytofix/cytoperm protocol. Cells from healthy donors were incubated with antibodies targeting cell surface antigens and then split into 5 for the following conditions: the "surface staining only" conditions (CS), and fixation and permeabilization using either BD cytofix/cytoperm buffer (ICSb), eBioscience fixation and permeabilization buffer (INSb 1), Maxpar NASB (INSb 2) and PFA/methanol (INSb 3). Next cells were labelled with a mix of antibodies targeting intranuclear markers. Data compare the frequencies of Treg cells (CD25hiFoxP3+), Tfh cells (CD4+BCL6+), Th17 cells (CD4+RoryT+) and CD8+Tbet+ cells between the various permeabilization conditions. The concentrations of antibodies used are as follow: FoxP3 (0.3 mg/ml), BCL6 (0.8 mg/ml), RoryT (0.6 mg/ml) and Tbet (0.3 mg/ml). Statistics was performed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple test correction ($^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.001$, $^{***}p<0.0001$). Data obtained from all the other permeabilization conditions were compared to INSb 1 condition. The data shown are representative of an independent experiment and represent median with interquartile. Experiments were performed 3 times independently. PBMC from different individuals were used for each independent experiment.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194593.g004

stimulated human PBMC: "BD cytofix/cytoperm buffer", "eBioScience permeabilization buffer", "Maxpar NASB" and "PFA/Methanol". We used a panel of 27 antibodies including 19 antibodies targeting cells surface antigens and 8 antibodies targeting intranuclear antigens.

The frequencies of the populations described in the control conditions are in accordance with those observed in the literature [14–17]. As expected, permeabilization was associated with lower frequencies of populations gated using surface markers. The variations observed were dependent on the buffer used. Variations in antibody concentrations are ruled out, since all cells were stained together before being split into the different permeabilization conditions. Considering that antibodies are efficiently coupled to surface antigens before the fixation/permeabilization step, we believe that the variations observed are due to the partial destruction of epitopes by the buffers.

Epitope instability upon permeabilization is well known in flow cytometry [5]; which explains our observations. Nevertheless, mass cytometry offers a broader range of antigen

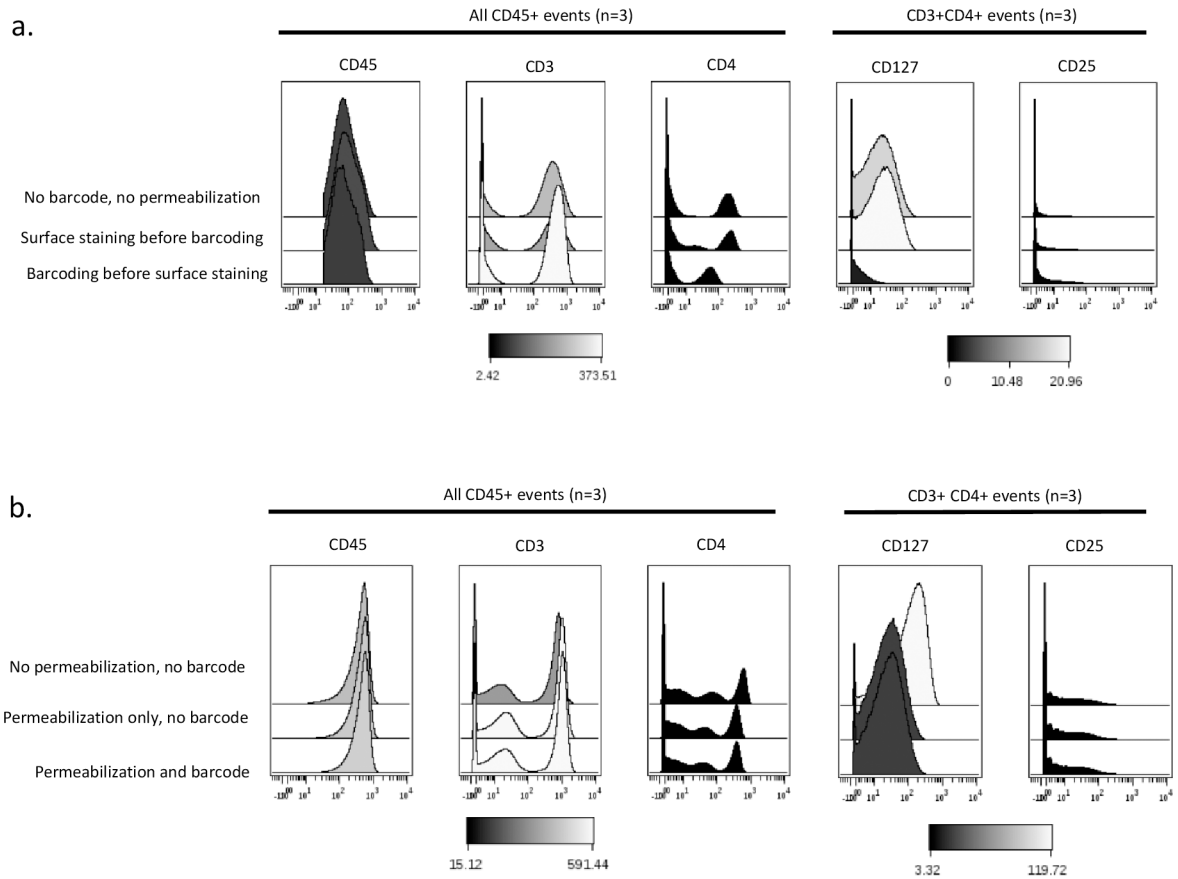


Fig 5. Partial loss of the signal intensity of CD4 and CD127 after barcoding. Cells were thawed as described above and used for the following purposes: a) assessment of the effects of barcoding on the expression of surface markers. Three experimental conditions were performed: no barcode/no permeabilization, surface staining before barcoding and finally barcoding before surface staining. Data show histogram overlays of CD45, CD3, CD4, CD127 and CD25 for the different conditions. The concentrations of antibodies used are as follow: CD45 (0.5 mg/ml), CD3 (0.08 mg/ml), CD4 (0.25 mg/ml), CD127 (0.5 mg/ml) and CD25 (0.5 mg/ml). b) Assessment of the cause of the lower signal intensity of CD4 and CD127 when PBMC are barcoded before cell surface staining. 3 conditions were evaluated: no barcode/no permeabilization, permeabilization only/no barcoding and permeabilization followed by barcoding. Data show histogram overlays of CD45, CD3, CD4, CD127 and CD25 for the different conditions. The data shown are representative of an independent experiment. Experiments were performed 3 times independently. PBMC from different individuals were used for each independent experiment.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194593.g005

detection compared to flow cytometry. Therefore, the setting of a suitable protocol to limit epitope instability is necessary to optimize the potential of mass cytometry.

For permeabilization protocols, we choose as reference eBioscience buffer, since the results we obtained (intranuclear T CD4+ cells markers) were similar with those previously reported [18–20]. It is important to remind that BD cytofix/cytoperm is a buffer for intracellular cytokines detection, whereas MaxPar NASB and Methanol/PFA are dedicated to intranuclear staining. In this study, the optimization we made of BD cytofix/cytoperm protocol permits the detection of intranuclear targets with the same efficacy as intranuclear permeabilization buffers (eBioscience Permeabilzation buffer, MaxPar NASB and PFA/Methanol). In addition, this optimized protocol does not alter the detection of surface markers.

Here, we also assessed the effects of the recommended quick permeabilization step prior to barcoding on the detection of 5 surface markers. We observed weaker signal intensities of CD4 and especially CD127 when cells were barcoded before cell surface staining. Accordingly, the poor performance of CD127 upon barcoding was previously described [7]. To overcome

such issues, Zunder and colleagues described various troubleshooting approaches when barcoding cells [3]. They described the detection of lower antibody staining intensity as a result of high mass-cell tag barcoding. In this study, we demonstrated that the lower staining intensity of CD127 and CD4 is not due to the mass-cell barcoding tag, but rather to the permeabilization step performed. Recently, a different barcoding approach based on CD45 coupled to different metal tags was described [21–22]. This novel barcoding approach does require any permeabilization step; however its application is limited to cells that uniformly express CD45.

Conclusion

In conclusion, here we compared different permeabilization protocols and showed that our adapted protocol allows the detection of intranuclear markers without altering the detection of a large panel of cell surface markers. Finally, we also confirmed the poor performance of CD127 upon barcoding. We show that this poor performance is due to the permeabilization step, and not due to the palladium isotopes. We suggest performingbarcoding after cell surface staining or after the staining of sensitive epitopes, thereby protecting sensitive epitopes while preserving a uniform intra-assay staining and acquisition of events.

Supporting information

S1 Table. List of antibodies.
(PDF)

S1 Fig. Distribution of CD45, CD3, CD4, CD8 and IgD on viSNE plots.
(PDF)

S2 Fig. Saturating conditions of CD19, CD3, CD16 and CD56.
(PDF)

S3 Fig. Median percentages of B and T cell populations.
(PDF)

S4 Fig. Histograms of all surface markers.
(PDF)

S5 Fig. Visualization of cell cycle markers.
(PDF)

S6 Fig. Saturating conditions of antibodies for barcoding conditions.
(PDF)

Author Contributions

Conceptualization: Gaëlle Dzangué-Tchoupou, Olivier Benveniste.

Data curation: Gaëlle Dzangué-Tchoupou.

Formal analysis: Gaëlle Dzangué-Tchoupou.

Investigation: Gaëlle Dzangué-Tchoupou.

Methodology: Gaëlle Dzangué-Tchoupou.

Software: Gaëlle Dzangué-Tchoupou.

Supervision: Olivier Benveniste, Yves Allenbach.

Validation: Gaëlle Dzangué-Tchoupou, Aurélien Corneau, Catherine Blanc, Olivier Benveniste.

Visualization: Gaëlle Dzangué-Tchoupou.

Writing – original draft: Gaëlle Dzangué-Tchoupou.

Writing – review & editing: Gaëlle Dzangué-Tchoupou, Aurélien Corneau, Catherine Blanc, Olivier Benveniste, Yves Allenbach.

References

1. Bjornson ZB, Nolan GP, Fantl WJ. Single-cell mass cytometry for analysis of immune system functional states. Curr Opin Immunol. 2013 Aug; 25(4):484–94. https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.07.004 PMID: 23999316
2. Bendall SC, Simonds EF, Qiu P, Amir el-A, Krutzik PO, Finck R, et al. Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. Science. 2011 May; 332(6030):687–96. https://doi.org/10.1126/science.1198704 PMID: 21551058
3. Zunder ER, Finck R, Behbehani GK, Amir E-AD, Krishnaswamy S, Gonzalez VD, et al. Palladium-based mass tag cell barcoding with a doublet-filtering scheme and single-cell deconvolution algorithm. Nat Protoc. 2015 Feb; 10(2):316–33. https://doi.org/10.1038/nprot.2015.020 PMID: 25612231
4. Baumgart S, Peddinghaus A, Schulte-Wrede U, Mei HE, Grützkau A. OMIP-034: Comprehensive immune phenotyping of human peripheral leukocytes by mass cytometry for monitoring immunomodulatory therapies. Cytom A. 2017 Jan; 91(1):34–8.
5. Krutzik PO, Clutter MR, Nolan GP. Coordinate analysis of murine immune cell surface markers and intracellular phosphoproteins by flow cytometry. J Immunol Baltim Md 1950. 2005 Aug 15; 175 (4):2357–65.
6. Yao Y, Liu R, Shin MS, Trentalange M, Allore H, Nassar A, et al. CyTOF supports efficient detection of immune cell subsets from small samples. J Immunol Methods. 2014 Dec 15; 415:1–5. https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.10.010 PMID: 25450003
7. Nassar AF, Wisnewski AV, Raddassi K. Automation of sample preparation for mass cytometry barcoding in support of clinical research: protocol optimization. Anal Bioanal Chem [Internet]. 2017 Jan; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28124752
8. Behbehani GK, Thom C, Zunder ER, Finck R, Gaudilliere B, Fragiadakis GK, et al. Transient partial permeabilization with saponin enables cellular barcoding prior to surface marker staining. Cytom Part J Int Soc Anal Cytol. 2014 Dec; 85(12):1011–9.
9. Bodenmiller B, Zunder ER, Finck R, Chen TJ, Savig ES, Bruggner RV, et al. Multiplexed mass cytometry profiling of cellular states perturbed by small-molecule regulators. Nat Biotechnol. 2012 Sep; 30 (9):858–67. https://doi.org/10.1038/nbt.2317 PMID: 22902532
10. Han L, Qiu P, Zeng Z, Jorgensen JL, Mak DH, Burks JK, et al. Single-cell mass cytometry reveals intracellular survival/proliferative signaling in FLT3-ITD-mutated AML stem/progenitor cells. Cytom A. 2015 Apr; 87(4):346–56.
11. Corneau A, Cosma A, Even S, Katlama C, Le Grand R, Frachet V, et al. Comprehensive Mass Cytometry Analysis of Cell Cycle, Activation, and Coinhibitory Receptors Expression in CD4 T Cells from Healthy and HIV-Infected Individuals. Cytom B Clin Cytom. 2017 Jan; 92(1):21–32.
12. Nassar AF, Wisnewski AV, Raddassi K. Mass cytometry moving forward in support of clinical research: advantages and considerations. Bioanalysis. 2016 Feb; 8(4):255–7. https://doi.org/10.4155/bio.15.257 PMID: 26847541
13. Nassar AF, Ogura H, Wisnewski AV. Impact of recent innovations in the use of mass cytometry in support of drug development. Drug Discov Today. 2015 Oct; 20(10):1169–75. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.06.001 PMID: 26092491
14. Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, Kim CH. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25 + regulatory T cells. J Immunol Baltim Md 1950. 2005 Oct 1; 175(7):4180–3.
15. Lin W, Jin L, Chen H, Wu Q, Fei Y, Zheng W, et al. B cell subsets and dysfunction of regulatory B cells in IgG4-related diseases and primary Sjögren's syndrome: the similarities and differences. Arthritis Res Ther. 2014 May 29; 16(3):R118. https://doi.org/10.1186/ar4571 PMID: 24887143
16. Schaerli P, Willimann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, Moser B. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. J Exp Med. 2000 Dec 4; 192(11):1553–62. PMID: 11104798

17. Morbach H, Eichhorn EM, Liese JG, Girschick HJ. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. Clin Exp Immunol. 2010 Nov; 162(2):271–9. https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04206.x PMID: 20854328

18. Ateba-Ngoa U, Mombo-Ngoma G, Zettlmeissl E, van der Vlugt LEPM, de Jong SE, de Jong S, et al. CD4+CD25hiFOXP3+ cells in cord blood of neonates born from filaria infected mother are negatively associated with CD4+Tbet+ and CD4+RORγt+ T cells. PloS One. 2014; 9(12):e114630. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114630 PMID: 25531674

19. Saygılı T, Akıncılar SC, Akgül B, Nalbant A. Aggregatibacter actinomycetemcomitans GroEL protein promotes conversion of human CD4+ T cells into IFNγ IL10 producing Tbet+ Th1 cells. PloS One. 2012; 7(11):e49252. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049252 PMID: 23152883

20. Shen H, Goodall JC, Hill Gaston JS. Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2009 Jun; 60(6):1647–56. https://doi.org/10.1002/art.24568 PMID: 19479869

21. Mei HE, Leipold MD, Schulz AR, Chester C, Maecker HT. Barcoding of live human peripheral blood mononuclear cells for multiplexed mass cytometry. J Immunol Baltim Md 1950. 2015 Feb 15; 194(4):2022–31.

22. Lai L, Ong R, Li J, Albani S. A CD45-based barcoding approach to multiplex mass-cytometry (CyTOF). Cytom Part J Int Soc Anal Cytol. 2015 Apr; 87(4):369–74.

Evaluating the Efficiency of Isotope Transmission for Improved Panel Design and a Comparison of the Detection Sensitivities of Mass Cytometer Instruments

Sabine Tricot,[1,2,3] Mickael Meyrand,[4] Chiara Sammicheli,[5] Jamila Elhmouzi-Younes,[1,2,3] Aurélien Corneau,[6] Sylvie Bertholet,[5] Marie Malissen,[4] Roger Le Grand,[1,2,3] Sandra Nuti,[5] Hervé Luche,[4] Antonio Cosma[1,2,3*]

1 CEA, Division of Immuno-Virology, IDMIT Center, Institute for Emerging Diseases and Innovative Therapies (iMETI), DSV, Fontenay-aux-Roses, France

2 Université Paris-Sud, UMR E1, Orsay, France

3 Vaccine Research Institute (VRI), Créteil, France

4 Centre d'Immunophenomique , PHENO- MIN, INSERM US012, CNRS UMS3367, UM2 Aix-Marseille Universit e, Marseille, France

5 Novartis Vaccines, Siena, Italy

6 UPMC, UMS Imagerie/Cytom etrie LUMIC, Paris, France

L'introduction de la cytométrie de masse, couplant un système d'introduction de cellules générant un flux de cellules uniques avec la spectrométrie de masse, a considérablement augmenté le nombre de paramètres pouvant être mesurés par cellule. Comme pour toute nouvelle technologie, il est nécessaire de diffuser les procédures de normalisation et de contrôle de la qualité. Ici, nous caractérisons les variations de sensibilité observées dans la gamme de masse d'un cytomètre de masse, en utilisant différents marqueurs de type lanthanides. Nous avons observé une différence de détection de cinq fois supérieure en fonction de l'isotope utilisé dans la gamme de masse et démontré que chaque instrument a son propre schéma de sensibilité. Par conséquent, la sélection des combinaisons de lanthanides est une étape clé dans l'établissement d'un panel de marquage pour les expériences basées sur la cytométrie de masse, en particulier pour les études multicentriques. Nous proposons le modèle de sensibilité comme base pour la conception des pannels, la normalisation des instruments et la mise en œuvre future des algorithmes de normalisation.

Cytometry PART A
Journal of the International Society for Advancement of Cytometry

MIFlowCyt

Evaluating the Efficiency of Isotope Transmission for Improved Panel Design and a Comparison of the Detection Sensitivities of Mass Cytometer Instruments

Sabine Tricot,[1,2,3] Mickael Meyrand,[4] Chiara Sammicheli,[5] Jamila Elhmouzi-Younes,[1,2,3] Aurélien Corneau,[6] Sylvie Bertholet,[5] Marie Malissen,[4] Roger Le Grand,[1,2,3] Sandra Nuti,[5] Hervé Luche,[4] Antonio Cosma[1,2,3]*

[1]CEA, Division of Immuno-Virology, IDMIT Center, Institute for Emerging Diseases and Innovative Therapies (iMETI), DSV, Fontenay-aux-Roses, France

[2]Université Paris-Sud, UMR E1, Orsay, France

[3]Vaccine Research Institute (VRI), Créteil, France

[4]Centre d'Immunophenomique , PHENOMIN, INSERM US012, CNRS UMS3367, UM2 Aix-Marseille Université, Marseille, France

[5]Novartis Vaccines, Siena, Italy

[6]UPMC, UMS Imagerie/Cytométrie LUMIC, Paris, France

Received 2 September 2014; Revised 20 January 2015; Accepted 3 February 2015

Grant sponsor: EU/EFPIA Innovative Medicines Initiative Joint Undertaking, Grant number: 115308 (BioVacSafe)

Grant sponsor: French Government Program: "Investissement d'avenir", Grant number: ANR-10-EQPX-02-01

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Correspondence to: Antonio Cosma, CEA, Division of Immuno-Virology, 18, route du panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France. E-mail: antonio.cosma@cea.fr

ISAC
International Society for Advancement of Cytometry

• **Abstract**

The recent introduction of mass cytometry, a technique coupling a cell introduction system generating a stream of single cells with mass spectrometry, has greatly increased the number of parameters that can be measured per single cell. As with all new technology there is a need for dissemination of standardization and quality control procedures. Here, we characterize variations in sensitivity observed across the mass range of a mass cytometer, using different lanthanide tags. We observed a five-fold difference in lanthanide detection over the mass range and demonstrated that each instrument has its own sensitivity pattern. Therefore, the selection of lanthanide combinations is a key step in the establishment of a staining panel for mass cytometry-based experiments, particularly for multicenter studies. We propose the sensitivity pattern as the basis for panel design, instrument standardization and future implementation of normalization algorithms. © 2015 International Society for Advancement of Cytometry

• **Key terms**

Key terms: mass cytometry; CyTOF; standardization; flow cytometry

CYTOMETRY by time-of-flight (CyTOF) is a recently developed technique allowing the simultaneous detection of more than 40 parameters at the single cell level. CyTOF technology is novel in that it makes use of antibodies or other specific probes conjugated with pure metal isotopes to label cells that are finally detected by atomic mass spectrometry (1). CyTOF technology has recently been used to characterize signaling pathways in hematopoietic cells (2,3), to analyze cytokine expression and phenotype in detail in antigen-specific CD8 T cells (4) and to map cell-cycle phases in PBMCs and bone marrow aspirates (5). The advantages of this new technology over conventional fluorescence-based flow cytometry were described in detail in a recent review (6). In short, whereas conventional flow cytometry can be used to measure fluorescence in a maximum of 18 channels, with considerable spectral overlap requiring *ad hoc* mathematical processing, CyTOF technology makes it possible to measure more than 40 different parameters, with minimal spectral overlap. The fluorochromes used in conventional flow cytometry include small organic molecules, such as FITC, and larger proteins, such as allophycocyanin, which may differ considerably in molecular weight and chemical properties. In addition, each fluorochrome has its own unique excitation and emission spectra and its spillover characteristics are therefore different from those of other fluorochromes. These properties strongly affect the sensitivity of the assay, the performance of which is dependent on the combination

Conflict of interest: Mickael Meyrand is now employed by Fluidigm (CyTOF equipment manufacturer).

Published online 20 February 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

DOI: 10.1002/cyto.a.22648

© 2015 International Society for Advancement of Cytometry

of fluorochromes used and the properties of the flow cytometer (7,8). By contrast, CyTOF uses metal isotopes of the lanthanide family with similar chemical characteristics. This chemical similarity of the metal tags may be a major advantage over the heterogeneity of fluorochromes in the process of panel design. Indeed, the design of multicolor panels for conventional flow cytometry is challenging and time-consuming (8).

In this study, we investigated whether panel design for CyTOF is independent of the choice of metal tag, as inferred from the chemical similarity of the isotopes currently used. This question first arose during daily determinations of the concentrations of metal atoms in the calibration solution, which contains similar amounts of cesium, lanthanum, terbium, and thulium, but for which different amounts of atoms were detected. During our early experiments, we also observed differences in staining index for the same antibody clone conjugated to different metals for probing of the same sample. Moreover, Bendall et al. in a recent review article showed a two-fold difference in sensitivity among lanthanide tags (6). We therefore, decided to investigate whether CyTOF might detect different lanthanides with different sensitivities and to determine how these variations might affect the signal intensity of a lanthanide-tagged antibody probe. Moreover, as inter-laboratory standardization remains a major challenge in flow cytometry, particularly for tests on samples of clinical relevance, we compared the detection sensitivities of four different CyTOF instruments across the range of lanthanides commercially available.

Materials and Methods

Reagents

The multi-element solution (SPEXCertiPrep, Jersey City, NJ) contained 10 mg l^{-1} each of the following highly purified elements: cerium (Ce), dysprosium (Dy), erbium (Er), europium (Eu), gadolinium (Gd), holmium (Ho), lanthanum (La), lutetium (Lu), neodymium (Nd), praseodymium (Pr), samarium (Sm), scandium (Sc), terbium (Tb), thorium (Th), thulium (Tm), ytterbium (Yb), and yttrium (Y). Each element is present as a mixture of its naturally occurring stable isotopes and therefore, the natural abundance of each isotope has to be considered to calculate the amount of expected atoms in solution [Fig. 1A and Eq. (1)]. The multielement solution was diluted to a concentration of 0.25 or 1 μg l^{-1} before acquisition. The tuning solution (Fluidigm, San Francisco, CA) contained 0.5 μg l^{-1} each of isotopically pure ^{133}Cs, ^{139}La, ^{159}Tb and ^{169}Tm, plus 0.5 μg l^{-1} of a non-isotopically pure form of iridium (Ir). The following anti-human monoclonal antibody reagents were obtained from BD Biosciences (San Jose, CA): anti-CD45 (clone D058-1283), anti-CD3 (clone SP34-2), anti-CD4 (clone L200), anti-CD8 (clone RPA-T8), and anti-TNF-α (clone MAb11). Anti-human clones were previously tested for cross reaction with *Cynomolgus* macaque antigens. Anti-mouse antibodies were obtained from BD Bioscience for anti-CD71 (clone C2) or eBioscience (San Diego, CA) for anti-CD45.1 (clone A20) and anti-CD45.2 (clone 104). The isotopes chosen for anti-CD45 antibody conjugation were ^{143}Nd, ^{154}Sm, ^{171}Yb for CD45.1 and ^{141}Pr, ^{156}Gd and ^{176}Yb for CD45.2. We used a previously described protocol (9) to ensure that the number of metal atoms grafted onto the anti-CD45.1 and anti-CD45.2 antibodies was similar, so as to obtain reagents of similar "brightness". Briefly, antibody concentration was determined by measuring absorbance at 280 nm with a Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware). An aliquot of the antibody preparation was then hydrolyzed in 2% HCl and the amount of isotope measured by CyTOF in solution mode. The number of atoms grafted onto each antibody was then calculated, taking into account the specific metal transmission coefficient, antibody concentration and metal atom concentration (Supporting Information Fig. 1A). All antibody reagents were supplied in low-sodium azide buffer without carrier proteins. Antibodies were conjugated to metals with the MaxPar X8 antibody labeling kit, according to the manufacturer's instructions (Fluidigm). In the multicenter evaluation, the MaxPar Mouse Spleen/Lymph Node Phenotyping Panel Kit (Fluidigm) was used to label mouse splenocytes. The protocol used was modified from that suggested by the manufacturer as follows: a ^{174}Yb-conjugated anti-MHCII antibody (clone M5/144, Fluidigm) was added and a self-conjugated anti-CD71 ^{154}Sm antibody was used instead of the anti-Ter119 antibody. Cellular events and dead cells were identified with iridium- and rhodium-conjugated DNA intercalators, respectively (Fluidigm). EQ^{TM} Four-Element Calibration Beads were purchased from Fluidigm and used as described by the manufacturer.

Ethics Statements

Adult cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) were used in accordance with French national regulation and under national veterinary inspectors (CEA Permit Number A 92-032-02). The CEA is in compliance with Standards for Human Care and Use of Laboratory of the Office for Laboratory Animal Welfare (OLAW, USA) under OLAW Assurance number #A5826-01. The use cynomolgus macaques is in accordance with recommendation with the European Directive (2010/63, recommendation Nu9). The protocols were reviewed by the Ethical Animal Committee of the CEA "Comité d'Ethique en

Expérimentation Animale" registered by the French Research Ministry under number 44.

Mice were housed under SPF conditions. All experimental procedures were performed in accordance with the French legislation and in compliance with the European Community Council Directive of September 2010 (2010/63/UE). Research on animals is authorized by the "Direction Départementale des Services Vétérinaires des Bouches-du-Rhône" (license A 13 014 07).

Intracellular Cytokine Staining

Cynomolgus macaque blood samples were collected in BD Vacutainer® Plus Plastic K3EDTA tubes (BD Biosciences) and PBMC were purified as described by the manufacturer. PBMC were washed, counted and suspended in cold freezing medium consisting of heat-inactivated fetal calf serum (Lonza, Amboise, France) containing 10% DMSO (Sigma–Aldrich Chemie, Saint-Quentin Fallavier, France). Samples were stored overnight at −80 °C in "Mr. Frosty" freezing containers before transfer at -135 °C for long term storage. Cryopreserved cells were thawed and washed with RPMI 1640 (Invitrogen, Saint Aubin, France) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Lonza) and 1% PenStrepNeo (Gibco, Saint Aubin, France). This culture medium was then used throughout the experimental procedure. PBMCs were dispensed into a round-bottomed 96-well plate at a density of 10^6 cells per well and incubated for 60 min with or without 4 μg ml^{-1} staphylococcal enterotoxin B (SEB, Sigma). Brefeldin A (10 μg ml^{-1}) (Sigma) was added to the cell suspension, which was then incubated for a further 4 h. Cells were then stored overnight at 4 °C. The next day, cells were washed in PBS and incubated for 20 min at room temperature with rhodium-conjugated DNA intercalator, for the detection of dead cells. Cells were washed and incubated with antibodies against surface markers in 1% BSA/PBS for 30 min on ice. They were then fixed by incubation in 2% paraformaldehyde/PBS, permeabilized with Perm/Wash buffer (BD Biosciences) and incubated with antibodies directed against intracellular markers diluted in Perm/Wash buffer. The cells were washed and incubated with iridium-containing DNA intercalator in Perm/Wash buffer and stored in 2% PFA/PBS until acquisition.

Murine Splenocyte Preparation and Staining

Splenocytes from C57BL/6-Ly5.2 and C57BL/6-Ly5.1 mice were freshly prepared according to the IMPC Immunophenotyping protocol (https://www.mousephenotype.org/impress/protocol/174/7). Cells extracted from mice of these two genotypes were mixed at three different ratios (3/97, 50/50, and 97/3), to mimic the detection of low and high proportions of different cell populations. The nonspecific binding of antibodies was prevented by blocking Fc receptors with an anti-CD16/32 antibody (clone 2.4G2) for 10 min at 4 °C. Mass cytometry staining was performed for 45 min at 4 °C on 3×10^6 splenocytes in cell surface staining buffer (0.5% BSA, 5 mM EDTA, 0.02% sodium azide in PBS), with 1 μg of each antibody added to a final volume of 100 μl. Cells were washed twice in PBS and incubated overnight at 4 °C in CytoFix (BD Bioscience) buffer supplemented with 250 nM MaxPar Intercalator-Iridium (pentamethylcyclopentadienyl-Ir(III)-dipyridophenazine). Before sample injection, the cells were washed twice in deionized water (Di), filtered and suspended at a density of 5×10^5cells ml^{-1} in deionized water containing 10% EQ™ Four-Element Calibration Beads solution (#201078, Fluidigm), to facilitate sample comparison.

Instrument Acquisition Details

Data were collected on CyTOF version 1 instruments (Fluidigm) equipped with CyTOF software version 5.1.615 or 5.1.648 (Fluidigm). For the analysis of the multi-element and tuning solutions, pulse counts and dual counts were measured by CyTOF in solution mode. Cells were suspended in deionized water at a density of 0.5 to 1×10^6 cells ml^{-1} and passed through a cell strainer cap with 35 μm pores (BD Biosciences) immediately before acquisition. Acquisition was performed in the dual-count mode and dual-count calibration was performed on the "data," as described by Leipold et al. (10) or on "instrument" as recently advised by the manufacturer. The last experiment was performed on a CyTOF version 2 instrument.

Results

Evaluating the Sensitivity of CyTOF Instruments for the Detection of Lanthanides

We evaluated the sensitivity of CyTOF for detecting lanthanides, using a multielement solution containing 17 highly purified elements. Fourteen of these elements were present as isotopes with atomic masses of 139–176 Da, corresponding to the antibody labeling kits currently available on the market (Fig. 1A). For each isotope, we calculated the number of atoms injected into the CyTOF as:

$$\frac{\text{Expected counts}}{\text{second}} = \left(\frac{C_i \ \left({}^{g}/_{l}\right)}{m_i}\right) \times \frac{\%NA_i}{100} \times N_A \times \text{Injection Speed} \left({}^{l}/_{s}\right) \quad (1)$$

where C_i, m_i, and NA_i are the concentration, atomic mass and natural abundance of the isotope i, respectively, N_A is Avogadro's number and Injection Speed is the amount of solution introduced per second. Some of the isotopes present in the multielement solution had the same atomic mass and were, therefore, detected in the same channel (Fig. 1A). We took this into account by summing together the results of Eq. (1) for isotopes with the same atomic mass. For instance, in detection channel 142, we detected both ^{142}Ce and ^{142}Nd; the expected counts were thus the sum of Eq. (1) calculated for i $=^{142}$Ce and i $=^{142}$Nd. In Figure 1B, the expected counts for each channel are shown together with the counts/second measured by CyTOF and the ratio between observed and expected counts. The ratio of observed to expected counts clearly revealed differences in the sensitivity of isotope detection as a function of atomic mass.

We performed the same analysis with data generated during the daily calibration procedure with the tuning solution.

A

Element	Isotope	% NA	Detection Channel
La	139	99.91	139
Ce	140	88.45	140
Pr	141	100.00	141
Ce	142	11.11	142
Nd	142	27.20	
Nd	143	12.18	143
Nd	144	23.80	144
Sm	144	3.07	
Nd	145	8.30	145
Nd	146	17.19	146
Sm	147	14.99	147
Nd	148	5.76	148
Sm	148	11.24	
Sm	149	13.82	149
Nd	150	5.64	150
Sm	150	7.38	
Eu	151	47.80	151
Gd	152	0.20	152
Sm	152	26.75	
Eu	153	52.20	153
Gd	154	2.18	154
Sm	154	22.75	
Gd	155	14.80	155
Gd	156	20.47	156
Dy	156	0.06	
Gd	157	15.65	157
Gd	158	24.84	158
Dy	158	0.10	
Tb	159	100.00	159
Gd	160	21.86	160
Dy	160	2.34	
Dy	161	18.91	161
Dy	162	25.50	162
Er	162	0.14	
Dy	163	24.90	163
Dy	164	28.18	164
Er	164	1.61	
Ho	165	100.00	165
Er	166	33.60	166
Er	167	22.95	167
Yb	168	0.13	168
Er	168	26.80	
Tm	169	100.00	169
Yb	170	3.05	170
Er	170	14.90	
Yb	171	14.30	171
Yb	172	21.90	172
Yb	173	16.13	173
Yb	174	31.80	174
Lu	175	97.41	175
Yb	176	12.70	176
Lu	176	2.59	

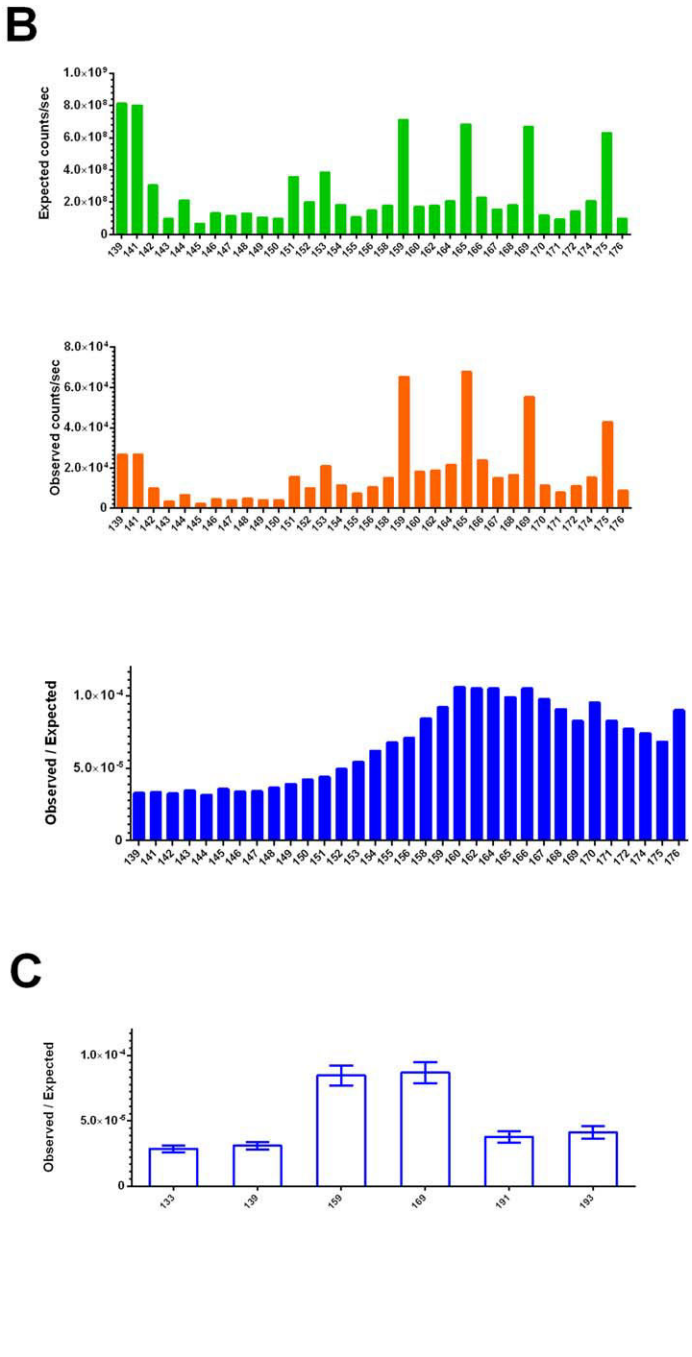


Figure 1. Analysis of the ratio of observed to expected atom counts. (**A**) List of elements present in the multi-element solution for which transmission was analyzed. Each element is indicated by its symbol. The isotopes and their natural abundance are shown, together with the CyTOF detection channel. Color codes group elements with multiple isotopes; (**B**) the upper and middle graphs show the expected and observed counts per second, respectively. Data are shown for each of the channels listed in (A), the lower graph show the ratios of observed to expected counts for the same CyTOF channels; (**C**) the ratio of observed to expected counts is shown for the five elements present in the tuning solution. The mean and standard deviation of seven independent measurements performed over a period of 1 month are shown. Detection channels are shown on the *x* axis. Data were generated by instrument F. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

Over the course of 1 month of daily calibration, we detected a mean of 120,109 counts of ^{159}Tb (range 108,874 to 127,229) per second of acquisition at a speed of 0.045 ml min^{-1}, for the 1.42×10^9 atoms injected. The ratio of observed to expected ^{159}Tb counts was 8.46×10^{-5}, which is very similar to that obtained for the multi-element solution (9.2×10^{-5}). We confirmed that ^{159}Tb was detected almost three times more efficiently than ^{139}La and, in general, that atoms with

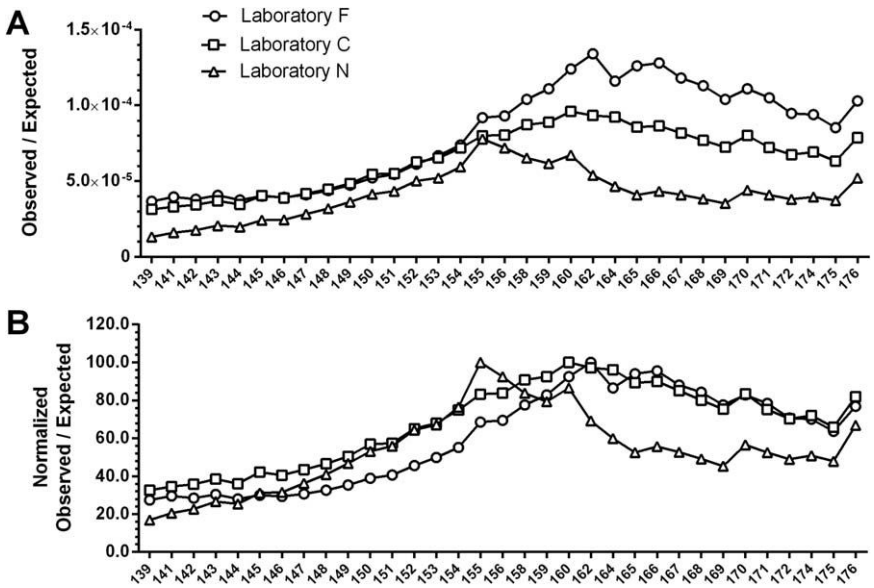


Figure 2. Comparison of isotope transmission in three different CyTOF instruments. (**A**) The ratio of observed to expected counts is shown for three different CyTOF instruments. (**B**) The datasets shown in panel (A) were normalized by setting their maximum values to 100% (GraphPad Prism version 6). Detection channels are shown on the *x* axis. Data were generated by instrument F, C and N.

atomic masses of 159–169 Da were detected more efficiently than atoms with masses below or above this range. In addition, determinations for ^{191}Ir and ^{193}Ir demonstrated a continuous decrease in the signal with increasing atomic mass.

For further confirmation of our observations, we analyzed the same multi-element solution with two other CyTOF instruments located in two different laboratories (Fig. 2). The data generated in the three laboratories are shown in Figure 2A, and are expressed as the ratio of observed to expected pulse counts. Data were normalized with respect to the maximum ratio (Fig. 2B), to account for possible errors in the dilution of the multi-element solution, which was performed independently in the three laboratories. The normalized observed/expected count ratio followed a similar pattern for all three instruments, but there were nevertheless marked differences between the results obtained with the three instruments. Instruments F and C were most sensitive between channels 160 and 164, whereas instrument N was most sensitive between channels 155 and 158. In addition, the pulse signal decreased rapidly after the peak at channel 160 for instrument N, whereas it remained stable after this channel for instruments F and C. By contrast, on the other side of this peak, the signal decreased more rapidly at lower atomic masses for instrument F than for the other two instruments.

The low concentration of the multi-element solution used in the previous experiments resulted in average detection of less than 1 pulse count per mass channel per single mass spectrum in almost all the detection channels (the instrument generates 76,800 spectra per second and data are integrated over 1 second; Supporting Information Fig. 2A). When more than 1 pulse count per mass channel per single mass spectrum is detected, the instrument uses the analog intensity of the pulse to derive the number of particles striking the detector by multiplying the intensity by the Dual Count Coefficients calculated during the tuning of the instrument (Dual Count Calibration). CyTOF Dual Data are, therefore, collected from pulse counts for low analyte concentrations and from analog intensities for high concentrations. Because a cell labeled with metal tag antibodies will typically generate signals higher than 1 pulse per spectrum, we evaluated whether the sensitivity pattern was the same following the application of the Dual Count Coefficients. To this aim, we analyzed the same multi-element solution at a concentration of 1 μg l^{-1} to obtain an average ion detection of more than 1 ion-count per mass channel per single mass spectrum, i.e. more than 76,800 pulse per second (Supporting Information Fig. 2B). In channel 139, 140, 141, 153, 159, 165, 169, and 175 the instrument detected more than 76,800 pulses per second and Dual Count Coefficients were applied to calculate Dual Data. The ratio of observed to expected dual counts followed a pattern similar to that observed looking only at the pulse counts using a concentration of multi-elemental solution equal to 0.25 μg l^{-1}. However, when Dual Count Coefficients were applied differences in detection were amplified and, for instance ^{159}Tb was detected almost fivefold more efficiently than ^{139}La.

Overall, these data indicate that CyTOF instruments may differ in their sensitivity for the detection of isotopes commonly used to label antibody probes. The observed sensitivity patterns differed between instruments.

Evaluation of Isotopes with Different Observed/Expected Pulse Count Ratios in the Context of Diverse Experimental Settings

We investigated whether the observed differences in sensitivity affected antigen detection when lanthanides were used as tags for antibody labeling, by conjugating the same probe

with different lanthanides. Intracellular cytokine staining was carried out according to a previously established protocol (11). We used the anti-CD8 clone RPA-T8 conjugated to four different lanthanides (^{147}Sm, ^{154}Sm, ^{159}Tb, or ^{166}Er) to stain PBMC samples collected from *Cynomolgus* macaques. CD8 histograms (Fig. 3B) were generated after gating for cellular events and CD45$^+$ cells (Fig. 3A). The percentage of CD8$^+$ cells was similar in the four samples, indicating that, with all four tags used in this panel, it was possible to distinguish between CD8$^+$ and CD8$^-$ cells. However, we observed large differences in the mean signal intensity (MSI) of the CD8$^+$ population. The MSI values for the populations detected with CD8-^{159}Tb and CD8-^{166}Er were 1009 and 1076, respectively; whereas CD8-^{154}Sm and CD8-^{147}Sm antibodies yielded lower MSI values (575 and 205, respectively). Conversely, the MSI of the CD3$^+$ population identified with the CD3-^{156}Gd antibody was similar in all four samples, ranging from 209 to 272. Similarly to the sensitivity differences observed in dual data with the multi-element solution, the MSI of the CD8 population detected with CD8-^{159}Tb was five-fold higher than the MSI of the CD8 population detected with the CD8-^{147}Sm. In the same experimental setting, we measured TNF-α levels in CD3$^+$CD8$^+$ cells (Fig. 3A) after stimulation with Staphylococcal enterotoxin B (SEB). We used the anti-TNF-α clone MAb11 conjugated to ^{154}Sm and ^{159}Tb for this purpose. The TNF-α-producing cells detected with anti-TNF-α-^{159}Tb formed a more resolved cloud, with a higher MSI than the TNF-α-producing cells detected with anti-TNF-α-^{154}Sm. Background staining was similar with both metal conjugates (Fig. 3C). The frequency of TNF-α$^+$ cells was similar in both staining conditions, but the resolution of positive over negative populations differed, resulting in a lower staining index with anti-TNF-α-^{154}Sm.

We investigated whether the lower resolution observed on instrument F for lower molecular masses was also observed on instrument C, as inferred from the similar mass response curves of these two instruments to the multi-element solution (Fig. 2), by performing an additional experiment on instrument C. We used mouse congenic strains for the marker CD45. We then labeled antibodies against the CD45.1 and CD45.2 molecules found in these C57Bl/6 Ly5.1 and C57Bl/6 Ly5.2 mice, respectively. Anti-mouse CD45.1 and anti-mouse CD45.2 antibodies of the same clone were labeled in parallel with lanthanide-loaded polymers spanning the whole mass range of the instrument: ^{143}Nd, ^{154}Sm, ^{171}Yb for CD45.1 and ^{141}Pr, ^{156}Gd, ^{176}Yb for CD45.2. From the mass response curve obtained with the multi-element solution (Fig. 2), ^{143}Nd and ^{141}Pr were expected to yield a lower MSI than ^{156}Gd, ^{154}Sm, ^{171}Yb, and ^{176}Yb, whereas ^{156}Gd and ^{154}Sm were expected to yield higher MSI values than ^{171}Yb, ^{176}Yb. We mixed two splenocyte preparations extracted from the CD45.1- and CD45.2-expressing mice in a 1:1 ratio and stained the resulting cell suspension with pairs of low-, intermediate- and high-molecular mass metal-tagged antibodies. The staining index (SI) for CD45.1- and CD45.2-expressing cells was then calculated and plotted against the atomic mass of the corresponding element used to tag the antibody (Fig. 4A). For both antibodies, we obtained a bell-shaped curve similar to that obtained with the metal element solution. SI was highest for CD45.1-^{154}Sm and CD45.2-^{156}Gd. This SI was about three times that obtained with pairs of antibodies tagged with metals in the lower mass range. We then investigated whether this differential sensitivity in the mass response would impair the accurate determination of any type of cell population frequency. We again used the congenic strains and prepared two additional cell suspensions with biased CD45.1/CD45.2 cell ratios (Fig. 4B). CD45.1- and CD45.2-positive populations were gated and the corresponding frequency and SI were determined. For a cell suspension with a given CD45.1/CD45.2 ratio, the target frequencies of CD45.1$^+$ and CD45.2$^+$ cells were similar for all types of antibody pairs, although SI was lower in all cases in which the lower mass elements ^{143}Nd and ^{141}Pr were used (Supporting Information Fig. 1B). This indicates that the accuracy of population frequency determination was not affected by our experimental setup.

These two examples demonstrate that differences in the sensitivity of CyTOF instruments for detecting different metals affects antigen detection, potentially leading to cell classification errors for low-abundance antigens. As for fluorochromes in conventional flow cytometry, the optimal choice of metal tag in mass cytometry will depend on the density of the antigen on target cells. In the experiments described here, the CD8 and CD45 antigens could be detected with any metal tag, because they are either highly abundant or have a bimodal expression profile. For the detection of TNF-α, which displays a more progressive continuum of expression, the use of a metal with a higher transmission efficiency is recommended, to ensure the precise, unambiguous definition of all positive events.

Multicenter Evaluation of Complex Immune Staining

The analysis of the multi-element solution with three different CyTOF instruments highlighted different patterns of lanthanide detection. We also found that differences in the sensitivity of detection for different lanthanides were associated with differences in antigen detection. There is growing interest in the use of single-cell technologies in multicenter clinical trials. We therefore evaluated the capacity of the three CyTOF instruments characterized previously with our multi-element solution to produce similar results for a complex immune staining panel. Cells were extracted and stained at a single site, to minimize experimental variation due to cell extraction and handling. Murine splenocytes extracted as described in the Materials and Methods were stained with a combination of 18 antibodies and intercalating agents. Just before acquisition, cells were suspended in 450 μl of DI water and spiked with 50 μl of EQ^{TM} Four-Element Calibration Beads for cross-instrument standardization. We first analyzed the signal generated by the EQ^{TM} Four-Element Calibration Beads in channels 140, 142, 151, 153, 165, and 175. Beads were gated on ^{191}Ir-negative and ^{140}Ce-, ^{142}Ce-, ^{151}Eu-, ^{153}Eu-, ^{165}Ho-, or ^{175}Lu-positive events (Fig. 5A). Events selected with the five distinct gates were then combined, using the Boolean operator "AND" to obtain a clean bead population. The expression of the six isotopes on the three CyTOF

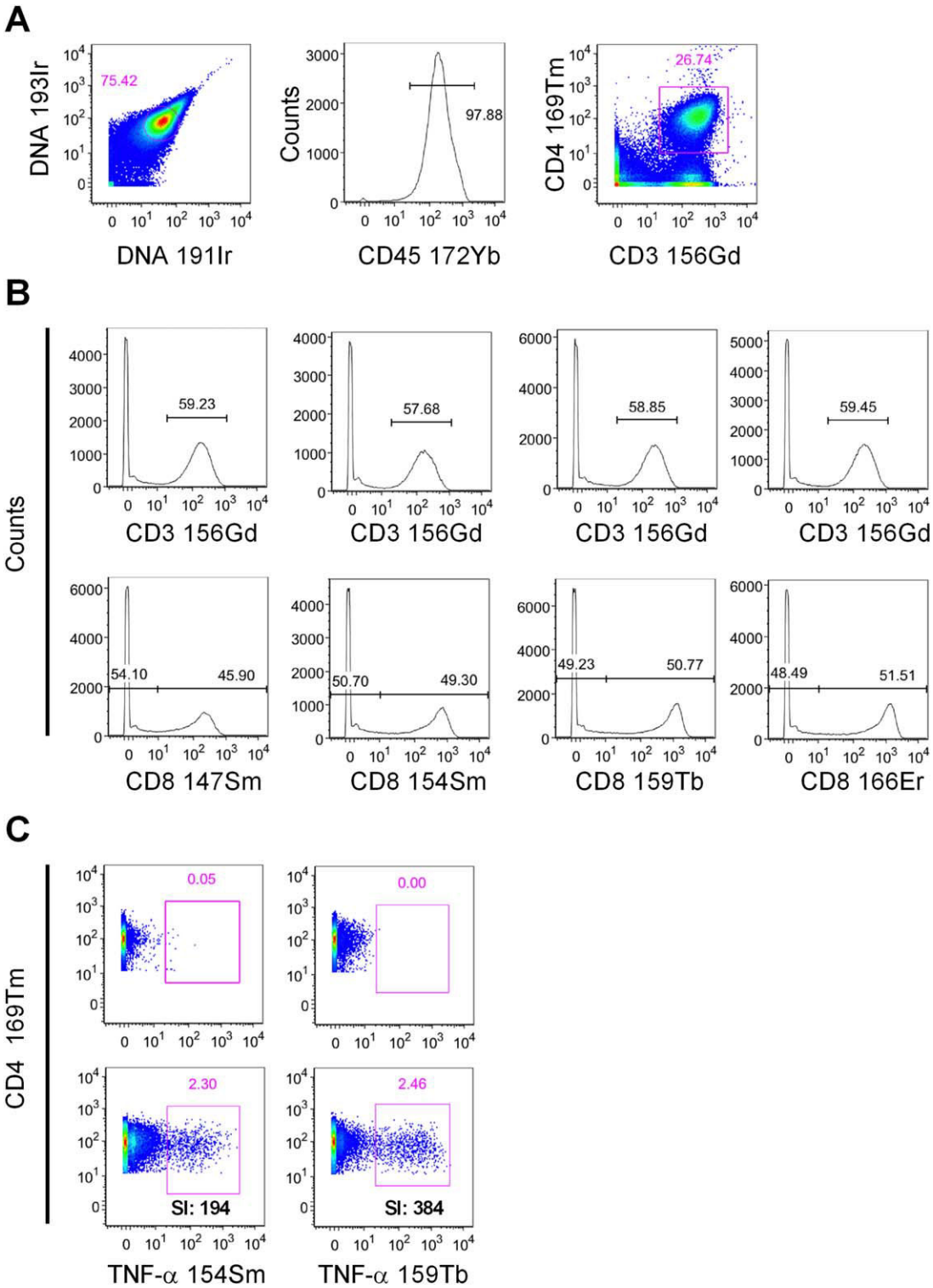


Figure 3. Impact of isotope transmission on the capacity to resolve cellular populations. (**A**) Example of gating strategy. Cells were gated according to the iridium-containing DNA intercalator and then on CD45 expression. CD4 T cells were then gated on a CD3 versus CD4 biaxial plot. (**B**) Distribution of the surface marker CD3, identified with the SP34-2 antibody clone conjugated to the ^{156}Gd metal tag, and the surface marker CD8, identified with the antibody clone RPA-T8 conjugated to ^{147}Sm, ^{154}Sm, ^{159}Tb or ^{166}Er metal tags in four different samples. Cells were previously gated according to DNA content and CD45 expression. (**C**) Distribution of TNF-α-expressing cells identified with the antibody clone MAb11 conjugated to ^{154}Sm or ^{159}Tb metal tags in mock (upper panels) and SEB (lower panel)-stimulated PBMCs. $CD3^+$ $CD4^+$ cells were previously gated on DNA content and CD45 expression. Data were collected on CyTOF version 1 instrument equipped with CyTOF software version 5.1.615 with dual-count calibration performed on "data". Data were analyzed with FlowJo (version 9.7.7). SI was calculated as follows: "((MSI-positive cells)−(MSI-negative cells)). Data were generated by instrument F. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

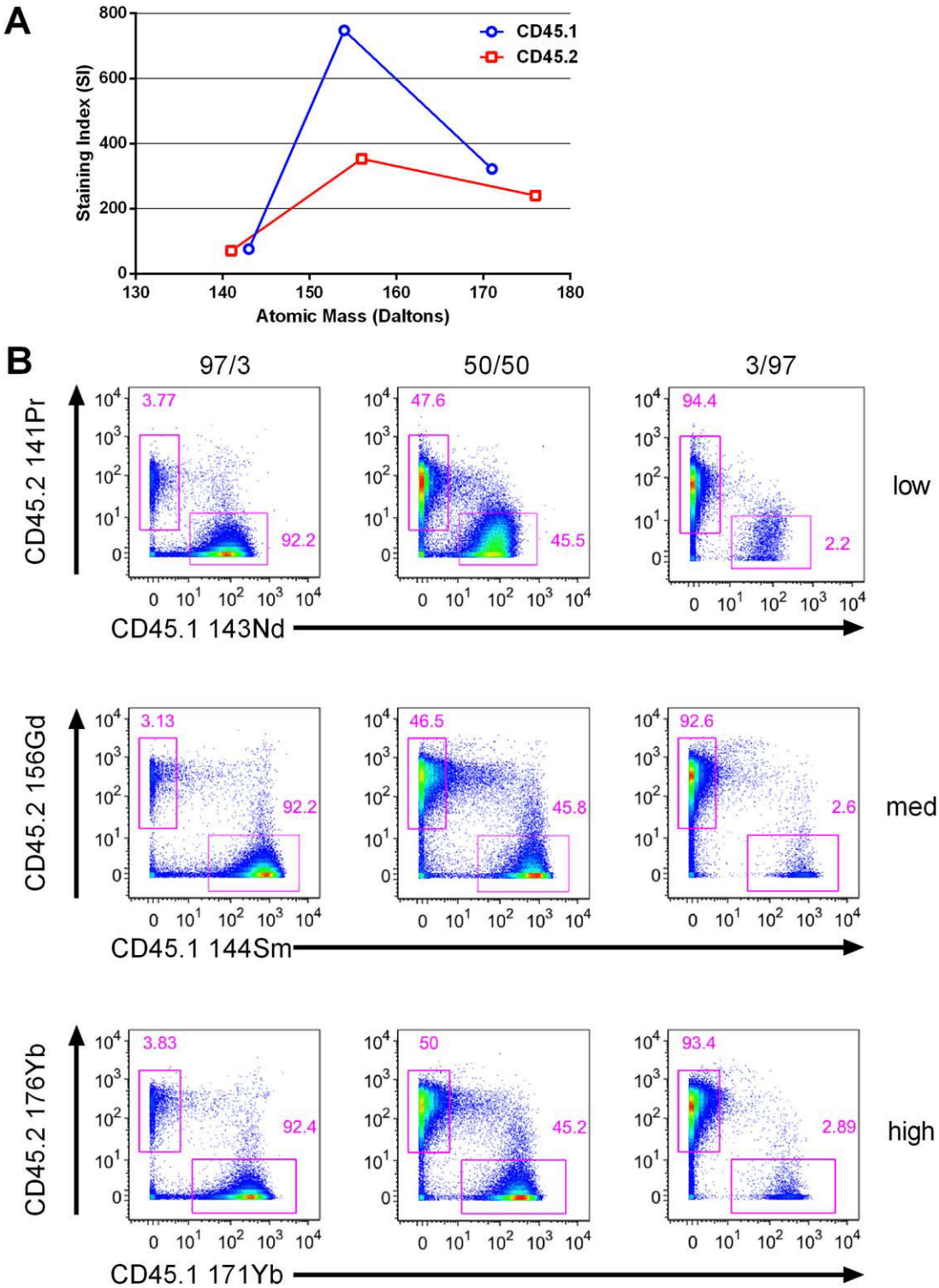


Figure 4. Impact of isotope tag selection on the capacity to resolve minor cell populations. (**A**) Staining index (SI) of positive cells for CD45.1 and CD45.2 markers for a 1:1 mixture of CD45.1 and CD45.2 cells. SI was calculated as follows: "((MSI-positive cells)—(MSI-negative cells)). SI is plotted against the corresponding atomic mass for all the metal-tagged antibodies used in the experiment. (**B**) Percentage of cells expressing either the CD45.1 or the CD45.2 marker in congenic mouse cell suspensions mixed in three different ratios. The CD45.1/CD45.2 cell ratio is indicated above the corresponding plot. The metal-tagged antibodies used in each set of conditions are indicated. Their positions in the mass range of the CyTOF detector are indicated as "low," "medium," and "high." For all plots, cells were previously gated on DNA content and cell length. Data were collected on CyTOF version 1 instrument equipped with CyTOF software version 5.1.648 with dual-count calibration performed on "instrument." Data were analyzed with FlowJo (version 9.7.7). Data were generated by instrument C. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

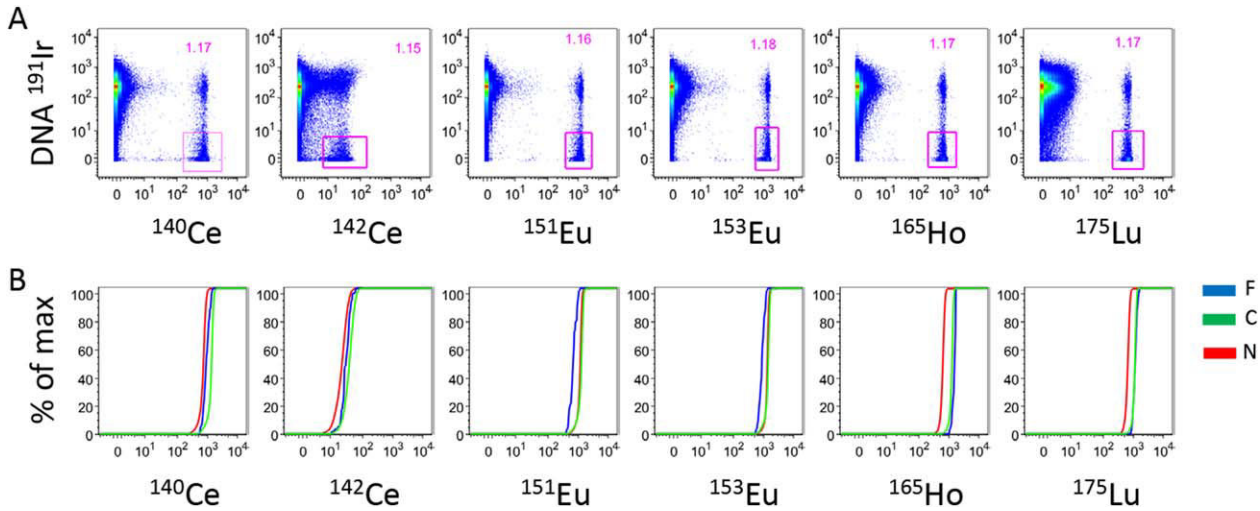


Figure 5. Comparison of the sensitivity of the three different CyTOF instruments for detecting beads with embedded isotopes. (**A**) EQ™ Four-Element Calibration Beads were gated using the DNA ^{191}Ir channel (*y* axis) and the ^{140}Ce, ^{142}Ce, ^{151}Eu, ^{153}Eu, ^{165}Ho, or ^{175}Lu channel (*x* axis). This combination of axes made it possible to exclude bead/cell doublets positive for the element embedded in the beads and the Ir-containing DNA intercalator. Data collected from laboratory F are shown as an example. (**B**) Events selected by the five distinct gates in (A) were combined using the Boolean operator "AND," to obtain a clean bead population without doublets, which was plotted as a cumulative distribution plot representation. Each colored line represents data from a different CyTOF instrument. Data were collected on CyTOF version 1 instrument equipped with CyTOF software version 5.1.648 with dual-count calibration performed on "instrument." Data were generated by instrument F, C, and N. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

instruments was plotted on cumulative distribution plots (Fig. 5B). Instrument C had the highest sensitivity for detecting ^{140}Ce, ^{142}Ce, ^{151}Eu, and ^{153}Eu, whereas instrument F was more sensitive for detecting ^{165}Ho and ^{175}Lu (Table 1 and Fig. 5B). The relative sensitivities of the three instruments were entirely consistent with the pattern obtained with the normalized observed/expected count ratio (Fig. 2B), demonstrating that the variation of overall transmission observed in Figure 2A probably resulted from variation in dilution of small volumes of the multi-element solution, which was carried out independently at the three different laboratories. It also demonstrates the utility of the multi-element solution for characterizing the mass range response of any CyTOF instrument. Overall, the analysis of bead MSI reproduced the sensitivity pattern observed with the multi-element solution.

Because cerium is embedded in the calibration beads as a mixture of its naturally occurring isotopes and the natural abundances of ^{140}Ce and ^{142}Ce are 88.4% and 11.1%, respectively; we expected to observe a MSI eightfold higher for ^{140}Ce than for ^{142}Ce. Surprisingly, we observed a 30-fold higher MSI for ^{140}Ce in comparison to ^{142}Ce for the three instruments (Table 1). One possible explanation for this discrepancy is that the low signal generated by ^{142}Ce is calculated by using pulse counts. A single bead is measured over 20–50 spectra and therefore ^{142}Ce generates less than 1 pulse per single mass spectrum. On the contrary the strong signal generated by ^{140}Ce is actually calculated from analog intensities using the Dual Count Coefficients. A similar phenomenon was observed with the multi-element solution: in Supporting Information Figures 2A and 2B, an important increase in Dual Data was observed when more than 1 pulse count per single mass spectrum was detected.

We then analyzed the signals generated by the antibody-stained cells, according to the gating strategy shown in Supporting Information Figure 3. Four representative cell populations are shown in Figure 6. For the CD45$^+$ population, cell events were further resolved by plotting the expression of CD11b and Ly6G/C, to distinguish between granulocytes and monocytes. As reported above, channel 141 on instrument N had a low observed/expected count ratio, resulting, as expected, in a lower capacity to resolve granulocytes and monocytes on a bivariate plot. Similarly, the identification of T cells on the basis of TCR-β and CD3e expression on MHC class II-negative cells was more efficient with the data generated by instruments F and C, which had a more sensitive channel 169. Finally, as shown in Figures 3A and 5A, expression markers with a clear bimodal distribution, such as CD4 and CD8, were easily discriminated, regardless of channel sensitivity. Overall, these data indicate that the detection sensitivity profile of each instrument is characteristic and must be taken into account in the staining panel design process.

Evaluating the Sensitivity of a CyTOF Version 2 Instrument for the Detection of Lanthanides

Recently, a new version of CyTOF instrument (CyTOF 2) was commercialized. This new version has a wider mass range,

Table 1. Mean stain intensities of the EQ beads obtained in six CyTOF channels for the three tested instruments

	EQ BEAD ELEMENT					
INSTRUMENT	^{140}Ce	^{142}Ce	^{151}Eu	^{153}Eu	^{165}Ho	^{175}Lu
F	997	32	736	951	1598	1232
C	1421	40	1319	1480	1321	1179
N	759	24	1219	1404	656	685

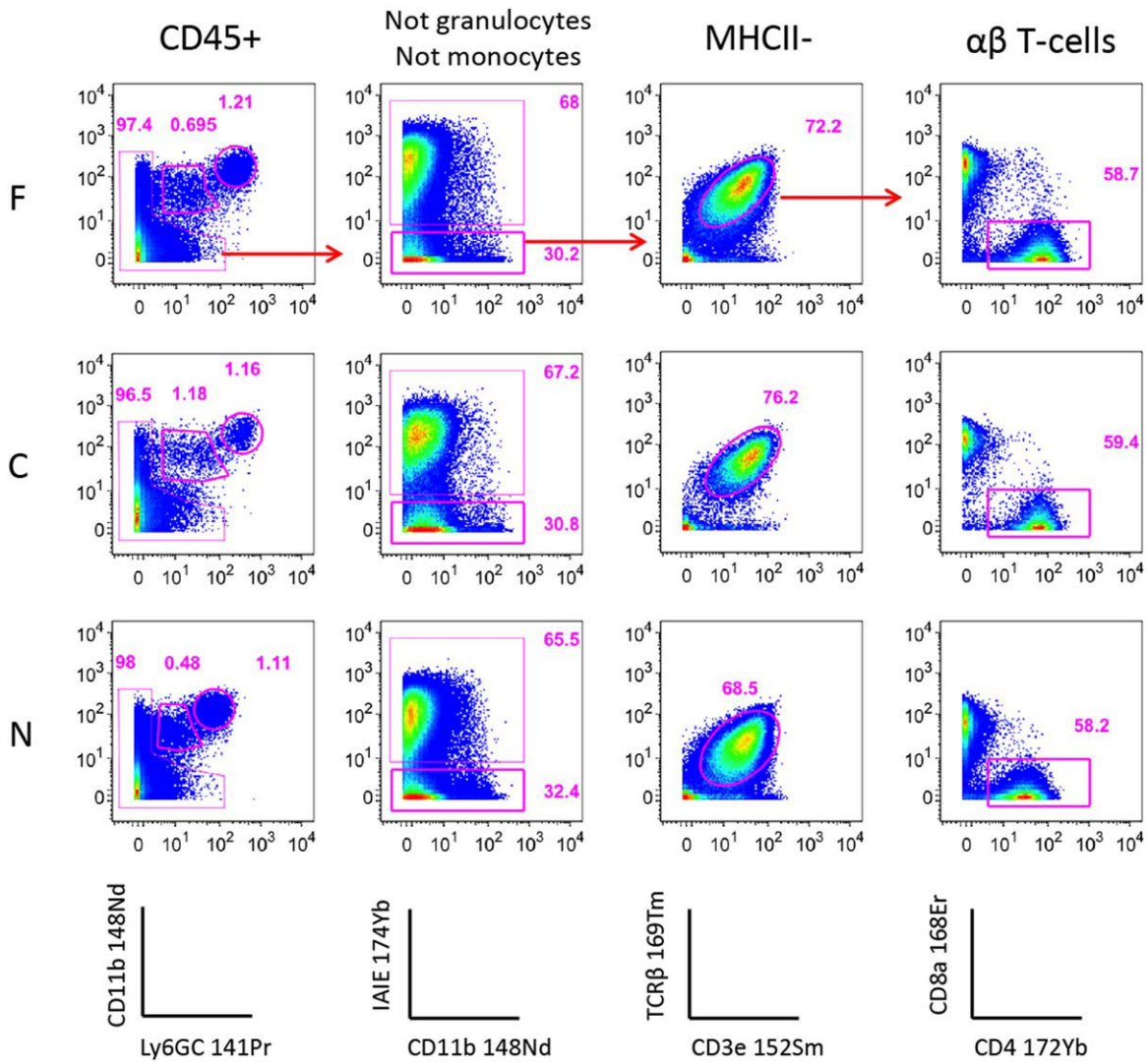


Figure 6. Detection sensitivity of three different CyTOF instruments in the context of complex immunostaining. Four representative sequentially gated populations are shown for the three CyTOF instruments (F, C and N). Population names are shown at the top of the figure and axis combinations are depicted at the bottom. The complete gating strategy is shown in Supporting Information Figure 2. Data were collected on CyTOF version 1 instrument equipped with CyTOF software version 5.1.648 with dual-count calibration performed on "instrument." Data were analyzed with FlowJo (version 9.7.5). Data were generated by instrument F, C, and N. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

increased sensitivity and an improved user interface. To demonstrate the validity of our observations on this new version of the instrument, we generated the transmission curve on a CyTOF 2 exactly as we did in Figure 1 for the CyTOF version 1. The ratio of observed to expected counts changed over the mass range but it showed a different trend in comparison to the three CyTOF version 1 tested so far (Supporting Information Fig. 4). The sensitivity pattern increased constantly from low to high mass range without showing the typical asymmetric bell curve observed in CyTOF version 1. As a result of this observation, the manufacturer of the instrument was contacted to modify ion transmission and obtain a sensitivity pattern more similar to instrument F to implement data standardization between the two instruments.

Discussion

We show here that CyTOF instruments differ in their sensitivity for detecting lanthanide isotopes and that these differences may affect antigen detection. Most importantly, in our comparison of CyTOF instruments from four different laboratories, we observed that each instrument had a characteristic sensitivity pattern. These observations highlight an important aspect of CyTOF technology that must be taken into account during antibody panel design, particularly for multicenter studies involving the use of several instruments. In conventional flow cytometry, the development and optimization of antibody panels is a multi-step process that, when properly done, ensures that the staining protocol is robust and maximizes signal detection. The optimization process includes

(i) selection of the best fluorochrome/antibody combinations, (ii) titration of each individual antibody, and (iii) parallel testing of different putative panels. The selection of the best fluorochrome/antibody combination is of paramount importance due to the heterogeneity of fluorchromes and the high level of spectral overlap. In CyTOF technology, the lower level of spectral overlap and the chemical similarities between lanthanides may facilitate selection of the optimal metal/antibody combination. Nevertheless, our data show that, despite their chemical similarity, lanthanides are detected with different sensitivities, as a function of their atomic mass. Indeed, the metal transmission efficiency curve was found to be an asymmetric bell curve centered on channels 155 and 169, with major differences between instruments. An immediate consequence of this observed pattern of sensitivity is that antigens with low levels of expression are better detected in the central mass range part of the detector, where the most sensitive channels are located, as demonstrated by the higher ratio of observed to expected counts for these channels. Antigens with highly bimodal expression profiles should be used preferentially in the less sensitive channels at the extreme ends of the mass range. Thus, panel optimization procedures should take into account the sensitivity curve, which should be established for each CyTOF instrument.

CyTOF is an innovative tool for the analysis of complex immune phenotypes. It will probably be used for multicenter studies in the future. No comparison of the performance of different instruments has ever before been published. We show here, for the first time, that each instrument has its own pattern of sensitivity that must be taken into account not only during panel design, but also when interpreting the data produced by different instruments. Indeed, different relative marker intensities may be observed on different instruments, even for the same sample stained with the same antibody panel. Indeed, by contrast to conventional flow cytometry, the main differences in sensitivity are related to the instrument itself rather than the reagent used.

CyTOF technology combines an inductively coupled plasma (ICP) ionization source to a time-of-flight (TOF) mass analyser (1). In the system two processes affect ion transmission as a function of atomic mass. First, the ICP torch works at atmospheric pressure, whereas the analytical section of the MS requires high vacuum conditions. Clouds of charged ions travel from the plasma to the analytical mass spectrometer via the interface cones. During the passage from atmospheric pressure to vacuum, the ions accelerate, acquire a kinetic energy that is equivalent to their atomic mass and the possibility of the ions being ejected outside the ion beam as a consequence of ion collision is greater for ions with lower masses (12). Second, the quadrupole ion guide that filters out ions with an $m/z < 80$ is tuned for the optimal transmission of ions in the center of the detection range, and transmission efficiencies are thus lower for ions with higher or lower masses (13). A combination of these two effects intuitively accounts for the asymmetric bell curve of the observed/expected count ratio obtained with the CyTOF instruments characterized in this study. According to the manufacturer, ion transmission is optimized during installation by tuning the quadrupole ion guide. However, this optimization is actually performed with the tuning solution which generates only two signals (^{159}Tb and ^{169}Tm) in the mass region where the peak of transmission is expected, thus rendering standardization across instruments impossible. Characterization of ion transmission on CyTOF 2 demonstrated that important deviation among instruments may be observed. Therefore, data presented in this article suggests the use of the multi-element solution or, alternatively, a solution containing a larger set of isotopically pure elements, to perform standardization of metal transmission across different CyTOF instruments.

Recently, Fink et al. (14) described an algorithm to normalize signal variation over time due to variation in instrument performances. They used beads embedded with five highly purified isotopes similar to the EQ™ Four-Element Calibration Beads used in Figure 5. Variations over time were monitored by multi-elemental beads and a multiplicative coefficient was calculated at each bead acquisition time-point. The algorithm calculated a unique coefficient per time-point which is then applied to all the data of that time-point regardless of the channel. Therefore, since each instrument has a characteristic isotope transmission curve, the algorithm should be used to normalize variation over-time relative to a single instrument but not to normalize data generated by different CyTOF. We suggest here the creation of a new reagent and algorithm to normalize inter-instrument variations. Beads should be embedded with additional elements covering the entire mass range and the normalization algorithm should calculate a correction coefficient specific for each channel and instrument.

In conclusion, our study indicates that the sensitivity of lanthanide detection should be determined when constructing CyTOF antibody panels. Each instrument has its own characteristic sensitivity pattern, which should be established. Nevertheless, panel design should probably also take other factors, such as isotope oxidation, the purity of the metal isotopes and spillover into adjacent channels, into account. Further comparative studies are required to address panel design strategies for CyTOF technology in a more general manner. A strategy for inter-laboratory standardization should also be developed.

Acknowledgments

The authors thank Olga Ornatsky, Dmitry Bandura, and Vladimir Baranov for helpful discussions during the setting up of the CyTOF technology at the FlowCyTech core facility in Fontenay-aux-Roses. They thank the NVx Flow-Cy-TOF core facility in Siena. They thank Catherine Blanc, manager of the CyPS core facility for access to CyTOF version 2.

Literature Cited

1. Bandura DR, Baranov VI, Ornatsky OI, Antonov A, Kinach R, Lou X, Pavlov S, Vorobiev S, Dick JE, Tanner SD. Mass cytometry: Technique for real time single cell multitarget immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry. Anal Chem 2009;81:6813–6822.
2. Bendall SC, Simonds EF, Qiu P, Amir ED, Krutzik PO, Finck R, Bruggner R V, Melamed R, Trejo A, Ornatsky OI, Balderas RS, Plevritis SK, Sachs K, Pe'er D, Tanner SD, Nolan GP. Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. Science 2011;332:687–696.

3. Bodenmiller B, Zunder ER, Finck R, Chen TJ, Savig ES, Bruggner RV, Simonds EF, Bendall SC, Sachs K, Krutzik PO, Nolan GP. Multiplexed mass cytometry profiling of cellular states perturbed by small-molecule regulators. Nat Biotechnol 2012;30:858–867.
4. Newell EW, Sigal N, Bendall SC, Nolan GP, Davis MM. Cytometry by time-of-flight shows combinatorial cytokine expression and virus-specific cell niches within a continuum of CD8+ T cell phenotypes. Immunity 2012;36:142–152.
5. Behbehani GK, Bendall SC, Clutter MR, Fantl WJ, Nolan GP. Single-cell mass cytometry adapted to measurements of the cell cycle. Cytometry A 2012;81A:552–566.
6. Bendall SC, Nolan GP, Roederer M, Chattopadhyay PK. A deep profiler's guide to cytometry. Trends Immunol 2012;33:323–332.
7. Maecker HT, Frey T, Nomura LE, Trotter J. Selecting fluorochrome conjugates for maximum sensitivity. Cytometry A 2004;62A:169–173.
8. Mahnke YD, Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. Clin Lab Med 2007;27:469–485.
9. Wang L, Abbasi F, Ornatsky O, Cole KD, Misakian M, Gaigalas AK, He H-J, Marti GE, Tanner S, Stebbings R. Human CD4+ lymphocytes for antigen quantification: Characterization using conventional flow cytometry and mass cytometry. Cytometry A 2012;81A:567–575.
10. Leipold MD, Maecker HT. Mass cytometry: Protocol for daily tuning and running cell samples on a CyTOF mass cytometer. J Vis Exp 2012;69:e4398.
11. Guenounou S, Bosquet N, Dembek CJ, Le Grand R, Cosma A. OMIP-016: Characterization of antigen-responsive macaque and human T-cells. Cytometry A 2013; 83A:182–184.
12. Niu H, Houk RS. Fundamental aspects of ion extraction in inductively coupled plasma mass spectrometry. Spectrochim Acta B Atomic Spectrosc 1996;51:779–815.
13. Gerlich D. Inhomogeneous RF-fields—A versatile tool for the study of processes with slow ions. Adv Chem Phys 1992;82:1–176.
14. Finck R, Simonds EF, Jager A, Krishnaswamy S, Sachs K, Fantl W, Pe'er D, Nolan GP, Bendall SC. Normalization of mass cytometry data with bead standards. Cytometry A 2013;83A:483–494.

BIBLIOGRAPHIE

1 Abdel-Mohsen M, Kuri-Cervantes L, Grau-Exposito J, Spivak AM, Nell RA, Tomescu C, Vadrevu SK, Giron LB, Serra-Peinado C, Genesca M, Castellvi J, Wu G, Del Rio Estrada PM, Gonzalez-Navarro M, Lynn K, King CT, Vemula S, Cox K, Wan Y, Li Q, Mounzer K, Kostman J, Frank I, Paiardini M, Hazuda D, Reyes-Teran G, Richman D, Howell B, Tebas P, Martinez- Picado J, Planelles V, Buzon MJ, Betts MR, Montaner LJ. 2018. CD32 is expressed on cells with transcriptionally active HIV but does not enrich for HIV DNA in resting T cells. Sci Transl Med 10.

2 Acosta-Rodriguez, Eva V; Rivino, Laura; Geginat, Jens; Jarrossay, David; Gattorno, Marco; Lanzavecchia, Antonio; Sallusto, Federica; Napolitani, Giorgio; ,Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17–producing T helper memory cells,Nature immunology,8,6,639,2007,Nature Publishing Group

3 Ahmed, Zahra; Kawamura, Tatsuyoshi; Shimada, Shinji; Piguet, Vincent; ,The role of human dendritic cells in HIV-1 infection,Journal of Investigative Dermatology,135,5,1225-1233,2015,Elsevier

4 Ajami, Bahareh; Bennett, Jami L; Krieger, Charles; McNagny, Kelly M; Rossi, Fabio MV; ,"Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool",Nature neuroscience,14,9,1142,2011,Nature Publishing Group

5 Albrecht, I; Niesner, U; Janke, M; Radbruch, A; Chang, H; ,The pro-inflammatory immunological memory: twist1 as a marker for chronically activated T lymphocytes,Zeitschrift fur Rheumatologie,67,8,684-688,2008,

6 Allen, JB; Wong, HL; Guyre, PM; Simon, GL; Wahl, SM; ,Association of circulating receptor Fc gamma RIII-positive monocytes in AIDS patients with elevated levels of transforming growth factor-beta.,The Journal of clinical investigation,87,5,1773-1779,1991,Am Soc Clin Investig

7 Álvarez-Errico, Damiana; Vento-Tormo, Roser; Sieweke, Michael; Ballestar, Esteban; ,"Epigenetic control of myeloid cell differentiation, identity and function",Nature Reviews Immunology,15,1,7,2015,Nature Publishing Group

8 Anbazhagan, Kolandaswamy; Duroux-Richard, Isabelle; Jorgensen, Christian; Apparailly, Florence; ,Transcriptomic network support distinct roles of classical and non-classical monocytes in human,International reviews of immunology,33,6,470-489,2014,Taylor & Francis

9 Ancuta, Petronela; Rao, Ravi; Moses, Ashlee; Mehle, Andrew; Shaw, Sunil K; Luscinskas, F William; Gabuzda, Dana; ,Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes,Journal of Experimental Medicine,197,12,1701-1707,2003,Rockefeller University Press

10 Andargachew, Rakieb; Martinez, Ryan J; Kolawole, Elizabeth M; Evavold, Brian D; ,CD4 T Cell Affinity Diversity Is Equally Maintained during Acute and Chronic Infection,The Journal of Immunology,,,ji1800295,2018,Am Assoc Immnol

11 Appay, V; Sauce, D; ,Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences,The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland,214,2,231-241,2008,"John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, UK"

12 Arhel, N. J., Souquere-Besse, S., Munier, S., Souque, P., Guadagnini, S., Rutherford, S., ... & Charneau, P. (2007). HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. The EMBO journal, 26(12), 3025-3037.

13 Arrildt, K. T., Joseph, S. B., & Swanstrom, R. (2012). The HIV-1 env protein: a coat of many colors. Current HIV/AIDS Reports, 9(1), 52-63.

14 Auffray, Cedric; Sieweke, Michael H; Geissmann, Frederic; ,"Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells",Annual review of immunology,27,2009

15 Autran, B., Carcelain, G., Li, T. S., Blanc, C., Mathez, D., Tubiana, R., ... & Leibowitch, J. (1997). Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. Science, 277(5322), 112-116.

16 Autran, Brigitte; Murphy, Robert L; Costagliola, Dominique; Tubiana, Roland; Clotet, Bonaventura; Gatell, Jose; Staszewski, Schlomo; Wincker, Norma; Assoumou, Lambert; El-Habib, Raphaelle; ,Greater viral rebound and reduced time to resume antiretroviral therapy after therapeutic immunization with the ALVAC-HIV vaccine (vCP1452),Aids,22,11,1313-1322,2008,LWW

17 Bandura, Dmitry R; Baranov, Vladimir I; Ornatsky, Olga I; Antonov, Alexei; Kinach, Robert; Lou, Xudong; Pavlov, Serguei; Vorobiev, Sergey; Dick, John E; Tanner, Scott D; ,Mass cytometry: technique for real time single cell multitarget immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry,Analytical chemistry,81,16,6813-6822,2009,ACS Publications

18 Banga R, Procopio FA, Noto A, Pollakis G, Cavassini M, Ohmiti K, Corpataux JM, de Leval L, Pantaleo G, Perreau M. 2016. PD-1(+) and follicular helper T cells are responsible for persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals. Nat Med 22:754-61.

19 Barouch, Dan H; Ghneim, Khader; Bosche, William J; Li, Yuan; Berkemeier, Brian; Hull, Michael; Bhattacharyya, Sanghamitra; Cameron, Mark; Liu, Jinyan; Smith, Kaitlin; ,Rapid inflammasome activation following mucosal SIV infection of rhesus monkeys,Cell,165,3,656-667,2016,Elsevier

20 Battistini, Angela; Sgarbanti, Marco; ,HIV-1 latency: an update of molecular mechanisms and therapeutic strategies,Viruses,6,4,1715-1758,2014,Multidisciplinary Digital Publishing Institute

21 Becher, Burkhard; Schlitzer, Andreas; Chen, Jinmiao; Mair, Florian; Sumatoh, Hermi R; Teng, Karen Wei Weng; Low, Donovan; Ruedl, Christiane; Riccardi-Castagnoli, Paola; Poidinger, Michael; ,High-dimensional analysis of the murine myeloid cell system,Nature immunology,15,12,1181,2014,Nature Publishing Group

22 Behbehani, Gregory K; Bendall, Sean C; Clutter, Matthew R; Fantl, Wendy J; Nolan, Garry P; ,Single-cell mass cytometry adapted to measurements of the cell cycle,Cytometry Part A,81,7,552-566,2012,Wiley-Blackwell

23 Bellman, Richard; ,A Markovian decision process,Journal of Mathematics and Mechanics,,,679-684,1957,JSTOR

24 Bendall, Sean C; Nolan, Garry P; Roederer, Mario; Chattopadhyay, Pratip K; ,A deep profiler's guide to cytometry,Trends in immunology,33,7,323-332,2012,Elsevier

25 Bendall, Sean C; Simonds, Erin F; Qiu, Peng; El-ad, D Amir; Krutzik, Peter O; Finck, Rachel; Bruggner, Robert V; Melamed, Rachel; Trejo, Angelica; Ornatsky, Olga I; ,Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum,Science,332,6030,687-696,2011,American Association for the Advancement of Science

26 Biancotto, Angélique; Iglehart, Sarah J; Vanpouille, Christophe; Condack, Cristian E; Lisco, Andrea; Ruecker, Elke; Hirsch, Ivan; Margolis, Leonid B; Grivel, Jean-Charles; ,HIV-1–induced activation of CD4+ T cells creates new targets for HIV-1 infection in human lymphoid tissue ex vivo,Blood,111,2,699-704,2008,Am Soc Hematology

27 Birx, Deborah L; Redfield, Robert R; Tencer, Kathleen; Fowler, Arnold; Burke, Donald S; Tosato, Giovanna; ,Induction of interleukin-6 during human immunodeficiency virus infection,Blood,76,11,2303-2310,1990,American Society of Hematology

28 Bjornson, Zach B; Nolan, Garry P; Fantl, Wendy J; ,Single-cell mass cytometry for analysis of immune system functional states,Current opinion in immunology,25,4,484-494,2013,Elsevier

29 Bodenmiller, Bernd; Zunder, Eli R; Finck, Rachel; Chen, Tiffany J; Savig, Erica S; Bruggner, Robert V; Simonds, Erin F; Bendall, Sean C; Sachs, Karen; Krutzik, Peter O; ,Multiplexed mass cytometry profiling of cellular states perturbed by small-molecule regulators,Nature biotechnology,30,9,858,2012,Nature Publishing Group

30 Bonner, WA; Hulett, HR; Sweet, RG; Herzenberg, Leonore A; ,Fluorescence activated cell sorting,Review of Scientific Instruments,43,3,404-409,1972,AIP

31 Bourry, O., Mannioui, A., Sellier, P., Roucairol, C., Durand-Gasselin, L., Dereuddre-Bosquet, N., ... & Le Grand, R. (2010). Effect of a short-term HAART on SIV load in macaque tissues is dependent on time of initiation and antiviral diffusion. Retrovirology, 7(1), 78.

32 Brenchley, Jason M; Schacker, Timothy W; Ruff, Laura E; Price, David A; Taylor, Jodie H; Beilman, Gregory J; Nguyen, Phuong L; Khoruts, Alexander; Larson, Matthew; Haase, Ashley T; ,CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract,Journal of Experimental Medicine,200,6,749-759,2004,Rockefeller University Press

33 Buzón, Maria J; Massanella, Marta; Llibre, Josep M; Esteve, Anna; Dahl, Viktor; Puertas, Maria C; Gatell, Josep M; Domingo, Pere; Paredes, Roger; Sharkey, Mark; ,HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects,Nature medicine,16,4,460,2010,Nature Publishing Group

34 Buzon MJ, Sun H, Li C, Shaw A, Seiss K, Ouyang Z, Martin-Gayo E, Leng J, Henrich TJ, Li JZ, Pereyra F, Zurakowski R, Walker BD, Rosenberg ES, Yu XG, Lichterfeld M. 2014. HIV-1 persistence in CD4+ T cells with stem cell-like properties. Nat Med 20:139-42

35 Camargo, Jose F; Kulkarni, Hemant; Agan, Brian K; Gaitan, Alvaro A; Beachy, Lisa A; Srinivas, Sowmya; He, Weijing; Anderson, Stephanie; Marconi, Vincent C; Dolan, Matthew J; ,Responsiveness of T Cells to Interleukin-7 Is Associated with Higher CD4+ T Cell Counts in HIV-1–Positive Individuals with Highly Active Antiretroviral Therapy–Induced Viral Load Suppression,The Journal of infectious diseases,199,12,1872-1882,2009,University of Chicago Press

36 Caruso, A., Licenziati, S., Corulli, M., Canaris, A. D., De Francesco, M. A., Fiorentini, S., ... & Turano, A. (1997). Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology, 27(1), 71-76.

37 Catalfamo, M., Di Mascio, M., Hu, Z., Srinivasula, S., Thaker, V., Adelsberger, J., ... & Rehm, C. (2008). HIV infection associated immune activation occurs by two distinct pathways that differentially affect CD4 and CD8 T cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, pnas-0810032105.

38 Cavrois, Marielle; Banerjee, Trambak; Mukherjee, Gourab; Raman, Nandhini; Hussien, Rajaa; Rodriguez, Brandon Aguilar; Vasquez, Joshua; Spitzer, Matthew H; Lazarus, Nicole H; Jones, Jennifer J; ,"Mass cytometric analysis of HIV entry, replication, and remodeling in tissue CD4+ T cells",Cell reports,20,4,984-998,2017,Elsevier

39 Cecchinato, Valentina; Tryniszewska, Elzbieta; Ma, Zhong Min; Vaccari, Monica; Boasso, Adriano; Tsai, Wen-Po; Petrovas, Constantinos; Fuchs, Dietmar; Heraud, Jean-Michel; Venzon, David; ,Immune activation driven by CTLA-4 blockade augments viral replication at mucosal sites in simian immunodeficiency virus infection,The Journal of Immunology,180,8,5439-5447,2008,Am Assoc Immnol

40 Chang, Hyun-Dong; Helbig, Christina; Tykocinski, Lars; Kreher, Stephan; Koeck, Juliana; Niesner, Uwe; Radbruch, Andreas; ,"Expression of IL-10 in Th memory lymphocytes is conditional on IL-12 or IL-4, unless the IL-10 gene is imprinted by GATA-3",European journal of immunology,37,3,807-817,2007,Wiley Online Library

41 Chao, MP; Seita, J; Weissman, IL; ,Establishment of a normal hematopoietic and leukemia stem cell hierarchy,Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology,,,sqb. 2008.73. 031,2008,Cold Spring Harbor Laboratory Press

42 Cheng, Rex G; Nixon, Douglas F; ,Herpes simplex virus and HIV-1: deciphering viral synergy,The Lancet Infectious Diseases,9,2,74,2009,Elsevier

43 Cheng, Yang; Wong, Michael T; van der Maaten, Laurens; Newell, Evan W; ,Categorical analysis of human T cell heterogeneity with one-dimensional soli-expression by nonlinear stochastic embedding,The Journal of Immunology,,,1501928,2015,Am Assoc Immnol

44 Chew, Glen M; Fujita, Tsuyoshi; Webb, Gabriela M; Burwitz, Benjamin J; Wu, Helen L; Reed, Jason S; Hammond, Katherine B; Clayton, Kiera L; Ishii, Naoto; Abdel-Mohsen, Mohamed; ,"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,e1005349,2016,Public Library of Science

45 Chomont, Nicolas; El-Far, Mohamed; Ancuta, Petronela; Trautmann, Lydie; Procopio, Francesco A; Yassine-Diab, Bader; Boucher, Genevieve; Boulassel, Mohamed-Rachid; Ghattas, Georges; Brenchley, Jason M; ,HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation,Nature medicine,15,8,893,2009,Nature Publishing Group

46 Chun, Tae-Wook; Stuyver, Lieven; Mizell, Stephanie B; Ehler, Linda A; Mican, Jo Ann M; Baseler, Michael; Lloyd, Alun L; Nowak, Martin A; Fauci, Anthony S; ,Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy,Proceedings of the National Academy of Sciences,94,24,13193-13197,1997,National Acad Sciences

47 Chung, Yeonseok; Tanaka, Shinya; Chu, Fuliang; Nurieva, Roza I; Martinez, Gustavo J; Rawal, Seema; Wang, Yi-Hong; Lim, Hoyong; Reynolds, Joseph M; Zhou, Xiao-hui; ,Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions,Nature medicine,17,8,983,2011,Nature Publishing Group

48 Cieri, Nicoletta; Camisa, Barbara; Cocchiarella, Fabienne; Forcato, Mattia; Oliveira, Giacomo; Provasi, Elena; Bondanza, Attilio; Bordignon, Claudio; Peccatori, Jacopo; Ciceri, Fabio; ,IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors,Blood,,,blood-2012-05-431718,2012,Am Soc Hematology

49 Cillo, Anthony R; Vagratian, David; Bedison, Margaret; Anderson, Elizabeth; Kearney, Mary F; Fyne, Elizabeth; Koontz, Dianna; Coffin, John M; Piatak, Michael; Mellors, John W; ,Improved single copy assays for quantification of persistent HIV-1 viremia in patients on suppressive antiretroviral therapy,Journal of clinical microbiology,,,JCM. 02060-14,2014,Am Soc Microbiol

50 Clayton, Kiera L; Douglas-Vail, Matthew B; Rahman, AKM Nur-ur; Medcalf, Karyn E; Xie, Irene Y; Chew, Glen M; Tandon, Ravi; Lanteri, Marion C; Norris, Philip J; Deeks, Steven G; ,"Soluble T cell immunoglobulin mucin domain 3 is shed from CD8+ T cells by the sheddase ADAM10, is increased in plasma during untreated HIV infection, and correlates with HIV disease progression",Journal of virology,89,7,3723-3736,2015,Am Soc Microbiol

51 Cockerham, Leslie R; Siliciano, Janet D; Sinclair, Elizabeth; O'Doherty, Una; Palmer, Sarah; Yukl, Steven A; Strain, Matt C; Chomont, Nicolas; Hecht, Frederick M; Siliciano, Robert F; ,CD4+ and CD8+ T cell activation are associated with HIV DNA in resting CD4+ T cells,PloS one,9,10,e110731,2014,Public Library of Science

52 Coleman, Christopher M; Wu, Li; ,HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs,Retrovirology,6,1,51,2009,BioMed Central

53 Colonna, M., Trinchieri, G., & Liu, Y. J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. Nature immunology, 5(12), 1219.

54 Coons, Albert H; Kaplan, Melvin H; ,Localization of antigen in tissue cells: II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody,Journal of Experimental Medicine,91,1,1-13,1950,Rockefeller University Press

55 Cooper, Arik; García, Mayra; Petrovas, Constantinos; Yamamoto, Takuya; Koup, Richard A; Nabel, Gary J; ,HIV-1 causes CD4 cell death through DNA-dependent protein kinase during viral integration,Nature,498,7454,376,2013,Nature Publishing Group

56 Cosmi, Lorenzo; Cimaz, Rolando; Maggi, Laura; Santarlasci, Veronica; Capone, Manuela; Borriello, Francesco; Frosali, Francesca; Querci, Valentina; Simonini, Gabriele; Barra, Giusi; ,Evidence of the transient nature of the Th17 phenotype of CD4+ CD161+ T cells in the synovial fluid of patients with juvenile idiopathic arthritis,Arthritis & Rheumatism,63,8,2504-2515,2011,Wiley Online Library

57 Crotty, Shane; ,"T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease",Immunity,41,4,529-542,2014,Elsevier

58 Crotty, Shane; ,Follicular helper CD4 T cells (Tfh),Annual review of immunology,29,,621-663,2011,Annual Reviews

59 Crotty, Shane; Ahmed, Rafi; ,Immunological memory in humans,Seminars in immunology,16,3,197-203,2004,Elsevier

60 Cubas, Rafael A; Mudd, Joseph C; Savoye, Anne-Laure; Perreau, Matthieu; Van Grevenynghe, Julien; Metcalf, Talibah; Connick, Elizabeth; Meditz, Amie; Freeman, Gordon J; Abesada-Terk Jr, Guillermo; ,Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection,Nature medicine,19,4,494,2013,Nature Publishing Group

61 Danilovic, Debora LS; Mendes-Correa, Maria C; Lima, Érika U; Zambrini, Heverton; K. Barros, Raffaelle; Marui, Suemi; ,Correlations of CTLA-4 gene polymorphisms and hepatitis C chronic infection,Liver International,32,5,803-808,2012,Wiley Online Library

62 Davies, Luke C; Jenkins, Stephen J; Allen, Judith E; Taylor, Philip R; ,Tissue-resident macrophages,Nature immunology,14,10,986,2013,Nature Publishing Group

63 De Boer, Rob J; ,Time scales of CD4+ T cell depletion in HIV infection,PLoS medicine,4,5,e193,2007,Public Library of Science

64 Deeks, Steven G; Walker, Bruce D; ,"The immune response to AIDS virus infection: good, bad, or both?",The Journal of clinical investigation,113,6,808-810,2004,Am Soc Clin Investig

65 Descours, B., Cribier, A., Chable-Bessia, C., Ayinde, D., Rice, G., Crow, Y., ... & Benkirane, M. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4+ T-cells. Retrovirology, 9(1), 87.

66 Descours, Benjamin; Petitjean, Gaël; López-Zaragoza, José-Luis; Bruel, Timothée; Raffel, Raoul; Psomas, Christina; Reynes, Jacques; Lacabaratz, Christine; Levy, Yves; Schwartz, Olivier; ,CD32a is a marker of a CD4 T-cell HIV reservoir harbouring replication-competent proviruses,Nature,543,7646,564,2017,Nature Publishing Group

67 Di Nunzio, F., Danckaert, A., Fricke, T., Perez, P., Fernandez, J., Perret, E., ... & Arhel, N. J. (2012). Human nucleoporins promote HIV-1 docking at the nuclear pore, nuclear import and integration. PloS one, 7(9), e46037.

68 Di Pucchio, Tiziana; Chatterjee, Bithi; Smed-Sörensen, Anna; Clayton, Sandra; Palazzo, Adam; Montes, Monica; Xue, Yaming; Mellman, Ira; Banchereau, Jacques; Connolly, John E; ,Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I,Nature immunology,9,5,551,2008,Nature Publishing Group

69 Dillon, S. M., Lee, E. J., Donovan, A. M., Guo, K., Harper, M. S., Frank, D. N., ... & Wilson, C. C. (2016). Enhancement of HIV-1 infection and intestinal CD4+ T cell depletion ex vivo by gut microbes altered during chronic HIV-1 infection. Retrovirology, 13(1), 5

70 Diggins, Kirsten E; Ferrell Jr, P Brent; Irish, Jonathan M; ,Methods for discovery and characterization of cell subsets in high dimensional mass cytometry data,Methods,82,,55-63,2015,Elsevier

71 Doitsh, Gilad; Cavrois, Marielle; Lassen, Kara G; Zepeda, Orlando; Yang, Zhiyuan; Santiago, Mario L; Hebbeler, Andrew M; Greene, Warner C; ,Abortive HIV infection mediates CD4 T cell depletion and inflammation in human lymphoid tissue,Cell,143,5,789-801,2010,Elsevier

72 Doitsh, Gilad; Galloway, Nicole LK; Geng, Xin; Yang, Zhiyuan; Monroe, Kathryn M; Zepeda, Orlando; Hunt, Peter W; Hatano, Hiroyu; Sowinski, Stefanie; Muñoz-Arias, Isa; ,Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection,Nature,505,7484,509,2014,Nature Publishing Group

73 Dustin, Michael L; Choudhuri, Kaushik; ,Signaling and polarized communication across the T cell immunological synapse,Annual review of cell and developmental biology,32,,303-325,2016,Annual Reviews

74 Dutertre, Charles-Antoine; Amraoui, Sonia; DeRosa, Annalisa; Jourdain, Jean-Pierre; Vimeux, Lene; Goguet, Matthieu; Degrelle, Séverine; Feuillet, Vincent; Liovat, Anne-Sophie; Müller-Trutwin, Michaela; ,Pivotal role of M-DC8+ monocytes from viremic HIV-infected patients in TNFα over-production in response to microbial products,Blood,,,blood-2012-03-418681,2012,American Society of Hematology

75 Eggena, Mark P; Barugahare, Banson; Jones, Norman; Okello, Martin; Mutalya, Steven; Kityo, Cissy; Mugyenyi, Peter; Cao, Huyen; ,Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation,The Journal of Immunology,174,7,4407-4414,2005,Am Assoc Immnol

76 Ellery, Philip J; Tippett, Emma; Chiu, Ya-Lin; Paukovics, Geza; Cameron, Paul U; Solomon, Ajantha; Lewin, Sharon R; Gorry, Paul R; Jaworowski, Anthony; Greene, Warner C; ,The CD16+ monocyte subset is more permissive to infection and preferentially harbors HIV-1 in vivo,The Journal of Immunology,178,10,6581-6589,2007,Am Assoc Immnol

77 Else, Laura J; Taylor, Stephen; Back, David J; Khoo, Saye H; ,Pharmacokinetics of antiretroviral drugs in anatomical sanctuary sites: the fetal compartment (placenta and amniotic fluid),Antivir Ther,16,8,1139-47,2011,

78 Epelman, Slava; Lavine, Kory J; Randolph, Gwendalyn J; ,Origin and functions of tissue macrophages,Immunity,41,1,21-35,2014,Elsevier

79 Estébanez-Muñoz, M., Stella, N., & Bernardino, J. I. (2012). HIV infection and chronic inflammation: is the bacterial translocation the underlying cause?. Medicina clinica, 138(15), 673-677.

80 Estes, Jacob D; Kityo, Cissy; Ssali, Francis; Swainson, Louise; Makamdop, Krystelle Nganou; Del Prete, Gregory Q; Deeks, Steven G; Luciw, Paul A; Chipman, Jeffrey G; Beilman, Gregory J; ,Defining total-body AIDS-virus burden with implications for curative strategies,Nature medicine,23,11,1271,2017,Nature Publishing Group

81 Estes, J. D., Li, Q., Reynolds, M. R., Wietgrefe, S., Duan, L., Schacker, T., ... & Carlis, J. (2006). Premature induction of an immunosuppressive regulatory T cell response during acute simian immunodeficiency virus infection. The Journal of infectious diseases, 193(5), 703-712.

82 Fahey, Laura M; Wilson, Elizabeth B; Elsaesser, Heidi; Fistonich, Chris D; McGavern, Dorian B; Brooks, David G; ,Viral persistence redirects CD4 T cell differentiation toward T follicular helper cells,Journal of Experimental Medicine,208,5,987-999,2011,Rockefeller University Press

83 Fantuzzi, Laura; Borghi, Paola; Ciolli, Veniero; Pavlakis, George; Belardelli, Filippo; Gessani, Sandra; ,Loss of CCR2 expression and functional response to monocyte chemotactic protein (MCP-1) during the differentiation of human monocytes: role of secreted MCP-1 in the regulation of the chemotactic response,Blood,94,3,875-883,1999,Am Soc Hematology

84 Farber, Donna L; Yudanin, Naomi A; Restifo, Nicholas P; ,"Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis",Nature Reviews Immunology,14,1,24,2014,Nature Publishing Group

85 Farkona, Sofia; Diamandis, Eleftherios P; Blasutig, Ivan M; ,Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer?,BMC medicine,14,1,73,2016,BioMed Central

86 Fazilleau, Nicolas; McHeyzer-Williams, Louise J; Rosen, Hugh; McHeyzer-Williams, Michael G; ,The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding,Nature immunology,10,4,375,2009,Nature Publishing Group

87 Ferreira, Marion; Pichon, Eric; Carmier, Delphine; Bouquet, Emilie; Pageot, Cécile; Bejan-Angoulvant, Theodora; Campana, Marion; Vermes, Emmanuelle; Marchand-Adam, Sylvain; ,Coronary Toxicities of Anti-PD-1 and Anti-PD-L1 Immunotherapies: a Case Report and Review of the Literature and International Registries,Targeted oncology,,,1-7,2018,Springer International Publishing

88 Février, Michèle; Dorgham, Karim; Rebollo, Angelita; ,CD4+ T cell depletion in human immunodeficiency virus (HIV) infection: role of apoptosis,Viruses,3,5,586-612,2011,Molecular Diversity Preservation International

89 Finck, Rachel; Simonds, Erin F; Jager, Astraea; Krishnaswamy, Smita; Sachs, Karen; Fantl, Wendy; Pe'er, Dana; Nolan, Garry P; Bendall, Sean C; ,Normalization of mass cytometry data with bead standards,Cytometry Part A,83,5,483-494,2013,"Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company Hoboken"

90 Finzi, Diana; Hermankova, Monika; Pierson, Theodore; Carruth, Lucy M; Buck, Christopher; Chaisson, Richard E; Quinn, Thomas C; Chadwick, Karen; Margolick, Joseph; Brookmeyer, Ronald; ,Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy,Science,278,5341,1295-1300,1997,American Association for the Advancement of Science

91 Fletcher, Courtney V; Staskus, Kathryn; Wietgrefe, Stephen W; Rothenberger, Meghan; Reilly, Cavan; Chipman, Jeffrey G; Beilman, Greg J; Khoruts, Alexander; Thorkelson, Ann; Schmidt, Thomas E; ,Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues,Proceedings of the National Academy of Sciences,111,6,2307-2312,2014,National Acad Sciences

92 Fleury, S; Rizzardi, GP; Chapuis, A; Tambussi, G; Knabenhans, C; Simeoni, E; Meuwly, J-Y; Corpataux, J-M; Lazzarin, A; Miedema, F; ,Long-term kinetics of T cell production in HIV-infected subjects treated with highly active antiretroviral therapy,Proceedings of the National Academy of Sciences,97,10,5393-5398,2000,National Academy of Sciences

93 Foxall, Russell B; Albuquerque, Adriana S; Soares, Rui S; Baptista, António P; Cavaleiro, Rita; Tendeiro, Rita; Gomes, Perpétua; Victorino, Rui MM; Sousa, Ana E; ,Memory and naive-like regulatory CD4+ T cells expand during HIV-2 infection in direct association with CD4+ T-cell depletion irrespectively of viremia,Aids,25,16,1961-1970,2011,LWW

94 Franken, Lars; Schiwon, Marzena; Kurts, Christian; ,Macrophages: sentinels and regulators of the immune system,Cellular microbiology,18,4,475-487,2016,

95 Frei, A. P., Bava, F. A., Zunder, E. R., Hsieh, E. W., Chen, S. Y., Nolan, G. P., & Gherardini, P. F. (2016). Highly multiplexed simultaneous detection of RNAs and proteins in single cells. Nature methods, 13(3), 269.

96 Fromentin, Rémi; Bakeman, Wendy; Lawani, Mariam B; Khoury, Gabriela; Hartogensis, Wendy; DaFonseca, Sandrina; Killian, Marisela; Epling, Lorrie; Hoh, Rebecca; Sinclair, Elizabeth; ,"CD4+ T cells expressing PD-1, TIGIT and LAG-3 contribute to HIV persistence during ART",PLoS pathogens,12,7,e1005761,2016,Public Library of Science

97 Galicia, Georgina; Gommerman, Jennifer L; ,Plasmacytoid dendritic cells and autoimmune inflammation,Biological chemistry,395,3,335-346,2014,De Gruyter

98 Gama, Lucio; Shirk, Erin N; Russell, Julia N; Carvalho, Karina I; Li, Ming; Queen, Suzanne E; Kalil, Jorge; Christine Zink, M; Clements, Janice E; Kallas, Esper G; ,Expansion of a subset of CD14highCD16negCCR2low/neg monocytes functionally similar to myeloid-derived suppressor cells during SIV and HIV infection,Journal of leukocyte biology,91,5,803-816,2012,Wiley Online Library

99 Ganesh, Lakshmanan; Leung, Kwanyee; Loré, Karin; Levin, Reuven; Panet, Amos; Schwartz, Owen; Koup, Richard A; Nabel, Gary J; ,Infection of specific dendritic cells by CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 promotes cell-mediated transmission of virus resistant to broadly neutralizing antibodies,Journal of virology,78,21,11980-11987,2004,Am Soc Microbiol

100 Gattinoni, Luca; Lugli, Enrico; Ji, Yun; Pos, Zoltan; Paulos, Chrystal M; Quigley, Máire F; Almeida, Jorge R; Gostick, Emma; Yu, Zhiya; Carpenito, Carmine; ,A human memory T cell subset with stem cell–like properties,Nature medicine,17,10,1290,2011,Nature Publishing Group

101 Gerold, Kay D; Zheng, Peilin; Rainbow, Daniel B; Zernecke, Alma; Wicker, Linda S; Kissler, Stephan; ,The soluble CTLA-4 splice variant protects from type 1 diabetes and potentiates regulatory T-cell function,Diabetes,,,DB_110130,2011,Am Diabetes Assoc

102 Ginhoux, Florent; Guilliams, Martin; ,Tissue-resident macrophage ontogeny and homeostasis,Immunity,44,3,439-449,2016,Elsevier

103 Ginhoux, Florent; Jung, Steffen; ,Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis,Nature Reviews Immunology,14,6,392-404,2014,Nature Research

104 Giorgi, J. V., Hultin, L. E., McKeating, J. A., Johnson, T. D., Owens, B., Jacobson, L. P., ... & Wolinsky, S. M. (1999). Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. The Journal of infectious diseases, 179(4), 859-870.

105 Gonçalves Silva, Isabel; Rüegg, Laura; Gibbs, Bernhard F; Bardelli, Marco; Fruehwirth, Alexander; Varani, Luca; Berger, Steffen M; Fasler-Kan, Elizaveta; Sumbayev, Vadim V; ,The immune receptor Tim-3 acts as a trafficker in a Tim-3/galectin-9 autocrine loop in human myeloid leukemia cells,Oncoimmunology,5,7,e1195535,2016,Taylor & Francis

106 González-Scarano, F., & Martín-García, J. (2005). The neuropathogenesis of AIDS. Nature reviews immunology, 5(1), 69.

107 Gosselin A, Wiche Salinas TR, Planas D, Wacleche VS, Zhang Y, Fromentin R, Chomont N, Cohen EA, Shacklett B, Mehraj V, Ghali MP, Routy JP, Ancuta P. 2017. HIV persists in CCR6+CD4+ T cells from colon and blood during antiretroviral therapy. Aids 31:35-48.

108 Gougeon, M. L., Lecoeur, H., Boudet, F., Ledru, E., Marzabal, S., Boullier, S., ... & Heeney, J. (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), 2964-2976

109 Grégori, Gérald; Patsekin, Valery; Rajwa, Bartek; Jones, James; Ragheb, Kathy; Holdman, Cheryl; Robinson, J Paul; ,Hyperspectral cytometry at the single-cell level using a 32-channel photodetector,Cytometry Part A,81,1,35-44,2012,"Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company Hoboken"

110 Haghverdi, Laleh; Buettner, Florian; Theis, Fabian J; ,Diffusion maps for high-dimensional single-cell analysis of differentiation data,Bioinformatics,31,18,2989-2998,2015,Oxford University Press

111 Harari, Alexandre; Vallelian, Florence; Pantaleo, Giuseppe; ,Phenotypic heterogeneity of antigen-specific CD4 T cells under different conditions of antigen persistence and antigen load,European journal of immunology,34,12,3525-3533,2004,WILEY-VCH Verlag Weinheim

112 Hassel, Jessica C; Heinzerling, Lucie; Aberle, Jens; Bähr, Oliver; Eigentler, Thomas K; Grimm, Marc-Oliver; Grünwald, Victor; Leipe, Jan; Reinmuth, Niels; Tietze, Julia K; ,Combined immune checkpoint blockade (anti-PD-1/anti-CTLA-4): evaluation and management of adverse drug reactions,Cancer treatment reviews,57,,36-49,2017,Elsevier

113 Hazenberg, Mette D; Hamann, Dörte; Schuitemaker, Hanneke; Miedema, Frank; ,T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4+ T cells go out of stock,Nature immunology,1,4,285,2000,Nature Publishing Group

114 Hellerstein, M. K., Hoh, R. A., Hanley, M. B., Cesar, D., Lee, D., Neese, R. A., & McCune, J. M. (2003). Subpopulations of long-lived and short-lived T cells in advanced HIV-1 infection. The Journal of clinical investigation, 112(6), 956-966.

115 Hill, Natasha J; Van Gunst, Kurt; Sarvetnick, Nora; ,Th1 and Th2 pancreatic inflammation differentially affects homing of islet-reactive CD4 cells in nonobese diabetic mice,The Journal of Immunology,170,4,1649-1658,2003,Am Assoc Immnol

116 Hoeffel, G., & Ginhoux, F. (2015). Ontogeny of tissue-resident macrophages. Frontiers in immunology, 6, 486.

117 Hu, Lingmin; Liu, Jibin; Chen, Xiaojun; Zhang, Yixin; Liu, Li; Zhu, Jian; Chen, Jianguo; Shen, Hongbing; Qiang, Fulin; Hu, Zhibin; ,CTLA-4 gene polymorphism+ 49 A/G contributes to genetic susceptibility to two infection-related cancers—hepatocellular carcinoma and cervical cancer,Human immunology,71,9,888-891,2010,Elsevier

118 Johnston, Robert J; Comps-Agrar, Laetitia; Hackney, Jason; Yu, Xin; Huseni, Mahrukh; Yang, Yagai; Park, Summer; Javinal, Vincent; Chiu, Henry; Irving, Bryan; ,The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8+ T cell effector function,Cancer cell,26,6,923-937,2014,Elsevier

119 Josefsson, Lina; Von Stockenstrom, Susanne; Faria, Nuno R; Sinclair, Elizabeth; Bacchetti, Peter; Killian, Maudi; Epling, Lorrie; Tan, Alice; Ho, Terence; Lemey, Philippe; ,The HIV-1 reservoir in eight patients on long-term suppressive antiretroviral therapy is stable with few genetic changes over time,Proceedings of the National Academy of Sciences,110,51,E4987-E4996,2013,National Acad Sciences

120 Kamentsky, Louis A; Melamed, Myron R; ,Spectrophotometric cell sorter,Science,156,3780,1364-1365,1967,American Association for the Advancement of Science

121 Kamentsky, Louis A; Melamed, Myron R; Derman, Herbert; ,Spectrophotometer: new instrument for ultrarapid cell analysis,Science,150,3696,630-631,1965,American Association for the Advancement of Science

122 Kaufmann, Andreas; Salentin, Robert; Gemsa, Diethard; Sprenger, Hans; ,Increase of CCR1 and CCR5 expression and enhanced functional response to MIP-1α during differentiation of human monocytes to macrophages,Journal of leukocyte biology,69,2,248-252,2001,Wiley Online Library

123 Kaufmann, Daniel E; Kavanagh, Daniel G; Pereyra, Florencia; Zaunders, John J; Mackey, Elizabeth W; Miura, Toshiyuki; Palmer, Sarah; Brockman, Mark; Rathod, Almas; Piechocka-Trocha, Alicja; ,Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction,Nature immunology,8,11,1246,2007,Nature Publishing Group

124 Kaufmann, Daniel E; Walker, Bruce D; ,PD-1 and CTLA-4 inhibitory cosignaling pathways in HIV infection and the potential for therapeutic intervention,The Journal of Immunology,182,10,5891-5897,2009,Am Assoc Immnol

125 Kim, Peter S; Ahmed, Rafi; ,Features of responding T cells in cancer and chronic infection,Current opinion in immunology,22,2,223-230,2010,Elsevier

126 Kim, Richard B; Fromm, Martin F; Wandel, Christoph; Leake, Brenda; Wood, Alastair JJ; Roden, Dan M; Wilkinson, Grant R; ,The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors.,The Journal of clinical investigation,101,2,289-294,1998,Am Soc Clin Investig

127 Klatt, Nichole R; Funderburg, Nicholas T; Brenchley, Jason M; ,"Microbial translocation, immune activation, and HIV disease",Trends in microbiology,21,1,6-13,2013,Elsevier

128 Klatt, N. R., Shudo, E., Ortiz, A. M., Engram, J. C., Paiardini, M., Lawson, B., ... & Apetrei, C. (2010). CD8+ lymphocytes control viral replication in SIVmac239-infected rhesus macaques without decreasing the lifespan of productively infected cells. PLoS pathogens, 6(1), e1000747.

129 Köhler, Georges; Milstein, Cesar; ,Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity,Nature,256,5517,495,1975,Nature Publishing Group

130 Kwon, Douglas S; Gregorio, Glenn; Bitton, Natacha; Hendrickson, Wayne A; Littman, Dan R; ,DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection,Immunity,16,1,135-144,2002,Elsevier

131 Linterman, Michelle A; Pierson, Wim; Lee, Sau K; Kallies, Axel; Kawamoto, Shimpei; Rayner, Tim F; Srivastava, Monika; Divekar, Devina P; Beaton, Laura; Hogan, Jennifer J; ,Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response,Nature medicine,17,8,975,2011,Nature Publishing Group

132 Lorenzo-Redondo, Ramon; Fryer, Helen R; Bedford, Trevor; Kim, Eun-Young; Archer, John; Pond, Sergei L Kosakovsky; Chung, Yoon-Seok; Penugonda, Sudhir; Chipman, Jeffrey G; Fletcher, Courtney V; ,Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy,Nature,530,7588,51,2016,Nature Publishing Group

133 Lou, Xudong; Zhang, Guohua; Herrera, Isaac; Kinach, Robert; Ornatsky, Olga; Baranov, Vladimir; Nitz, Mark; Winnik, Mitchell A; ,Polymer-based elemental tags for sensitive bioassays,Angewandte Chemie International Edition,46,32,6111-6114,2007,WILEY-VCH Verlag Weinheim

134 Maaten, Laurens van der; Hinton, Geoffrey; ,Visualizing data using t-SNE,Journal of machine learning research,9,Nov,2579-2605,2008,

135 Mackay, L. K., Wynne-Jones, E., Freestone, D., Pellicci, D. G., Mielke, L. A., Newman, D. M., ... & Carbone, F. R. (2015). T-box transcription factors combine with the cytokines TGF-β and IL-15 to control tissue-resident memory T cell fate. Immunity, 43(6), 1101-1111.

136 Magiorkinis, Gkikas; Angelis, Konstantinos; Mamais, Ioannis; Katzourakis, Aris; Hatzakis, Angelos; Albert, Jan; Lawyer, Glenn; Hamouda, Osamah; Struck, Daniel; Vercauteren, Jurgen; ,The global spread of HIV-1 subtype B epidemic,"Infection, genetics and evolution",46,,169-179,2016,Elsevier

137 Majonis, Daniel; Herrera, Isaac; Ornatsky, Olga; Schulze, Maren; Lou, Xudong; Soleimani, Mohsen; Nitz, Mark; Winnik, Mitchell A; ,Synthesis of a functional metal-chelating polymer and steps toward quantitative mass cytometry bioassays,Analytical chemistry,82,21,8961-8969,2010,ACS Publications

138 Maldarelli, Frank; Wu, X; Su, L; Simonetti, FR; Shao, W; Hill, S; Spindler, J; Ferris, AL; Mellors, JW; Kearney, MF; ,Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells,Science,345,6193,179-183,2014,American Association for the Advancement of Science

139 Manches, Olivier; Frleta, Davor; Bhardwaj, Nina; ,Dendritic cells in progression and pathology of HIV infection,Trends in immunology,35,3,114-122,2014,Elsevier

140 Manel, Nicolas; Unutmaz, Derya; Littman, Dan R; ,The differentiation of human T H-17 cells requires transforming growth factor-β and induction of the nuclear receptor RORγt,Nature immunology,9,6,641,2008,Nature Publishing Group

141 Manuzak, Jennifer A; Dillon, Stephanie M; Lee, Eric J; Dong, Zachary M; Hecht, Daniel K; Wilson, Cara C; ,Increased Escherichia coli-induced interleukin-23 production by CD16+ monocytes correlates with systemic immune activation in untreated HIV-1-infected individuals,Journal of virology,87,24,13252-13262,2013,Am Soc Microbiol

142 Martin GE, Pace M, Thornhill JP, Phetsouphanh C, Meyerowitz J, Gossez M, Brown H, Olejniczak N, Lwanga J, Ramjee G, Kaleebu P, Porter K, Willberg CB, Klenerman P, Nwokolo N, Fox J, Fidler S, Frater J. 2018. CD32-Expressing CD4 T Cells Are Phenotypically Diverse and Can Contain Proviral HIV DNA. Frontiers in Immunology 9.

143 Massanella, Marta; Gómez-Mora, Elisabet; Carrillo, Jorge; Curriu, Marta; Ouchi, Dan; Puig, Jordi; Negredo, Eugènia; Cabrera, Cecilia; Clotet, Bonaventura; Blanco, Julià; ,Increased ex vivo cell death of central memory CD4 T cells in treated HIV infected individuals with unsatisfactory immune recovery,Journal of translational medicine,13,1,230,2015,BioMed Central

144 Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A. L., & Lefrançois, L. (2001). Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. Science, 291(5512), 2413-2417.

145 Mattapallil, Joseph J; Douek, Daniel C; Hill, Brenna; Nishimura, Yoshiaki; Martin, Malcolm; Roederer, Mario; ,Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection, Nature, 434,7037,1093,2005, Nature Publishing Group

146 Masten, B. J., Olson, G. K., Tarleton, C. A., Rund, C., Schuyler, M., Mehran, R., ... & Lipscomb, M. F. (2006). Characterization of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in human lung. The Journal of Immunology, 177(11), 7784-7793.

147 Mäurer, Mathias; Loserth, Silke; Kolb-Mäurer, Annette; Ponath, Anke; Wiese, Stefan; Kruse, Niels; Rieckmann, Peter; ,A polymorphism in the human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) gene (exon 1+ 49) alters T-cell activation,Immunogenetics,54,1,1-8,2002,Springer

148 McDonald, David; Wu, Li; Bohks, Stacy M; KewalRamani, Vineet N; Unutmaz, Derya; Hope, Thomas J; ,Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions,Science,300,5623,1295-1297,2003,American Association for the Advancement of Science

149 Merad, Miriam; Sathe, Priyanka; Helft, Julie; Miller, Jennifer; Mortha, Arthur; ,The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting,Annual review of immunology,31,,563-604,2013,Annual Reviews

150 Merad, M., & Manz, M. G. (2009). Dendritic cell homeostasis. Blood, 113(15), 3418-3427.

151 Micci, Luca; Alvarez, Xavier; Iriele, Robin I; Ortiz, Alexandra M; Ryan, Emily S; McGary, Colleen S; Deleage, Claire; McAtee, Brigitte B; He, Tianyu; Apetrei, Cristian; ,CD4 depletion in SIV-infected macaques results in macrophage and microglia infection with rapid turnover of infected cells,PLoS pathogens,10,10,e1004467,2014,Public Library of Science

152 Miyara, Makoto; Yoshioka, Yumiko; Kitoh, Akihiko; Shima, Tomoko; Wing, Kajsa; Niwa, Akira; Parizot, Christophe; Taflin, Cécile; Heike, Toshio; Valeyre, Dominique; ,Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor,Immunity,30,6,899-911,2009,Elsevier

153 Moir, Susan; Fauci, Anthony S; ,B cells in HIV infection and disease,Nature Reviews Immunology,9,4,235,2009,Nature Publishing Group

154 Muranski, Pawel; Borman, Zachary A; Kerkar, Sid P; Klebanoff, Christopher A; Ji, Yun; Sanchez-Perez, Luis; Sukumar, Madhusudhanan; Reger, Robert N; Yu, Zhiya; Kern, Steven J; ,Th17 cells are long lived and retain a stem cell-like molecular signature,Immunity,35,6,972-985,2011,Elsevier

155 Murooka, Thomas T; Deruaz, Maud; Marangoni, Francesco; Vrbanac, Vladimir D; Seung, Edward; Von Andrian, Ulrich H; Tager, Andrew M; Luster, Andrew D; Mempel, Thorsten R; ,HIV-infected T cells are migratory vehicles for viral dissemination,Nature,490,7419,283,2012,Nature Publishing Group

156 Murray, Peter J; ,Macrophage polarization,Annual review of physiology,79,,541-566,2017,Annual Reviews

157 Newell, Evan W; Sigal, Natalia; Bendall, Sean C; Nolan, Garry P; Davis, Mark M; ,Cytometry by time-of-flight shows combinatorial cytokine expression and virus-specific cell niches within a continuum of CD8+ T cell phenotypes,Immunity,36,1,142-152,2012,Elsevier

158 Nicholas, Katherine J; Zern, Emily K; Barnett, Louise; Smith, Rita M; Lorey, Shelly L; Copeland, Courtney A; Sadagopal, Shanmugalakshmi; Kalams, Spyros A; ,B cell responses to HIV antigen are a potent correlate of viremia in HIV-1 infection and improve with PD-1 blockade,PloS one,8,12,e84185,2013,Public Library of Science

159 Niesner, Uwe; Albrecht, Inka; Janke, Marko; Doebis, Cornelia; Loddenkemper, Christoph; Lexberg, Maria H; Eulenburg, Katharina; Kreher, Stephan; Koeck, Juliana; Baumgrass, Ria; ,Autoregulation of Th1-mediated inflammation by twist1,Journal of Experimental Medicine,205,8,1889-1901,2008,Rockefeller University Press

160 Nishimura, Yoshiaki; Brown, Charles R; Mattapallil, Joseph J; Igarashi, Tatsuhiko; Buckler-White, Alicia; Lafont, Bernard AP; Hirsch, Vanessa M; Roederer, Mario; Martin, Malcolm A; ,Resting naive CD4+ T cells are massively infected and eliminated by X4-tropic simian–human immunodeficiency viruses in macaques,Proceedings of the National Academy of Sciences,102,22,8000-8005,2005,National Academy of Sciences

161 Nowak, Martin A; Lloyd, Alun L; Vasquez, Gabriela M; Wiltrout, Theresa A; Wahl, Linda M; Bischofberger, Norbert; Williams, Jon; Kinter, Audrey; Fauci, Anthony S; Hirsch, Vanessa M; ,Viral dynamics of primary viremia and antiretroviral therapy in simian immunodeficiency virus infection.,Journal of virology,71,10,7518-7525,1997,Am Soc Microbiol

162 Nurieva, Roza I; Chung, Yeonseok; Martinez, Gustavo J; Yang, Xuexian O; Tanaka, Shinya; Matskevitch, Tatyana D; Wang, Yi-Hong; Dong, Chen; ,Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells,Science,325,5943,1001-1005,2009,American Association for the Advancement of Science

163 O'Shea, John J; Paul, William E; ,Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells,Science,327,5969,1098-1102,2010,American Association for the Advancement of Science

164 Okoye, Afam A; Picker, Louis J; ,CD 4+ T-cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure,Immunological reviews,254,1,54-64,2013,

165 Ornatsky, Olga I; Kinach, Robert; Bandura, Dmitry R; Lou, Xudong; Tanner, Scott D; Baranov, Vladimir I; Nitz, Mark; Winnik, Mitchell A; ,Development of analytical methods for multiplex bio-assay with inductively coupled plasma mass spectrometry,Journal of analytical atomic spectrometry,23,4,463-469,2008,Royal Society of Chemistry

166 Panos, G., & Watson, D. C. (2015). Effect of HIV-1 subtype and tropism on treatment with chemokine coreceptor entry inhibitors; overview of viral entry inhibition. Critical reviews in microbiology, 41(4), 473-487.

167 Patel, Amit A; Zhang, Yan; Fullerton, James N; Boelen, Lies; Rongvaux, Anthony; Maini, Alexander A; Bigley, Venetia; Flavell, Richard A; Gilroy, Derek W; Asquith, Becca; ,The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation,Journal of Experimental Medicine,214,7,1913-1923,2017,Rockefeller University Press

168 Patel, Pragna; Borkowf, Craig B; Brooks, John T; Lasry, Arielle; Lansky, Amy; Mermin, Jonathan; ,Estimating per-act HIV transmission risk: a systematic review,Aids,28,10,1509-1519,2014,LWW

169 Pieper, Jennifer; Johansson, Sara; Snir, Omri; Linton, Ludvig; Rieck, Mary; Buckner, Jane H; Winqvist, O; van Vollenhoven, Ronald; Malmström, Vivianne; ,Peripheral and Site-Specific CD 4+ CD 28null T Cells from Rheumatoid Arthritis Patients Show Distinct Characteristics,Scandinavian journal of immunology,79,2,149-155,2014,Wiley Online Library

170 Piguet, Vincent; Steinman, Ralph M; ,The interaction of HIV with dendritic cells: outcomes and pathways,Trends in immunology,28,11,503-510,2007,Elsevier

171 Popov, Sergei; Chenine, Agnès-Laurence; Gruber, Andreas; Li, Pei-Lin; Ruprecht, Ruth M; ,Long-term productive human immunodeficiency virus infection of CD1a-sorted myeloid dendritic cells,Journal of virology,79,1,602-608,2005,Am Soc Microbiol

172 Porichis, Filippos; Kwon, Douglas S; Zupkosky, Jennifer; Tighe, Daniel P; McMullen, Ashley; Brockman, Mark A; Pavlik, David F; Rodriguez-Garcia, Marta; Pereyra, Florencia; Freeman, Gordon J; ,Responsiveness of HIV-specific CD4 T cells to PD-1 blockade,Blood,,,blood-2010-12-328070,2011,Am Soc Hematology

173 Prezzemolo, Teresa; Guggino, Giuliana; La Manna, Marco Pio; Di Liberto, Diana; Dieli, Francesco; Caccamo, Nadia; ,Functional signatures of human CD4 and CD8 T cell responses to Mycobacterium tuberculosis,Frontiers in immunology,5,,180,2014,Frontiers

174 Rangachari, Manu; Zhu, Chen; Sakuishi, Kaori; Xiao, Sheng; Karman, Jozsef; Chen, Andrew; Angin, Mathieu; Wakeham, Andrew; Greenfield, Edward A; Sobel, Raymond A; ,Bat3 promotes T cell responses and autoimmunity by repressing Tim-3–mediated cell death and exhaustion,Nature medicine,18,9,1394,2012,Nature Publishing Group

175 Raposo, Rui André Saraiva; de Mulder Rougvie, Miguel; Paquin-Proulx, Dominic; Brailey, Phillip M; Cabido, Vinicius D; Zdinak, Paul M; Thomas, Allison S; Huang, Szu-han; Beckerle, Greta A; Jones, Richard B; ,IFITM1 targets HIV-1 latently infected cells for antibody-dependent cytolysis,JCI insight,2,1,,2017,American Society for Clinical Investigation

176 Ren, Shengjun; Rollins, Barrett J; ,Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit,Cell,117,2,239-251,2004,Elsevier

177 Restifo, Nicholas P; Gattinoni, Luca; ,Lineage relationship of effector and memory T cells,Current opinion in immunology,25,5,556-563,2013,Elsevier

178 Rhee, Soo-Yon; Fessel, W Jeffrey; Liu, Tommy F; Marlowe, Natalia M; Rowland, Charles M; Rode, Richard A; Vandamme, Anne-Mieke; Van Laethem, Kristel; Brun-Vezinet, Françoise; Calvez, Vincent; ,Predictive value of HIV-1 genotypic resistance test interpretation algorithms,Journal of Infectious Diseases,200,3,453-463,2009,The University of Chicago Press

179 Richards, Kathryn H; Aasa-Chapman, Marlén MI; McKnight, Áine; Clapham, Paul R; ,Modulation of HIV-1 macrophage-tropism among R5 envelopes occurs before detection of neutralizing antibodies,Retrovirology,7,1,48,2010,BioMed Central

180 Riella, Leonardo V; Paterson, Alison M; Sharpe, Arlene H; Chandraker, Anil; ,Role of the PD-1 Pathway in the Immune Response,American Journal of Transplantation,12,10,2575-2587,2012,Wiley Online Library

181 Rodríguez, Benigno; Sethi, Ajay K; Cheruvu, Vinay K; Mackay, Wilma; Bosch, Ronald J; Kitahata, Mari; Boswell, Stephen L; Mathews, W Christopher; Bangsberg, David R; Martin, Jeffrey; ,Predictive value of plasma HIV RNA level on rate of CD4 T-cell decline in untreated HIV infection,Jama,296,12,1498-1506,2006,American Medical Association

182 Rothenberger, Meghan K; Keele, Brandon F; Wietgrefe, Stephen W; Fletcher, Courtney V; Beilman, Gregory J; Chipman, Jeffrey G; Khoruts, Alexander; Estes, Jacob D; Anderson, Jodi; Callisto, Samuel P; ,Large number of rebounding/founder HIV variants emerge from multifocal infection in lymphatic tissues after treatment interruption,Proceedings of the National Academy of Sciences,,,201414926,2015,National Acad Sciences

183 Sada-Ovalle, Isabel; Ocaña-Guzman, Ranferi; Pérez-Patrigeón, Santiago; Chávez-Galán, Leslie; Sierra-Madero, Juan; Torre-Bouscoulet, Luis; Addo, Marylyn M; ,Tim-3 blocking rescue macrophage and T cell function against Mycobacterium tuberculosis infection in HIV+ patients,Journal of the International AIDS Society,18,1,20078,2015,Wiley Online Library

184 Sallusto, Federica; Geginat, Jens; Lanzavecchia, Antonio; ,"Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance",Annu. Rev. Immunol.,22,,745-763,2004,Annual Reviews

185 Sampath, P., Moideen, K., Ranganathan, U. D., & Bethunaickan, R. (2018). Monocyte subsets: Phenotypes and Function in tuberculosis infection. Frontiers in immunology, 9.

186 Sandler, Netanya G; Douek, Daniel C; ,"Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities",Nature Reviews Microbiology,10,9,655,2012,Nature Publishing Group

187 Santa-Marta, Mariana; Brito, Paula; Godinho-Santos, Ana; Goncalves, Joao; ,Host factors and HIV-1 replication: clinical evidence and potential therapeutic approaches,Frontiers in immunology,4,,343,2013,Frontiers

188 Schlitzer, Andreas; McGovern, Naomi; Ginhoux, Florent; ,Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems,Seminars in cell & developmental biology,41,,9-22,2015,Academic Press

189 Schmitt, Nathalie; Bustamante, Jacinta; Bourdery, Laure; Bentebibel, Salah Eddine; Boisson-Dupuis, Stephanie; Hamlin, Fran; Tran, Mau V; Blankenship, Derek; Pascual, Virginia; Savino, Daniel A; ,IL-12 receptor β1 deficiency alters in vivo T follicular helper cell response in humans,Blood,,,blood-2012-08-448902,2013,Am Soc Hematology

190 Schmitt, Nathalie; Liu, Yang; Bentebibel, Salah-Eddine; Munagala, Indira; Bourdery, Laure; Venuprasad, K; Banchereau, Jacques; Ueno, Hideki; ,The cytokine TGF-β co-opts signaling via STAT3-STAT4 to promote the differentiation of human T FH cells,Nature immunology,15,9,856,2014,Nature Publishing Group

191 Schwartz, Jordan Ari; Clayton, Kiera L; Mujib, Shariq; Zhang, Hongliang; Rahman, AKM Nur-ur; Liu, Jun; Yue, Feng Yun; Benko, Erika; Kovacs, Colin; Ostrowski, Mario A; ,Tim-3 is a Marker of Plasmacytoid Dendritic Cell Dysfunction during HIV Infection and Is Associated with the Recruitment of IRF7 and p85 into Lysosomes and with the Submembrane Displacement of TLR9,The Journal of Immunology,,,1601298,2017,Am Assoc Immnol

192 Seung, Edward; Dudek, Timothy E; Allen, Todd M; Freeman, Gordon J; Luster, Andrew D; Tager, Andrew M; ,PD-1 blockade in chronically HIV-1-infected humanized mice suppresses viral loads,PloS one,8,10,e77780,2013,Public Library of Science

193 Sigal, Alex; Kim, Jocelyn T; Balazs, Alejandro B; Dekel, Erez; Mayo, Avi; Milo, Ron; Baltimore, David; ,Cell-to-cell spread of HIV permits ongoing replication despite antiretroviral therapy,Nature,477,7362,95,2011,Nature Publishing Group

194 Siliciano, Janet D; Kajdas, Joleen; Finzi, Diana; Quinn, Thomas C; Chadwick, Karen; Margolick, Joseph B; Kovacs, Colin; Gange, Stephen J; Siliciano, Robert F; ,Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells,Nature medicine,9,6,727,2003,Nature Publishing Group

195 Siliciano, Robert F; Greene, Warner C; ,HIV latency,Cold Spring Harbor perspectives in medicine,1,1,a007096,2011,Cold Spring Harbor Laboratory Press

196 Silvin, A., Chun, I. Y., Lahaye, X., Imperatore, F., Brault, J. B., Cardinaud, S., ... & Goudot, C. (2017). Constitutive resistance to viral infection in human CD141+ dendritic cells. Science immunology, 2(13).

197 Skapenko, Alla; Leipe, Jan; Niesner, Uwe; Devriendt, Koen; Beetz, Rolf; Radbruch, Andreas; Kalden, Joachim R; Lipsky, Peter E; Schulze-Koops, Hendrik; ,GATA-3 in human T cell helper type 2 development,Journal of Experimental Medicine,199,3,423-428,2004,Rockefeller University Press

198 Spitzer, Matthew H; Gherardini, Pier Federico; Fragiadakis, Gabriela K; Bhattacharya, Nupur; Yuan, Robert T; Hotson, Andrew N; Finck, Rachel; Carmi, Yaron; Zunder, Eli R; Fantl, Wendy J; ,An interactive reference framework for modeling a dynamic immune system,Science,349,6244,1259425,2015,American Association for the Advancement of Science

199 Szabo, Susanne J; Sullivan, Brandon M; Peng, Stanford L; Glimcher, Laurie H; ,Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses,Annual review of immunology,21,1,713-758,2003,"Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA"

200 Tang-Huau, Tsing-Lee; Segura, Elodie; ,Human in vivo-differentiated monocyte-derived dendritic cells,Seminars in cell & developmental biology,,,,2018,Elsevier

201 Tanner, Scott D; Baranov, Vladimir I; Ornatsky, Olga I; Bandura, Dmitry R; George, Thaddeus C; ,An introduction to mass cytometry: fundamentals and applications,"Cancer Immunology, Immunotherapy",62,5,955-965,2013,Springer

202 Tebit, Denis M; Arts, Eric J; ,Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease,The Lancet infectious diseases,11,1,45-56,2011,Elsevier

203 Thieblemont, Nathalie; Weiss, Laurence; Sadeghi, Hoss M; Estcourt, Claudia; Haeffner-Cavaillon, Nicole; ,CD14lowCD16high: a cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection,European journal of immunology,25,12,3418-3424,1995,WILEY-VCH Verlag GmbH Weinheim

204 Thornhill, John Patrick; Fidler, Sarah; Klenerman, Paul; Frater, John; Phetsouphanh, Chansavath; ,The role of CD4+ T follicular helper cells in HIV infection: from the Germinal Center to the Periphery,Frontiers in immunology,8,,46,2017,Frontiers

205 Tricot, Sabine; Meyrand, Mickael; Sammicheli, Chiara; Elhmouzi-Younes, Jamila; Corneau, Aurélien; Bertholet, Sylvie; Malissen, Marie; Le Grand, Roger; Nuti, Sandra; Luche, Hervé; ,Evaluating the efficiency of isotope transmission for improved panel design and a comparison of the detection sensitivities of mass cytometer instruments,Cytometry Part A,87,4,357-368,2015,

206 Triques, Karine; Stevenson, Mario; ,Characterization of restrictions to human immunodeficiency virus type 1 infection of monocytes,Journal of virology,78,10,5523-5527,2004,American Society for Microbiology

207 Unutmaz, Derya; Pileri, Piero; Abrignani, Sergio; ,Antigen-independent activation of naive and memory resting T cells by a cytokine combination.,Journal of Experimental Medicine,180,3,1159-1164,1994,Rockefeller University Press

208 Van Furth, R; Cohn, ZA; Hirsch, JG; Humphrey, JH; Spector, WG; Langevoort, HL; ,"The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells",Bulletin of the World Health Organization,46,6,845,1972,World Health Organization

209 Van Wijk, Femke; Cheroutre, Hilde; ,Mucosal T cells in gut homeostasis and inflammation,Expert review of clinical immunology,6,4,559-566,2010,Taylor & Francis

210 Vandergeeten, Claire; Fromentin, Rémi; DaFonseca, Sandrina; Lawani, Mariam B; Sereti, Irini; Lederman, Michael M; Ramgopal, Moti; Routy, Jean-Pierre; Sékaly, Rafick-Pierre; Chomont, Nicolas; ,Interleukin-7 promotes HIV persistence during antiretroviral therapy,Blood,,,blood-2012-11-465625,2013,Am Soc Hematology

211 Velu, Vijayakumar; Titanji, Kehmia; Zhu, Baogong; Husain, Sajid; Pladevega, Annette; Lai, Lilin; Vanderford, Thomas H; Chennareddi, Lakshmi; Silvestri, Guido; Freeman, Gordon J; ,Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade,Nature,458,7235,206,2009,Nature Publishing Group

212 Venzke, Stephanie; Keppler, Oliver T; ,Role of macrophages in HIV infection and persistence,Expert review of clinical immunology,2,4,613-626,2006,Taylor & Francis

213 Vérollet, Christel; Souriant, Shanti; Bonnaud, Emilie; Jolicoeur, Paul; Raynaud-Messina, Brigitte; Kinnaer, Cassandre; Fourquaux, Isabelle; Imle, Andrea; Benichou, Serge; Fackler, Oliver T; ,HIV-1 reprograms the migration of macrophages,Blood,,,blood-2014-08-596775,2014,American Society of Hematology

214 Von Stockenstrom, Susanne; Odevall, Lina; Lee, Eunok; Sinclair, Elizabeth; Bacchetti, Peter; Killian, Maudi; Epling, Lorrie; Shao, Wei; Hoh, Rebecca; Ho, Terence; ,Longitudinal genetic characterization reveals that cell proliferation maintains a persistent HIV type 1 DNA pool during effective HIV therapy,The Journal of infectious diseases,212,4,596-607,2015,Oxford University Press

215 Wacleche, Vanessa Sue; Tremblay, Cécile L; Routy, Jean-Pierre; Ancuta, Petronela; ,The biology of monocytes and dendritic cells: Contribution to HIV pathogenesis,Viruses,10,2,65,2018,Multidisciplinary Digital Publishing Institute

216 Wagner, Thor A; McLaughlin, Sherry; Garg, Kavita; Cheung, Charles YK; Larsen, Brendan B; Styrchak, Sheila; Huang, Hannah C; Edlefsen, Paul T; Mullins, James I; Frenkel, Lisa M; ,Proliferation of cells with HIV integrated into cancer genes contributes to persistent infection,Science,345,6196,570-573,2014,American Association for the Advancement of Science

217 Waterhouse, Paul; Penninger, Josef M; Timms, Emma; Wakeham, Andrew; Shahinian, Arda; Lee, Kelvin P; Thompson, Craig B; Griesser, Henrik; Mak, Tak W; ,Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4,Science,270,5238,985-988,1995,American Association for the Advancement of Science

218 Wei, Xiping; Ghosh, Sajal K; Taylor, Maria E; Johnson, Victoria A; Emini, Emilio A; Deutsch, Paul; Lifson, Jeffrey D; Bonhoeffer, Sebastian; Nowak, Martin A; Hahn, Beatrice H; ,Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection,Nature,373,6510,117,1995,Nature Publishing Group

219 Weiner, Louis M; Li, Wei; Holmes, Michele; Catalano, Robert B; Dovnarsky, Monica; Padavic, Kristin; Alpaugh, R Katherine; ,"Phase I trial of recombinant macrophage colony-stimulating factor and recombinant γ-interferon: toxicity, monocytosis, and clinical effects",Cancer Research,54,15,4084-4090,1994,AACR

220 Wightman, Fiona; Solomon, Ajantha; Kumar, Sanjeev S; Urriola, Nicolas; Gallagher, Kerri; Hiener, Bonnie; Palmer, Sarah; Mcneil, Catriona; Garsia, Roger; Lewin, Sharon R; ,Effect of ipilimumab on the HIV reservoir in an HIV-infected individual with metastatic melanoma,"AIDS (London, England)",29,4,504,2015,NIH Public Access

221 Williams, Dionna W; Eugenin, Eliseo A; Calderon, Tina M; Berman, Joan W; ,"Monocyte maturation, HIV susceptibility, and transmigration across the blood brain barrier are critical in HIV neuropathogenesis",Journal of leukocyte biology,91,3,401-415,2012,Wiley Online Library

222 Williams, James P; Hurst, Jacob; Stöhr, Wolfgang; Robinson, Nicola; Brown, Helen; Fisher, Martin; Kinloch, Sabine; Cooper, David; Schechter, Mauro; Tambussi, Giuseppe; ,HIV-1 DNA predicts disease progression and post-treatment virological control,Elife,3,,e03821,2014,eLife Sciences Publications Limited

223 Wolf, Elizabeth; Herbeck, Joshua T; Van Rompaey, Stephen; Kitahata, Mari; Thomas, Katherine; Pepper, Gregory; Frenkel, Lisa; ,Phylogenetic evidence of HIV-1 transmission between adult and adolescent men who have sex with men,AIDS research and human retroviruses,33,4,318-322,2017,"Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA"

224 Wong, Joseph K; Hezareh, Marjan; Günthard, Huldrych F; Havlir, Diane V; Ignacio, Caroline C; Spina, Celsa A; Richman, Douglas D; ,Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia,Science,278,5341,1291-1295,1997,American Association for the Advancement of Science

225 Wong, Michael Thomas; Ong, David Eng Hui; Lim, Frances Sheau Huei; Teng, Karen Wei Weng; McGovern, Naomi; Narayanan, Sriram; Ho, Wen Qi; Cerny, Daniela; Tan, Henry Kun Kiaang; Anicete, Rosslyn; ,A high-dimensional atlas of human T cell diversity reveals tissue-specific trafficking and cytokine signatures,Immunity,45,2,442-456,2016,Elsevier

226 Wu, Li; KewalRamani, Vineet N; ,Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination,Nature reviews immunology,6,11,859,2006,Nature Publishing Group

227 Xu, Hangdi; Zhao, Mingfei; He, Jiliang; Chen, Zhi; ,Association between cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 gene+ 49 A/G polymorphism and chronic infection with hepatitis B virus: a meta-analysis,Journal of International Medical Research,41,3,559-567,2013,"Sage Publications Sage UK: London, England"

228 Yates, Andrew; Stark, Jaroslav; Klein, Nigel; Antia, Rustom; Callard, Robin; ,Understanding the slow depletion of memory CD4+ T cells in HIV infection,PLoS medicine,4,5,e177,2007,Public Library of Science

229 Zhu, Chen; Anderson, Ana C; Schubart, Anna; Xiong, Huabao; Imitola, Jaime; Khoury, Samia J; Zheng, Xin Xiao; Strom, Terry B; Kuchroo, Vijay K; ,The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity,Nature immunology,6,12,1245,2005,Nature Publishing Group

230 Ziegler-Heitbrock, Loems; ,Reprint of: Monocyte subsets in man and other species,Cellular immunology,291,1-2,11-15,2014,Elsevier

231 Zyl, Gert; Bale, Michael J; Kearney, Mary F; ,HIV evolution and diversity in ART-treated patients,Retrovirology,15,1,14,2018,BioMed Central

Résumé

La cytométrie de masse CMM) a révolutionné l'étude de la diversité cellulaire et phénotypique, en augmentant de manière significative le nombre de marqueurs pouvant être analysés simultanément (41 à ce jour). En permettant de définir précisément l'état des populations de lymphocytes, notamment en ce qui concerne leur différenciation, activation et leur entrée dans le cycle cellulaire, la CMM a mis au jour de petits sous-ensembles jusqu'ici inconnus. Dans cette étude, la CMM a été utilisée pour tenter de mieux caractériser les réservoirs du VIH.

Avec l'introduction de la thérapie antirétrovirale combinée (ART) en 1996, l'infection par le VIH est passée d'un destin fatal à une maladie chronique gérable avec une durée de vie normale grâce à une réduction de la réplication virale active (la quantité de virus est en deçà des limites de détections optimales). Cependant, si le traitement est interrompu, la charge virale chez le patient augmente à nouveau du fait des réservoirs de provirus viables localisés dans des populations de cellules à longue durée de vie et qui ne peuvent pas être éliminées par les traitements actuels. Ces cellules infectées réservoirs constituent un obstacle majeur à l'éradication du VIH.

Le réservoir le mieux caractérisé est celui des lymphocytes T CD4+ et est principalement hébergé dans les TCM, les TTM, les TSCM et les Tfh. Une première étude nous a permis d'évaluer les stades du cycle cellulaire en association à des marqueurs de différenciation, d'activation et d'épuisement, pour aboutir à une évaluation poussée de l'état de quiescence des lymphocytes T CD4 susceptibles d'abriter les réservoirs latents de VIH. Cette large analyse multiplexe démontre que certains sous-ensembles des LTCD4+CD25-HLA-DR- classiquement considérés "au repos"- contiennent en fait des quantités notables de cellules en cycle ou exprimant des récepteurs inhibiteurs, ouvrant de nouvelles voies pour une redéfinition des cellules T CD4 quiescentes du sang périphérique.

Une deuxième étude avait pour but de définir les populations de LT CD4 produisant du VIH in vivo. Nous avons développé une analyse multiparamétrique sur des cellules de patients VIH+ sous ART et en phase d'interruption thérapeutique (ATI). Cette étude met en évidence que les cellules CD3+CD4+CD32high expriment un fort taux de marqueurs d'activation et reçoivent d'importants signaux d'activation via des cytokines, à l'inverse des cellules CD32a-. D'autre part, l'analyse des LTCD4+ producteurs de VIH (exprimant la protéine de capside p24), nous a permis de détecter un très faible nombre de cellules positives p24+ (inférieur à 0,004% en phase d'ATI mais aucun avant). Le phénotype des cellules productrices a ensuite été mis en évidence. Il s'agit de lymphocytes T n'exprimant pas de CD8, enrichis d'un facteur 4 en cellules TSCM, et d'un facteur 2 en TFH. Ces populations sont très enrichies en cellules activées co-exprimant 3 marqueurs d'activation (augmentés d'un facteur 20) et sont en cycle (Ki67+) et/ou sur-expriment des molécules de contrôle immunitaire (ICP) avec un enrichissement d'un facteur 500. Ceci nous permet de détecter des cellules productrices avec des fréquences beaucoup plus élevées dans ces populations TCD3+CD8- en cycle à hauteur de 0,08%, et en phase G2 (2,46%), mais également dans les cellules présentant une poly-expression des 4 immune-checkpoints (2,27%).

L'avènement de la cytométrie de masse a augmenté de façon exponentielle les informations que nous pouvions obtenir sur une cellule. Grâce à cet outil, l'identification du cycle cellulaire, en corrélation avec différents marqueurs phénotypiques, permet d'explorer des informations jusque-là inaccessibles, entre autres l'analyse des réservoirs latents et productifs du VIH. Ce travail permet ainsi de caractériser le plus précisément possible ces cellules productrices de VIH, mais aussi les cellules latentes, et potentiellement réservoirs du virus.

Mots clés : Cytométrie de masse, Analyse multiparamétrique, VIH, Cycle cellulaire, Marqueurs d'épuisement cellulaire, Activation

Abstract

Mass cytometry (CMM) has revolutionized the study of cell and phenotypic diversity, significantly increasing the number of markers that can be analysed simultaneously (41 to date). By making it possible to precisely define the state of the lymphocyte populations, particularly regarding their differentiation, activation and entry into the cell cycle, the CMM has revealed small subsets so far unknown. In this study, the CMM was used to try to better characterize the HIV's reservoirs.

With the introduction in 1996 of Combined Antiretroviral Therapy (ART), HIV infection has shifted from a fatal destiny to a manageable chronic disease with a normal life span through a reduction in active viral replication (the amount of virus is below optimal detection limits). However, if treatment is interrupted, the viral load increases again in the patient due to viable provirus reservoirs located in long-lived cell populations that cannot be eliminated by current treatments. These reservoirs constitute a major obstacle to the eradication of HIV.

The best characterized reservoir is that of CD4+ T cells and is mainly hosted in TCM, TTM, TSCM and Tfh. A first study allowed us to evaluate the stages of the cell cycle in association with markers of differentiation, activation and exhaustion, leading to a thorough assessment of the quiescent state of CD4 T cells likely to harbour latent reservoirs of HIV. This broad multiplex analysis demonstrates that some subsets of LTCD4+CD25-HLA-DR- classically considered "at rest" – do actually contain significant amounts of cells in cycling or expressing inhibitory receptors, opening new pathways for redefining CD4 T quiescent cells from peripheral blood.

A second study aimed to define CD4+ T Cells populations producing HIV in vivo. We have developed a multiparametric analysis on cells of HIV+ patients under ART and in therapeutic interruption phase (ATI). This study shows that CD3+CD4+CD32high cells express a high level of activation markers and receive important activation signals via cytokines, unlike CD32a- cells. On the other hand, the analysis of HIV-producing LTCD4+ (expressing the p24 capsid protein), allowed us to detect a very small number of p24+ positive cells (less than 0.004% in ATI phase but none before). The phenotype of the producing cells was then highlighted. These are T lymphocytes that do not express CD8, enriched with a factor 4 in TSCM cells, and a factor 2 in TFH. These populations are highly enriched in activated cells co-expressing 3 activation markers (increased by a factor of 20) and are in cycle (Ki67+) and/or over-express immune control molecules (ICPs) with an enrichment of a factor of 500. This allows us to detect producing cells with much higher frequencies in these TCD3+CD8- populations in cycles up to 0.08%, and in G2 phase (2.46%), but also in cells with poly-expression of 4 immune-checkpoints (2.27%).

The advent of mass cytometry has exponentially increased the information we could get on a cell. Thanks to this tool, cell cycle identification, in correlation with different phenotypic markers, makes possible the exploration of previously inaccessible information, including the analysis of latent and productive reservoirs of HIV. This work enables us to characterize as precisely as possible these HIV-producing cells, but also the latent cells, and potentially reservoirs of the virus.

Key words: Mass cytometry, Multiparametric analysis, HIV, Cell cyle, Immune-checkpoint, Cellular activation