

Université de Montréal

**L'impact des immunosuppresseurs sur les réservoirs du VIH
après transplantation rénale**

Par :

Alessandro Modica

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise (M.Sc.) en Microbiologie et Immunologie

Été 2022

© Alessandro Modica, 2022

Université de Montréal
Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé

**L'impact des immunosuppresseurs sur les réservoirs du VIH
après transplantation rénale**

Présenté par

Alessandro Modica

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Mélanie Dieudé

Président-rapporteur

Nicolas Chomont

Directeur de recherche

Caroline Gilbert

Membre du jury

Résumé

La thérapie antirétrovirale (TAR) n'éradique pas le VIH de l'organisme. Le VIH persiste grâce à la prolifération de lymphocytes T CD4+ infectés de manière latente. De plus, bien que la plupart des provirus persistent sous une forme latente, un petit nombre de cellules infectées produisent des protéines virales et des virions. Les immunosuppresseurs administrés aux personnes subissant une greffe de rein, pour prévenir le rejet d'organe, inhibent la prolifération des lymphocytes T et l'activation immunitaire. Nous avons émis l'hypothèse que les immunosuppresseurs pourraient réduire à la fois la taille du réservoir viral latent ainsi que les marqueurs associés à la production résiduelle de VIH. Sept participants vivant avec le VIH sous TAR efficace et ayant subi une transplantation rénale suivie de la prise d'un traitement immunosuppresseur ont été recrutés. Des échantillons sanguins longitudinaux ont été prélevés avant et après la greffe (6-7 échantillons/participant, sur 2 ans).

Les effets des immunosuppresseurs sur l'activation des lymphocytes T ainsi que les taux d'anticorps plasmatiques dirigés contre l'enveloppe du VIH (un reflet de la production virale résiduelle) ont été évalués par cytométrie en flux et ELISA, respectivement. L'ADN total du VIH et les transcrits d'ARN-gag-LTR associés aux cellules ont été quantifiés par qPCR et la fréquence des cellules p24+ par HIV-Flow. Pour confirmer les résultats obtenus in vivo, nous avons optimisé un protocole de culture cellulaire pour évaluer l'impact des immunosuppresseurs les plus fréquemment utilisés (MMF, tacrolimus, dasatinib) sur les cellules infectées dans un environnement contrôlé.

Suite à la transplantation et à l'initiation du traitement immunosuppresseur, nous avons observé une diminution significative des niveaux d'expression des marqueurs d'activation et de prolifération HLA-DR et Ki67 dans les lymphocytes T CD4+, accompagnée d'une augmentation de la fréquence des cellules mémoires centrales et d'une forte diminution de la fréquence des lymphocytes T régulateurs. Les niveaux d'anticorps ciblant l'enveloppe du VIH ont également diminué pendant le traitement immunosuppresseur. Il y avait une diminution modeste et transitoire des niveaux d'ADN et d'ARN du VIH un mois après la transplantation rénale. Les résultats de HIV-Flow n'ont montré aucun impact significatif des immunosuppresseurs sur le réservoir inductible, avec de grandes variations entre les participants. Le modèle de culture

cellulaire *in vitro* a révélé que de faibles doses d'immunosuppresseurs induisent généralement une diminution des marqueurs du VIH, alors que des doses plus élevées conduisent à des variations dépendantes des donneurs. Ainsi, nos résultats montrent que les traitements immunosuppresseurs diminuent la prolifération et l'activation des lymphocytes T CD4+, ce qui est concomitant avec une diminution modeste et transitoire des taux d'ADN et d'ARN du VIH. Nos résultats indiquent que la combinaison des traitements immunosuppresseurs actuels sont toutefois insuffisants pour affecter profondément et durablement le réservoir du VIH et suggèrent que la taille du réservoir est étroitement régulée par des forces homéostatiques difficiles à contrer.

Mots-clés : VIH, réservoirs, persistance, transplantation rénal, immunosuppresseurs, homéostasie

Abstract

Antiretroviral therapy (ART) does not eradicate HIV from the body. HIV persists through proliferation of latently infected CD4⁺T-cells. Moreover, although most proviruses persist in a latent form, a small number of infected cells produce viral protein and virions. Immunosuppressants given to people undergoing kidney transplants to prevent rejection inhibit T-cell proliferation and immune activation. We hypothesized that immunosuppressants could reduce both the size of the latent viral reservoir as well as markers associated with residual production of HIV. Seven participants living with HIV on suppressive ART who underwent kidney transplantation and initiated immunosuppressive therapy were enrolled. Longitudinal blood samples were collected before and after the transplant (6-7 samples/participant, over 2years).

The effects of immunosuppressants on T-cell activation as well as plasma HIV-envelope antibody responses (a surrogate of residual viral production) were assessed by flow cytometry and ELISA, respectively. Total HIV-DNA and cell-associated LTR-gag-RNA transcripts were quantified by qPCR and the frequency of p24⁺ cells by HIV-Flow in isolated CD4⁺T-cells. To confirm the results saw *in vivo*, we optimized a cell culture protocol to assess the impact of frequently given immunosuppressants (tacrolimus, MMF and dasatinib) on infected cells in a controlled environment.

Following organ transplant and initiation of immunosuppressive treatment, we observed a significant decrease in the expression levels of HLA-DR and Ki67 in CD4⁺T-cells, which was accompanied by an increase in the frequency of central memory cells and a sharp decrease in the frequency of regulatory T-cells. Antibody levels targeting HIV envelope also decreased during immunosuppressive therapy. There was a modest and transient decrease in HIV DNA and RNA levels one month following kidney transplantation. HIV-Flow results showed no significant impact of immunosuppressants on the inducible reservoir, with large variations between participants. The *in vitro* cell culture model showed that low doses of immunosuppressants generally induces a reduction in HIV markers, but higher doses lead to variations between donors. Immunosuppressive therapy decreases the proliferation and activation of CD4⁺ T-cells which is concomitant with a modest and transient decrease in HIV DNA and RNA levels.

Our results indicate that current immunosuppressive drugs are insufficient to profoundly and durably affect the HIV reservoir and suggest that the size of the reservoir is tightly regulated by homeostatic forces that are difficult to counteract.

Key words: HIV, reservoirs, persistence, proliferation, renal transplant, immunosuppressants, homeostasis

Table des matières

Résumé	3
Abstract.....	5
Liste des Figures.....	9
Liste des Tableaux.....	10
Liste des sigles et abréviations.....	11
Remerciements.....	12
1. Introduction	14
1.1. Découverte et identification du VIH	14
1.2. Infection par le VIH	16
1.3. Pathogénicité du virus	19
1.4. Le traitement antirétroviral	21
1.5. Les réservoirs du VIH.....	24
1.5.1. Les mécanismes de la persistance virale	24
1.5.2. Réservoir viral intact et défectif.....	29
1.5.3. Quantifier le réservoir viral	30
1.6. Stratégies thérapeutiques curatives.....	33
1.7. Le VIH et la transplantation	35
1.8. Les immunosuppresseurs	37
1.8.1. Les inhibiteurs de la calcineurine (cyclosporine et Tacrolimus)	38
1.8.2. Le mycophénolate mofétil	39
1.8.3. Les corticostéroïdes	40
1.8.4. Le basiliximab.....	40
1.9. Problématique et hypothèse	41
2. Matériels et méthodes.....	43
2.1. Cohorte transplantation et VIH.....	43
2.2. Données cliniques des participants	44
2.3. Isolation et conservation des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC).....	44
2.4. Décongélation des PBMC et enrichissement des cellules T CD4+	45
2.5. Quantification de l'ADN viral	45

2.6.	Quantification de l'ARN viral.....	47
2.7.	Analyses phénotypiques par cytométrie en flux	48
2.8.	ELISA.....	49
2.9.	HIV-Flow.....	50
2.10.	Test de prolifération avec agents immunosuppresseurs	51
3.	Résultats.....	52
3.1.	Impact des immunosuppresseurs sur l'activation des cellules T CD4+	52
3.2.	Impact des immunosuppresseurs sur les réservoirs du VIH.....	57
3.2.1.	Mesures de l'ADN viral.....	57
3.2.2.	Mesures de l'ARN viral.....	58
3.2.3.	Mesures du réservoir fonctionnel.....	60
3.3.	Impact des immunosuppresseurs sur les niveaux d'anticorps anti-VIH.....	63
3.4.	Impact des immunosuppresseurs sur la prolifération du réservoir du VIH in vitro	65
4.	Discussion.....	72
4.1.	L'impact mesurable des immunosuppresseurs sur les sous populations de lymphocytes T CD4+ in vivo	72
4.2.	Faible impact des immunosuppresseurs sur les marqueurs du réservoir viral in vivo.....	74
4.3.	Effet des immunosuppresseurs sur les réservoirs ex vivo	76
5.	Conclusions et perspectives.....	77
	Références bibliographiques	79
	Annexe	95

Liste des Figures

Figure 1. Répartition des sous-types VIH-1 à travers le monde (Figure provenant de Hemelaar et al., 2019)	15
Figure 2. Le cycle de réplication du VIH (Figure provenant de Engelman & Cherepanov, 2012) ¹	18
Figure 3. Cinétique des événements immunologiques et virologiques associés à l'infection par le VIH (figure adaptée de Routy et al., 2015).....	20
Figure 4. Mécanismes participant à la persistance des provirus latents (Figure provenant de Cohn et al., 2020)	28
Figure 5. Taille du réservoir en fonction de la méthodologie utilisée (Figure provenant de Deeks et al., 2016)	32
Figure 6. Cibles des immunosuppresseurs sur les lymphocytes T CD4+ (Figure adapté de Demkes et al., 2021)	38
Figure 7. Schéma de l'organisation de l'échantillonnage et des traitements des participants	43
Figure 8. Stratégie d'identification des sous-types cellulaires et phénotypage des marqueurs	52
Figure 9. Fréquences des marqueurs d'activation et de prolifération (HLA-DR/Ki67)	54
Figure 10. Fréquences des cellules CD45RA positive et négative et des sous-types cellulaires qui en découle.....	55
Figure 11. Fréquences des cellules T régulatrices et des LT CD4+ FoxP3+	57
Figure 12. Quantification de l'ADN total et intégré chez les participants	58
Figure 13. Quantification de l'ARN associé aux cellules et l'activité transcriptionnelle du virus chez les participants.....	59
Figure 14. Stratégie d'identification des cellules p24+	60
Figure 15. Quantification du réservoir fonctionnel chez les participants de la cohorte.....	61
Figure 16. Phénotype des LT CD4+ exprimant la p24 chez 3 participants	63
Figure 17. Quantification des anticorps anti-VIH et anti-coronavirus chez les différents participants	64
Figure 18. Histogramme de pourcentage de prolifération pour chaque immunosuppresseur utilisé en fonction de la dose	66
Figure 19. Quantification de l'ADN viral après 6 jours de culture avec différents immunosuppresseurs..	68
Figure 20. Évaluation de l'activité transcriptionnel viral après 6 jours de culture avec différents immunosuppresseurs.....	69
Figure 21. Quantification de cellules p24+ après 6 jours de prolifération en présence de différents immunosuppresseurs.....	70

Liste des Tableaux

Tableau 1. Données cliniques des participants de la cohorte Transplantation/VIH.....	44
Tableau 2. Protocole de préamplification pour les PCR quantitatives nichées ADN	46
Tableau 3. Protocole d'amplification pour la seconde réaction des PCR quantitatives nichées ADN	46
Tableau 4. Liste des sondes et des amorces utilisées pour les PCR quantitatives nichées ADN.....	47
Tableau 5. Protocole de préamplification pour les PCR quantitatives nichées ARN	48
Tableau 6. Protocole d'amplification pour les PCR quantitatives nichées ARN.....	48

Liste des sigles et abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARV	Antirétroviraux
AZT	Azidothymidine
BS	Sérum bovin (<i>bovine serum</i>)
CCR5	Récepteur à C-C chimiokine de type 5
CD #	Cluster de différenciation #
CDC	Centre pour le contrôle et la prévention de maladies (« <i>Center of disease control</i> »)
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CXCR4	Récepteur à C-X-C chimiokine de type 4
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Désoxyribonucléotide Triphosphate
ELISA	Technique immuno-enzymatique sur support solide (<i>enzyme-linked immunosorbant assay</i>)
FBS	Sérum bovin fœtal (<i>bovine fetal serum</i>)
IL #	Interleukine #
IPDA	Essai permettant la mesure de l'ADN intégré intact (<i>Intact proviral DNA assay</i>)
LRA	Agents d'inversion de la latence (« <i>Latency reversing agent</i> »)
LT CD4+	Lymphocyte T CD4+
MMF	Mycophenolate mofetil
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NFAT	Facteur nucléaire des lymphocytes T activés
PBMC	Cellules mononucléaires du sang (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Tampon de phosphate salin (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Amplification en chaîne par polymérase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PMA	Acétate de myristate de phorbol (<i>phorbol myristate acetate</i>)
qPCR	PCR quantitative
QVOA	Essai quantitatif de croissance virale (<i>quantitative viral outgrowth assay</i>)
R10	RPMI 10% FBS, 5% pénicilline/streptomycine
RPMI	Milieu de culture pour cellules humaines (<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>)
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
TAR	Traitement antirétroviral
Tcm	Lymphocyte T central mémoire
Tem	Lymphocyte T effecteur mémoire
TILDA	Essai de dilution limite de l'ARN tat/rev induit (<i>Tat/rev inducible limiting dilution assay</i>)
TSCM	Cellule T ayant des caractéristiques de cellules souches (« <i>T Stem Cell-like Memory</i> »)
Ttm	Lymphocyte T transitionnel mémoire
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VIS	Virus de l'Immunodéficience Simienne

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de laboratoire Nicolas Chomont. Merci de m'avoir donné cette opportunité d'apprendre et de grandir dans ton équipe. J'ai découvert le plaisir de faire partie d'une équipe passionnée menée par quelqu'un qui l'est et qui nous encourage à l'être. Je suis très reconnaissant que tu m'aies donné cette chance et je tâcherai de ne pas oublier les leçons de rigueur, éthique de travail ainsi que toutes les connaissances que tu m'as inculquées durant ces deux ans.

Je voudrais remercier tous les membres du laboratoire, courant et passé. Pierre merci de m'avoir formé et introduit à l'équipe. Tu as été un très bon mentor et j'aurais adoré que tu restes plus longtemps. Rémi merci pour ton aide tout au long de ces deux ans, de toujours te rendre disponible et de nous donner les outils pour nous débrouiller par nous-même. Un grand merci Amélie pour ta patience, ton aide et ta capacité surhumaine à gérer le laboratoire. Armando merci pour ton soutien et ta mauvaise humeur condescendante. Tu m'as tellement fait rire et nos sessions p3 vont me manquer. Et merci à tous les autres membres du laboratoire qui ont fait de ces deux années de maîtrise un moment enrichissant et formateur.

Je voudrais remercier mes parents qui m'ont soutenu et encouragé durant ces deux années. Merci Ava pour ta présence quasi quotidienne pendant mes marches jusqu'au labo, merci d'être toujours présente et disponible quand j'ai besoin.

Merci à Augustine et Gérémy, le trio des aubergines, amateurs professionnels des pauses thé. Les petites tomates et le tzatziki vont me manquer.

Merci à Camille pour ton soutien et ton support, j'ai beaucoup appris, grandi et muri grâce à toi.

Merci à Nicolas Pavé pour son aide dans mon parcours académique et sa capacité à toujours me garder concentré sur mon travail. Merci à l'équipe Koh-lanta pour leur bonne humeur et leur amour pour les doubles oréos.

Merci au Dre Danielle Rouleau, Dre Héloïse Cardinal, Dr Daniel Kaufmann, Dr Claude Fortin, Dre Valérie Martel-Laferrière, Dre Marie-Chantal Fortin, Laurie Gokool et Chantal Morrisseau pour leur aide et implication dans la cohorte que j'ai utilisée pour ce projet.

Merci au Fonds de recherche du Québec, aux instituts de recherches en santé au Canada et au Réseau Sida-Mi qui ont subventionné mon projet de recherche.

Je reconnais que ma maîtrise a été réalisée sur un territoire autochtone non cédé. La Nation Kanien'kehá:ka (Mohawk) est reconnue comme gardienne de la terre et des eaux de Tiohtiá:ke/Montréal.

1. Introduction

1.1. Découverte et identification du VIH

Les premiers cas d'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ont été initialement rapportés par le CDC (Center of Disease Control and Prevention) sous la forme d'infections opportunistes chez des hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes (HARSAH). En 1981, le CDC publie un article décrivant 5 hommes ayant développé une infection pulmonaire rare (*Pneumocystis carinii pneumonia*) ainsi que d'autres maladies opportunistes suggérant une défaillance de leur système immunitaire (MS Gottlieb, 1981). Dans les jours qui suivent la publication de cet article, de nombreux cas similaires venant de plusieurs grandes villes des États-Unis sont rapportés. Au fil du temps, de plus en plus de cas sont signalés avec les mêmes caractéristiques : le développement d'infections opportunistes causées par une déplétion des lymphocytes T CD4+ associée à une sévère immunosuppression. C'est en 1982 que le CDC nomme de façon officielle cette maladie, SIDA (Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise).

Très vite, les caractéristiques épidémiologiques de la maladie changent. Premièrement, une expansion globale a lieu : des cas apparaissent en Europe, Afrique, Amérique du Sud et en Asie, faisant de cette maladie une pandémie. De plus, la communauté d'hommes ayants des relations sexuelles avec des hommes (HARSAH) n'est plus la seule touchée par la maladie, des hétérosexuels, des usagers de drogues, des personnes ayant reçu des transfusions sanguines ainsi que des enfants de mères infectées sont devenus séropositifs eux aussi. Ces nouveaux cas permettent d'en apprendre davantage sur la maladie et notamment sur ses modes de transmission, à savoir le contact direct avec le sang, ainsi que lors de rapports sexuels non protégés ou encore par transmission verticale de la mère à l'enfant. En 1983, le lien entre l'agent infectieux et la maladie est révélé avec l'isolation du virus à partir d'une biopsie de ganglion lymphatique humain (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983). Plusieurs équipes à travers le monde ont également isolé le virus chez des personnes atteintes du SIDA, permettant de confirmer le lien entre le virus et le développement de la maladie (Gallo *et al.*, 1984, Levy *et al.*, 1984).

La première transmission a été retracée en Afrique, bien avant son apparition sur le continent américain (Korber *et al.*, 2000; Worobey *et al.*, 2008). Un virus très similaire au VIH,

le virus de l'immunodéficience simienne (VIS), aurait traversé la barrière d'espèce pour devenir un pathogène de l'homme et aurait ensuite évolué vers les multiples souches du VIH que l'on connaît aujourd'hui. Il existe deux types de VIH, mais l'infection à VIH-1 représente la vaste majorité des cas d'infection à travers le monde. Le VIH de type 1 (VIH-1) se subdivise en plusieurs lignées (M, N, O et P) qui représentent chacune un événement de transmission du singe à l'homme. Les lignées M (pour « major ») et N partagent une proximité phylogénétique et sont les descendantes directes du VIScpz qui touchent les chimpanzés (Sharp & Hahn, 2011). Malgré leur descendance commune, la lignée M est bien plus prévalente et est à l'origine de la pandémie mondiale. Elle peut être divisée en plusieurs sous-groupes (A, B, C, D, E...) selon l'évolution et les différentes recombinaisons du génome viral. Les sous-groupes A et AG sont retrouvés majoritairement en Afrique, le B est plus présent en Amérique, Europe de l'ouest, et en Océanie, tandis que le C en Afrique du Sud et en Inde, et le CRF (circulating recombinant form) -AE est prédominant en Asie du sud-est (Figure 1). La lignée P provient du VISgor, un pathogène du gorille, alors que les origines de la lignée O restent incertaines. Malgré cette diversité de lignées et groupes, tous ces virus peuvent causer le SIDA avec certaines différences se caractérisant principalement par les populations touchées, la capacité d'infection de ces différents virus et leur efficacité répliquative.

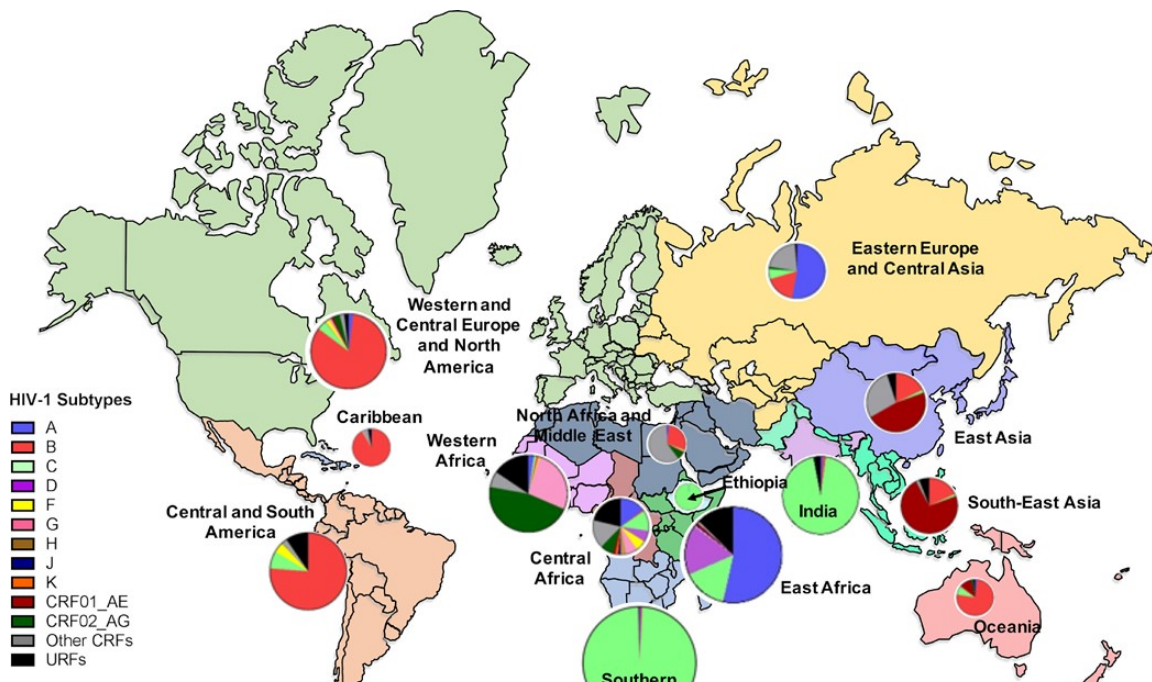


Figure 1. Répartition des sous-types VIH-1 à travers le monde (Figure provenant de Hemelaar et al., 2019)

Le VIH de type 2, ayant une proximité phylogénétique avec le VIS retrouvé chez le mangabey fuligineux (*Cercocebus atys*), est bien moins répandu que le type 1. Sa réplication lente rend sa transmission moins efficace (Hirsch, Olmsted, Murphey-Corb, Purcell, & Johnson, 1989; Popper *et al.*, 2000). Le VIH-2 se subdivise en 2 lignées, la première (A) retrouvée en Afrique de l'Ouest et la seconde (B) principalement en Côte d'Ivoire.

1.2. Infection par le VIH

Le VIH est un virus de la famille des *Retroviridae*, du genre *Lentivirus*. C'est donc un virus enveloppé à ARN simple brin se répliquant principalement dans les lymphocytes T CD4+. Bien qu'il soit possible de trouver des génomes viraux dans les macrophages, les astrocytes et possiblement d'autres types cellulaires, les lymphocytes T CD4+ sont la cible préférentielle du VIH pour sa réplication (Wong *et al.*, 2019, Massanella *et al.*, 2019). La particule virale du VIH, enveloppée et sphérique, mesure entre 100 et 145 nm de diamètre dépendamment de son état de maturation (Briggs 2003). L'enveloppe de cette particule virale se compose d'une bicouche lipidique provenant de la cellule infectée qui a produit le virus. À la surface de l'enveloppe virale, se trouve des hétérodimères de glycoprotéines gp120 (en surface) et de gp41 (transmembranaire) qui s'associent de façon non-covalente en trimères d'hétérodimères. La liaison de ce complexe de glycoprotéines au récepteur CD4 de la cellule cible initie le cycle de réplication et cause un changement conformationnel de la protéine gp120 (Kwong *et al.*, 1998). Cela permet la liaison de la gp41 au corécepteur et l'initiation de la fusion à la surface cellulaire. Les glycoprotéines d'enveloppe du virus interagissent également avec les corécepteurs CCR5 ou CXCR4 afin de permettre la fusion des membranes virales et cellulaires CD4 (Dalglish *et al.*, 1984; Dragic *et al.*, 1996; Feng, Broder, Kennedy, & Berger, 1996; Klatzmann *et al.*, 1984). La grande majorité des infections sont causées par des virus de tropisme R5, désignant un virus qui utilise le corécepteur CCR5 pour faire son entrée, ce qui explique la plus grande prévalence de ce variant chez les personnes vivant avec le VIH au début de leur infection. Au cours de la progression de l'infection, le tropisme du virus peut toutefois évoluer vers l'utilisation du corécepteur CXCR4 (Bleul, Wu, Hoxie, Springer, & Mackay, 1997) (Figure 2).

Des études récentes ont montré que la décapsidation du virus se fait dans le noyau et non pas dans le cytoplasme, comme énoncé depuis des années (Burdick RC *et al.*, 2020 ; Dharan A *et al.*, 2020). Lors de cette décapsidation, la transcription inverse est amorcée. Le génome viral, initialement sous forme de deux molécules d'ARN simple brin de polarité positive, subit une transcription inverse (ARN>ADN), un processus connu pour être peu fidèle, ce qui cause l'insertion de mutations dans le génome. Ces dernières sont souvent délétères et produisent des génomes défectifs. Ce haut taux de mutations permet également une évolution rapide du virus ce qui contribue à l'évasion aux réponses immunitaires (Borrow *et al.*, 1997; Wei *et al.*, 2003). Un complexe de pré-intégration se forme ensuite, composé de plusieurs protéines virales, comme l'intégrase et Vpr, des protéines cellulaires telles que BAF et LEDGF, et l'ADN génomique viral. Ce complexe est importé vers le noyau par transport actif afin que l'intégration dans le génome cellulaire soit effectuée. Après l'intégration du génome, les facteurs nécessaires à l'initiation de la réplication, la machinerie de transcription de la cellule ainsi que les protéines de régulatrices Tat et Rev vont contribuer à la production des ARN messagers (ARNm) viraux. La protéine Vpr facilite la migration du génome en empêchant la cellule de progresser de la phase G2 vers la phase M du cycle cellulaire. Les protéines virales accessoires sont les premières à être produites lors d'une infection productive. Parmi elles, les facteurs Nef et Vpu permettent de diminuer l'expression du CD4 et des molécules CMH de type I à la surface de la cellule infectée, ce qui la protège d'une nouvelle infection ou d'être la cible des cellules effectrices. Le facteur Vif stimule la transcription inverse et inhibe la protéine cellulaire APOBEC3G, ce qui empêche l'apparition d'hypermutations dans le génome viral lors de la transcription inverse (Malim & Bieniasz, 2012). Les virions sont assemblés au niveau de la membrane cellulaire où la protéine Gag organise les différentes étapes de l'assemblage et du bourgeonnement, comme la réorganisation de la membrane cellulaire et l'encapsidation de l'ARN génomique grâce à la séquence Ψ . Pour permettre le bourgeonnement et la sortie des virions immatures, la protéine virale Vpu contrecarre l'effet antiviral de la protéine cellulaire tétherine (BST2), qui a pour rôle de retenir les nouvelles particules virales entraînant leur endocytose leur dégradation. Enfin, la protéine Gag est clivée par une protéase virale ce qui permet la maturation des particules virales afin qu'elles infectent de nouvelles cellules (Sundquist & Krausslich, 2012).

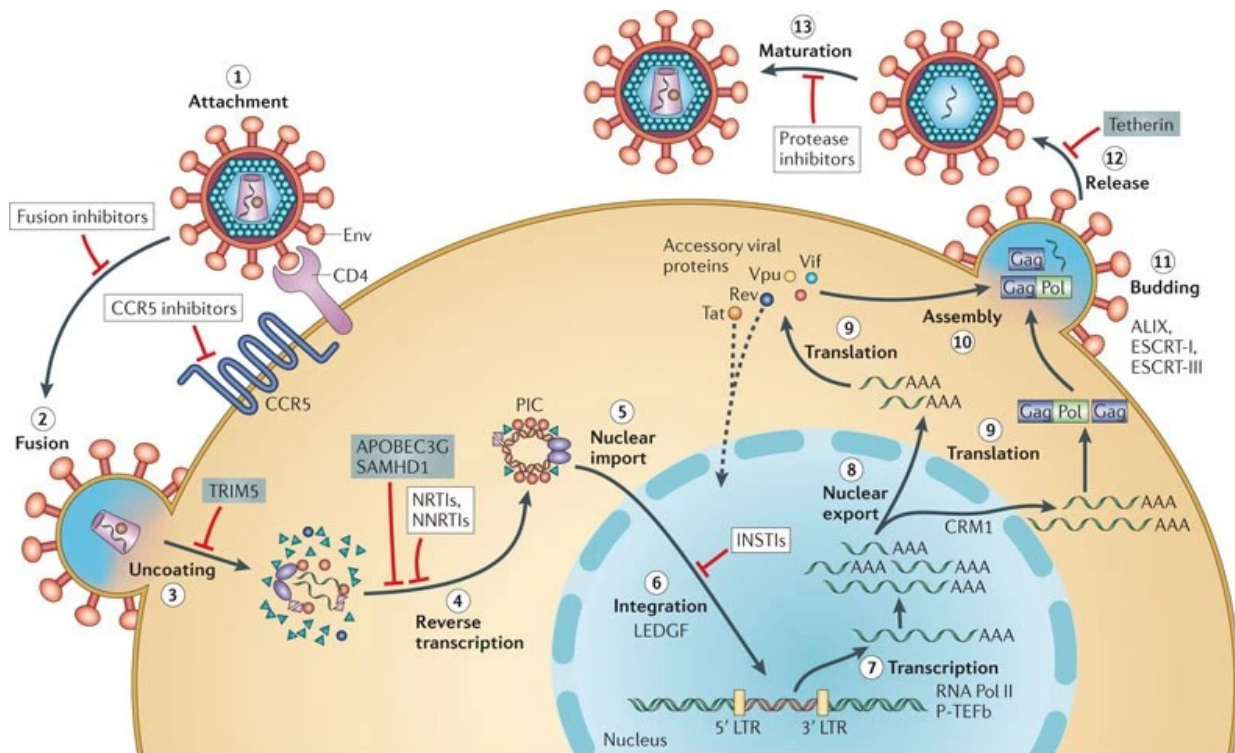


Figure 2. Le cycle de réplication du VIH (Figure provenant de Engelman & Cherepanov, 2012)¹

L'intégration du génome viral au génome cellulaire ne conduit pas systématiquement à une infection productive. En effet, le provirus intégré peut parfois demeurer dans un état latent au sein de la cellule infectée. La transcription et l'initiation de la réplication virale sont étroitement liées au statut d'activation de la cellule car ils dépendent de la présence de facteurs de transcription, tels que NF- κ B et AP-1 (Duverger *et al.*, 2013; Shan *et al.*, 2017; Hiscott, Kwon, & Genin, 2001).

¹Utilisé avec la permission de Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer Nature, Nat Rev Microbiol, The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. Engelman, A., Cherepanov, P., Copyright © 2012

Il existe d'autres facteurs qui influencent le choix entre production active et latence, comme l'environnement épigénétique, plusieurs facteurs intrinsèques au VIH ainsi que certains facteurs cellulaires qui seront présentés plus tard. C'est cette capacité à pouvoir entrer dans un état de latence couplée aux tropismes multiples du VIH ainsi que sa capacité à échapper à la réponse immunitaire qui rendent ce virus si complexe à éliminer.

1.3.Pathogénicité du virus

Les infections par le VIH se font principalement par les muqueuses (lors de relations sexuelles non-protégées), par inoculation directe lors de contaminations sanguines (transfusions sanguines ou utilisation de seringues souillées) ou par transmission verticale de la mère à l'enfant (lors de la grossesse, de l'accouchement ou de l'allaitement). L'infection par le VIH se caractérise par plusieurs phases qui mènent au décès de la personne infectée si aucune thérapie n'est entreprise (Figure 3).

Lors de la première phase de l'infection, aussi appelée phase aiguë, le virus se propage rapidement dans le corps, d'abord en infectant localement les CD4 tissulaires, puis en liant des récepteurs exprimés par les cellules présentatrices d'antigènes. Ces dernières séquestrent le virus et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires. Cela permet au virus d'infecter sa cible préférentielle, les lymphocytes T CD4⁺ des tissus lymphoïdes, menant à une augmentation graduelle de la virémie (M. S. Cohen *et al.*, 2011). Le virus se dissémine ensuite à travers la circulation sanguine périphérique et infecte de multiples sites anatomiques. La cinétique de développement de la réponse immunitaire, relativement similaire d'une personne à une autre, est utilisée pour diviser cette phase en différents stades nommés Fiebig (Fiebig *et al.*, 2003). Lors de la phase aiguë, certains symptômes similaires à ceux de la grippe ou encore des lésions cutanées peuvent apparaître, même si cette phase est souvent asymptomatique. Le VIH est capable de se disséminer rapidement car la réponse immunitaire adaptative n'est pas encore développée à ce stade. Ainsi le VIH se réplique activement dans le compartiment gastro-intestinal qui contient une grande population lymphocytaire (Mehandru *et al.*, 2004). Cette réplification rapide va causer la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ se trouvant dans la muqueuse intestinale ce qui entraîne la dégradation des tissus lymphoïdes liés à l'intestin (Brenchley *et al.*, 2004). Il existe d'autres mécanismes indirectement responsables de la baisse des lymphocytes T CD4⁺ qui demeurent

mal caractérisés (apoptose de cellules non infectées par exemple), bien qu'il soit clair que le virus lui-même joue un rôle important dans ce processus (Mattapallil *et al.*, 2005; Z. Zhang *et al.*, 1999). Malgré la perte accrue de CD4+, la réponse immunitaire se développe suffisamment pour entraîner une diminution de la charge virale plasmatique et une hausse progressive du compte lymphocytaire en périphérie (stade fiebig IV). Ce seuil d'équilibre (appelé « set point ») entre la réplication virale et la pression immunitaire est possible grâce à l'apparition de la réponse T cytotoxique et la production d'anticorps dirigés contre le virus. Toutefois, le niveau de lymphocytes T CD4+ au niveau des muqueuses demeure bas. Durant le dernier stade Fiebig, la phase de latence clinique de l'infection survient : le virus continue de se répliquer de façon constante grâce à sa capacité mutagène qui lui permet d'échapper à la réponse immunitaire de façon successive en concomitance avec une hyperactivation du système immunitaire (Pantaleo *et al.*, 1993). L'équilibre entre la réponse immunitaire et la réplication virale peut varier dans la durée dépendamment de la personne (3 à 10 ans) et se caractérise par une virémie stable et mène ensuite au début de la phase chronique lorsque l'équilibre est perdu.

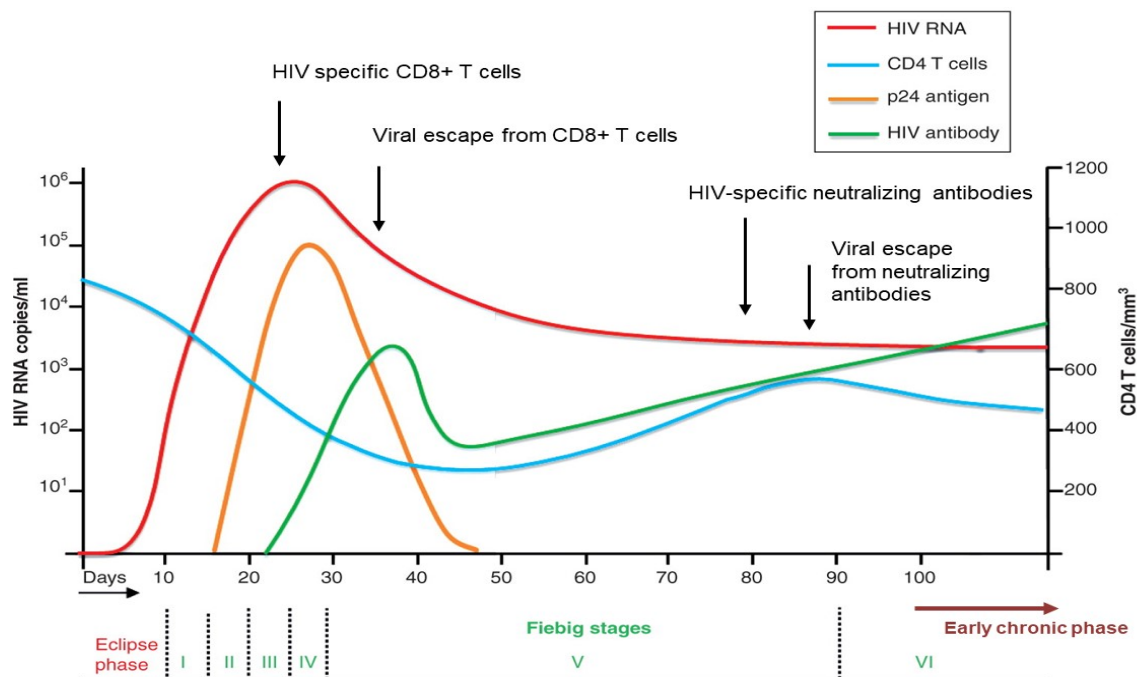


Figure 3. Cinétique des événements immunologiques et virologiques associés à l'infection par le VIH (figure adaptée de Routy *et al.*, 2015)

La phase chronique se caractérise par une déplétion graduelle des lymphocytes T CD4+ causée par une inflammation systémique. Cette phase d'une durée variable pouvant aller jusqu'à

plusieurs années chez certains individus est associée à un cercle vicieux. En effet, l'activation constante du système immunitaire contribue à une réplication accrue du virus entraînant la translocation microbienne au niveau des muqueuses intestinales, qui en retour alimente l'inflammation chronique (Brenchley *et al.*, 2006; Mehraj *et al.*, 2020). Comme énoncé précédemment, la forte réplication virale dans le compartiment intestinal cause une dégradation de l'immunité des muqueuses qui n'est pas restaurée et qui mène à une perte de l'intégrité de la barrière intestinale, permettant alors l'entrée de produits bactériens dans le système sanguin. Cette fuite bactérienne crée une sur-stimulation des cellules immunitaires (innées et adaptatives) ce qui cause un épuisement immunitaire et l'expression de marqueurs de contrôle immunitaire comme PD-1. Cet épuisement affaiblit la qualité de la réponse immunitaire contre les cellules infectées par le VIH ainsi que d'autres pathogènes, ce qui contribue à la progression clinique de la maladie et mène au développement du SIDA (Betts *et al.*, 2006; Rosenberg *et al.*, 1997; Trautmann *et al.*, 2006).

La progression vers le stade SIDA est liée à la diminution du nombre de lymphocytes T CD4⁺ en-dessous de 200 cellules/ μ l de sang. Avec une population lymphocytaire aussi basse, on observe une augmentation de la charge virale plasmatique ainsi que l'apparition de maladies opportunistes comme la candidose, certaines pneumonies, le sarcome de Kaposi ainsi que certains cancers comme le lymphome non hodgkinien. En absence de traitement, la majorité des personnes vivant avec le VIH progressent vers un SIDA où les infections opportunistes conduisent au décès.

1.4. Le traitement antirétroviral

Les premiers traitements administrés aux personnes vivant avec le VIH avaient pour but d'atténuer les symptômes et de lutter contre les maladies opportunistes. Les premières molécules développées qui ciblaient directement la réplication du virus ont été les inhibiteurs nucléosidiques de la transcription inverse (INTIs). Les INTIs ont une extrémité 3' modifiée (absence d'un groupement hydroxyle) et entrent en compétition avec les nucléosides de la cellule. Leur incorporation termine l'élongation de la chaîne et empêchent l'élongation par la transcriptase inverse (Arts et Wainberg 1996). Ces médicaments, comme l'AZT, étaient donnés sous forme de comprimés quotidiens et permettaient de limiter l'infection de nouvelles cellules et ainsi de réduire la charge virale plasmatique. Ces premiers traitements permettaient aussi de

réduire l'inflammation générale et d'augmenter le compte de cellules T CD4+ (Fischl *et al.*, 1987). Malgré ces résultats encourageants, ces traitements ne font pas l'unanimité : Beaucoup de personnes refusent de les prendre en raison des multiples effets secondaires qu'ils causent (principalement douleurs diverses, insomnie et perte d'appétit) ou du scepticisme de la communauté lié à ces nouveaux composés. Aussi, l'accessibilité à ces molécules demeure limitée. D'autres problèmes émergent et affaiblissent l'efficacité des traitements, notamment l'apparition de mutations de résistance causées par la transcriptase inverse virale (Larder, Darby, et Richman 1989; Menéndez-Arias 2002; Rhee *et al.*, 2016; Cuevas *et al.*, 2015). Ces résistances se traduisent par un risque élevé d'échec thérapeutique qui mène au retour de la réplication virale jusqu'au décès en l'absence de traitements alternatifs (Hogg *et al.*, 2006). Avec l'apparition de nouvelles classes d'agents disponibles, comme les inhibiteurs de protéase ou les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse, et pour pallier le risque de résistance thérapeutique, la première trithérapies antirétrovirale (TAR) est proposée en 1996. Ceci est une étape importante dans la lutte contre le VIH, permettant un meilleur contrôle de la charge virale et un rétablissement du système immunitaire (Autran *et al.*, 1997; Alan S. Perelson *et al.*, 1997).

La TAR est une combinaison de molécules antirétrovirales de différentes classes, qui agissent sur différentes cibles enzymatiques virales simultanément et permettent une action plus globale. Les inhibiteurs de protéase bloquent l'activité protéolytique nécessaire à la maturation des virions. Ces molécules n'empêchent pas l'entrée du virus mais inhibent la maturation de la capsid, rendant les particules virales non-infectieuses et limitant donc la dissémination du virus. Les nouveaux traitements antirétroviraux (ARV) sont moins toxiques, causent moins d'effets secondaires et sont moins prônes aux risques de résistance et donc plus efficaces. Avec les progrès pharmaco-thérapeutiques, de nouvelles classes d'agents apparaissent. Notamment les inhibiteurs de l'intégrase, qui bloquent le transfert du brin d'ADN médié par l'enzyme virale et préviennent l'intégration du génome viral dans celui de la cellule cible, ce qui diminue fortement la quantité d'ADN viral intégré (Arts et Hazuda 2012). Cette nouvelle classe d'agents est très efficace, autant chez les personnes qui initient un traitement que chez celles ayant développé des résistances à leur traitement précédent. Des nouveaux agents comme les inhibiteurs de la capsid peuvent cibler la transcription inverse, l'entrée du noyau ou encore perturber l'assemblage de la capsid pour produire des virions non-infectieux. Des résultats très prometteurs ont récemment

été rapporté avec le lenacapavir, un inhibiteur de la capsidie qui semble efficace chez les personnes ayant plusieurs résistances aux ARV (Segal-Maurer S *et al.* 2022).

Étant donné que l'infection est contrôlée de façon efficace avec les stratégies thérapeutiques modernes, un des objectifs actuels est d'améliorer ces traitements pour les personnes vivant avec le VIH en allégeant la thérapie, en passant soit à une bithérapie soit à une prise de médicaments plus espacée dans le temps. Le traitement a permis de transformer l'infection par le VIH en une maladie chronique, sans développement de stade SIDA et avec moins d'effets secondaires, ce qui augmente considérablement l'espérance de vie des personnes infectées. De plus, la TAR rend le virus indétectable dans le corps (sang et la plupart des tissus), réduisant considérablement la transmission du virus et les nouvelles infections, ce qui permet de redonner une qualité de vie aux personnes vivant avec le VIH (Eisinger, Dieffenbach, & Fauci, 2019).

Le contrôle de l'infection reste un succès considérable dans la lutte contre l'épidémie mais l'objectif reste la guérison complète. En effet, avec les traitements actuels, l'arrêt des thérapies antirétrovirales s'accompagne le plus souvent d'un rebond de la charge virale en quelques semaines. La TAR doit donc être prise pour la durée de la vie de la personne vivant avec le VIH. A ce jour, seulement cinq personnes sont aujourd'hui considérées comme guéries par intervention thérapeutique de l'infection : Timothy Ray Brown (le patient de Berlin), Adam Castillejo (le patient de Londres), la patiente de New York, le patient de Düsseldorf et potentiellement le patient de City of Hope qui a été annoncé cet été à la conférence AIDS 2022 à Montréal. Tous ont reçu une transplantation allogénique de cellules hématopoïétiques, d'un donneur porteur de la délétion CCR5 Δ 32, pour traiter une leucémie ou un lymphome (Hütter *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2019; Björn-Erik O. Jensen *et al.*, 2019). Cette délétion confère une résistance à l'infection par les souches R5 du VIH-1. Avant la greffe, la plupart des cellules immunitaires (dont celles qui sont infectées par le VIH) sont éliminées, puis une greffe de cellules de moelle osseuse de donneur CCR5 Δ 32 permet le remplacement par des cellules résistantes à l'infection. Si la greffe fonctionne, un arrêt de la trithérapie est considéré pour observer l'activité virale. Timothy Ray Brown n'a subi aucun rebond viral en 13 ans d'interruption de TAR. En ce qui concerne Adam Castillejo, depuis son interruption thérapeutique en septembre 2017, aucun rebond viral n'a été observé ce qui suggère une

potentielle rémission prolongée. La patiente de New York, le patient de Düsseldorf et le patient de City of Hope n'ont subi aucun rebond viral après une interruption de traitement en 2021, 2018 et 2022 respectivement. Malgré le succès prometteur de cette intervention, on ne peut considérer cette approche comme une intervention thérapeutique potentielle à cause du fort risque de mortalité lié à la transplantation allogénique de cellules hématopoïétiques qui est d'environ 30%.

1.5. Les réservoirs du VIH

Les réservoirs du VIH sont des cellules qui permettent la persistance de virus compétents pour la réplication sur une longue échelle de temps chez les personnes sous TAR (Eisele & Siliciano, 2012). Ces réservoirs sont composés de différents types cellulaires qui persistent dans de nombreux sites anatomiques malgré la prise d'antirétroviraux. Ce sont les lymphocytes T CD4+ infectés de façon latente, donc contenant un virus intégré sans activité transcriptionnelle, qui constituent le compartiment cellulaire le plus important dans la persistance virale et la cause probable du rebond viral lors de l'arrêt de la TAR (Chun *et al.*, 1997; Finzi *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 1997). Le réservoir s'établit dans les premiers jours suivant l'infection et tout au long de la phase non traitée de l'infection (Abrahams *et al.*, 2019; Brodin *et al.*, 2016). Une initiation précoce de la TAR résulte en une infection limitée des tissus, ce qui réduit la taille du réservoir et la déplétion lymphocytaire (Garcia-Broncano *et al.*, 2019; Hocqueloux *et al.*, 2013; Leyre *et al.*, 2020). L'initiation rapide de la TAR permet aussi de diminuer rapidement le nombre de cellules portant de l'ADN viral car les cellules productivement infectées ayant de courtes demi-vies, comme les cellules effectrices ou les macrophages sont éliminés rapidement (Honeycutt *et al.*, 2017). Malgré cette forte diminution du nombre de cellules infectées, l'hétérogénéité du réservoir fait que la majorité des cellules restantes ont la caractéristique d'avoir une longue demi-vie (43 mois) ce qui rend leur élimination sans intervention ciblée très lente (plus de 70 ans) et montre que le réservoir du VIH ne peut être éliminé uniquement par la thérapie antirétrovirale (Crooks *et al.*, 2015; Finzi *et al.*, 1999; Siliciano *et al.*, 2003).

1.5.1. Les mécanismes de la persistance virale

La persistance virale repose en partie sur la survie prolongée de cellules infectées de façon latente (Figure 4). Il existe plusieurs sous-types de cellules avec de longues demi-vies, notamment les cellules T mémoires ayant des caractéristiques de cellules souches (Tscm ou

« stem cell memory »). Elles correspondent au stade de différenciation le plus précoce des cellules mémoires. Avec leur demi-vie d'environ 10 ans, leur capacité d'auto-renouvellement et de prolifération homéostatique ou en réponse à un antigène, ces cellules contribuent fortement à la persistance du réservoir viral (Lugli *et al.*, 2013; Costa Del Amo *et al.*, 2018). Au cours de la TAR, cette contribution augmente avec les années (Buzon *et al.*, 2014; Jaafoura *et al.*, 2014). Les Tscm expriment moins fortement le corécepteur CCR5 comparativement aux cellules mémoires plus différenciées. Elles restent susceptibles à l'infection du VIH dont la réplication est facilitée avec l'expression restreinte et/ou modulée des facteurs de restriction du VIH comme TRIM5 α (Tripartite motif-containing protein 5), APOBEC3G (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G) et SAMHD1 (SAM domain and HD domain-containing protein 1) (Flynn *et al.*, 2014; Buzon *et al.*, 2014; Tabler *et al.*, 2014). Les lymphocytes T CD4⁺ dits mémoire central (Tcm) ont aussi été identifiés comme des réservoirs majeurs du VIH à durée de vie longue (Chomont *et al.*, 2009, Soriano-Sarabia *et al.*, 2014). Les Tcm, essentiellement localisées dans les tissus lymphoïdes secondaires, constituent le réservoir principal du VIH et sont caractérisées par un programme pro-survie et une longue demi-vie (Bacchus-Souffran *et al.*, 2021; Riou *et al.*, 2007).

La survie prolongée de certaines cellules infectées de manière latente n'est pas le seul mécanisme de persistance du VIH. La prolifération des LT CD4⁺ est un autre mécanisme cellulaire important permettant au réservoir du VIH de se maintenir au cours des TAR (Figure 4). La clonalité d'une grande proportion du réservoir viral, définie par des cellules partageant un provirus identique intégré au même site dans le génome de la cellule hôte, reflète l'importance de ce mécanisme pour la persistance du VIH (Bui *et al.*, 2017; Cohn *et al.*, 2015; Gantner *et al.*, 2020; Hosmane *et al.*, 2017; Simonetti *et al.*, 2016; von Stockenström *et al.*, 2015). Plusieurs types de prolifération contribuent à la persistance du réservoir latent. La prolifération homéostatique médiée par l'IL-7 permet la persistance du VIH grâce au maintien de la niche lymphocytaire en induisant la prolifération des LT CD4⁺ mémoires et naïfs (Chomont *et al.*, 2009, Seddon, Tomlinson, & Zamoyska, 2003). Une déplétion des LT CD4⁺ induite par l'infection du VIH s'accompagne d'une augmentation des niveaux plasmatiques d'IL-7 ce qui contribue à la prolifération accrue de ces cellules (Napolitano *et al.*, 2001). Lors d'études cliniques, l'administration d'IL-7 à des PVVIH sous TAR a entraîné une augmentation marquée du nombre absolu de cellules portant un provirus intégré suggérant que les cellules réservoirs

peuvent proliférer en réponse à l'IL-7 (Vandergeeten *et al.*, 2013; Logerot *et al.*, 2018; Katlama *et al.*, 2016). Des expériences *in vitro* ont aussi démontré que les cellules infectées prolifèrent en présence d'IL-7, sans que cette prolifération n'induit de réactivation du provirus ou de différenciation cellulaire (Bosque *et al.*, 2011). C'est le cas des Tcm : Leur capacité à proliférer de façon homéostatique en réponse à l'IL-7 sans réactiver le provirus de sa latence ainsi que leur longue demi-vie en font des cellules privilégiées de la persistance du VIH. Cela permet au Tcm infectés de contribuer au maintien du réservoir en l'absence de nouvelles infections. Cela fait de ces cellules un réservoir important par sa taille mais aussi grâce à leur capacité à persister à long terme sans être affectée par certains stimuli immunologiques (Vandergeeten *et al.*, 2013). Il est clair que l'IL-7, en tant que moteur de la prolifération homéostatique, contribue à la persistance et à l'expansion des réservoirs du VIH. Des études récentes ont montré que les cellules infectées participant au réservoir viral sont davantage clonales que la population globale de LT CD4+, et qu'on retrouve au sein de ce pool de cellules infectées un renouvellement fréquent des clones principaux. Ces observations ne peuvent pas être attribuées uniquement au processus prolifératif continu lié au maintien homéostatique induit par l'IL-7, indiquant que certains clones prolifèrent davantage que d'autres et que d'autres types de prolifération jouent un rôle dans la persistance des réservoirs du VIH.

Lors de la reconnaissance d'un antigène présenté par une molécule du CMH II par le TCR exprimée par les cellules T CD4+, ces dernières subissent une prolifération « induite par l'antigène ». Contrairement à la prolifération homéostatique, la prolifération antigénique induit une expansion massive du clone activé afin de générer un pool de cellules effectrices permettant l'élimination de l'antigène présenté. Le rôle important de la prolifération induite par les antigènes dans la persistance virale a été récemment démontré dans plusieurs études (Gantner *et al.*, 2020; Mendoza *et al.*, 2020; Simonetti *et al.*, 2021 ; Wang *et al.*, 2018). La nature des antigènes reconnus par les LT CD4+ infectés par le VIH qui permettent le maintien des réservoirs du VIH pendant les TAR n'a pas encore été complètement caractérisée. Les premières recherches ont montré que les cellules mémoires infectées sont spécifiques pour le VIH (Demoustier *et al.*, 2002; Douek *et al.*, 2002). Le maintien sélectif de ces cellules pourrait s'expliquer par la présence de l'antigène dans les protéines virales produites à bas bruit même sous TAR efficace (Wu *et al.*, 2021). D'autres études plus récentes ont montré que le VIH persiste préférentiellement dans des cellules spécifiques pour des antigènes dits 'communs', donc

à la fois répandus dans la population car souvent rencontrés mais aussi persistant dans le corps. Plusieurs études ont montré une contribution importante des LT CD4+ spécifique au cytomégalovirus (CMV) et le rôle potentiel de la vaccination contre la grippe dans l'augmentation de la taille du réservoir, même si ce dernier reste controversé (Christensen-Quick *et al.*, 2018; Gunthard *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2012; Yek *et al.*, 2016; Wagner *et al.*, 2017; Wagner *et al.*, 2014; Reeves *et al.*, 2018; Henrich *et al.*, 2017; Hey-Nguyen *et al.*, 2019)c

Le rôle de la prolifération cellulaire dans le maintien des réservoirs du VIH est évident mais la façon dont les provirus présents dans ces cellules activées échappent à la reconnaissance du système immunitaire lors de la division de celles-ci reste encore flou. La stimulation TCR, étant connue pour réactiver efficacement les provirus de leur latence, ces derniers ou une partie devraient commencer à produire des protéines virales lors de l'activation des cellules mémoires qui les abritent, faisant de ces cellules des cibles pour les réponses adaptatives. Cependant cette sélection négative de cellules pouvant produire des virus compétents pour la réplication n'est pas observée et des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer les facteurs viraux et cellulaires qui peuvent permettre au VIH de résister à ces pressions immunitaires.

Enfin, la clonalité accrue des cellules infectées pourrait être liée à une intégration préférentielle des provirus dans certains gènes impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire tels que BACH2 (broad complex-tramtrack-bric a brac and Cap'n'collar homology 2), STAT5 (Signal transducer and activator of transcription 5) ou MKL2 (MKL/myocardin-like protein 2) (Maldarelli *et al.*, 2014; Cesana *et al.*, 2017) (Figure 4). La présence de provirus intégré dans ces gènes peut inactiver leur transcription ou induire la production de protéines chimères dont la fonction serait altérée (Liu *et al.*, 2020). L'intégration de provirus peut avoir lieu dans des gènes impliqués dans les cancers, suggérant que l'intégration de provirus dans des oncogènes pourrait induire la prolifération non contrôlée de certains clones infectés. La contribution de ce mécanisme à la persistance du VIH reste controversée (Wagner *et al.*, 2012; Coffin *et al.*, 2021). En effet, contrairement aux virus oncogènes, le VIH n'est pas connu pour induire des cancers. De ce fait, l'intégration de provirus dans certaines régions spécifiques pourrait faciliter la prolifération mais ne devrait pas causer une expansion incontrôlée d'un clone infecté.

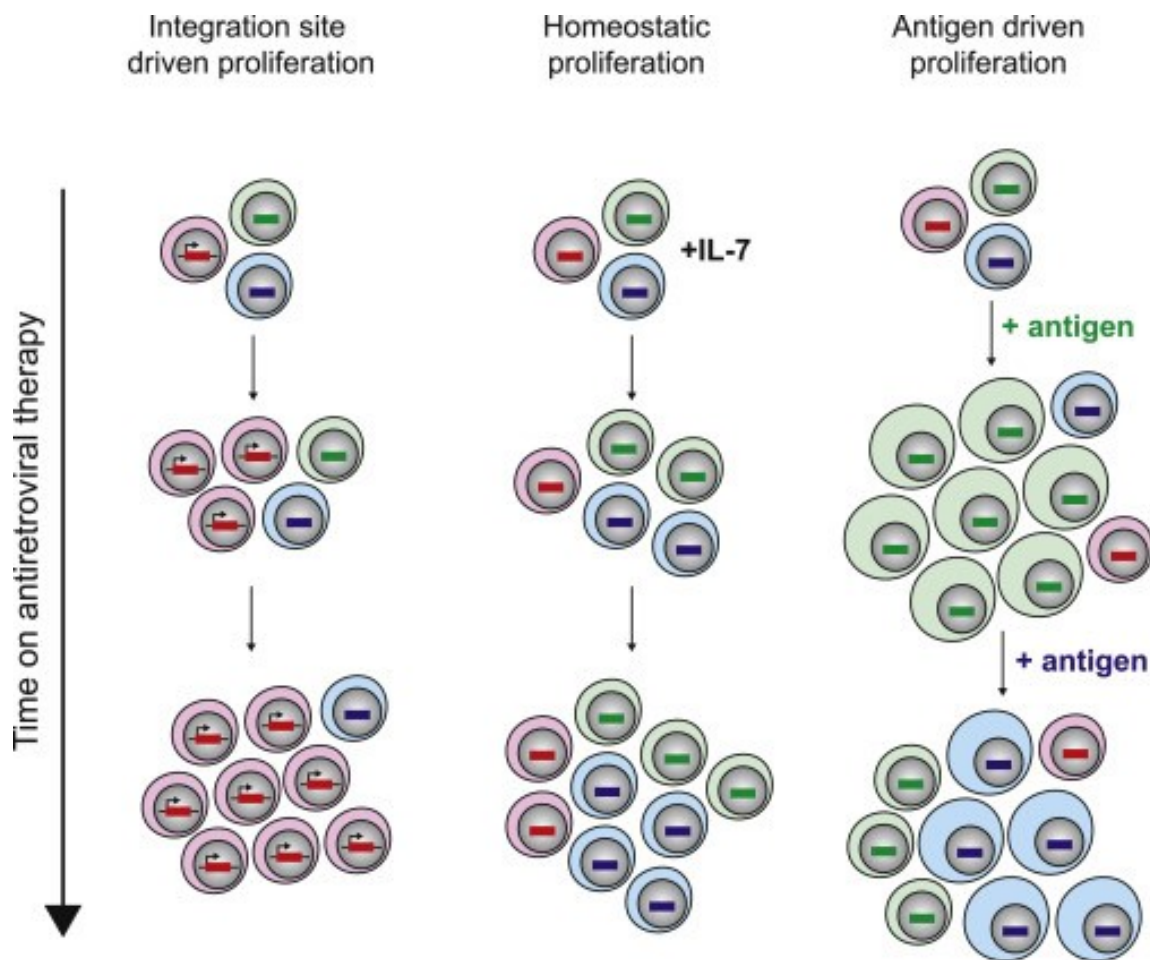


Figure 4. Mécanismes participant à la persistance des provirus latents (Figure provenant de Cohn et al., 2020)

Ainsi, ces trois mécanismes de prolifération (homéostatique, antigénique et liée aux sites d'intégration) contribuent à la persistance du VIH dans les LT CD4+ infectés de façon latente (Figure 4).

Les phénomènes contribuant au maintien du réservoir ont principalement été étudié dans le compartiment sanguin pour des raisons évidentes d'accessibilité et d'acceptabilité éthique. Il a toutefois été montré que le VIH persiste non seulement dans le sang mais aussi dans de nombreux tissus au cours des TAR. Les tissus lymphoïdes associés à l'intestin et le tractus génital constituent des sites de répllication importants durant l'infection aiguë, mais participent aussi au réservoir viral à long terme sous TAR (Cantero-Perez *et al.*, 2019; Chun *et al.*, 2008 ; Leyre STM 2020). Dans une étude post-mortem, de l'ADN viral a été retrouvé dans plus de 28 tissus du corps, montrant la dissémination importante du virus (Chaillon *et al.*, 2020). La

persistance du VIH dans ces réservoirs anatomiques pourrait être en partie assurée par un autre mécanisme non cité précédemment. En effet, une faible réplication résiduelle pourrait persister dans certains compartiments tissulaires ce qui pourrait contribuer au maintien du réservoir au cours des TAR (Joose *et al.*, 2008 ; Josefsson *et al.*, 2013 ; Lorenzo Redondo *et al.*, 2016). Cette réplication potentielle serait notamment possible en raison d'une mauvaise pénétration des agents antirétroviraux dans ces compartiments bien que ce modèle reste controversé (Estes *et al.*, 2017; Fletcher *et al.*, 2014; Lorenzo-Redondo *et al.*, 2016). D'autre part, certains réservoirs anatomiques comme les organes lymphoïdes secondaires et les organes immunoprivilégiés, sont caractérisés par une absence de cellules effectrices cytotoxiques ce qui empêche l'élimination des cellules infectées et contribue au renouvellement continu du réservoir (Connick *et al.*, 2007; Fukazawa *et al.*, 2015). Ces cellules nouvellement infectées pourraient d'ailleurs jouer un rôle majeur dans le rebond viral observé lors de l'arrêt de la thérapie antirétrovirale (Boritz *et al.*, 2016). Il est probable que ces cellules contiennent un virus compétent pour la réplication, les distinguant de la majorité du réservoir viral qui est constitué de provirus contenant des défauts qui entravent le cycle répliatif et ne leur permettent pas de produire des particules virales infectieuses.

1.5.2. Réservoir viral intact et défectif

Lors de l'arrêt de la TAR, toutes les cellules infectées avec de l'ADN viral ne participent pas de la même façon au rebond viral. Lors de l'infection par le VIH non inhibée par les TAR, le génome viral évolue rapidement. Cette évolution est causée par l'accumulation de mutations, qui contribuent à l'évasion à la réponse immunitaire, mais peut aussi rendre le virus incompetent à la réplication. Cet effet secondaire n'est pas un événement rare dans le réservoir VIH : La plupart des cellules infectées chez les personnes sous TAR contiennent des provirus qui n'ont pas la capacité de produire des virions infectieux à cause de mutations délétères, et elles ne contribuent donc pas au rebond viral lors de l'arrêt de la TAR. Les cellules qui contiennent des génomes viraux intacts, c'est-à-dire prédits pour être capable de se répliquer, sont soumises à de fortes pressions immunitaires faisant diminuer leur fréquence au fil de l'infection (Bruner *et al.*, 2016; Peluso *et al.*, 2020). Certains génomes défectueux sont malgré tout capable de produire des produits viraux comme de l'ARN ou des protéines virales, même s'ils ne génèrent pas de particules virales infectieuses (Imamichi *et al.*, 2016). Ceci expliquerait pourquoi l'évaluation de

la taille globale des réservoirs du VIH, mesuré par la fréquence de cellules portant de l'ADN viral (indépendamment du fait qu'il soit intact ou non), corrèle positivement avec la fréquence des cellules exprimant des marqueurs d'activation comme CD38 ou HLA-DR (Cockerham *et al.*, 2014; Hatano *et al.*, 2013; Khoury *et al.*, 2017). La contribution des différentes formes de réservoirs à la pathologie du VIH reste encore incertaine, mais le rôle du réservoir intact dans l'inflammation chronique et le rebond viral à la suite d'une interruption de traitement est clair. Il est donc primordial de pouvoir spécifiquement mesurer la taille réelle du réservoir (Liu *et al.*, 2020).

1.5.3. Quantifier le réservoir viral

Il existe plusieurs méthodes pour mesurer le réservoir viral qui varient en fonction de la cible virale détectée, mais aussi en fonction de leur spécificité et de leur sensibilité, offrant une multitude de possibilités pour caractériser les réservoirs du VIH (Eriksson *et al.*, 2013). Sachant que le génome du VIH peut persister sous différentes formes (provirus intégré et formes épisomales non intégrées) ayant des contributions différentes aux réservoirs viraux, il est utile de pouvoir les comparer (Figure 5). On peut déterminer la fréquence de cellules contenant un génome viral intégré par amplification quantitative à l'aide de réactions en chaîne à la polymérase (qPCR). Des amorces spécifiques pour le génome viral ainsi que des amorces spécifiques des séquences Alu retrouvées fréquemment dans le génome humain sont utilisées (Mexas *et al.*, 2012; Vandergeeten *et al.*, 2014). Cette approche très sensible, requiert un faible nombre de cellules et s'effectue rapidement. Malgré ses qualités, cette qPCR surestime le réservoir car elle prend en compte tous les génomes intégrés retrouvés dans les cellules infectées, et la majorité d'entre eux sont défectueux. Même si la quantité d'ADN viral intégré va corrélérer avec le nombre de génomes viraux participant au rebond viral, la majorité des génomes intégrés dans les cellules infectées ne peuvent pas produire de particules virales infectieuses (Bruner *et al.*, 2016; Chun *et al.*, 1997; Kiselina *et al.*, 2016).

L'essai de dilution limite de l'ARN *tat/rev* induit (ou TILDA) est une méthode pour quantifier la fréquence de cellules portant des génomes viraux compétent pour la transcription (Procopio *et al.*, 2015). Cette méthode de quantification du réservoir permet de mesurer les ARNm des gènes *tat* et *rev* après la stimulation de LT CD4+. En réalisant des dilutions limites,

la fréquence des génomes pouvant produire des ARN multi-épissés peut être calculée. Cette méthode est une technique rapide, sensible et reproductible. On peut effectuer un TILDA sur un grand nombre de cellules, permettant une quantification plus précise en raison de la rareté des événements recherchés.

Il existe des techniques avec une forte sensibilité comme le RNA Flow-FISH ou le HIV-Flow, qui sont des techniques utilisant la cytométrie en flux. Ces méthodes permettent d'évaluer à la fois la taille du réservoir compétent pour la traduction (détection de protéines virales), mais aussi de caractériser le phénotype des cellules infectées capables de produire des protéines virales, qu'on désigne comme le réservoir fonctionnel (Baxter *et al.*, 2017; Pardons, Baxter, *et al.*, 2019). Concrètement, la combinaison de deux marqueurs viraux (ARN et p24 ou 2 anticorps anti-p24 pour le RNA-Flow FISH et le HIV-Flow, respectivement) permet l'identification de manière spécifique les cellules infectées par le VIH. Ces techniques nécessitent un nombre important de cellules pour pouvoir mesurer des événements qui sont très rares et donc difficile à détecter.

La méthode qui permet d'obtenir la mesure la plus précise et réaliste du réservoir compétent est l'essai quantitatif de la croissance viral (QVOA), qui permet de mesurer la fréquence des cellules portant des provirus compétents pour la réplication (Wong *et al.*, 1997 ; Chun *et al.*, 1997; Finzi *et al.*, 1997; Richman *et al.*, 2019). Des lymphocytes T CD4⁺ sont mis en culture en dilution limite puis activés *in vitro*, permettant la réplication et donc la propagation des virus compétents vers les cellules environnantes (des cellules dites « feeders » qui peuvent être des lignées sensibles à l'infection par le VIH ou des LT CD4⁺ provenant de personne VIH-). À la suite d'une culture prolongée de 14 à 21 jours, les puits contenant initialement des cellules infectées par des virus compétents pour la réplication sont identifiés par leur niveau production virale dans le surnageant de culture mesuré à l'aide d'un ELISA (essai immuno-enzymatique sur support solide) pour la protéine p24. Le nombre d'unités virales infectieuses par million de cellules est calculée à partir du nombre de puits positifs en utilisant la loi de Poisson. Cette technique est très laborieuse, coûteuse et requiert un nombre considérable de cellules ce qui limite son utilisation à large échelle. Une faiblesse associée à cette quantification est la possibilité que certains provirus compétents pour la réplication ne soient pas réactivés par les agents stimulants, ce qui va sous-estimer la taille réelle du réservoir (Ho *et al.*, 2013).

En obtenant la séquence nucléique complète des génomes viraux, il est possible de prédire leur capacité à produire des produits viraux. Les techniques basées sur le séquençage complet des provirus, comme le FLIPS qui reposent sur un séquençage des génomes à partir de dilutions limites d'ADN (Hiener *et al.*, 2017), permettent une analyse détaillée du génome à la fois sur le plan de son intégrité mais aussi de sa phylogénie. Dans le but de simplifier ces méthodes pour les rendre utilisable à large échelle, le IPDA (Intact proviral DNA assay) a été développé (Bruner *et al.*, 2019). Cette technique repose sur l'utilisation d'amorces spécifiques de régions fréquemment défectueuses (hypermutation ou délétion). La présence d'un signal positif en ddPCR permet de dissocier les virus potentiellement intacts de ceux qui sont défectifs. La spécificité des amorces utilisées par cette méthode limite son utilisation sur des échantillons de personnes infectées par des virus de clade B (Kinloch, Nat Comm 2021). Au-delà de la séquence du génome viral, l'environnement génétique du site d'intégration est également important. Ainsi, il a été démontré que la modulation épigénétique est un élément important dans la régulation de la transcription du VIH, suggérant que certains génomes intacts n'ont pas la capacité de produire de particules infectieuses, même quand les conditions de stimulation sont propices.

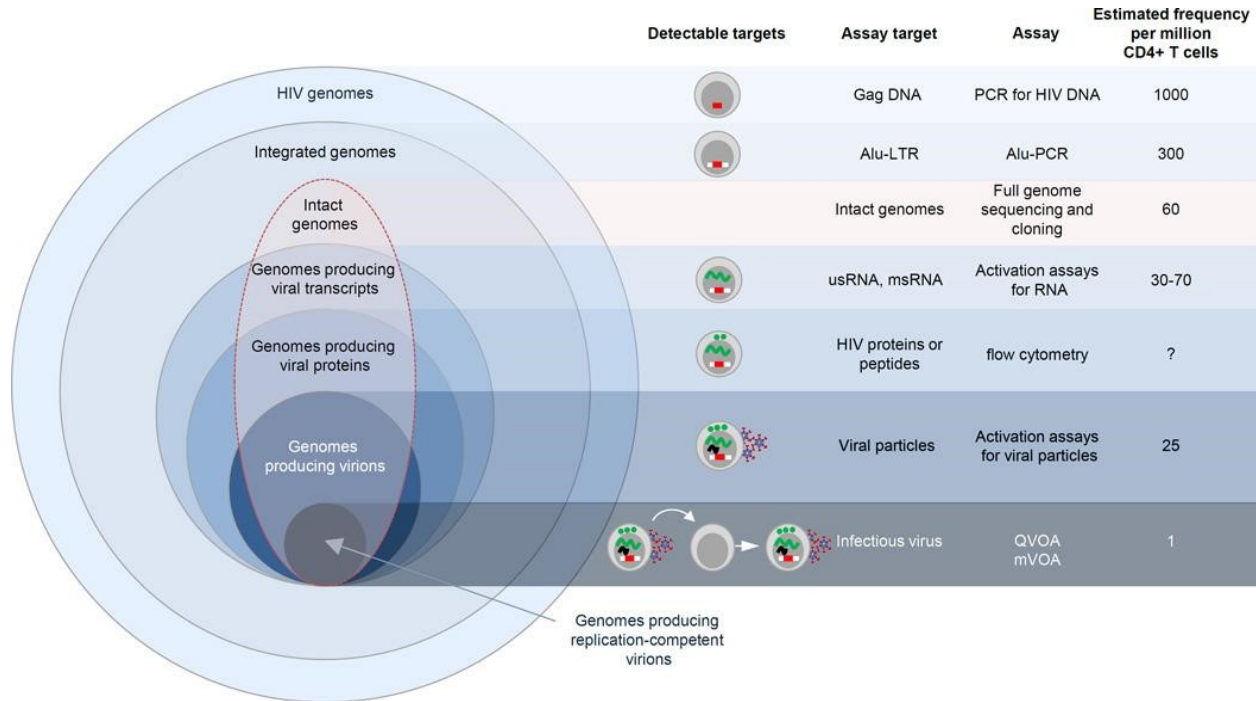


Figure 5. Taille du réservoir en fonction de la méthodologie utilisée (Figure provenant de Deeks *et al.*, 2016)

Reproduit avec la permission de Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer Nature, Nature Medicine. International AIDS Society global scientific strategy: towards an HIV cure 2016. Deeks, S. G., Lewin, S. R., Ross, A. L. *et al.*, Copyright © 2016

Beaucoup de facteurs vont déterminer le choix de la méthode de quantification la mieux adaptée pour évaluer la taille du réservoir VIH. La faisabilité de ces approches varie en fonction des cibles mesurées, de l'expertise nécessaire, voire même du nombre de cellules disponibles. Avec les différentes sensibilités de chaque méthode, le meilleur moyen d'obtenir l'évaluation la plus précise possible est d'utiliser plusieurs techniques de quantification afin d'avoir une image plus complète du réservoir afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la persistance du virus.

1.6. Stratégies thérapeutiques curatives

Après l'initiation de TAR hautement efficace en 1996, et la découverte que ces thérapies ne seraient pas suffisantes pour éliminer le virus (Gilden, 1996), de nouvelles stratégies thérapeutiques curatives ont été développées. Le but ultime de ces interventions est l'éradication complète du virus aussi nommée guérison mais pourrait aussi être une rémission prolongée, c'est-à-dire un contrôle naturel de la réplication virale à un niveau indétectable en l'absence de TAR.

Ces stratégies peuvent être divisées en deux catégories : soit un traitement curatif (ou éradication), qui permettrait de cibler et d'éliminer toutes les cellules infectées. L'autre approche consiste en un traitement de bâillonnement qui permettrait de contrôler le virus grâce au système immunitaire en absence de TAR. Dans les deux cas, le but est de diminuer le nombre de cellules infectées avant l'arrêt du traitement, afin d'atteindre un nombre extrêmement réduit de provirus pour atteindre un contrôle virologique sans traitement (Williams *et al.*, 2014).

L'approche du traitement éliminatoire, ou « shock and kill », a pour but de réactiver les génomes latents afin de rendre les cellules infectées reconnaissable par le système immunitaire qui pourraient ensuite les éliminer. Pour réactiver le génome, des agents de réversion de la latence (LRA) ont été développés. Ils ciblent différents mécanismes moléculaires impliqués dans la latence du VIH (épigénétique ou facteurs de transcription). Il existe plusieurs types de LRA,

comme les SMAC mimétique (mimétique du second activateur mitochondrial des caspases) ou les agonistes de la protéine kinase C (PKC) qui activent les voies signalisations cellulaires conduisant à la translocation de NF- κ B dans le noyau. Ces classes de LRA semblent pouvoir réactiver les provirus intégrés des cellules se trouvant dans le sang mais aussi au niveau des tissus (Nixon *et al.*, 2020). D'autres LRA, comme les inhibiteurs à l'enzyme histone désacétylase (HDACi), vont induire la décondensation de la chromatine ce qui facilite l'initiation de la transcription des génomes viraux (Bartholomeeusen *et al.*, 2013). Les bloqueurs de point de contrôle immunitaire, comme les anticorps bloquant PD-1, ont également démontré des propriétés anti-latence *in vitro* (Fromentin *et al.*, 2019) et *in vivo* (Uldrick TS, STM 2022). Cette stratégie ciblant les points de contrôle immunitaire pourrait aussi améliorer les fonctions cytotoxiques des LT CD8+ spécifique du VIH (Abbar *et al.*, 2020). Les LRA ayant un effet marqué sur la réactivation des provirus latents présentent parfois une toxicité importante et peuvent aussi avoir un effet négatif sur les fonctions des autres sous-types de cellules comme les LT CD8+ ce qui rend leur utilisation complexe (Jones RB *et al.*, 2014). De plus l'effet pharmacologique de ces molécules n'est pas homogène sur toutes les sous-populations de LT CD4+ ce qui renforce le besoin de les utiliser en combinaison (Pardons *et al.*, 2019). De plus, la réactivation des provirus n'est que la première étape de cette approche, le système immunitaire devant ensuite contribuer à l'élimination de ces nouvelles cibles et éventuellement à un contrôle virologique en l'absence de TAR. Les cellules CD8+ spécifiques du VIH qui persistent sous TAR ne semblent pas posséder des fonctions cytotoxiques suffisantes pour éliminer les cellules réservoirs réactivées (Shan *et al.*, 2012). Dans une étude *in vitro*, il a été démontré qu'une activation préalable des LT CD8+ par des peptides viraux était nécessaire pour accroître l'élimination des cellules infectées nouvellement activées. *In vivo*, dans des modèles de singes infectés par VIS et sous TAR, des combinaisons immunomodulatrices originales ont été testées. Ainsi, la vaccination thérapeutique par Ad26/MVA stimulant la réponse immunitaire spécifique du VIS en combinaison avec un agoniste du TLR7 stimulant la réponse innée induit un meilleur contrôle à la suite de l'arrêt de TAR que les interventions utilisées individuellement (Borducchi *et al.*, 2016). Par ailleurs, l'élimination des cellules réservoirs réactivées pourrait se faire via la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (Haynes *et al.*, 2012; Richard *et al.*, 2015).

La deuxième approche qui consiste à contrôler le virus est communément appelé le « block and lock ». Cette stratégie a pour but d'induire une latence dans toutes les cellules infectées pour empêcher tout rebond viral à la suite d'un arrêt de traitement. Plusieurs molécules ont la capacité de freiner ou d'inhiber complètement la réactivation virale, voir même d'induire des modifications épigénétiques permettant le maintien d'une latence même après que la molécule ne soit plus administrée, mais à ce jour aucune étude clinique n'a validé l'efficacité de ces molécules (Mousseau *et al.*, 2015).

A ce jour, aucune stratégie ne peut efficacement remplacer la TAR ou empêcher le rebond viral lors de l'arrêt du traitement antirétroviral, hormis la greffe de cellules portant la délétion CCR5 Δ 32 vue précédemment, mais qui n'est pas une stratégie viable pour la population globale. La TAR reste un moyen efficace de contrôler le VIH, il est toutefois important de continuer les efforts de recherches pour éliminer un traitement lourd pour le quotidien des personnes vivant avec le VIH sans amener les risques d'un rebond viral. Il est nécessaire d'approfondir l'étude des mécanismes de persistance des réservoirs du VIH pour développer des stratégies thérapeutiques qui permettront de bloquer la propagation du virus via l'élimination de ses réservoirs. Le processus de prolifération cellulaire reste une cible intéressante pour combattre la persistance du virus et des réservoirs qui le maintiennent.

1.7. Le VIH et la transplantation

Comme souligné précédemment, l'infection par le VIH induit une forte inflammation dans le corps qui peut avoir une multitude d'effets néfastes sur différents compartiments ou tissus du corps. Il est aujourd'hui connu que l'infection par le VIH peut être la cause ou un facteur contribuant à l'accélération de maladies rénales conduisant à des insuffisances rénales (Rao *et al.*, 1984; Gardenswartz *et al.*, 1984 ; Wyatt, 2017). Plusieurs étiologies de dysfonctionnement rénal sont associées à l'infection par VIH comme la néphropathie associée au VIH (NAVIH), les microangiopathies thrombotiques et le dépôt de complexes immuns. Environ 10% des personnes infectées par le VIH vont développer une NAVIH et le VIH est la troisième cause de maladie rénale en phase terminale chez les Afro-Américains de 20 à 64 ans. Le VIH peut aussi affecter indirectement la santé rénale en raison de la néphrotoxicité

associée à la trithérapie ou des traitement anti-microbiens utilisés pour soigner les maladies opportunistes. Il est toutefois important de souligner que malgré les effets néfastes de l'infection sur la fonction rénale, l'utilisation de la TAR a permis de diminuer le nombre de personnes nécessitant une dialyse et a globalement amélioré la survie.

Dans le passé, l'infection par le VIH était considérée comme une contre-indication à la transplantation aux États-Unis et en Europe en raison de préoccupations concernant la progression possible de la maladie du VIH dans un contexte d'immunosuppression suite à la greffe. Pour cette raison, la dialyse était considérée comme la seule option pour les personnes souffrant de maladies rénales en phase terminale associées à une infection par le VIH. Cependant la transplantation rénale chez les personnes sous trithérapie a montré de meilleures chances de survie comparé à la dialyse. De plus les greffes rénales chez les personnes vivant avec le VIH ont des taux de succès similaires aux greffes chez personnes non-infectées. Ces résultats encourageants ont permis de rendre accessible la greffe rénale pour les personnes vivant avec le VIH et souffrant d'une néphropathie (Stock PG *et al.*, 2010).

La transplantation, même chez les personnes vivant avec le VIH, reste un traitement de dernier recours. Le taux de survie post-transplantation est amélioré par un choix judicieux des donneurs permettant de diminuer le risque de rejet de greffe ou des complications. Le groupe ABO (groupe sanguin) et le génotypage humain « leucocyte antigen » (HLA) doivent être identifiés pour vérifier la compatibilité du receveur avec le donneur. Les groupes ABO doivent être au minimum compatible s'ils ne sont pas identiques. Concernant le HLA, si les HLA-A, -B et -DR sont identiques entre le donneur et le receveur, la greffe est prioritaire et favorisée. Puisque la majorité des organes transplantés proviennent de donneurs cadavériques, il est difficile d'obtenir une concordance parfaite entre les HLA du donneur et du receveur. La priorité est donc donnée dans la concordance du HLA-DR puis le HLA-A et enfin HLA-B lors du choix de la provenance du greffon. Une différence dans les HLA peut causer une réaction immunitaire contre l'hôte ou le greffon, menant à un rejet de l'organe. Pour pallier ces risques, la prise d'immunosuppresseurs est la méthode la plus efficace actuellement utilisée.

1.8. Les immunosuppresseurs

Les immunosuppresseurs ont pour but de diminuer la réaction allogénique en éliminant certaines cellules immunitaires dont les lymphocytes T, ou en empêchant l'activation et la prolifération de ces cellules en inhibant un ou plusieurs signaux d'activation. Les premiers traitements d'immunosuppressions reposaient sur l'irradiation complète du corps entraînant l'élimination des cellules prolifératives comme les lymphocytes T (Sayegh & Carpenter, 2004). C'est en 1962 que le premier immunosuppresseur est introduit, l'azathioprine. Cet inhibiteur de la voie de synthèse des purines a permis de rendre les transplantations rénales possibles et réalistes. Le second immunosuppresseur à avoir été développé fut la cyclosporine A. Bien que datant de 1978 elle est encore utilisée aujourd'hui. Les années quatre-vingt-dix ont vu la mise en marché d'un grand nombre d'agents immunosuppresseurs : tacrolimus, néoral, mycophenolate mofetil (MMF), sirolimus, deoxyspergualin puis plusieurs anticorps poly et monoclonaux. Les molécules les plus couramment utilisées aujourd'hui sont des inhibiteurs de la calcineurine (cyclosporine et tacrolimus), des anticorps monoclonaux dirigés contre le CD25 (récepteur à l'IL-2) ou contre les lymphocytes T (thymoglobulines), des inhibiteurs de la synthèse de bases puriques tels que l'azathioprine ou les mycophénolates et les corticostéroïdes (Figure 5). Le traitement immunosuppresseur donné aux personnes greffées est souvent composé de plusieurs types de molécules pour obtenir de meilleurs résultats, avec une combinaison d'inhibiteur de la calcineurine, de corticostéroïdes et d'un antiprolifératif.

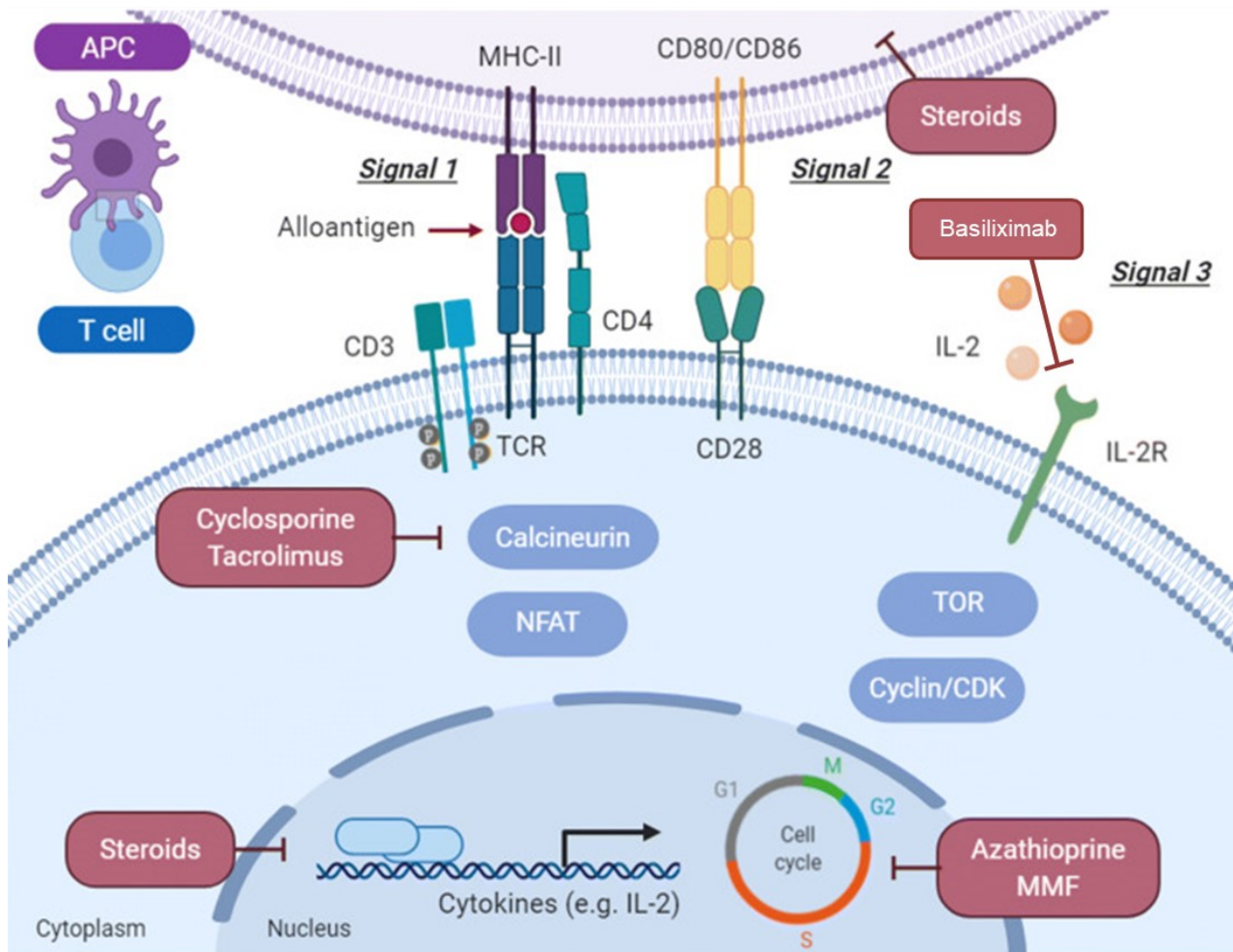


Figure 6. Cibles des immunosuppresseurs sur les lymphocytes T CD4+ (Figure adapté de Demkes et al., 2021)

1.8.1. Les inhibiteurs de la calcineurine (cyclosporine et Tacrolimus)

La cyclosporine, un polypeptide dérivé d'un champignon, est à l'origine des avancées dans la transplantation grâce à ses caractéristiques immunosuppressives efficaces. La cyclosporine, causant des effets secondaires cosmétiques (comme de l'acné ou de l'hypertrichose), a peu à peu été remplacée par le tacrolimus, un macrolide dont l'effet immunosuppressif a été découvert en 1983. Ce macrolide a le même mécanisme d'action que la cyclosporine mais est dix à cent fois plus efficace. Le tacrolimus, une fois dans la cellule, se lie aux immunophilines cytosoliques (protéines hautement conservées qui participent aux repliements des protéines) FKBP-12 et FKBP-52. Le complexe tacrolimus-immunophile inhibe

l'activité de la calcineurine ce qui l'empêche de cliver le groupement phosphate du NFAT (nuclear factor of activation T-cells). L'inhibition de la calcineurine interfère avec la translocation d'une multitude de facteurs de transcription (dont NFAT) qui sont impliqués dans la transcription des gènes cytokiniques, notamment l'IL-2. Le tacrolimus inhibe aussi l'activation de gènes médiés par l'AMPc (adenosine monophosphate cyclique) et les éléments CREB (calcium response element binding protein). Ainsi, l'inhibition de la calcineurine inhibe la transcription dépendante de CREB ce qui interfère avec la production d'IL-3, IL-5 et IL-7, IFN- γ et TNF- α en plus de l'IL-2.

1.8.2. Le mycophénolate mofétil

Le mycophénolate mofétil (MMF) est absorbé dans l'estomac puis transformé en acide mycophénolique (MPA). Comme l'azathioprine, l'acide mycophénolique est un antimétabolite qui inhibe la division cellulaire en limitant la synthèse de bases puriques. Le MPA inhibe l'inositol monophosphate déshydrogénase (IMPDH), qui a un rôle essentiel dans la synthèse de la guanosine. Il existe deux isoenzymes de l'IMPDH qui sont codées par des gènes distincts mais seul l'isoenzyme I est constitutivement exprimée. Toutefois l'expression des deux isoformes est induite par l'activation des lymphocytes T (Jain *et al.*, 2004; Carr *et al.*, 1993). Le MPA induit donc une déplétion en guanosine intracellulaire ainsi que l'inhibition de la synthèse *de novo* des bases puriques ce qui bloque la transition G1/S du cycle cellulaire. Les lymphocytes T et B dépendent de IMPDH pour assurer la synthèse de purines et la réplication de l'ADN, alors que d'autres types cellulaires peuvent utiliser d'autres voies alternatives, ce qui fait de cet agent un inhibiteur sélectif de la prolifération des lymphocytes. L'inhibition de la prolifération des lymphocytes T n'est pas seulement due à l'inhibition de la synthèse d'ADN : l'inhibition de la transcription de certains gènes comme celui codant pour le CD25 pourrait également participer à l'effet immunosuppresseur du MPA (Préaud *et al.*, 2011).

1.8.3. Les corticostéroïdes

Les corticostéroïdes sont utilisés pour la prévention du rejet de greffe d'organes solides grâce à leurs propriétés anti-inflammatoires et leur effet immunosuppresseur. Bien que seulement partiellement élucidé, le mécanisme d'action des corticostéroïdes implique la liaison de ceux-ci à des récepteurs cytosoliques avant d'être transportés dans le noyau afin que le complexe ainsi formé module l'expression de certains gènes dont plusieurs contrôlent l'expression de cytokines (Muller, 2004; Lindenfeld *et al.*, 2004; Kresky *et al.*, 2011). Les corticostéroïdes inhibent notamment la production d'IL-2 ce qui diminue la prolifération des lymphocytes T. La prise de corticostéroïdes induit aussi une réduction de l'activation des lymphocytes T cytotoxique (Kresky *et al.*, 2011). Les stéroïdes n'affectent pas seulement les lymphocytes T, mais aussi les lymphocyte B, les granulocytes, les macrophages et les monocytes qui vont subir des modifications dans leurs nombres, distributions et même leurs fonctionnalités (Lindenfeld *et al.*, 2004; Kresky *et al.*, 2011). Les corticostéroïdes pourraient aussi exercer leur activité immunosuppressive via des interactions avec la membrane cellulaire, mais ces mécanismes ne sont pas complétement élucidés (Bobadilla & Gamba, 2007; Bergman *et al.*, 2005).

1.8.4. Le basiliximab

Le basiliximab est anticorps monoclonal bloquant la chaîne α du récepteur de l'IL-2, le CD25. Suite à leur activation, les cellules T produisent de l'IL-2 et expriment CD25 afin de favoriser la survie et la prolifération de ces cellules de façon autocrine et paracrine. L'engagement entre l'IL-2 et son récepteur correspond au signal 3, qui permet une activation de la cellule si seulement si le signal 1 (CMH-TCR) et le signal 2 (corécepteurs) sont aussi présents. Ainsi les anticorps monoclonaux bloquant le récepteur à l'IL-2 limitent la prolifération des cellules en inhibant leur activation via le blocage du troisième signal. Ces agents immunosuppresseurs modulent la réponse immunitaire en bloquant l'activation des lymphocytes T mais n'induisent pas de déplétion lymphocytaire (Levey *et al.*, 1999; Kresky *et al.*, 2011).

1.9. Problématique et hypothèse

Malgré la TAR qui permet de contrôler la réplication virale, le VIH ne disparaît pas et persiste sous forme latente dans des réservoirs cellulaires qui causent un rebond viral lors de l'arrêt du traitement. Même si la TAR a amélioré considérablement la qualité de vie des personnes vivant avec le VIH, notamment en augmentant leur espérance de vie, il demeure important de développer une stratégie thérapeutique curative.

Comme énoncé précédemment, le VIH persiste dans des réservoirs latents échappant à la réponse immunitaire. L'un des mécanismes de persistance est la prolifération cellulaire. Quelle soit homéostatique ou induite par l'antigène, cette prolifération permet au réservoir viral d'être maintenu sans que le génome intégré ne soit réactivé et donc potentiellement pris pour cible par la réponse immunitaire antivirale. Inhiber cette prolifération pourrait représenter une approche thérapeutique intéressante pour empêcher le maintien des réservoirs.

Lors de transplantations d'organes solides, des immunosuppresseurs sont administrés aux patients receveurs pour lutter contre le rejet de greffe. Ces immunosuppresseurs inhibent l'activation et la prolifération des cellules immunitaires. De rares études rétrospectives chez des personnes vivant avec le VIH et recevant des immunosuppresseurs suite à une greffe ont tenté de démontrer l'impact de ces traitements sur la persistance du VIH (Stock PG, *et al.*, 2014; Henrich *et al.*, 2021). En effet, ces études conduites chez plus de 150 participants ont montré que la prise d'immunosuppresseurs induisait une diminution des niveaux d'ARN viral et que les comptes CD4+ demeuraient stables. Il a aussi été montré que la cyclosporine inhibe directement la réplication du virus, et que le mycophenolate induit une diminution de la virémie détectée chez des personnes vivant avec le VIH (Ciuffreda *et al.*, 2007 Margolis *et al.*, 2002; Innis *et al.*, 2021).

Hypothèse : Sachant que la prolifération des lymphocytes T contribue de manière importante à la persistance du réservoir VIH sous TAR, notre hypothèse est que **le traitement immunosuppresseur pris par des receveurs de greffe, en inhibant la prolifération cellulaire, entrainera une diminution de la taille des réservoirs viraux.**

Le but est d'évaluer l'impact de la modulation de l'activation et de la prolifération cellulaire induite par les immunosuppresseurs sur les réservoirs du VIH. Pour cela nous avons mesuré l'impact du traitement immunosuppresseur sur les marqueurs immunologiques, le génome viral et son activité transcriptionnelle ainsi que sur le réservoir fonctionnel du VIH. Nous avons finalement élaboré un protocole de culture cellulaire pour tester l'impact des immunosuppresseurs *in vitro* afin d'évaluer leur impact sur le réservoir viral dans un environnement contrôlé.

2. Matériels et méthodes

2.1. Cohorte transplantation et VIH

Cette étude a pour but de mesurer l'impact des immunosuppresseurs, reçus à la suite d'une transplantation rénale, sur les réservoirs viraux retrouvés chez des personnes vivant avec le VIH sous TAR efficace. Pour cette étude, notre laboratoire a reçu 60 ml de sang (6x10ml tube EDTA) à tous les 6 mois précédents la greffe, puis à des intervalles de temps réguliers à la suite de la transplantation (1, 3, 6, 12 et 24 mois après la greffe à plus ou moins 2 mois). Les prélèvements pré-transplant permettent d'avoir des mesures du réservoir avant le début du traitement immunosuppresseur. Tous les participants reçoivent le même type de traitement immunosuppresseur, composé de deux doses de basiliximab au jour 0 et 4 après la transplantation ainsi que d'un anti-calcineurine, du MMF et de la prednisone dès le premier jour suivant la greffe.

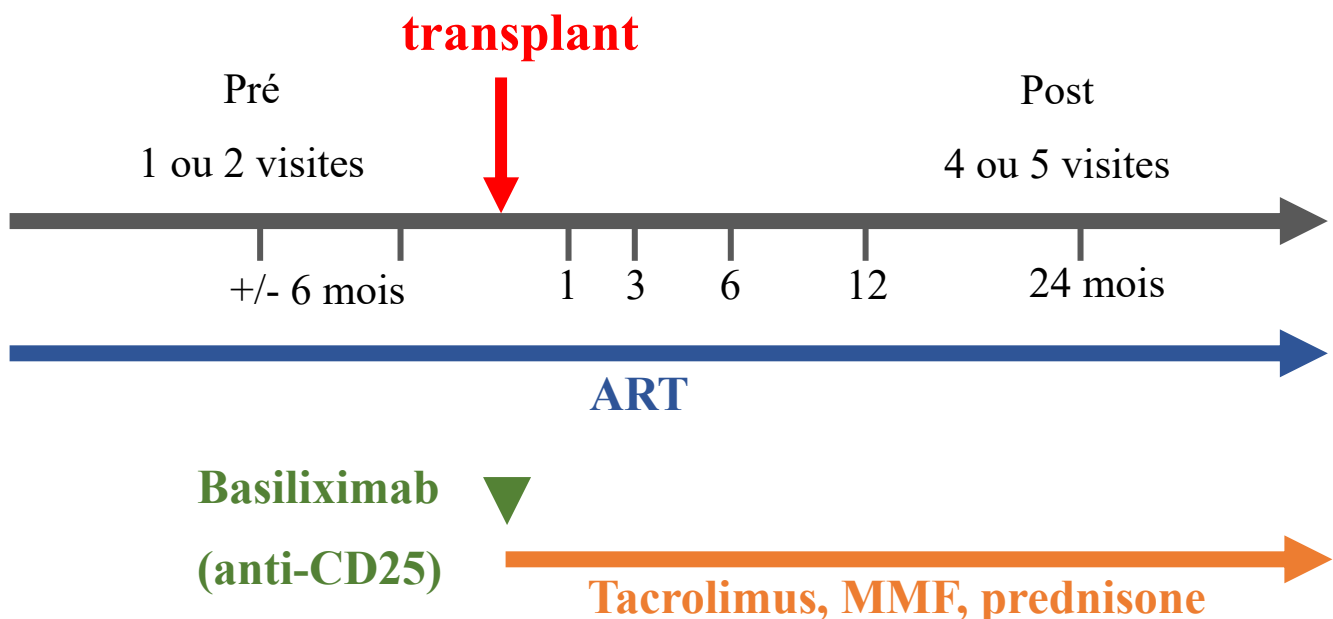


Figure 7. Schéma de l'organisation de l'échantillonnage et des traitements des participants

2.2. Données cliniques des participants

Les sept participants de cette étude sont des hommes et des femmes recrutés à Montréal, sous TAR et en attente d'une greffe de rein. Tous les participants ont une charge virale indétectable pour toutes les visites, donc moins de 50 copies d'ARN du VIH/mL de plasma.

	<u>R02</u>	<u>R05</u>	<u>R09</u>	<u>R12</u>	<u>R13</u>	<u>524</u>	<u>534</u>
Sexe	Homme	Femme	Homme	Homme	Femme	N/A	N/A
Age (années)	60 ans	47 ans	62 ans	65 ans	57 ans	N/A	N/A
Date de l'infection par le VIH	1999	2004	1999	2001	1999	2013	2017
Date d'initiation de TAR	2010	2007	2007	2001	2010	N/A	2017
Moyenne de CD4 (cellules/μl de sang)	412	472	341	354	361	313	292
Charge virale (copies d'ARN/ml de plasma)	Non détectable	Non détectable	Non détectable	Non détectable	Non détectable	Non détectable	Non détectable
Sérologie CMV	Négatif	Négatif	Négatif	Non détectable	Non détectable	N/A	N/A
Sérologie VHB	Négatif	Négatif	Négatif	Guérie	Négatif	N/A	N/A
Traitements immunosuppresseurs	basiliximab prednisone tacrolimus MMF	basiliximab prednisone tacrolimus MMF	basiliximab prednisone tacrolimus/ cyclosporine MMF	basiliximab prednisone tacrolimus MMF	basiliximab prednisone tacrolimus MMF	basiliximab prednisone tacrolimus MMF	basiliximab prednisone tacrolimus MMF

Les données cliniques disponibles des participants sont indiquées dans le Tableau 1.

Tableau 1. Données cliniques des participants de la cohorte Transplantation/VIH

2.3. Isolation et conservation des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC)

Le sang est obtenu par phlébotomie et les PBMC sont isolées par gradient de Ficoll (Lymphoprep, Stemcell). Le plasma est conservé à -80°C. Le sang est dilué (1 :3) dans un milieu de culture pour cellules humaines (RPMI). 15 mL de Ficoll est lentement ajouté à 30 mL du mélange de cellule et milieu de culture. Après une centrifugation de 25 min à 2000 rpm (Sorvall

ST16 centrifuge series, ThermoFisher), un anneau de PBMC se forme dans le tube et peut être prélevé grâce à une pipette pasteur. Les cellules sont ensuite lavées à trois reprises et comptées avant d'être re-suspendues à 10×10^6 et 50×10^6 cellules/ml dans du sérum bovin (BS) conservé sur glace mélangé à 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO). Les cellules sont ensuite transférées à -80°C rapidement puis transférées dans des réservoirs d'azote liquide 24h après la mise à froid, ce qui assure leur conservation à long terme.

2.4. Décongélation des PBMC et enrichissement des cellules T CD4+

Les PBMC conservées dans de l'azote sont placées dans un bain-marie à 37°C jusqu'à ce qu'elles soient partiellement décongelées et ensuite placées dans 1 ml de sérum bovin (BS) préalablement chauffé à 37°C . Du RPMI chaud est ajouté tout en agitant le tube, puis la suspension est centrifugée à 1500 rpm pendant 5 min puis les cellules sont comptées. Après un second lavage, les cellules sont resuspendues dans du EasySep™ buffer (Stemcell) à une concentration maximale de 50×10^6 cellules/ml. Les cellules sont ensuite enrichies en lymphocytes T CD4+ à l'aide d'une trousse de sélection négative de CD4 humain (Stemcell).

2.5. Quantification de l'ADN viral

Le laboratoire a mis au point une PCR quantitative ultrasensible pour mesurer l'ADN total ou intégré du VIH dans les lymphocytes T CD4+ (Vandergeeten *et al.*, 2014). Après avoir décongelé et enrichi des PBMCs en lymphocytes T CD4+, les cellules sont lavées dans du RPMI avec 10% de FBS et 5% de pénicilline/streptomycine (R10) puis comptées et mise en culot secs d'environ 1×10^6 cellules et entreposées à -80°C . Les quantifications de l'ADN total et intégré du VIH sont ensuite effectuées par PCR nichée multiplex quantitative. Les deux copies du gène codant pour le CD3 sont également amplifiées comme contrôle pour pouvoir quantifier précisément le nombre de cellules dans chacun des puits de PCR. L'ADN est extrait des cellules en utilisant le kit d'extraction AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal kit de Qiagen (#80224). Dans chaque puit sont pipeté 35 μl d'un mélange de pré-amplification composé d'un tampon de Taq polymérase à 1X (Invitrogen), avec 3 mM de MgCl_2 , 300 μM de désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs), 300 nM des deux amorces CD3 (HCD3OUT5' et HCD3OUT3'), 300 nM d'amorces spécifiques à la séquence amplifiée (ULF1 et UR1 pour l'ADN total ou Alu1 et Alu2 pour l'ADN intégré) et 2.5 U de Taq polymérase (Invitrogen) ainsi que l'eau. Le protocole pour

l'ADN intégré est très similaire avec 150 nM supplémentaires pour l'amorce ULF1 et 3.75 U de Taq sont ajoutés. 15 µl d'ADN sont ajoutés au mix de pré-amplification. Dans chaque plaque, une gamme de standard est ajoutée et permet la quantification absolue du nombre de copies d'ADN du VIH. Ces standards proviennent d'ACH2 lysées, des cellules infectées avec une copie unique de VIH intégré. L'ADN des ACH2 est dilué de manière sériée en huit suspensions allant de 20x10⁶ cellules/ml à 200 cellules/ml. Un contrôle négatif composé d'eau est également ajouté en plus de la gamme standard. Les échantillons sont préamplifiés dans un thermocycleur *ProFlex PCR System* (Applied Biosystem) selon le programme indiqué dans le Tableau 2.

	Température (°C)	ADN VIH total	ADN VIH intégré
		Temps	
Dénaturation	95	8 min	8min
Cycling	95	1 min	1 min
	55	40 sec X12	1 min X12
	72	1 min	10 min
Élongation	72	15 min	15 min
Entreposage	4	∞	∞

Tableau 2. Protocole de préamplification pour les PCR quantitatives nichées ADN

A la suite de cette première PCR, 13.6 µl de mélange réactionnel sont ajoutés à 6.4 µl d'une dilution au 10^{ème} du produit de la pré-amplification. Le mélange réactionnel est composé de *ToughMix* (Quantabio) à 1X, de 1250 nM des amorces utilisées (HCD3-IN-3' et HCD3-IN-5' pour le CD3 et LambdaT et UR2 pour le VIH ainsi que 200 nM de la sonde correspondante (CD3, UHIV) et de l'eau. Après l'ajout d'un second contrôle négatif post première amplification, la quantification est effectuée dans un RotorGene (Qiagen) selon le programme indiqué dans le Tableau 3. Le nombre de copies d'ADN viral quantifié est rapporté sur le nombre de copies CD3 mesurées dans les échantillons pour déterminer la fréquence de cellules infectées.

	Température (°C)	Temps	
Dénaturation	95	4 min	
Cycling Acquisition simple	95	3 sec	X 40
	60	10 sec	
	-	-	

Tableau 3. Protocole d'amplification pour la seconde réaction des PCR quantitatives nichées ADN

Cible	Étape	Nom de l'amorce ou sonde	Séquence (5' à 3')
ADN du VIH total	Préamplification	ULF1	ATG CCA CGT AAG CGA AAC TCT GGG TCT CTC TDG TTA GAC
		UR1	CCA TCT CTC TCC TTC TAG C
	PCR quantitative	LambdaT	ATG CCA CGT AAG CGA AAC T CTG AGG GAT CTC TAG TTA CC
		UHIV Taqman	/56-FAM/CA CTC AAG G/ZEN/C AAG CTT TAT TGA GGC /3IABkFQ/
ADN du VIH intégré	Préamplification	ULF1	ATG CCA CGT AAG CGA AAC TCT GGG TCT CTC TDG TTA GAC
		Alu 1 Alu 2	TCC CAG CTA CTG GGG AGG CTG AGG GCC TCC CAA AGT GCT GGG ATT ACA G
	PCR quantitative	LambdaT	ATG CCA CGT AAG CGA AAC T CTG AGG GAT CTC TAG TTA CC
		UHIV Taqman	/56-FAM/CA CTC AAG G/ZEN/C AAG CTT TAT TGA GGC /3IABkFQ/
CD3	Préamplification	HCD3OUT5' HCD3OUT3'	ACT GAC ATG GAA CAG GGG AAG CCA GCT CTG AAG TAG GGA ACA TAT
		HCD3IN5' HCD3IN3'	GGC TAT CAT TCT TCT TCA AGG T CCT CTC TTC AGC CAT TTA AGT A
	PCR quantitative	CD3 Taqman	/56-FAM/AG CAG AGA A/ZEN/C AGT TAA GAG CCT CCA T/3IABkFQ/

Tableau 4. Liste des sondes et des amorces utilisées pour les PCR quantitatives nichées ADN

2.6. Quantification de l'ARN viral

La quantité l'ARN viral LTR-gag associé aux cellules est déterminée par PCR quantitative nichée couplé à une étape de rétrotranscription. Cette mesure permet d'évaluer l'activité transcriptionnelle des provirus. L'ADN et l'ARN d'un million de cellules T CD4+ ont été extraits à l'aide de la trousse AllPrep DNA/RNA de Qiagen (#80224) selon les indications de la compagnie. L'ADN extrait est quantifié par PCR quantitative dans les mêmes conditions décrites précédemment. 16.5 µl d'un mélange de pré-amplification composé d'un mélange réactionnel à 1X (Invitrogen), de 500nM des amorces, de 2 µl d'une solution de Taq composée d'une transcriptase inverse et d'une polymérase (Invitrogen) ainsi que de l'eau. 8.5 µl d'ARN sont prélevés et combinés au mélange de pré-amplification dans une plaque contenant un contrôle négatif et une gamme de standard préalablement diluée allant de 3x10⁵ copies à 3 copies par puit. La plaque contenant les échantillons est placée dans un thermocycleur *ProFlex PCR System* (Applied Biosystem) programmé comme indiqué dans le Tableau 5.

	Température (°C)	Temps
Transcription inverse	50	30 min
Dénaturation	94	2 min
Cycling	94	15 sec
	55	30 sec
	68	1 min
Elongation	68	5 min
Entreposage	4	∞

Tableau 5. Protocole de préamplification pour les PCR quantitatives nichées ARN

6.4 µl du produit d'amplification dilué 10X sont ajoutés à 13.6 µl d'un mix de post-amplification pour la PCR quantitative. Le mélange est constitué de PerfeCTaq PCR ToughMix par Quantabio à 1X (Quantabio), de 1250 nM des amorces nécessaires, de 100 nM de la sonde et d'eau stérile. Un contrôle négatif est également ajouté en plus des échantillons avant que la quantification ne soit réalisée dans un RotorGene (Qiagen) selon le programme indiqué dans le Tableau 6. Le nombre de copies de LTR-gag est reporté aux valeurs de génomes proviraux mesuré en parallèle avec l'ADN.

	Température (°C)	Temps
Dénaturation	95	4 min
Cycling	95	3 sec
	60	10 sec
Acquisition simple	-	-

Tableau 6. Protocole d'amplification pour les PCR quantitatives nichées ARN

2.7. Analyses phénotypiques par cytométrie en flux

Après avoir décongelé les PBMC, 2×10^6 cellules sont transférées dans des plaques coniques 96 puits. Les cellules sont centrifugées à 1800 rpm pendant 3 min puis lavées et centrifugées à 1800 rpm pendant 3 min et resuspendues dans 100 µl d'une solution de PBS et FBS à 4% contenant les anticorps suivants : CD3 (BD #555342), CD4 (BD #564651), CD8 (BD #563795), CD25 (BD #562442), CD27 (eBioscience #47-0279-42), CD45RA (BD #563870), CD69 (BD #310912), HLA-DR (BD #560743), Vivid (Thermo Fisher #L34965), PD-1 (BD #565299) et CCR7 (BD #562381). Les cellules sont incubées pendant 30 min à 4°C. Pour compenser les fluorochromes utilisés, un volume adéquat d'anticorps est mélangé à des billes de compensation (Thermo Fisher # 01-3333-42) ce qui permet d'utiliser les mêmes anticorps pour le marquage sur cellules et pour la compensation. Les cellules sont ensuite lavées dans 200 µl de PBS avec 4% de FBS et centrifugées à 1800 rpm pendant 3min. Les culots sont ensuite resuspendus dans un tampon

Fix/Perm (Invitrogen #005123) à 1X dans son diluant (Invitrogen #005223) et incubés pendant 45 min à 4°C. Après avoir été lavées dans 200 µl de tampon Perm FOXP3 1x (Invitrogen #008333) et centrifugées à 2100 rpm pendant 3 min, les cellules sont resuspendues dans du tampon Perm FOXP3 1x contenant les anticorps suivants : Ki67 (BD #556026) et FoxP3 (eBioscience #12-4777-42), le tout est placé à température ambiante pendant 45 min à l'abri de la lumière. Les cellules sont lavées une dernière fois dans 200 µl de Perm FOXP3 1x et centrifugées à 2100 rpm pendant 3min. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 150 µl de PBS et peuvent être analysées dans un cytomètre en flux LSR II (BD biosciences) muni du logiciel d'analyse FACSdiva™ (BD biosciences). L'analyse des résultats est ensuite réalisée grâce au logiciel d'analyse FlowJo™ (BD biosciences).

2.8. ELISA

Pour la détection d'anticorps spécifiques au VIH (gp120 et le domaine ID2) ainsi qu'au Covid (OC43 RBD) dans les sérums des donneurs de la cohorte, une plate-forme ELISA a été utilisée. Des plaques Nunc Maxisorp à 96 puits (Millipore Sigma, Burlington, MA, USA) ont été recouvertes de 50 ng de ID2 ou gp120 recombinant, ou 2.5 µg/ml de OC43 RBD recombinant par puits dans une solution saline tamponnée au Tris (TBS) pendant une nuit à 4 ° C. Les plaques ont été lavées avec 3 x TBS + 0,05 % de Tween-20 avant d'être bloquées à température ambiante pendant 2 h avec du TBS + 5 % de poudre de lait écrémé et 0,1 % de Tergitol. Les sérums humains ont été dilués avec un tampon de blocage dans une dilution 10x et ajoutés aux plaques bloquées avant d'être incubés pendant une nuit à 4°C. Les plaques ont été lavées quatre fois avec un tampon de lavage suivi d'une incubation avec de anticorps secondaire (dilué dans un tampon de blocage) pendant 1 h à température ambiante, suivi de quatre lavages. L'activité enzymatique HRP a été déterminée après l'ajout d'un mélange 1:1 de réactifs oxydant Western Lightning et luminol (Perkin Elmer Life Sciences). L'émission lumineuse a été mesurée avec un luminomètre LB942 TriStar (Berthold Technologies). Le signal obtenu avec la BSA a été soustrait pour chaque sérum et a ensuite été normalisé au signal obtenu avec le mAb CR3022 présent dans chaque plaque.

2.9. HIV-Flow

Le HIV-Flow est une technique de cytométrie en flux permettant de phénotyper les cellules portant les réservoirs du VIH (Pardons *et al.*, 2019). Brièvement, les cellules T CD4⁺ sont stimulées avec de l'acétate de myristate de phorbol (PMA)/ionomycine pendant 24h puis les cellules sont marquées avec deux anticorps spécifiques pour la protéine virale p24 pour cibler les cellules infectées portant des provirus ayant la capacité d'être induit et compétents pour la traduction de protéines. Les cellules sont d'abord décongelées et enrichies en T CD4⁺ avant d'être transférées dans des tubes de 5 ml à une concentration maximale de 2×10^6 cellules/ml. De la brefeldine A est ajoutée pour conserver le phénotype originel. Les cellules sont ensuite stimulées avec de la PMA à 162 nM et de la ionomycine à 1 µg/mL avec un cocktail d'ARV (3TC à 200 nM et raltégravir à 200 nM) pendant 24 h. Les cellules sont lavées et centrifugées à 1800 rpm avant d'être resuspendues dans 200 µl de PBS contenant Live/Dead-Aqua (Thermo Fisher #L34965) et placées à 4°C pendant 20 min. Les cellules sont ensuite lavées dans 1800 µl de PBS avec 4% de HS et centrifugées à 1800 rpm pendant 5 min. Les cellules sont ensuite marquées de façon extracellulaire avec 100ul d'une solution de PBS et Sérum Humain (HS) à 4% contenant les anticorps suivants : CD3 (BD #612940), CD4 (BD #612887), CD25 (BD #564385), CD45RA (BD #563870), HLA-DR (BD #564040), CCR7 (BD #563711). Les cellules sont une nouvelle fois lavées dans 1800 µl de PBS avec 4% de HS et centrifugées à 1800 rpm pendant 5min. La fixation et perméabilisation des cellules est réalisée avec 100 µl d'un tampon Fix/Perm (Invitrogen #005123) à 1X dans son diluant (Invitrogen #005223) et les cellules sont incubées pendant 45 min à 4°C. Après avoir été lavées dans 1800 µl de tampon Perm FOXP3 1x (Invitrogen #008333) et centrifugées à 2100 rpm pendant 5min, les cellules sont marquées pour des cibles intracellulaire et donc re-suspendues dans du tampon Perm FOXP3 1x contenant les anticorps suivants : Ki67 (BD #562899), FoxP3 (eBioscience #53-4776-42), KC57 (Beckman Coulter #6604667), 28B7 (Medimabs #MM-0289-APC). Le marquage intracellulaire est réalisé à température ambiante pendant 45 min à l'abri de la lumière. Enfin les cellules sont suspendues dans 150 µl de PBS et peuvent être analysées à l'aide du cytomètre en flux Symphony (BD biosciences) muni du logiciel d'analyse FACSdiva™ (BD biosciences). L'analyse des résultats est ensuite réalisée grâce au logiciel d'analyse FlowJo™ (BD biosciences).

2.10. Test de prolifération avec agents immunosuppresseurs

Après avoir décongelé et enrichi des PBMCs en lymphocytes T CD4+, les cellules sont re-suspendues à 2×10^6 cellules/ml dans du RPMI HS 4% + ARV pendant 1 heure à 37°C. Les cellules sont ensuite marquées avec un Cell Trace Violet (Thermo Fisher #C34557) pendant 7 min à 37°C avant d'être lavées avec du RPMI HS 4%. Les cellules sont transférées dans une plaque préalablement sensibilisée avec des anticorps agonistes du CD3/28 dans un milieu de RPMI HS 4% avec des ARV (raltégravir et saquinavir à 200 nM) et de l'IL-2 (10 ng/ml). Les cellules sont mises en culture avec un de trois immunosuppresseurs, du MMF (Sigma #M3536-50Mg), du tacrolimus (Cederlane #3631/10) ou du dasatinib (Cederlane #HY-10181) selon les doses indiquées plus bas (section 3.4). Les cellules sont ensuite transférées dans un incubateur à 37°C pendant 2 jours avant d'être lavées et comptées puis elles sont remises en plaque dans du RPMI HS 4% avec des ARV et de l'IL-2 et les immunosuppresseurs dépendamment de la condition. Les cellules sont ensuite remises en culture pendant 3 jours à 37°C. A la suite d'un lavage, les cellules sont exposées à de la BFA ainsi que de la PMA à 25 nM et de la ionomycine à 1 µg/mL, puis un HIV-Flow est réalisé le jour suivant. Des culots secs sont produits pour chaque condition et des PCR ADN et ARN VIH sont réalisées. Toutes ces mesures permettent de déterminer si dans des conditions expérimentales contrôlées, les immunosuppresseurs ont un impact sur la taille des réservoirs VIH après 6 jours de culture.

3. Résultats

3.1. Impact des immunosuppresseurs sur l'activation des cellules T CD4+

Afin de mesurer l'effet des immunosuppresseurs sur les cellules T CD4+, nous avons réalisé des marquages extra- et intracellulaires pour cibler différents marqueurs d'activation, de prolifération ainsi que certains marqueurs nous permettant de discriminer différents sous-types cellulaires au sein de la population générale (Matériel et méthode, 2.7). Les résultats ont été obtenus par cytométrie en flux, et l'analyse a été faite sur FlowJo™ en utilisant la stratégie d'identification présentée dans la figure 8.

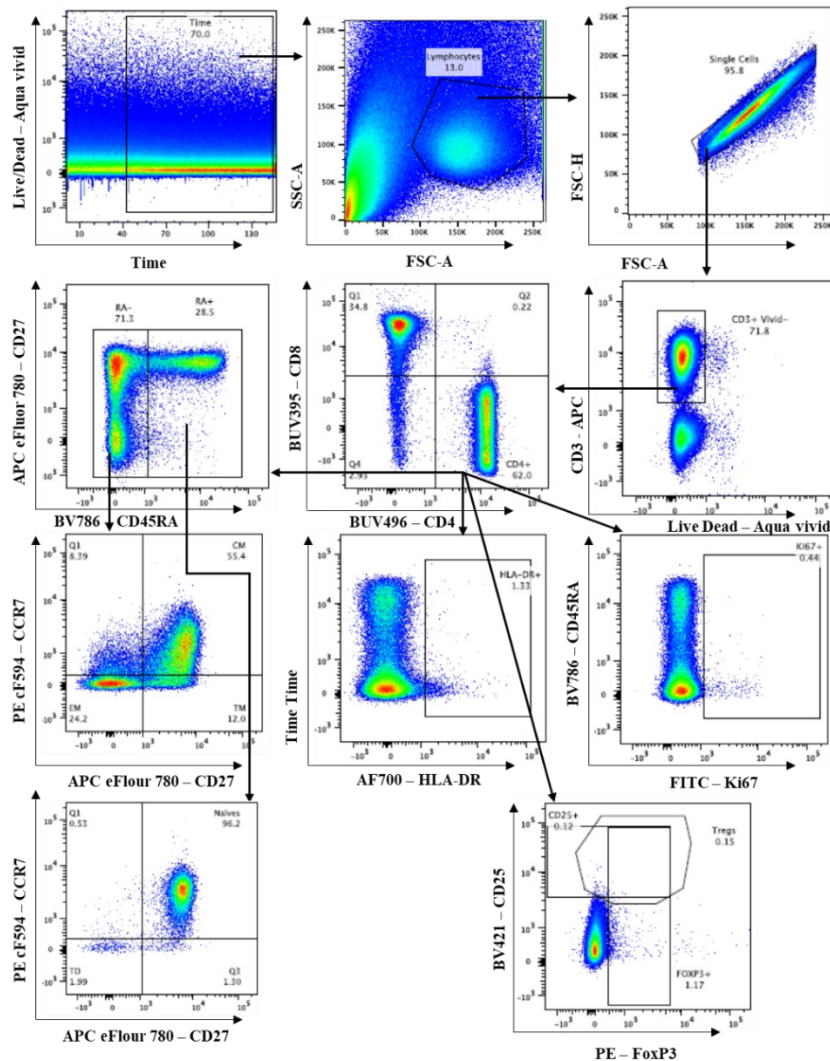
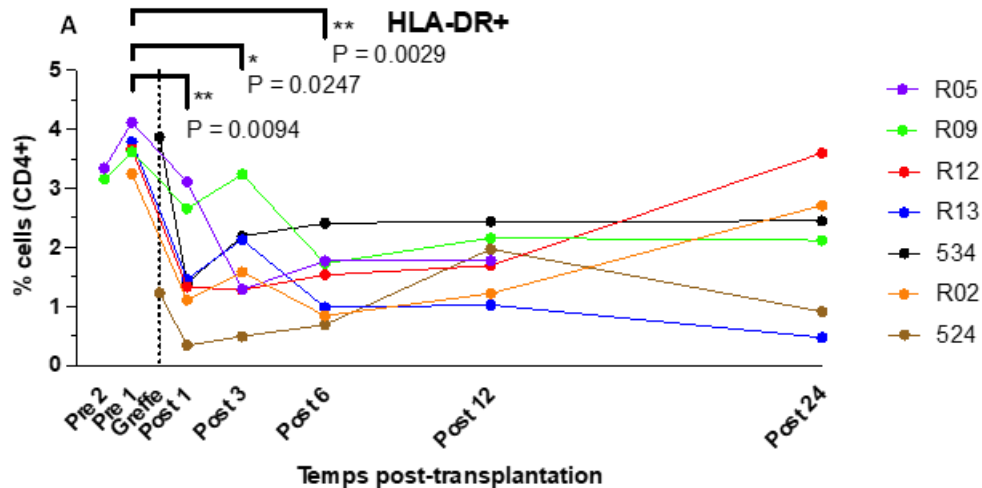


Figure 8. Stratégie d'identification des sous-types cellulaires et phénotype des marqueurs

Afin de mesurer l'impact des immunosuppresseurs sur l'activation et la prolifération des cellules T CD4+ des personnes vivant avec le VIH sous TAR et recevant une greffe, nous avons mesuré la variation de cellules exprimant le marqueur de prolifération Ki67 par cytométrie en flux (Figure 9A). Nous avons aussi mesuré les variations d'expression des marqueurs d'activation HLA-DR (Figure 9B). Les fréquences de lymphocytes T CD4+ exprimant le marqueur d'activation HLA-DR sont diminuées à un mois ($p=0.0094$, fold change=0.46) et demeurent inférieures aux niveaux pré-greffe à 3 et 6 mois suivants la greffe ($p=0.0247$, fold change=0.51 et $p=0.0029$, fold change=0.43 respectivement, Figure 9A). Toutefois, ces différences n'étaient plus statistiquement significatives après un et deux ans. En ce qui concerne le marqueur de prolifération Ki67, l'expression de celui-ci baisse significativement à un mois après la greffe ($p=0.0029$, fold change=0.48, figure 9B). Cette baisse ne demeure plus significative à 3 mois et pour les time points après ça.

Ainsi, les traitements immunosuppresseurs induisent une diminution marquée mais transitoire de l'activation et de la prolifération des lymphocytes T CD4+.



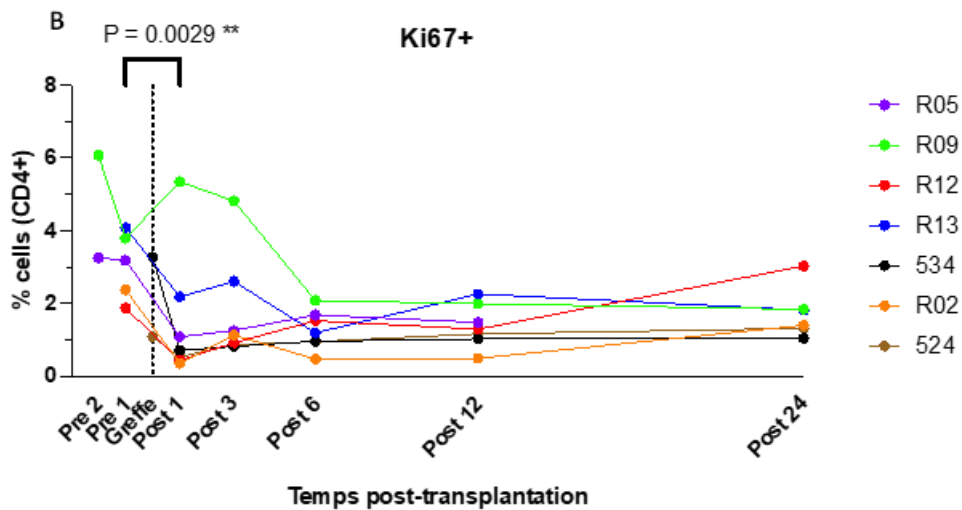


Figure 9. Fréquences des marqueurs d'activation et de prolifération (HLA-DR/Ki67)

Un marquage extracellulaire (HLA-DR) et intranucléaire (Ki67) a été réalisé sur les échantillons longitudinaux des 7 participants puis analysé par cytométrie en flux dans les LT CD4+. (A) Fréquence de cellules LT CD4+ exprimant le marqueur d'activation HLA-DR. (B) Fréquence de cellules T CD4+ exprimant le marqueur de prolifération Ki67.

Afin d'évaluer l'impact des immunosuppresseurs sur la distribution des différents sous-types de lymphocytes T CD4+ nous avons mesuré la fréquence des sous populations de cellules mémoires, en particulier celles qui ont été précédemment démontrée comme étant enrichies en réservoir du VIH (Figure 10). L'analyse de l'évolution de la fréquence des différentes sous populations avant et après la prise des immunosuppresseurs révèle des différences donneurs-dépendantes pour la plupart des sous-types mémoires (Figure 10C-E). On note une augmentation statistiquement significative de la fréquence de cellules n'exprimant pas CD45RA (soit l'ensemble des cellules mémoires) au cours des deux ans de prise d'immunosuppresseurs (p=

0.0078 et fold change=1.19, Figure 10B). Aussi, la fréquence de cellules centrales mémoires augmente légèrement après 2 ans de traitement ($p=0.0034$ et fold change=1.97, Figure 10F).

Ainsi les traitements immunosuppresseurs sont associés à une augmentation modeste mais significative de la fréquence des cellules mémoires centrales T CD4+.

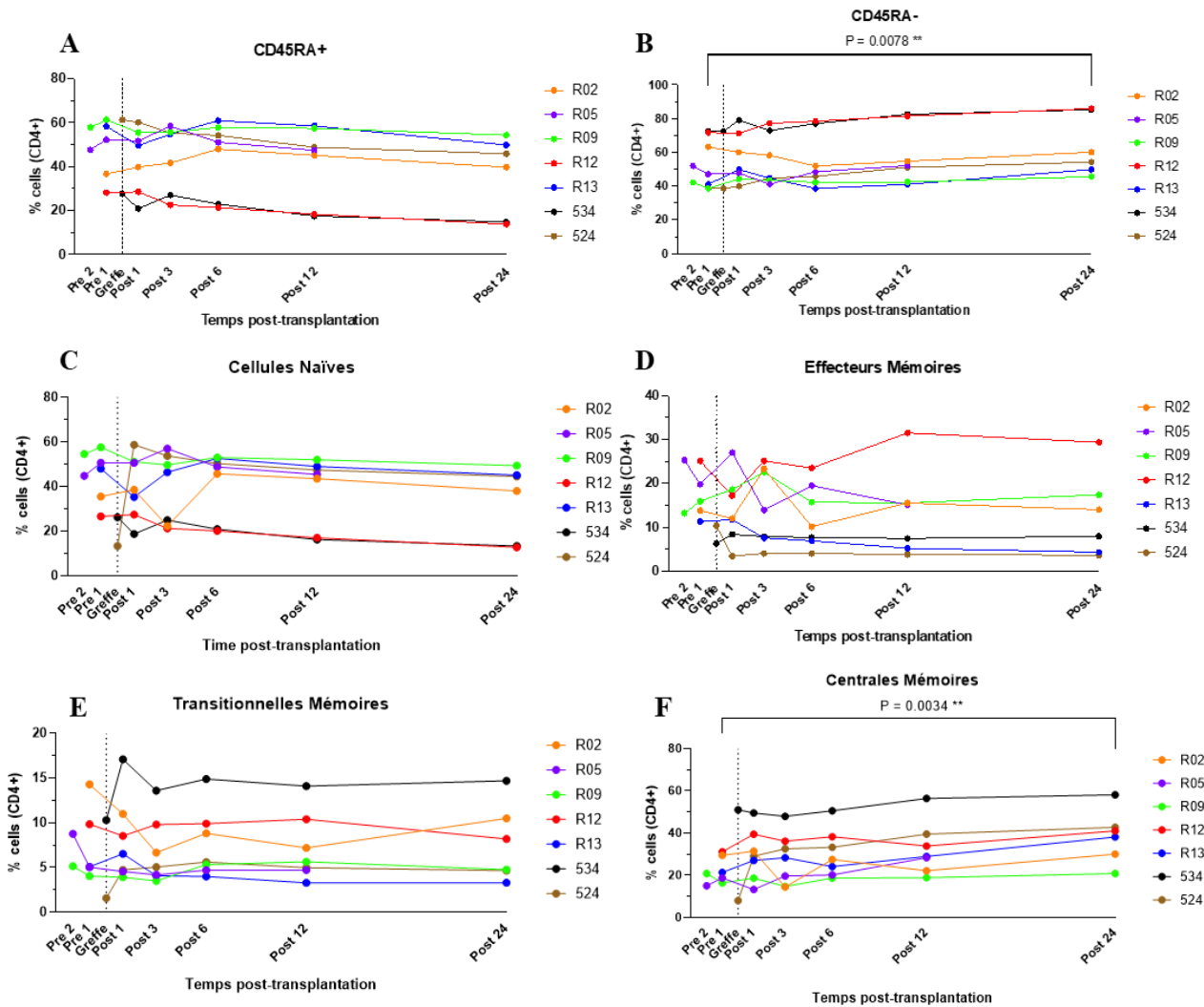
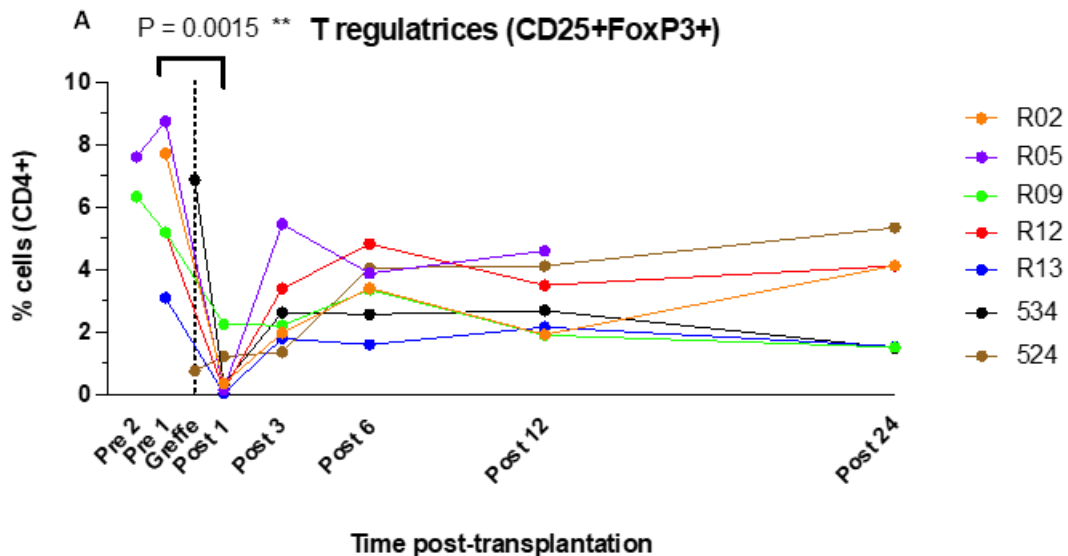


Figure 10. Fréquences des cellules CD45RA positive et négative et des sous-types cellulaires qui en découle.

Un marquage cellulaire a été réalisé sur les échantillons longitudinaux des 7 participants. (A) Fréquence de cellules exprimant le marqueur CD45RA. (B) Fréquence de cellules n'exprimant pas le marqueur CD45RA. (C) Fréquence de cellules naïves identifiées comme CD45RA+/CCR7+/CD27+. (D) Fréquence de cellules effectrice mémoires identifiées comme CD45RA-/CCR7-/CD27-. (E) Fréquence de cellules transitionnelles mémoires identifiées comme CD45RA-/CCR7-/CD27+. (F) Fréquence de cellules centrales mémoires identifiées comme CD45RA-/CCR7+/CD27+.

Afin de mesurer l'effet des immunosuppresseurs sur la fréquence des cellules T régulatrices (Tregs), nous avons mesuré la fréquence de lymphocytes T CD4+ exprimant les marqueurs Foxp3+ et CD25+. Nos résultats montrent une diminution drastique mais transitoire de la fréquence de cellules T régulatrices dans le premier mois qui suit la greffe ($p = 0.0015$ et fold change=0.48, Figure 11 A). Afin d'exclure la possibilité que le basiliximab (anticorps anti-CD25) lie encore le CD25 un mois après l'administration ce qui diminuerait la capacité à détecter les cellules T régulatrices, nous avons confirmé cette baisse des T régulatrices avec une diminution de cellules identifiées uniquement par l'expression de FoxP3 (Figure 11 B).

L'ensemble de ces expériences montrent que les traitements immunosuppresseurs induisent une diminution modeste et transitoire de l'activation et de la prolifération des cellules T CD4+ qui est accompagnée par une diminution drastique de la fréquence des Tregs et une augmentation de la fréquence des cellules centrales mémoires à long terme.



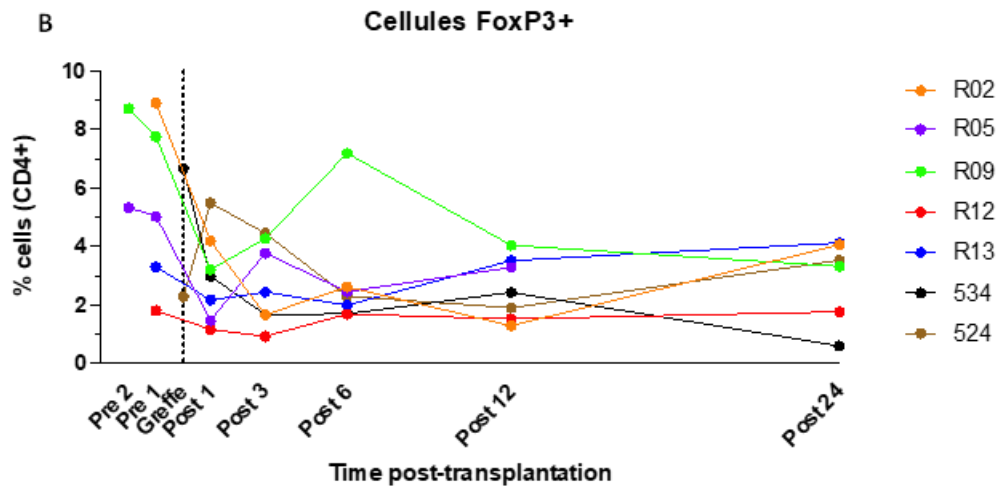


Figure 11. Fréquences des cellules T régulatrices et des LT CD4+ FoxP3+

Un marquage extracellulaire (CD25) et intranucléaire (FoxP3) a été réalisé sur les échantillons longitudinaux des 7 participants. (A) Fréquence de LT CD4+ exprimant les marqueurs CD25 et Foxp3 identifiés comme des cellules T régulatrices. (B) Fréquence de LT CD4+ exprimant le facteur de transcription Foxp3.

3.2. Impact des immunosuppresseurs sur les réservoirs du VIH

3.2.1. Mesures de l'ADN viral

Après avoir mesuré l'effet des immunosuppresseurs sur l'activation, la prolifération et la distribution des lymphocytes T CD4+, nous avons évalué leur impact sur les réservoirs du VIH. Une quantification de la taille du réservoir a été réalisée dans les échantillons longitudinaux des 7 participants en utilisant une PCR quantitative pour mesurer les quantités d'ADN total et intégré. Bien qu'aucune différence statistiquement significative ne soit notée, on note une diminution modeste et transitoire de la fréquence des cellules T CD4+ infectées après la transplantation chez la majorité des participants (n=4/7) (Figure 12A-B). Cette variation est moins évidente avec les mesures d'ADN viral intégré (Figure 12C-D).

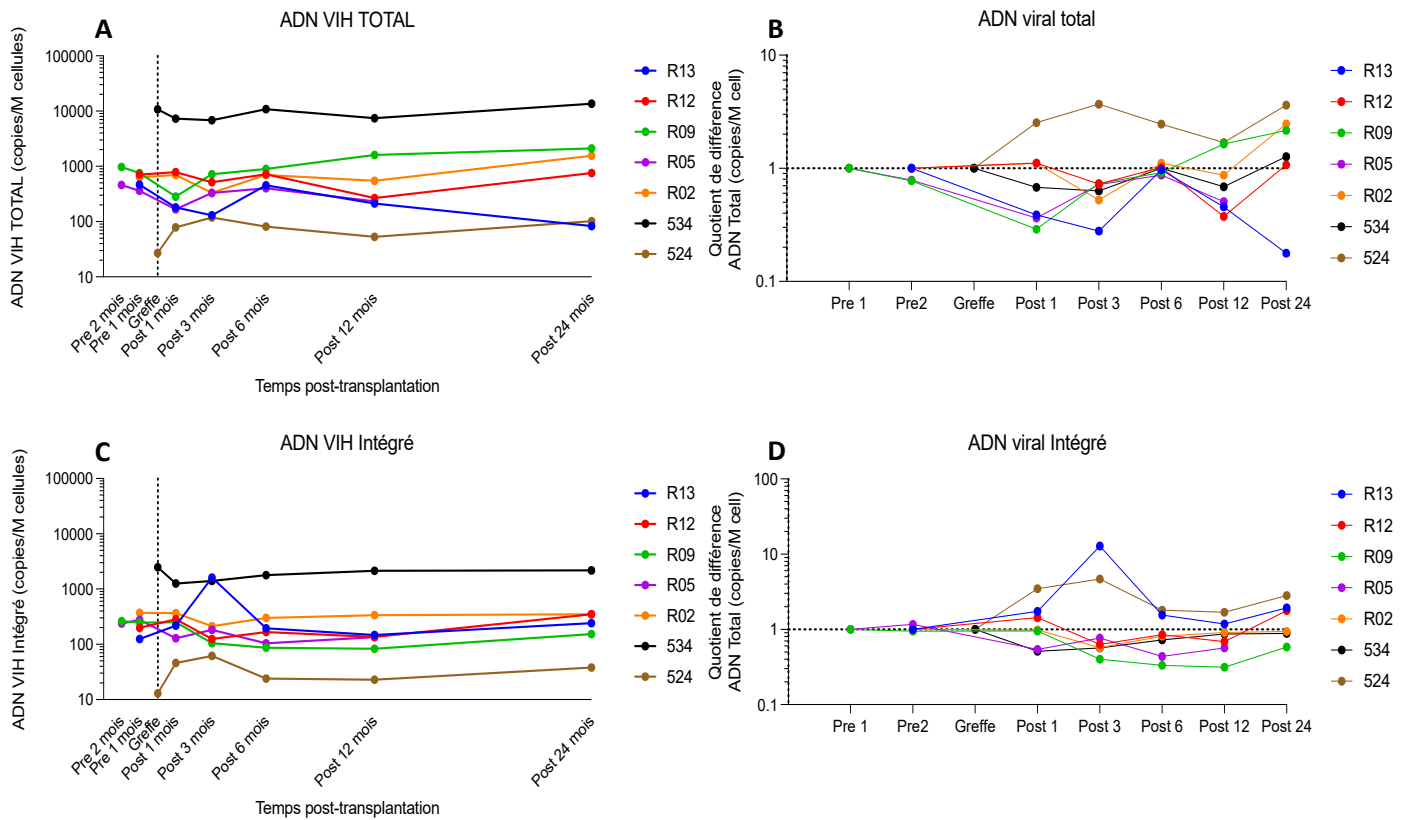


Figure 12. Quantification de l'ADN total et intégré chez les participants

L'ADN a été extrait par extraction double (ADN et ARN) puis le nombre de copies d'ADN viral total et intégré a été quantifié par PCR quantitative nichée. (A) Mesure de l'ADN total dans les échantillons longitudinaux des 7 participants. (B) Quotient de différence (fold change) des valeurs d'ADN total mesurées. (C) Mesure de l'ADN viral intégré au génome cellulaire dans les échantillons longitudinaux des 7 participants. (D) Quotient de différence (fold change) des valeurs d'ADN intégré mesurées.

3.2.2. Mesures de l'ARN viral

Afin de mesurer l'activité transcriptionnelle des réservoirs du VIH, nous avons également mesuré l'ARN viral (LTR-Gag) associé aux cellules. Ces mesures montrent une faible variation

des taux d'ARN viral associé aux cellules qui suivent la tendance observée avec l'ADN total, avec une diminution modeste et transitoire chez la majorité des participants dans les premiers mois suivants la greffe (Figure 13A-B). En calculant le ratio ARN/ADN, nous avons évalué l'activité transcriptionnelle du réservoir. Les résultats montrent une activité transcriptionnelle relativement stable au cours du temps, bien que des différences inter-individuelles soient notées (Figure 13C-D).

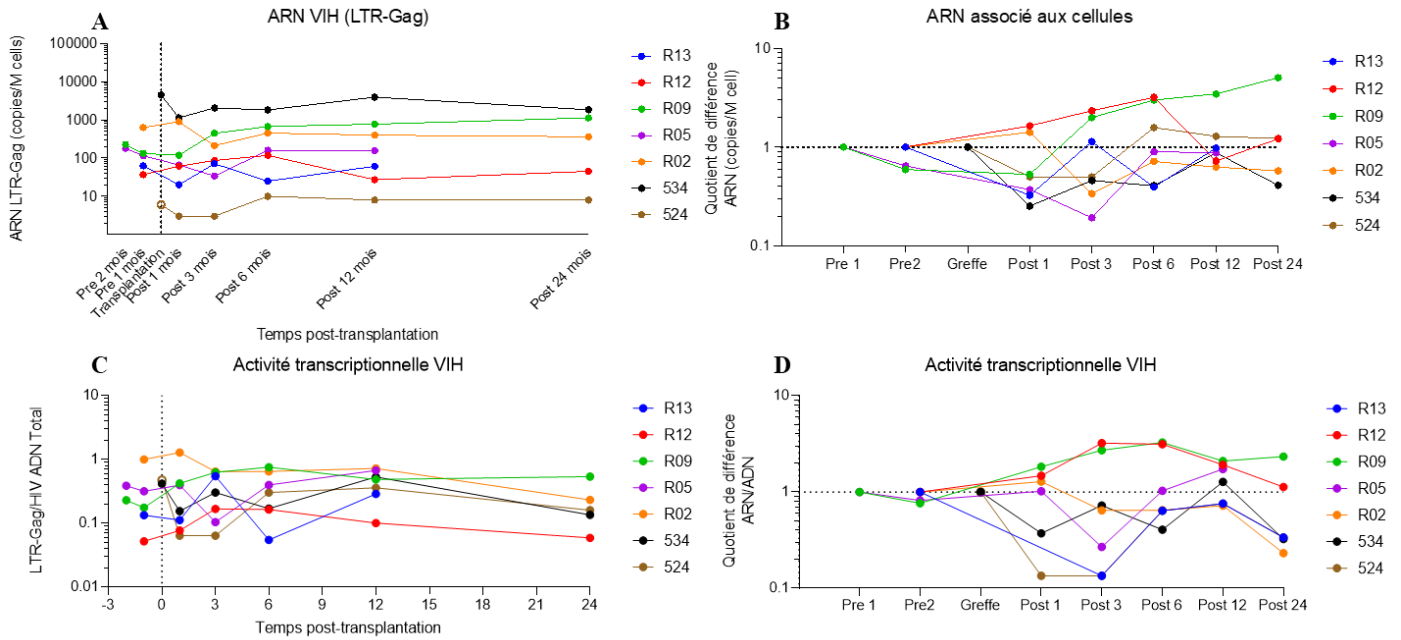


Figure 13. Quantification de l'ARN associé aux cellules et l'activité transcriptionnelle du virus chez les participants

L'ARN a été extrait par extraction double (ADN et ARN) puis il a été quantifié par PCR quantitative nichée couplé à une étape de rétrotranscription. (A) Mesure d'ARN associé aux cellules dans les échantillons longitudinaux des 7 participants. (B) Quotient de différence (fold change) des valeurs d'ARN mesurées. (C) Mesure de l'activité transcriptionnelle du virus (ARN/ADN) dans les échantillons longitudinaux des 7 participants. (D) Quotient de différence (fold change) des valeurs d'activité transcriptionnelle. Les cercles vides représentent la limite de détection des échantillons non quantifiables.

3.2.3. Mesures du réservoir fonctionnel

Nous avons ensuite évalué les effets des immunosuppresseurs sur le réservoir viral fonctionnel. Pour cela nous avons utilisé la technique du HIV-Flow élaborée dans laboratoire pour quantifier et phénotyper les cellules capables de produire la protéine virale p24 après 24h de stimulation par la PMA et la ionomycine (Pardons *et al.*, 2019).

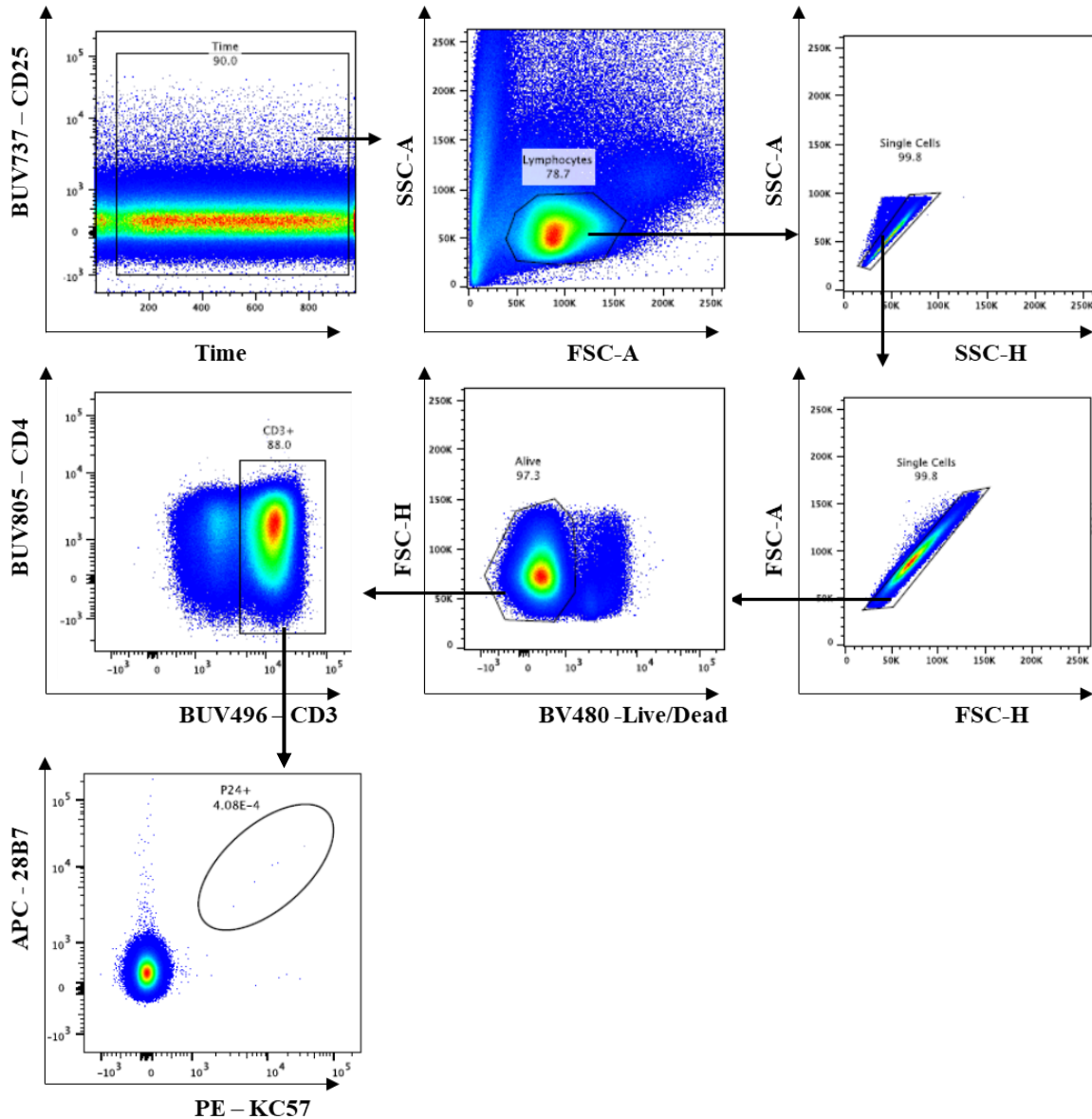


Figure 14. Stratégie d'identification des cellules p24+

Le HIV-Flow nécessite un nombre important de cellules et le nombre de cellules disponibles étant limité, des cellules p24+ n'ont pas été détectées dans plusieurs échantillons de notre

cohorte, ce qui a compliqué l'analyse longitudinale. Globalement, les fréquences de cellules p24+ montrent des variations dans le temps, mais sans tendance claire vers une augmentation ou une diminution à l'échelle de la cohorte (Figure 15). Chez le participant R09 qui porte la plus haute fréquence de cellules p24+, on note une diminution modeste de la fréquence de p24+ dans le mois qui suit la transplantation, de 261 à 200 cellules p24+/million de cellules T CD4+, avant que cette fréquence n'augmente à nouveau dans les mois qui suivent (Figure 15).

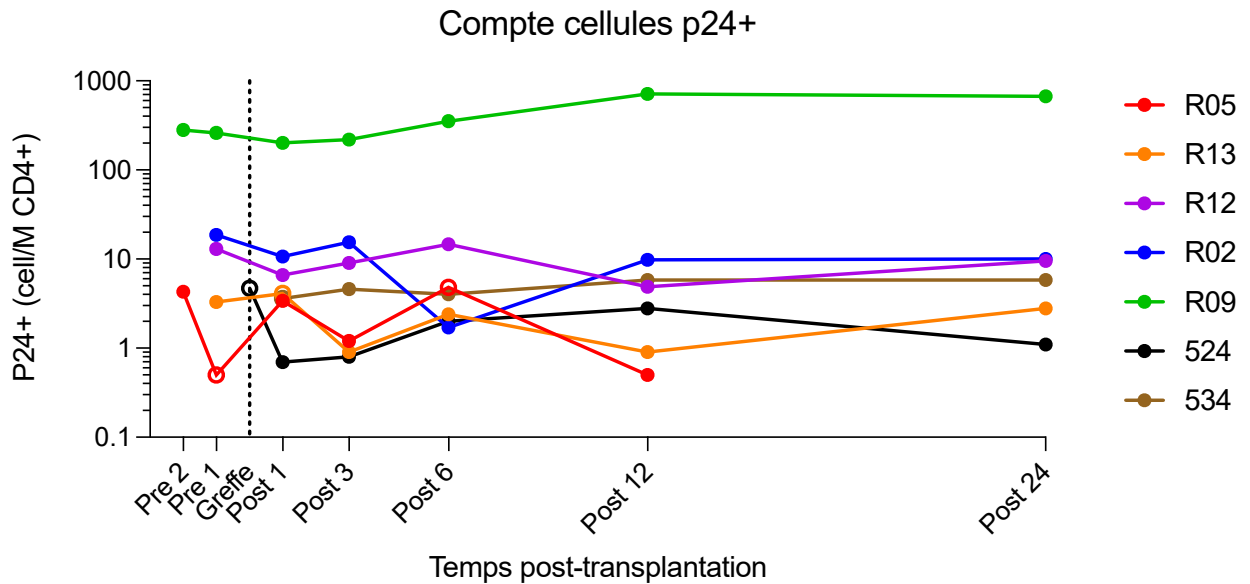
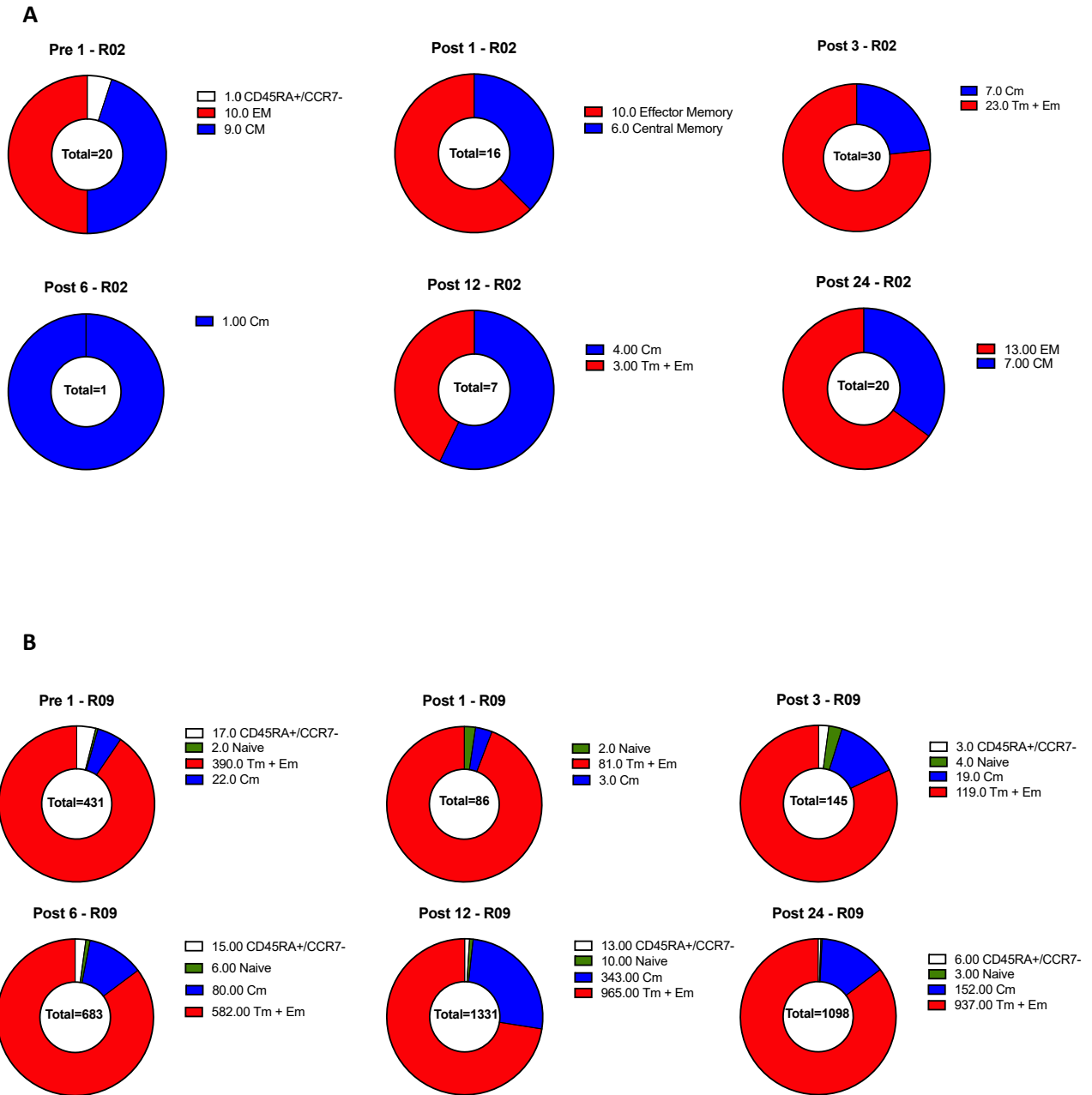


Figure 15. Quantification du réservoir fonctionnel chez les participants de la cohorte

La fréquence de cellules T CD4+ produisant la protéine virale p24 suite à une stimulation par PMA et ionomycine a été mesurée dans les échantillons longitudinaux des 7 participants. Les cercles vides représentent la limite de détection des échantillons dans lesquels des cellules p24+ n'ont pas été détectées.

Au-delà de la quantification des réservoirs fonctionnels, la technique de HIV-Flow permet également d'identifier les sous populations de cellules exprimant la p24. Pour ces analyses, seuls les donneurs pour lesquels la majorité des échantillons contenait au moins 5 cellules p24+ ont été inclus (participants R02, R09 et R12). Nos résultats montrent que le phénotype des cellules exprimant la p24 demeure relativement stable au cours du temps, avec l'immense majorité des cellules p24+ retrouvées au sein des cellules centrales et effectrices mémoires (Figure 16A-C).

Les autres sous populations de cellules T CD4+ (naïve ou en différenciation terminale) expriment rarement la protéine virale p24.



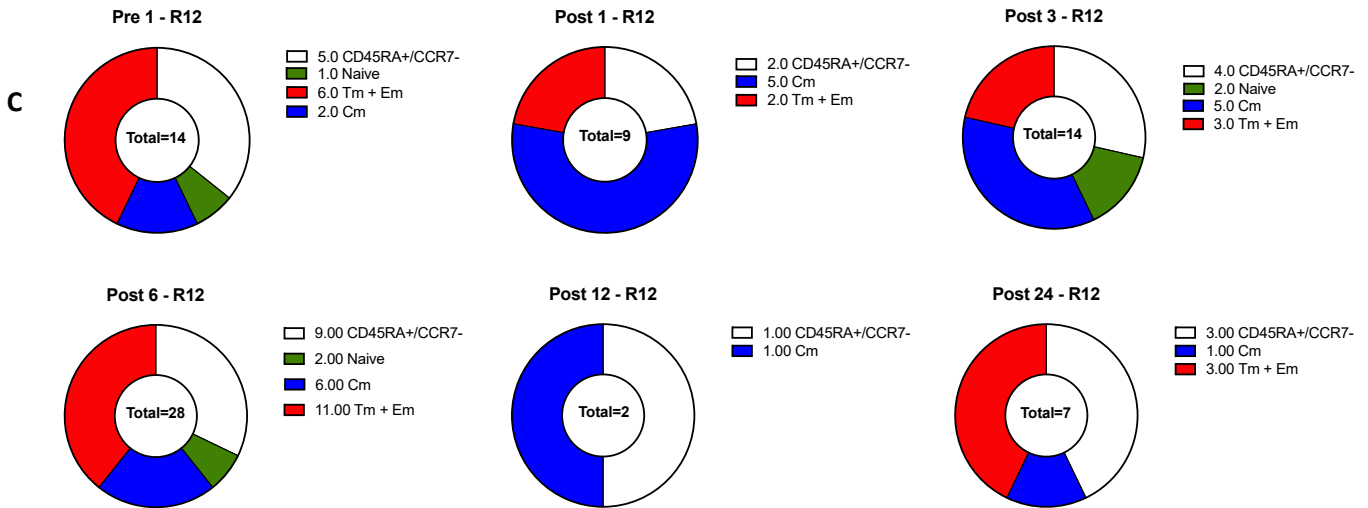


Figure 16. Phénotype des LT CD4+ exprimant la p24 chez 3 participants

Fréquence par million de cellules p24+/million obtenue lors des HIV-FLOW montrés dans la figure 13, seuls les donneurs avec une majorité d'échantillons contenant au moins 5 cellules p24+ ont été inclus dans cette analyse. (A) Phénotype des cellules p24+ chez les participants R02 (A), R09 (B) et R12 (C). Le nombre de cellules p24+ analysé est indiqué au centre de chaque cercle. Chaque fraction du cercle représente le pourcentage de cellules p24+ exprimant un phénotype donné au sein d'un échantillon.

Ces expériences montrent que le traitement immunosuppresseur induit une faible diminution des marqueurs viraux dans les premiers mois qui suivent la transplantation mais ces variations ne sont pas durables ou significatives. La fréquence ainsi que la distribution cellulaire du réservoir fonctionnel restent stables et inchangées après l'initiation du traitement immunosuppresseur.

3.3. Impact des immunosuppresseurs sur les niveaux d'anticorps anti-VIH

Toutes les mesures de réservoir décrites ci-dessus permettent d'analyser les variations du réservoir viral latent mais ne permettent pas de conclure quant à l'effet des immunosuppresseurs sur la production résiduelle de particules virales. En collaboration avec l'équipe du Dr Andrés Finzi, nous avons mesuré la variation de la réponse humorale anti-VIH, un marqueur associé à la production virale résiduelle après la prise du traitement immunosuppresseur. En utilisant le plasma des échantillons reçus des différents donneurs, l'équipe du Dr Finzi a mesuré les niveaux d'anticorps dirigé contre l'enveloppe du VIH totale (gp120) ou de son domaine interne (ID2) ainsi que les anticorps dirigés contre de domaine de liaison au récepteur (RBD) de la capsid des coronavirus (contrôle négatif) par la technique ELISA. Les mesures montrent une diminution dans les réponses anticorps anti-enveloppe du VIH ciblant la gp120 ou son domaine interne

(ID2) chez la majorité des participants (Figure 17 A-B). Toutefois, cette diminution n'est pas spécifique aux réponses anti-VIH, puisque les réponses contre le RBD des coronavirus sont également diminuées (Figure 17C).

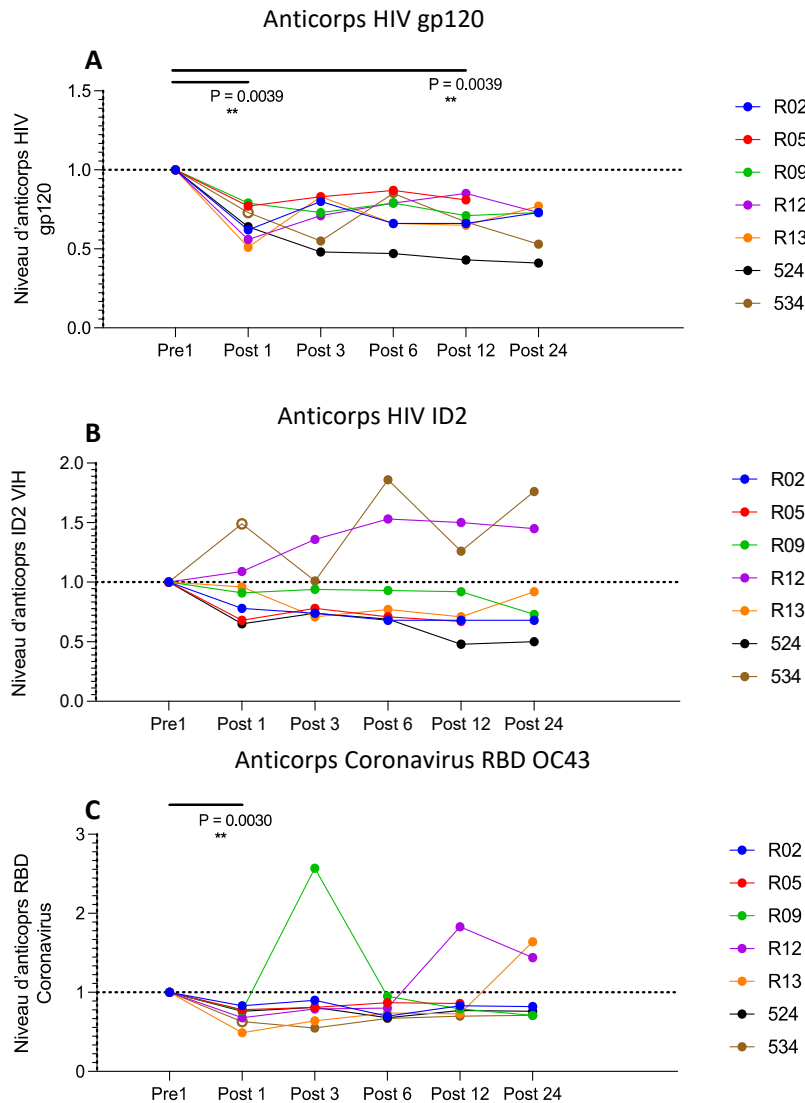


Figure 17. Quantification des anticorps anti-VIH et anti-coronavirus chez les différents participants

(A) Mesure des taux d'anticorps anti-enveloppe du VIH (gp120) dans les plasmas longitudinaux des 7 participants. (B) Mesure des taux d'anticorps anti-enveloppe du VIH (ID2) dans les plasmas longitudinaux des 7 participants. (C) Mesure des taux d'anticorps anti-RBD des coronavirus dans les plasmas longitudinaux des 7 participants. Les cercles vides représentent la limite de détection des échantillons non quantifiables.

3.4.Impact des immunosuppresseurs sur la prolifération du réservoir du VIH *in vitro*

Dans le but de confirmer les résultats obtenus dans l'étude *in vivo*, nous avons mis au point un modèle de culture cellulaire afin de mesurer l'effet des immunosuppresseurs sur le réservoir viral dans des cellules de personnes vivant avec le VIH mises en culture. Les cellules ont été stimulées par CD3/CD28 afin d'induire la prolifération des cellules réservoirs et les mesures de fréquence de cellules p24+, d'ADN et d'ARN viral ont été réalisées après six jours de culture en présence de trois immunosuppresseurs (MMF, tacrolimus et dasatinib). Deux doses de chaque molécule ont été déterminées dans des expériences préliminaires (non montrées) qui visaient à définir les concentrations d'immunosuppresseurs induisant une inhibition partielle ou complète de la prolifération des LT CD4+ en culture. Le contrôle négatif consiste en des cellules stimulées et cultivées sans immunosuppresseur

Ces expériences *in vitro* ont été réalisées avec des cellules T CD4+ isolées de 5 donneurs vivant avec le VIH et recevant une TAR efficace. Dans un premier temps, nous avons évalué l'inhibition de la prolifération induite par chaque molécule représentée pour un des donneurs dans la figure 18. Les pourcentages de prolifération des échantillons de tous les donneurs obtenus pour les deux doses testées sont présentés en annexe 1.

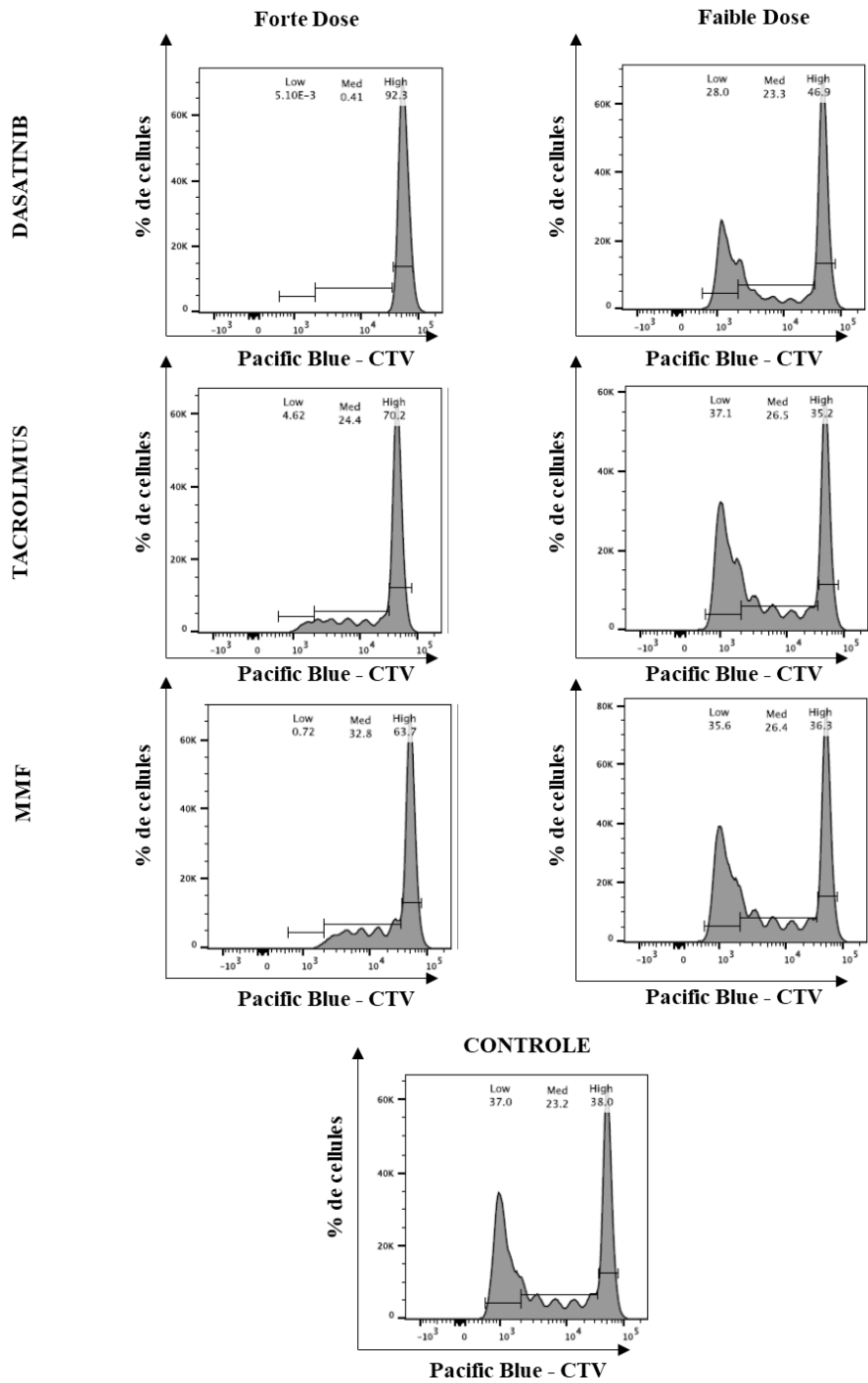


Figure 18. Histogramme de pourcentage de prolifération pour chaque immunosuppresseur utilisé en fonction de la dose

Afin de mesurer l'effet des immunosuppresseurs sur le réservoir total, nous avons mesuré la fréquence de cellules portant de l'ADN viral après six jours de culture. Les mesures d'ADN viral ont montré que la culture avec du MMF à faible dose (20 nM) induit une diminution de la fréquence de cellules contenant de l'ADN viral chez la majorité des donneurs (4/5), seul HIV29 montrant une augmentation de la fréquence de cellules infectées par le VIH (Figure 19A). En présence de la dose plus élevée de MMF (400 nM) on note de plus hauts niveaux d'ADN viral qu'avec la dose faible pour trois des cinq donneurs (Figure 19A). Enfin, pour trois des cinq échantillons testés, l'exposition des cellules au MMF (que la dose soit forte ou faible) induit une baisse de la fréquence de cellules infectées mesurées comparé au contrôle sans médicament.

La faible dose de tacrolimus (0.12 nM) induit une diminution de la fréquence de cellules infectées dans la majorité des échantillons (n=3/5) (Figure 19B). Toutefois, la forte dose de tacrolimus (5 nM) résulte en une augmentation de la fréquence de cellules infectées dans 3 des 5 échantillons par rapport au contrôle sans immunosuppresseur (Figure 19B).

Enfin la présence de dasatinib à faible dose (1.25 nM) a induit une diminution de la fréquence des cellules infectées détectées dans 4 échantillons, alors que la dose plus élevée (50nM) réduit ce nombre à trois, avec les cellules de HIV20 qui voient leur fréquence d'infection augmenter et dépasser le niveau du contrôle (Figure 19C).

Ainsi, les immunosuppresseurs utilisés à faible dose semblent induire une diminution de la fréquence des cellules portant de l'ADN viral dans la majorité des échantillons testés.

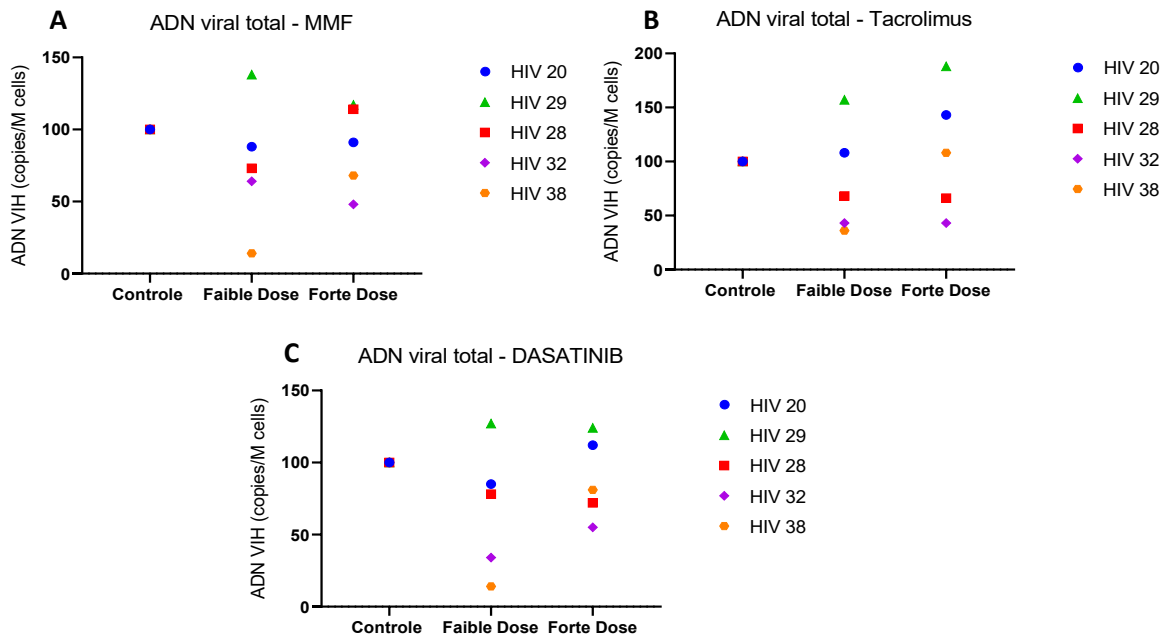


Figure 19. Quantification de l'ADN viral après 6 jours de culture avec différents immunosuppresseurs

L'ADN total a été extrait par extraction double (ADN et ARN) puis il a été quantifié par PCR quantitative nichée. Pour chaque donneur, toutes les valeurs ont été normalisées (contrôle sans immunosuppresseur = 100%). Mesures des niveaux d'ADN du VIH par million de cellules après culture en présence de (A) MMF, (B) tacrolimus et (C) dasatinib.

Pour évaluer l'effet des 3 immunosuppresseurs sur l'activité transcriptionnelle du réservoir *in vitro*, nous avons mesuré l'ARN du VIH associé aux cellules dans toutes les conditions de culture et grâce aux mesures d'ADN nous avons obtenu l'activité transcriptionnelle du virus (ARN/ADN). L'exposition à une faible dose de MMF (20 nM) induit une diminution de l'activité transcriptionnelle virale chez la majorité des donneurs (3/5) (Figure 20A). Toutefois, la forte dose de MMF (400 nM) en culture induit une augmentation de cette activité chez trois des cinq donneurs comparés au contrôle (Figure 20A). La faible dose de tacrolimus (0.12 nM) induit une augmentation de l'activité transcriptionnelle virale chez trois donneurs, alors que la dose élevée (5 nM) induit une diminution marquée de cette fréquence dans 4 des 5 échantillons testés (Figure 20B). Enfin la faible dose de dasatinib (1.25 nM) induit une diminution de cette activité virale chez la majorité des donneurs (n=3/5), alors que la dose plus élevée (50 nM) réduit ce marqueur viral chez seulement un échantillon (Figure 20C).

En accord avec les autres mesures de la persistance du VIH, nos résultats indiquent que les faibles doses d'immunosuppresseurs, particulièrement le MMF et le dasatinib, induisent une diminution de l'activité transcriptionnelle du virus dans la majorité des échantillons testés.

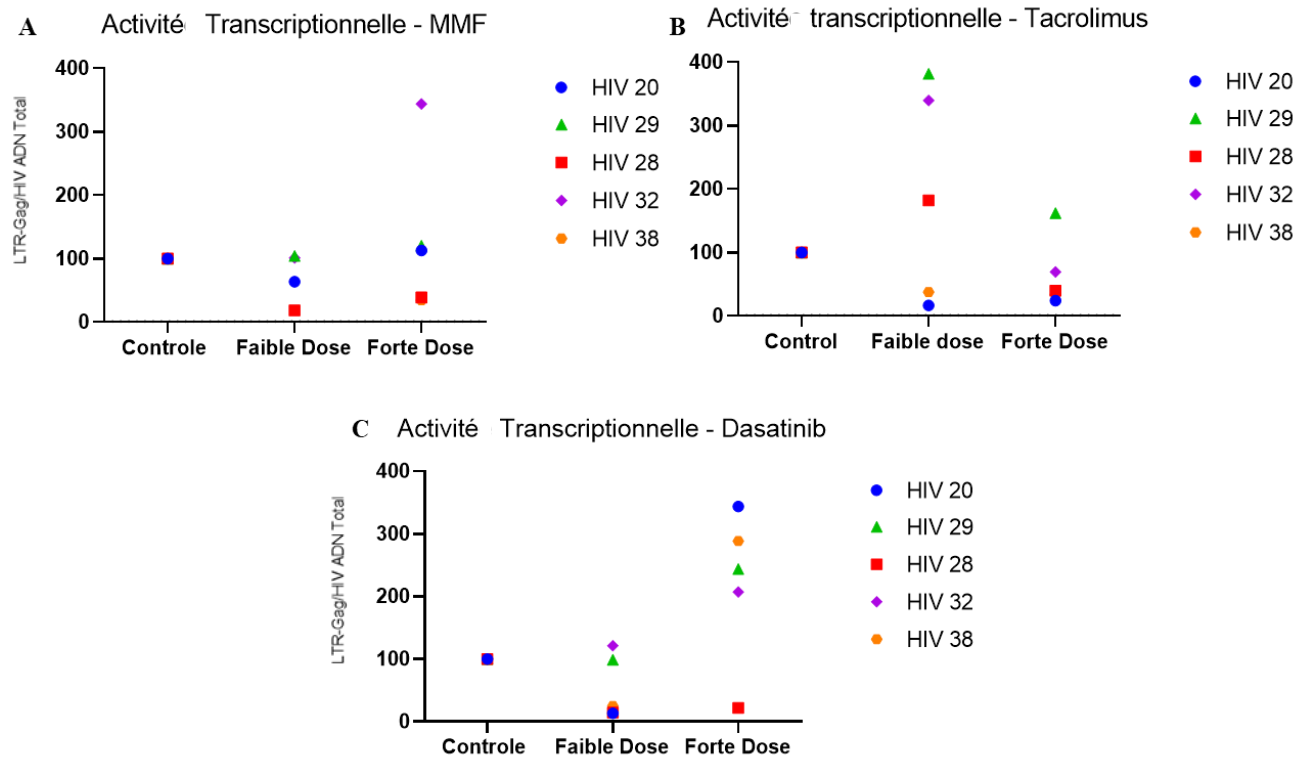


Figure 20. Évaluation de l'activité transcriptionnel viral après 6 jours de culture avec différents immunosuppresseurs

L'ARN associé aux cellules a été extrait par extraction double (ADN et ARN) puis a été quantifié par PCR quantitative nichée couplée à une étape de rétrotranscription. Pour chaque donneur, Les valeurs d'ARN/M de copies ont été divisé par les valeurs d'ADN total/M de copies et le résultat est représenté sur l'axe des ordonnées pour les trois . Mesures de l'activité transcriptionnelle du VIH après culture en présence de (A) MMF, (B) tacrolimus et (C) dasatinib.

Pour mesurer l'impact des immunosuppresseurs sur le réservoir fonctionnel, nous avons mesuré la fréquence de cellules p24+ par la technique de HIV-Flow après stimulation PMA/ionomycine dans chaque condition de culture. La mise en culture des LT CD4+ de donneurs vivant avec le VIH sous TAR avec la faible dose de MMF (20 nM) a induit une diminution de la fréquence des cellules p24+ dans les échantillons des 5 donneurs (Figure 21A). La dose plus élevée de MMF (200 nM) a également induit une diminution de la fréquence des cellules p24+ dans la majorité des échantillons (n=4/5).

La présence d'une faible dose de tacrolimus (0.12 nM) a induit une diminution de la fréquence de cellules p24+ chez deux donneurs. Toutefois, la dose plus élevée (5 nM) a induit une diminution de cette fréquence dans les LT CD4+ du donneur HIV32 et a fortement augmenté cette fréquence dans les cellules du donneur HIV28, qui étaient tous deux très peu affectés par la faible dose (Figure 21B).

Enfin une faible dose de dasatinib (1.25 nM) a induit une diminution de la fréquence de p24+ chez quatre des cinq donneurs, alors que la dose plus élevée (50 nM) a induit une augmentation de cette fréquence chez deux de ces quatre donneurs (Figure 21C).

Globalement nos résultats montrent qu'une inhibition partielle de la prolifération par les immunosuppresseurs tend à diminuer la fréquence des cellules p24 après 6 jours de culture dans la majorité des échantillons testés.

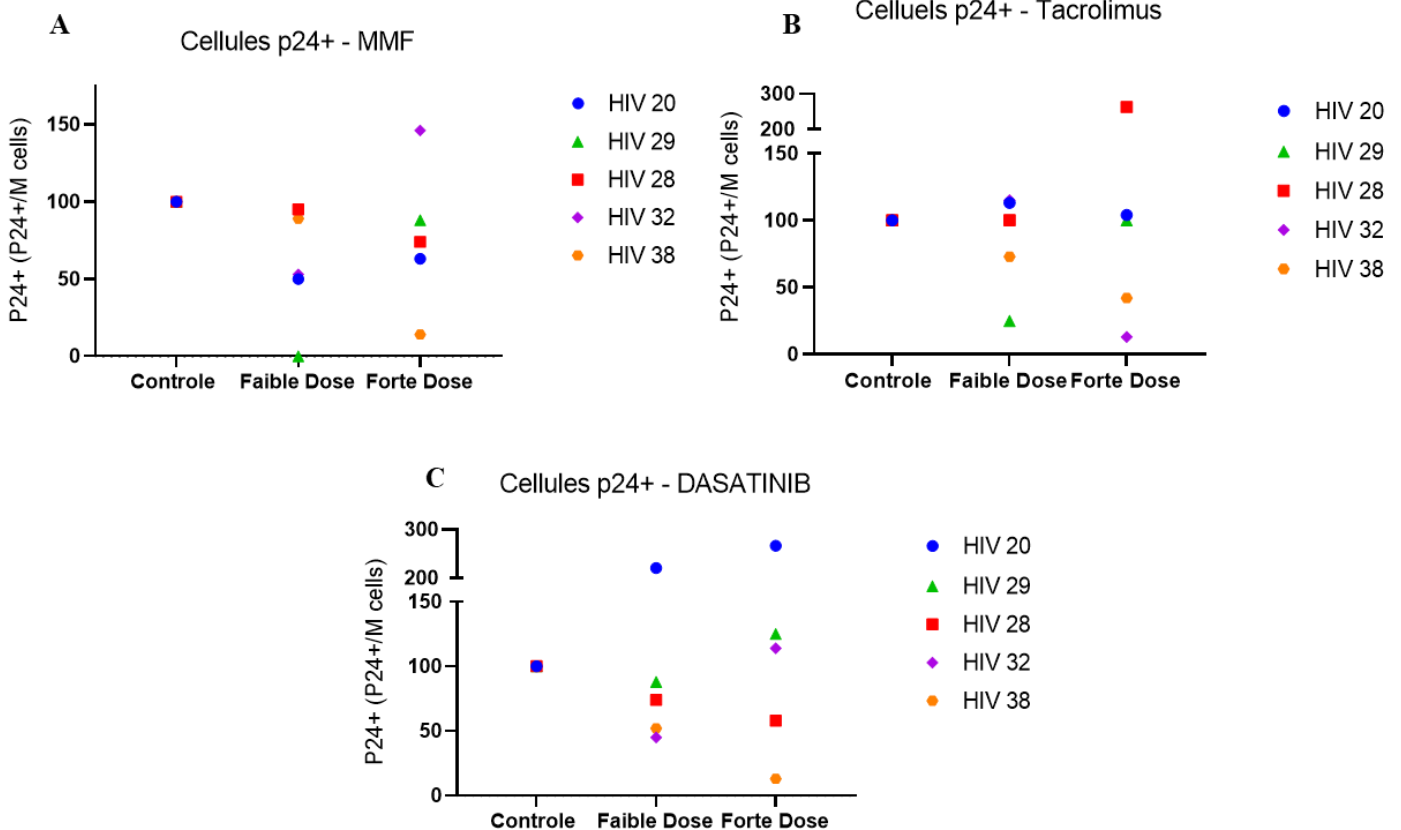


Figure 21. Quantification de cellules p24+ après 6 jours de prolifération en présence de différents immunosuppresseurs

La fréquence de cellules p24+ a été mesurée par HIV-Flow dans les échantillons de 5 donneurs après 6 jours de culture en présence de différents immunosuppresseurs. Pour chaque donneur, toutes les valeurs ont été normalisées (contrôle sans immunosuppresseur = 100%). Mesures des fréquences de cellules p24+ après culture en présence de (A) MMF, (B) tacrolimus et (C) dasatinib.

Les immunosuppresseurs utilisés à faible dose semblent induire une diminution de la fréquence des cellules portant de l'ADN viral, une diminution de l'activité transcriptionnelle du virus et une diminution de la fréquence des cellules p24 après 6 jours de culture dans la majorité des échantillons testés. Les fortes doses d'immunosuppresseurs, quant à elles, induisent des augmentations des différents marqueurs du réservoir viral au terme de la culture.

4. Discussion

La TAR ne permet pas à la guérison de l'infection par le VIH. Le virus ne disparaît pas et persiste dans des réservoirs latents qui sont la source du rebond viral lors de l'arrêt du traitement (Chun *et al.*, 1997; Finzi *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 1997). Le VIH persiste dans des réservoirs latents grâce à la prolifération cellulaire qui peut être induite par l'antigène ou d'origine homéostatique, et qui permet au réservoir viral de se maintenir sans réactivation du virus (Gantner *et al.*, 2020; Mendoza *et al.*, 2020; Simonetti *et al.*, 2021 ; Wang *et al.*, 2018). Le but de ce projet était d'évaluer si une inhibition de la prolifération cellulaire via la prise d'immunosuppresseurs pouvait avoir un impact sur la persistance des réservoirs du VIH.

Après une transplantation rénale, les patients greffés reçoivent un traitement immunosuppresseur qui inhibe l'activation et la prolifération des cellules immunitaires afin de prévenir le rejet de greffe. Cette combinaison de molécules est souvent similaire d'un greffé à un autre, avec l'administration d'un antiprolifératif comme le mycophénolate, d'un inhibiteur de l'activation cellulaire comme les anti-calcineurines, de la prednisone pour inhiber la production de cytokines et du basiliximab (anti-CD25) pour inhiber l'activation des cellules T.

Ces traitements ayant pour but d'inhiber l'activation et prolifération des lymphocytes T, notre démarche a visé à mesurer l'impact de ces traitements sur la taille des réservoirs du VIH qui dépendent de la prolifération cellulaire pour se renouveler.

4.1.L'impact mesurable des immunosuppresseurs sur les sous populations de lymphocytes T CD4+ in vivo

Nous avons tout d'abord évalué l'impact des immunosuppresseurs sur la sous population de lymphocytes T CD4+. Les mesures par cytométrie en flux ont montré des diminutions significatives de la fréquence de cellules T CD4+ exprimant HLA-DR et Ki67, des marqueurs de prolifération et d'activation, respectivement. Ces résultats sont attendus et confirment les effets immunosuppresseurs des traitements reçus par les patients greffés (Shipkova M *et al.*, 2012).

De manière intéressante, nous avons observé de fortes variations donneurs-dépendantes dans la fréquence de sous-types mémoires CD4+, notamment celles des mémoires transitionnelles et effectrices après la prise d'immunosuppresseurs. Toutefois, la seule tendance significative

observée chez tous les donneurs est une augmentation de la fréquence des cellules mémoires centrales. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les cellules mémoires centrales sont moins dépendantes de la prolifération que les cellules plus différenciées pour leur maintien homéostatique puisque leur niveau de prolifération est moins élevé en condition basale (Vandergeeten *et al.*, 2013). Ainsi, les traitements immunosuppresseurs pourraient préférentiellement empêcher l'auto-renouvellement des cellules mémoires transitionnelles et effectrices, ce qui se traduirait par une augmentation de la fréquence relative des cellules mémoires centrales.

Le résultat le plus marqué sur les sous-types cellulaires est la chute drastique de la fréquence des cellules T régulatrices dans le mois qui suit la transplantation. Cette diminution importante, confirmée par une baisse similaire des fréquences de cellules exprimant uniquement FoxP3, semble contre-intuitive pour des personnes recevant une transplantation d'organe, chez lesquelles le besoin d'inhiber les réponses immunitaires est primordial. En effet, les cellules T régulatrices ont un rôle important dans la lutte contre le rejet en prévenant l'activation et l'expansion des cellules T effectrices impliqué dans le rejet cellulaire, mais elles peuvent aussi induire la mort des cellules B et ainsi lutter contre le rejet humoral (Ma *et al.*, 2008, Walsh *et al.* 2004, Wood *et al.*, 2003). Puisqu'elles jouent un rôle important dans la tolérance du nouvel organe par l'hôte, cette diminution de la fréquence des cellules T régulatrice pourrait être néfaste pour les personnes transplantées et augmenter le rejet (Dummer *et al.*, 2012). Toutefois, cette diminution de la fréquence des cellules T régulatrices est limitée au premier mois qui suit la transplantation, puis se normalise dans les mois qui suivent, ce qui indique que cette déplétion est transitoire. Le basiliximab, un anticorps anti-CD25, est le seul traitement administré uniquement dans les jours qui suivent la greffe : les patients reçoivent deux doses de cet anticorps aux jours 0 et 4 suivant la greffe, alors que les autres immunosuppresseurs sont donnés continuellement à la suite de la transplantation. Il a récemment été montré que le basiliximab altère le nombre et les fonctions des cellules T régulatrices, notamment leur capacité à sécréter de l'IL-10 *in vitro*. Une diminution de la fréquence des T régulatrices a été observée chez des enfants transplantés du cœur et traités avec du basiliximab aux jours 0 et 4 (Lopez-Abente *et al.*, 2021). Les cellules T régulatrices ont un fort besoin d'IL-2 comparé aux autres sous-types cellulaires, et le blocage du récepteur de la cytokine pourrait expliquer cet effet très marqué sur cette population. Avec seulement deux doses, le basiliximab peut être retrouvé plus de 40 jours

après les injections, ce qui permettrait de maintenir une faible fréquence des T régulatrices même après 1 mois (Nagai *et al.*, 2010). Les mécanismes causant la déplétion des T régulatrices par le basiliximab restent incertains. Des études supplémentaires seront nécessaires pour identifier ces mécanismes et potentiellement réévaluer l'apport thérapeutique du basiliximab dans un contexte de transplantation d'organe.

4.2.Faible impact des immunosuppresseurs sur les marqueurs du réservoir viral in vivo

De manière générale, les mesures de l'ADN total et intégré n'ont révélé aucune tendance marquée commune aux 7 participants de l'étude. Toutefois, de faibles diminutions dans la fréquence de cellules infectées sont observable chez la majorité des participants (4/7) dans le mois qui suit la transplantation (Figure 12), bien que cette diminution modeste et transitoire ne soit pas statistiquement significative. De plus, l'activité transcriptionnelle du réservoir viral ne montre aucun changement majeur ou durable causé par les immunosuppresseurs. Enfin, nos résultats montrent très peu de variation dans le nombre de cellules p24+ mesuré (Figure 15) après l'initiation de l'immunosuppression et une distribution cellulaire stable de celles-ci (Figure 16).

Même si le faible nombre de cellules disponibles pour le HIV-Flow a limité la précision de nos mesures, l'ensemble de nos résultats concernant les mesures de la taille du réservoir sont cohérents : L'administration d'immunosuppresseurs chez les 7 participants de cette étude n'a pas affecté la taille des réservoirs du VIH de manière marquée. Cette absence d'effet pourrait être expliqué par le dosage des immunosuppresseurs administrés aux participants. En effet, les données cliniques (non montrées) indiquent que les dosages des immunosuppresseurs varient grandement durant les deux années qui suivent la transplantation, afin d'atteindre un niveau d'immunosuppression suffisant pour contrer le rejet de greffe sans que cela ne devienne inconfortable ou dangereux pour le patient. Cette variation dans les dosages (concentrations qui peuvent aller du simple au double pendant plusieurs mois) pourrait nuire à l'inhibition continue de la prolifération et permettre aux cellules infectées de se maintenir lors de niveau faible d'immunosuppression.

Au-delà de ces variations dans les concentrations des immunosuppresseurs, il est clair que même les concentrations les plus élevées administrées aux participants de cette étude n'étaient pas suffisantes pour inhiber entièrement l'activation et la prolifération des cellules infectées. Bien que nous ayons observé une immunosuppression marquée chez les 7 participants, notamment une diminution de la réponse humorale avec une réduction des taux d'anticorps retrouvé dans le plasma des donneurs ainsi qu'une baisse d'expression de marqueurs d'activation et de prolifération des cellules T CD4+ (Figure 9), cette diminution demeure incomplète. Ainsi, même les doses maximales données aux patients de cette cohorte n'ont pas entièrement inhibé la prolifération des lymphocytes T CD4+. Ceci s'explique très probablement par le fait que les immunosuppresseurs inhibent la prolifération induite par l'antigène de manière efficace (signaux 1, 2 et 3), mais faiblement la prolifération homéostatique, qui est pourtant un contributeur majeur à la persistance des réservoirs du VIH (Chomont *et al.*, 2009, Seddon, Tomlinson, & Zamoyska, 2003). Il est également important de souligner que la longue demi-vie des cellules mémoires infectées est également un contributeur important au maintien du réservoir viral qui n'est pas ciblé par les immunosuppresseurs, même lors de phases d'immunosuppression élevée (Crooks *et al.*, 2015; Finzi *et al.*, 1999; Siliciano *et al.*, 2003).

Une dernière explication pour expliquer l'absence d'effet marqué sur les réservoirs du VIH pourrait être due à la durée du traitement immunosuppresseur. Dans le cadre de cette étude, le dernier échantillon que nous ayons analysé correspond à 2 ans de traitement immunosuppresseur. Il est possible que l'immunosuppression n'ait pas d'impact immédiat sur la taille des réservoirs du VIH mais que des effets mesurables apparaissent après plusieurs années. Dans ce contexte, il serait intéressant de quantifier la taille du réservoir chez ces mêmes participants 5 ou 10 ans après la greffe afin d'évaluer l'effet à long terme des immunosuppresseurs sur les réservoirs du VIH.

Une limite importante de notre étude est le faible nombre de participants, ce qui diminue notre capacité à observer des différences statistiquement significatives. Ainsi, la question de l'impact des immunosuppresseurs sur les réservoirs du VIH nécessitera de plus amples travaux dans le futur. Bien qu'une étude incluant davantage de participants, des doses plus élevées et un traitement plus long avec les immunosuppresseurs soit souhaitable, force est de constater que les combinaisons d'immunosuppresseurs prescrits actuellement pour empêcher le rejet de greffe

avec une excellente efficacité clinique n'affectent pas durablement les réservoirs du VIH. Nos résultats suggèrent que les forces homéostatiques responsables de la persistance des réservoirs du VIH sont difficiles à contrecarrer et suggèrent que des molécules ciblant spécifiquement la prolifération homéostatique comme les anti-IL-7 (Akkapeddi *et al.*, 2019) pourraient avoir un effet plus marqué.

4.3.Effet des immunosuppresseurs sur les réservoirs ex vivo

L'étude clinique ayant montré l'absence d'un effet marqué des immunosuppresseurs sur le réservoir viral des participants, nous avons créé un modèle expérimental contrôlé afin d'évaluer l'effet direct des immunosuppresseurs sur les cellules infectées issues de personnes vivant avec le VIH et mises en culture. Après seulement six jours de culture et une stimulation PMA/ionomycine, des variations dans le nombre de cellules infectées ont pu être observé et les immunosuppresseurs ont montré des effets dépendants de la dose et de l'échantillon considéré. De manière intéressante, le MMF en faible dose a conduit à une diminution du nombre de cellules p24+ ainsi qu'à une réduction de la fréquence de cellules contenant de l'ADN et ARN viral dans les cellules provenant de la majorité des participants. De manière similaire, les faibles doses de tacrolimus et de dasatinib ont entraîné une diminution de la plupart des marqueurs de réservoir dans la majorité des échantillons testés. Ceci montre que les immunosuppresseurs ont la capacité d'inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4+ lorsqu'ils sont préalablement stimulés avec du CD3/CD28. Toutefois, nous avons observé que les doses plus élevées d'immunosuppresseurs ont induit une augmentation de la fréquence de cellules infectées chez la majorité des participants. Ces résultats sont surprenants, surtout qu'ils concernent tous les marqueurs viraux (p24+, ADN et ARN), mais pas nécessairement pour les mêmes donneurs. Ceci confirme les effets donneurs-dépendants de ces molécules et montre la variabilité de leurs effets. D'autre part, il est possible que des doses plus élevées des immunosuppresseurs soient toxiques pour certaines sous populations de cellules T CD4+, particulièrement celles qui sont peu enrichies en réservoir, ce qui expliquerait une augmentation relative de la fréquence des cellules infectées. Des études plus approfondies seront nécessaires pour comprendre ces effets dose-dépendants et pour identifier les participants qui seraient plus à même de voir un effet bénéfique des immunosuppresseurs sur la taille des réservoirs du VIH.

5. Conclusions et perspectives

Le but de ce projet était de montrer l'effet des immunosuppresseurs sur les réservoirs du VIH. Nous avons montré que les immunosuppresseurs induisent une diminution marquée mais transitoire de l'activation et de la prolifération des lymphocytes T CD4+, avec une augmentation significative des cellules T CD4+ centrales mémoires au cours des deux ans après la prise des immunosuppresseurs et une chute drastique des cellules T régulatrices dans le mois qui suit la transplantation. Nous avons aussi montré que le traitement immunosuppresseur induit une faible diminution des marqueurs viraux dans les premiers mois qui suivent la transplantation et que ces variations ne sont pas durables.

Nos résultats indiquent que les combinaisons d'immunosuppresseurs utilisés chez les greffés du rein sont insuffisantes pour affecter profondément et durablement le réservoir du VIH et suggèrent que la taille du réservoir est étroitement régulée par des forces homéostatiques difficiles à contrer.

Pour aller plus loin il serait intéressant de tester l'effet d'autres immunosuppresseurs sur les réservoirs VIH. En effet, l'idée de perturber le réservoir viral en ciblant un mécanisme qui le maintient à beaucoup de potentiel et d'autres avenues pourraient être testées pour induire un effet plus marqué. Le basiliximab a montré un fort impact sur les sous populations cellulaires dans les premiers mois et les seuls effets observés sur le réservoir étaient également mesurés dans les premiers mois suivant la transplantation. Il serait intéressant d'élaborer un protocole de culture cellulaire similaire à celui présenté précédemment (Résultats 2.9) avec du basiliximab comme immunosuppresseur pour observer son impact direct sur les réservoirs VIH.

Dans la continuité des expériences de cultures cellulaires avec les immunosuppresseurs, il serait pertinent de tester des combinaisons d'immunosuppresseurs pour évaluer un potentiel effet synergique des différentes molécules. Il serait également intéressant de tester d'autres méthodes de stimulation comme l'IL-7, et des temps de culture plus long, qui nous permettrait d'évaluer l'impact des immunosuppresseurs sur la prolifération homéostatique.

Bien que nos résultats obtenus sur un faible nombre de participants montrent un effet modeste des immunosuppresseurs sur les réservoirs viraux, cette stratégie pourrait être améliorée. Il est possible que l'inhibition partielle de l'activation et la prolifération obtenue par le dosage des immunosuppresseurs donnés aux transplantés n'était pas suffisante pour véritablement impacter le réservoir. Néanmoins, nos résultats suggèrent que le réservoir viral est bien plus stable qu'on ne le pensait et que d'autres mécanismes encore inconnus pourrait contribuer à sa stabilité et permettre le maintien de sa taille. Ainsi, le réservoir du VIH pourrait avoir sa propre homéostasie et il est primordial de poursuivre les recherches visant à identifier les mécanismes par lesquels il se maintient afin de mettre au point des stratégies pour l'éliminer.

Références bibliographiques

- Abbar B, Baron M, Katlama C, *et al.* Immune checkpoint inhibitors in people living with HIV: what about anti-HIV effects? *AIDS* 2020 ; 34(2) : 167-75.
- Abrahams, M. R., Joseph, S. B., Garrett, N., Tyers, L., Moeser, M., Archin, N., . . . Swanstrom, R. (2019). The replication-competent HIV-1 latent reservoir is primarily established near the time of therapy initiation. *Sci Transl Med*, 11(513). doi:10.1126/scitranslmed.aaw5589
- Akkapeddi, P., Fragoso, R., Hixon, J.A. *et al.* A fully human anti-IL-7R α antibody promotes antitumor activity against T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 33, 2155–2168 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0434-8>
- Arts, E J, et M A Wainberg. 1996. « Mechanisms of Nucleoside Analog Antiviral Activity and Resistance during Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcription. » *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40 (3): 527-40. <https://doi.org/10.1128/AAC.40.3.527>.
- Arts, E. J., et D. J. Hazuda. 2012. « HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (4): a007161-a007161. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007161>.
- Autran, B., G. Carcelain, T. S. Li, C. Blanc, D. Mathez, R. Tubiana, C. Katlama, P. Debré, et J. Leibowitch. 1997. « Positive Effects of Combined Antiretroviral Therapy on CD4 + T Cell Homeostasis and Function in Advanced HIV Disease ». *Science* 277 (5322): 112-16. <https://doi.org/10.1126/science.277.5322.112>.
- Bacchus-Souffan C, Fitch M, Symons J, Abdel-Mohsen M, Reeves DB, Hoh R *et al.* Relationship between CD4 T cell turnover, cellular differentiation and HIV persistence during ART. *PLoS Pathog.* 2021;17(1):e1009214.
- Banga R, Procopio FA, Noto A, *et al.* PD-1(+) and follicular helper T cells are responsible for persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals. *Nat Med* 2016 ; 22(7) : 754-61.
- Barre-Sinoussi, F, J. Chermann, F Rey, M. Nugeyre, S Chamaret, J Gruest, C Dauguet, *et al.* 1983. « Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) ». *Science* 220 (4599): 868-71. <https://doi.org/10.1126/science.6189183>.
- Bartholomeeusen, K., Fujinaga, K., Xiang, Y., & Peterlin, B. M. (2013). Histone deacetylase inhibitors (HDACis) that release the positive transcription elongation factor b (P-TEFb) from its inhibitory complex also activate HIV transcription. *J Biol Chem*, 288(20), 14400-14407. doi:10.1074/jbc.M113.464834

- Baxter, A. E., Niessl, J., Fromentin, R., Richard, J., Porichis, F., Massanella, M., . . . Kaufmann, D. E. (2017). Multiparametric characterization of rare HIV-infected cells using an RNA-flow FISH technique. *Nat Protoc*, 12(10), 2029-2049. doi:10.1038/nprot.2017.079
- Bergman A, Johnson-Levonas A, Burke J, Larson P, Zaru L, Reyderman L, *et al.* Assessment of pharmacokinetic interactions between ezetimibe and cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 2005;77:P75.
- Betts, M. R., Nason, M. C., West, S. M., De Rosa, S. C., Migueles, S. A., Abraham, J., . . . Koup, R. A. (2006). HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8⁺ T cells. *Blood*, 107(12), 4781-4789. doi:10.1182/blood-2005-12-4818
- Björn-Erik O. Jensen, Elena Knops, Nadine Lübke, Annemarie Wensing, Javier Martinez-Picado, Rolf Kaiser, Monique Nijhuis, *et al.* s. d. « ANALYTIC TREATMENT INTERRUPTION (ATI) AFTER ALLOGENEIC CCR5- D32 HSCT FOR AML IN 2013 », 1.
- Bleul, C. C., Wu, L., Hoxie, J. A., Springer, T. A., & Mackay, C. R. (1997). The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(5), 1925-1930. doi:10.1073/pnas.94.5.1925
- Bobadilla NA, Gamba G. New insights into the pathophysiology of cyclosporine nephrotoxicity: a role of aldosterone. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293:F2-9.
- Borducchi, E. N., Cabral, C., Stephenson, K. E., Liu, J., Abbink, P., Ng'ang'a, D., . . . Barouch, D. H. (2016). Ad26/MVA therapeutic vaccination with TLR7 stimulation in SIV-infected rhesus monkeys. *Nature*, 540(7632), 284-287. doi:10.1038/nature20583
- Boritz, E. A., Darko, S., Swaszek, L., Wolf, G., Wells, D., Wu, X., . . . Douek, D. C. (2016). Multiple Origins of Virus Persistence during Natural Control of HIV Infection. *Cell*, 166(4), 1004-1015. doi:10.1016/j.cell.2016.06.039
- Borrow, P., Lewicki, H., Wei, X., Horwitz, M. S., Pfeffer, N., Meyers, H., . . . Shaw, G. M. (1997). Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med*, 3(2), 205-211. doi:10.1038/nm0297-205
- Bosque A, Famiglietti M, Weyrich AS, Goulston C, Planelles V. Homeostatic proliferation fails to efficiently reactivate HIV-1 latently infected central memory CD4⁺ T cells. *PLoS Pathog.* 2011;7(10):e1002288.
- Brenchley, J. M., Price, D. A., Schacker, T. W., Asher, T. E., Silvestri, G., Rao, S., . . . Douek, D. C. (2006). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*, 12(12), 1365-1371. doi:10.1038/nm1511

- Brenchley, J. M., Schacker, T. W., Ruff, L. E., Price, D. A., Taylor, J. H., Beilman, G. J., . . . Douek, D. C. (2004). CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med*, 200(6), 749-759. doi:10.1084/jem.20040874
- Briggs, J. A.G. 2003. « Structural Organization of Authentic, Mature HIV-1 Virions and Cores ». *The EMBO Journal* 22 (7): 1707-15. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg143>.
- Brodin, J., Zanini, F., Thebo, L., Lanz, C., Bratt, G., Neher, R. A., & Albert, J. (2016). Establishment and stability of the latent HIV-1 DNA reservoir. *Elife*, 5. doi:10.7554/eLife.18889
- Bruner, K. M., Murray, A. J., Pollack, R. A., Soliman, M. G., Laskey, S. B., Capoferri, A. A., . . . Siliciano, R. F. (2016). Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection. *Nat Med*, 22(9), 1043-1049. doi:10.1038/nm.4156
- Bruner, K. M., Wang, Z., Simonetti, F. R., Bender, A. M., Kwon, K. J., Sengupta, S., . . . Siliciano, R. F. (2019). A quantitative approach for measuring the reservoir of latent HIV-1 proviruses. *Nature*, 566(7742), 120-125. doi:10.1038/s41586-019-0898-8
- Bui JK, Sobolewski MD, Keele BF, Spindler J, Musick A, Wiegand A *et al*. Proviruses with identical sequences comprise a large fraction of the replication-competent HIV reservoir. *PLoS Pathog*. 2017;13(3):e1006283.
- Burdick RC, Li C, Munshi M, Rawson JMO, Nagashima K, Hu WS, Pathak VK. HIV-1 uncoats in the nucleus near sites of integration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Mar 10;117(10):5486-5493. doi: 10.1073/pnas.1920631117. Epub 2020 Feb 24. PMID: 32094182; PMCID: PMC7071919.
- Buzon MJ, Sun H, Li C, Shaw A, Seiss K, Ouyang Z *et al*. HIV-1 persistence in CD4+ T cells with stem cell-like properties. *Nat Med*. 2014;20(2):139-42.
- Cantero-Perez, J., Grau-Exposito, J., Serra-Peinado, C., Rosero, D. A., Luque-Ballesteros, L., Astorga-Gamaza, A., . . . Genesca, M. (2019). Resident memory T cells are a cellular reservoir for HIV in the cervical mucosa. *Nat Commun*, 10(1), 4739. doi:10.1038/s41467-019-12732-2
- Carr, S.F., *et al.*, Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases. *J Biol Chem*, 1993. 268(36): p. 27286-90.
- Cesana D, Santoni de Sio FR, Rudilosso L, Gallina P, Calabria A, Beretta S *et al*. HIV-1-mediated insertional activation of STAT5B and BACH2 trigger viral reservoir in T regulatory cells. *Nature communications*. 2017;8(1):498.
- Chaillon, A., Gianella, S., Dellicour, S., Rawlings, S. A., Schlub, T. E., De Oliveira, M. F., . . . Smith, D. M. (2020). HIV persists throughout deep tissues with repopulation from multiple anatomical sources. *J Clin Invest*, 130(4), 1699-1712. doi:10.1172/JCI134815

- Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B *et al.* HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med.* 2009;15(8):893-900.
- Christensen-Quick A, Chaillon A, Yek C, Zanini F, Jordan P, Ignacio C *et al.* Influenza Vaccination Can Broadly Activate the HIV Reservoir During Antiretroviral Therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2018;79(3):e104-e07.
- Chun, T. W., Nickle, D. C., Justement, J. S., Meyers, J. H., Roby, G., Hallahan, C. W., . . . Fauci, A. S. (2008). Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy. *J Infect Dis*, 197(5), 714-720. doi:10.1086/527324
- Chun, T. W., Stuyver, L., Mizell, S. B., Ehler, L. A., Mican, J. A., Baseler, M., . . . Fauci, A. S. (1997). Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(24), 13193-13197. doi:10.1073/pnas.94.24.13193
- Cockerham, L. R., Siliciano, J. D., Sinclair, E., O'Doherty, U., Palmer, S., Yukl, S. A., . . . Deeks, S. G. (2014). CD4+ and CD8+ T cell activation are associated with HIV DNA in resting CD4+ T cells. *PLoS One*, 9(10), e110731. doi:10.1371/journal.pone.0110731
- Coffin JM, Bale MJ, Wells D, Guo S, Luke B, Zerbato JM *et al.* Integration in oncogenes plays only a minor role in determining the in vivo distribution of HIV integration sites before or during suppressive antiretroviral therapy. *PLoS Pathog.* 2021;17(4):e1009141.
- Cohen, Myron S., George M. Shaw, Andrew J. McMichael, et Barton F. Haynes. 2011. « Acute HIV-1 Infection ». *New England Journal of Medicine* 364 (20): 1943-54. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1011874>.
- Cohn, L. B., Silva, I. T., Oliveira, T. Y., Rosales, R. A., Parrish, E. H., Learn, G. H., . . . Nussenzweig, M. C. (2015). HIV-1 integration landscape during latent and active infection. *Cell*, 160(3), 420-432. doi:10.1016/j.cell.2015.01.020
- Connick, E., Mattila, T., Folkvord, J. M., Schlichtemeier, R., Meditz, A. L., Ray, M. G., . . . Skinner, P. J. (2007). CTL fail to accumulate at sites of HIV-1 replication in lymphoid tissue. *J Immunol*, 178(11), 6975-6983. doi:10.4049/jimmunol.178.11.6975
- Costa Del Amo P, Lahoz-Beneytez J, Boelen L, Ahmed R, Miners KL, Zhang Y *et al.* Human TSCM cell dynamics in vivo are compatible with long-lived immunological memory and stemness. *PLoS Biol.* 2018;16(6):e2005523.
- Crooks, A. M., Bateson, R., Cope, A. B., Dahl, N. P., Griggs, M. K., Kuruc, J. D., . . . Archin, N. M. (2015). Precise Quantitation of the Latent HIV-1 Reservoir: Implications for Eradication Strategies. *J Infect Dis*, 212(9), 1361-1365. doi:10.1093/infdis/jiv218

- Cuevas, José M., Ron Geller, Raquel Garijo, José López-Aldeguer, et Rafael Sanjuán. 2015. « Extremely High Mutation Rate of HIV-1 In Vivo ». Édité par Sarah L. Rowland-Jones. *PLOS Biology* 13 (9): e1002251. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002251>.
- Dalglish, A. G., Beverley, P. C., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F., & Weiss, R. A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, 312(5996), 763-767. doi:10.1038/312763a0
- Demoustier A, Gubler B, Lambotte O, de Goer MG, Wallon C, Goujard C *et al.* In patients on prolonged HAART, a significant pool of HIV infected CD4 T cells are HIV-specific. *AIDS*. 2002;16(13):1749-54.
- Dharan, A., Bachmann, N., Talley, S. *et al.* Nuclear pore blockade reveals that HIV-1 completes reverse transcription and uncoating in the nucleus. *Nat Microbiol* 5, 1088–1095 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0735-8>
- Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y *et al.* HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature*. 2002;417(6884):95-8.
- Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., . . . Paxton, W. A. (1996). HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*, 381(6584), 667-673. doi:10.1038/381667a0
- Dummer, C. D., Carpio, V. N., Goncalves, L. F., Manfro, R. C. & Veronese, F. V. FOXP3+ regulatory T cells: From suppression of rejection to induction of renal allograft tolerance. *Transplant Immunol*. 26, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2011.08.009> (2012).
- Duverger, A., Wolschendorf, F., Zhang, M., Wagner, F., Hatcher, B., Jones, J., . . . Kutsch, O. (2013). An AP-1 binding site in the enhancer/core element of the HIV-1 promoter controls the ability of HIV-1 to establish latent infection. *J Virol*, 87(4), 2264-2277. doi:10.1128/JVI.01594-12
- Eisele E, Siliciano RF. Redefining the viral reservoirs that prevent HIV-1 eradication. *Immunity*. 2012 Sep 21;37(3):377-88. doi: 10.1016/j.immuni.2012.08.010. PMID: 22999944; PMCID: PMC3963158.
- Eisinger, R. W., Dieffenbach, C. W., & Fauci, A. S. (2019). HIV Viral Load and Transmissibility of HIV Infection: Undetectable Equals Untransmittable. *JAMA*, 321(5), 451-452. doi:10.1001/jama.2018.21167
- Eriksson, S., Graf, E. H., Dahl, V., Strain, M. C., Yukl, S. A., Lysenko, E. S., . . . Siliciano, J. D. (2013). Comparative analysis of measures of viral reservoirs in HIV-1 eradication studies. *PLoS Pathog*, 9(2), e1003174. doi:10.1371/journal.ppat.1003174

- Estes, J. D., Kityo, C., Ssali, F., Swainson, L., Makamdop, K. N., Del Prete, G. Q., . . . Schacker, T. W. (2017). Defining total-body AIDS-virus burden with implications for curative strategies. *Nat Med*, 23(11), 1271-1276. doi:10.1038/nm.4411
- Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., & Berger, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, 272(5263), 872-877. doi:10.1126/science.272.5263.872
- Fiebig, E. W., Wright, D. J., Rawal, B. D., Garrett, P. E., Schumacher, R. T., Peddada, L., . . . Busch, M. P. (2003). Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS*, 17(13), 1871-1879. doi:10.1097/00002030-200309050-00005
- Finzi, D., Blankson, J., Siliciano, J. D., Margolick, J. B., Chadwick, K., Pierson, T., . . . Siliciano, R. F. (1999). Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med*, 5(5), 512-517. doi:10.1038/8394
- Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L. M., Buck, C., Chaisson, R. E., . . . Siliciano, R. F. (1997). Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*, 278(5341), 1295-1300. doi:10.1126/science.278.5341.1295
- Fischl, M. A., Richman, D. D., Grieco, M. H., Gottlieb, M. S., Volberding, P. A., Laskin, O. L., . . . *et al.* (1987). The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med*, 317(4), 185-191. doi:10.1056/NEJM198707233170401
- Fletcher, C. V., Staskus, K., Wietgreffe, S. W., Rothenberger, M., Reilly, C., Chipman, J. G., . . . Schacker, T. W. (2014). Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(6), 2307-2312. doi:10.1073/pnas.1318249111
- Flynn JK, Paukovics G, Cashin K, Borm K, Ellett A, Roche M *et al.* Quantifying susceptibility of CD4+ stem memory T-cells to infection by laboratory adapted and clinical HIV-1 strains. *Viruses*. 2014;6(2):709-26.
- Fromentin, R., DaFonseca, S., Costiniuk, C. T., El-Far, M., Procopio, F. A., Hecht, F. M., . . . Chomont, N. (2019). PD-1 blockade potentiates HIV latency reversal ex vivo in CD4(+) T cells from ART-suppressed individuals. *Nat Commun*, 10(1), 814. doi:10.1038/s41467-019-08798-7
- Fukazawa, Y., Lum, R., Okoye, A. A., Park, H., Matsuda, K., Bae, J. Y., . . . Picker, L. J. (2015). B cell follicle sanctuary permits persistent productive simian immunodeficiency virus infection in elite controllers. *Nat Med*, 21(2), 132-139. doi:10.1038/nm.3781

- Gallo, R., S. Salahuddin, M Popovic, G. Shearer, M Kaplan, B. Haynes, T. Palker, *et al.* 1984. « Frequent Detection and Isolation of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and at Risk for AIDS ». *Science* 224 (4648): 500-503. <https://doi.org/10.1126/science.6200936>
- Gantner, P., Pagliuzza, A., Pardons, M., Ramgopal, M., Routy, J. P., Fromentin, R., & Chomont, N. (2020). Single-cell TCR sequencing reveals phenotypically diverse clonally expanded cells harboring inducible HIV proviruses during ART. *Nat Commun*, 11(1), 4089. doi:10.1038/s41467-020-17898-8
- Garcia-Broncano, P., Maddali, S., Einkauf, K. B., Jiang, C., Gao, C., Chevalier, J., . . . Lichterfeld, M. (2019). Early antiretroviral therapy in neonates with HIV-1 infection restricts viral reservoir size and induces a distinct innate immune profile. *Sci Transl Med*, 11(520). doi:10.1126/scitranslmed.aax7350
- Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, *et al.* A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med* 2011 ; 17(10) : 1290-7.
- Gilden D. When HAART is not enough. *GMHC Treat Issues*. 1996 Oct;10(10):1-6. PMID: 11364005.
- Gunthard HF, Wong JK, Spina CA, Ignacio C, Kwok S, Christopherson C *et al.* Effect of influenza vaccination on viral replication and immune response in persons infected with human immunodeficiency virus receiving potent antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2000;181(2):522-31.
- Gupta, R. K., Peppas, D., Hill, A. L., Galvez, C., Salgado, M., Pace, M., . . . Olavarria, E. (2020). Evidence for HIV-1 cure after CCR5Delta32/Delta32 allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation 30 months post analytical treatment interruption: a case report. *Lancet HIV*. doi:10.1016/S2352-3018(20)30069-2
- Hatano, H., Jain, V., Hunt, P. W., Lee, T. H., Sinclair, E., Do, T. D., . . . Deeks, S. G. (2013). Cell-based measures of viral persistence are associated with immune activation and programmed cell death protein 1 (PD-1)-expressing CD4+ T cells. *J Infect Dis*, 208(1), 50-56. doi:10.1093/infdis/jis630
- Haynes, B. F., Gilbert, P. B., McElrath, M. J., Zolla-Pazner, S., Tomaras, G. D., Alam, S. M., . . . Kim, J. H. (2012). Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *N Engl J Med*, 366(14), 1275-1286. doi:10.1056/NEJMoa1113425
- Henrich TJ, Hobbs KS, Hanhauser E, Scully E, Hogan LE, Robles YP *et al.* Human Immunodeficiency Virus Type 1 Persistence Following Systemic Chemotherapy for Malignancy. *J Infect Dis*. 2017;216(2):254-62.
- Henrich, TJ, Schreiner, C, Cameron, C, *et al.* Everolimus, an mTORC1/2 inhibitor, in ART-suppressed individuals who received solid organ transplantation: A prospective study. *Am J Transplant*. 2021; 21: 1765– 1779. <https://doi.org/10.1111/ajt.16244>
- Hey-Nguyen WJ, Bailey M, Xu Y, Suzuki K, Van Bockel D, Finlayson R *et al.* HIV-1 DNA Is Maintained in Antigen-Specific CD4+ T Cell Subsets in Patients on Long-Term Antiretroviral

Therapy Regardless of Recurrent Antigen Exposure. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2019;35(1):112-20.

- Hiener, B., Horsburgh, B. A., Eden, J. S., Barton, K., Schlub, T. E., Lee, E., . . . Palmer, S. (2017). Identification of Genetically Intact HIV-1 Proviruses in Specific CD4(+) T Cells from Effectively Treated Participants. *Cell Rep*, 21(3), 813-822. doi:10.1016/j.celrep.2017.09.081
- Hiscott, J., Kwon, H., & Genin, P. (2001). Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kappaB pathway. *J Clin Invest*, 107(2), 143-151. doi:10.1172/JCI11918
- Ho, Y. C., Shan, L., Hosmane, N. N., Wang, J., Laskey, S. B., Rosenbloom, D. I., . . . Siliciano, R. F. (2013). Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell*, 155(3), 540-551. doi:10.1016/j.cell.2013.09.020
- Hocqueloux, L., Avettand-Fenoel, V., Jacquot, S., Prazuck, T., Legac, E., Melard, A., . . . Virales, A. C. o. t. A. N. d. R. s. l. S. e. l. H. (2013). Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key to achieving both low HIV reservoirs and normal T cell counts. *J Antimicrob Chemother*, 68(5), 1169-1178. doi:10.1093/jac/dks533
- Hogg, Robert S, David R Bangsberg, Viviane D Lima, Chris Alexander, Simon Bonner, Benita Yip, Evan Wood, Winnie W. Y Dong, Julio S. G Montaner, et P. Richard Harrigan. 2006. « Emergence of Drug Resistance Is Associated with an Increased Risk of Death among Patients First Starting HAART ». Édité par H. Clifford Lane. *PLoS Medicine* 3 (9): e356. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030356>.
- Honeycutt, J. B., Thayer, W. O., Baker, C. E., Ribeiro, R. M., Lada, S. M., Cao, Y., . . . Garcia, J. V. (2017). HIV persistence in tissue macrophages of humanized myeloid-only mice during antiretroviral therapy. *Nat Med*, 23(5), 638-643. doi:10.1038/nm.4319
- Hosmane, N. N., Kwon, K. J., Bruner, K. M., Capoferri, A. A., Beg, S., Rosenbloom, D. I., . . . Siliciano, R. F. (2017). Proliferation of latently infected CD4(+) T cells carrying replication-competent HIV-1: Potential role in latent reservoir dynamics. *J Exp Med*, 214(4), 959-972. doi:10.1084/jem.20170193
- Hutter, G., Nowak, D., Mossner, M., Ganepola, S., Mussig, A., Allers, K., . . . Thiel, E. (2009). Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med*, 360(7), 692-698. doi:10.1056/NEJMoa0802905
- Imamichi, H., Dewar, R. L., Adelsberger, J. W., Rehm, C. A., O'Doherty, U., Paxinos, E. E., . . . Lane, H. C. (2016). Defective HIV-1 proviruses produce novel protein-coding RNA species in HIV-infected patients on combination antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(31), 8783-8788. doi:10.1073/pnas.1609057113

- Innis EA, Levinger C, Szaniawski MA, Williams ESCP, Alcamí J, Bosque A, Schiffer JT, Coiras M, Spivak AM, Planelles V. Pharmacologic control of homeostatic and antigen-driven proliferation to target HIV-1 persistence. *Biochem Pharmacol.* 2021 Dec;194:114816. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114816. Epub 2021 Oct 26. PMID: 34715067; PMCID: PMC8629953.
- Jaafoura S, de Goer de Herve MG, Hernandez-Vargas EA, Hendel-Chavez H, Abdoh M, Mateo MC *et al.* Progressive contraction of the latent HIV reservoir around a core of less-differentiated CD4(+) memory T Cells. *Nature communications.* 2014;5:5407.
- Jones RB, Kovacs C, Chun TW, Ostrowski MA. Short communication: HIV type 1 accumulates in influenza-specific T cells in subjects receiving seasonal vaccination in the context of effective antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2012;28(12):1687-92.
- Joos B, Fischer M, *et al.* HIV rebounds from latently infected cells, rather than from continuing low-level replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:16725–16730.
- Josefsson L, von Stockenström S, *et al.* The HIV-1 reservoir in eight patients on long-term suppressive antiretroviral therapy is stable with few genetic changes over time. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:E4987–E4996.
- Katlama C, Lambert-Niclot S, Assoumou L, Papagno L, Lecardonnell F, Zoorob R *et al.* Treatment intensification followed by interleukin-7 reactivates HIV without reducing total HIV DNA: a randomized trial. *AIDS.* 2016;30(2):221-30.
- Khoury, G., Fromentin, R., Solomon, A., Hartogensis, W., Killian, M., Hoh, R., . . . Lewin, S. R. (2017). Human Immunodeficiency Virus Persistence and T-Cell Activation in Blood, Rectal, and Lymph Node Tissue in Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals Receiving Suppressive Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis*, 215(6), 911-919. doi:10.1093/infdis/jix039
- Kiselinova, M., De Spiegelare, W., Buzon, M. J., Malatinkova, E., Lichterfeld, M., & Vandekerckhove, L. (2016). Integrated and Total HIV-1 DNA Predict Ex Vivo Viral Outgrowth. *PLoS Pathog*, 12(3), e1005472. doi:10.1371/journal.ppat.1005472
- Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., . . . Montagnier, L. (1984). T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*, 312(5996), 767-768. doi:10.1038/312767a0
- Korber, B., Muldoon, M., Theiler, J., Gao, F., Gupta, R., Lapedes, A., . . . Bhattacharya, T. (2000). Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science*, 288(5472), 1789-1796. doi:10.1126/science.288.5472.1789 Worobey *et al.*, 2008
- Krensky AM, Bennett WM, Vincenti F. Immunosuppressants, tolerogens, and immunostimulants. In: Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC, editors. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 12th ed. New York: McGraw-Hill; 2011. p. 1005-1029.

- Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J., & Hendrickson, W. A. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*, 393(6686), 648-659. doi:10.1038/31405
- Larder, B. A., Darby, G., & Richman, D. D. (1989). HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science*, 243(4899), 1731-1734. doi:10.1126/science.2467383
- Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999;130:461-470.
- Levy, J., A. Hoffman, S. Kramer, J. Landis, J. Shimabukuro, et L. Oshiro. 1984. « Isolation of Lymphocytopathic Retroviruses from San Francisco Patients with AIDS ». *Science* 225 (4664): 840-42. <https://doi.org/10.1126/science.6206563>.
- Leyre, L., Kroon, E., Vandergeeten, C., Sacdalan, C., Colby, D. J., Buranapraditkun, S., . . . Rv254/Search, R. V. S. S. s. g. (2020). Abundant HIV-infected cells in blood and tissues are rapidly cleared upon ART initiation during acute HIV infection. *Sci Transl Med*, 12(533). doi:10.1126/scitranslmed.aav3491
- Lindenfeld J, Miller GG, Shakar SF, Zolty R, Lowes BD, Wolfel EE, *et al*. Drug therapy in the heart transplant recipient: part I: cardiac rejection and immunosuppressive drugs. *Circulation* 2004;110:3734-3740.
- Lindenfeld J, Miller GG, Shakar SF, Zolty R, Lowes BD, Wolfel EE, *et al*. Drug therapy in the heart transplant recipient: part II: immunosuppressive drugs. *Circulation* 2004;110:3858-3865.
- Liu PT, Keele BF, Abbink P, *et al*. Origin of rebound virus in chronically SIV-infected Rhesus monkeys following treatment discontinuation. *Nat Commun* 2020; 11:5412.
- Liu R, Yeh YJ, Varabyou A, Collora JA, Sherrill-Mix S, Talbot CC, Jr. *et al*. Single-cell transcriptional landscapes reveal HIV-1-driven aberrant host gene transcription as a potential therapeutic target. *Sci Transl Med*. 2020;12(543).
- Logerot S, Rancez M, Charmeteau-de Muyllder B, Figueiredo-Morgado S, Rozlan S, Tambussi G *et al*. HIV reservoir dynamics in HAART-treated poor immunological responder patients under IL-7 therapy. *AIDS*. 2018;32(6):715-20.
- López-Abente, J., Martínez-Bonet, M., Bernaldo-de-Quirós, E. *et al*. Basiliximab impairs regulatory T cell (TREG) function and could affect the short-term graft acceptance in children with heart transplantation. *Sci Rep* 11, 827 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80567-9>

- Lorenzo-Redondo, R., Fryer, H. R., Bedford, T., Kim, E. Y., Archer, J., Pond, S. L. K., . . . Wolinsky, S. M. (2016). Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature*, 530(7588), 51-56. doi:10.1038/nature16933
- Lugli E, Dominguez MH, Gattinoni L, Chattopadhyay PK, Bolton DL, Song K *et al*. Superior T memory stem cell persistence supports long-lived T cell memory. *J Clin Invest*. 2013;123(2):594-9.
- Ma, Y. *et al*. Adoptive transfer of double negative T regulatory cells induces B-cell death in vivo and alters rejection pattern of rat-to-mouse heart transplantation. *Xenotransplantation* 15, 56–63. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3089.2008.00444.x> (2008).
- Maldarelli F, Wu X, Su L, Simonetti FR, Shao W, Hill S *et al*. HIV latency. Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells. *Science*. 2014;345(6193):179-83.
- Malim, M. H., & Bieniasz, P. D. (2012). HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(5), a006940. doi:10.1101/cshperspect.a006940
- Margolis DM, Kewn S, Coull JJ, *et al*. The addition of mycophenolate mofetil to antiretroviral therapy including abacavir is associated with depletion of intracellular deoxyguanosine triphosphate and decrease in plasma HIV-1 RNA. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 31: 45.
- Massanella M, Bakeman W, Sithinamsuwan P, *et al*. Infrequent HIV
- Mattapallil, J. J., Douek, D. C., Hill, B., Nishimura, Y., Martin, M., & Roederer, M. (2005). Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature*, 434(7037), 1093-1097. doi:10.1038/nature03501
- Mehandru, Saurabh, Michael A. Poles, Klara Tenner-Racz, Amir Horowitz, Arlene Hurley, Christine Hogan, Daniel Boden, Paul Racz, et Martin Markowitz. 2004. « Primary HIV-1 Infection Is Associated with Preferential Depletion of CD4+ T Lymphocytes from Effector Sites in the Gastrointestinal Tract ». *Journal of Experimental Medicine* 200 (6): 761-70. <https://doi.org/10.1084/jem.20041196>.
- Mehraj, V., Ramendra, R., Isnard, S., Dupuy, F. P., Ponte, R., Chen, J., . . . Aging Cohort Study, G. (2020). Circulating (1->3)-beta-D-glucan Is Associated With Immune Activation During Human Immunodeficiency Virus Infection. *Clin Infect Dis*, 70(2), 232-241. doi:10.1093/cid/ciz212
- Mendoza P, Jackson JR, Oliveira TY, Gaebler C, Ramos V, Caskey M *et al*. Antigen-responsive CD4+ T cell clones contribute to the HIV-1 latent reservoir. *J Exp Med*. 2020;217(7).
- Menéndez-Arias, Luis. 2002. « Targeting HIV: Antiretroviral Therapy and Development of Drug Resistance ». *Trends in Pharmacological Sciences* 23 (8): 381-88. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(02\)02054-0](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(02)02054-0).

- Mexas, A. M., Graf, E. H., Pace, M. J., Yu, J. J., Papasavvas, E., Azzoni, L., . . . O'Doherty, U. (2012). Concurrent measures of total and integrated HIV DNA monitor reservoirs and ongoing replication in eradication trials. *AIDS*, 26(18), 2295-2306. doi:10.1097/QAD.0b013e32835a5c2f
- Mousseau, G., Kessing, C. F., Fromentin, R., Trautmann, L., Chomont, N., & Valente, S. T. (2015). The Tat Inhibitor Didehydro-Cortistatin A Prevents HIV-1 Reactivation from Latency. *mBio*, 6(4), e00465. doi:10.1128/mBio.00465-15
- MS Gottlieb, MD, HM Schanker, MD, PT Fan, MD, A Saxon, MD, JD Weisman, DO, Div of Clinical Immunology-Allergy; Dept of Medicine, UCLA School of Medicine. CDC MMWR. https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/june_5.htm
- Nagai, T. *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of basiliximab in Japanese pediatric renal transplant patients. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 48, 214–223 (2010).
- Napolitano LA, Grant RM, Deeks SG, Schmidt D, De Rosa SC, Herzenberg LA *et al.* Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. *Nat Med.* 2001;7(1):73-9.
- Nixon, C. C., Mavigner, M., Sampey, G. C., Brooks, A. D., Spagnuolo, R. A., Irlbeck, D. M., . . . Garcia, J. V. (2020). Systemic HIV and SIV latency reversal via non-canonical NF-kappaB signalling in vivo. *Nature*, 578(7793), 160-165. doi:10.1038/s41586-020-1951-3
- Pantaleo, Giuseppe, Cecilia Graziosi, James F. Demarest, Luca Butini, Maria Montroni, Cecil H. Fox, Jan M. Orenstein, Donald P. Kotler, et Anthony S. Fauci. 1993. « HIV Infection Is Active and Progressive in Lymphoid Tissue during the Clinically Latent Stage of Disease ». *Nature* 362 (6418): 355-58. <https://doi.org/10.1038/362355a0>.
- Pardons, M., Baxter, A. E., Massanella, M., Pagliuzza, A., Fromentin, R., Dufour, C., . . . Chomont, N. (2019). Single-cell characterization and quantification of translation-competent viral reservoirs in treated and untreated HIV infection. *PLoS Pathog*, 15(2), e1007619. doi:10.1371/journal.ppat.1007619
- Pardons, M., Fromentin, R., Pagliuzza, A., Routy, J. P., & Chomont, N. (2019). Latency-Reversing Agents Induce Differential Responses in Distinct Memory CD4 T Cell Subsets in Individuals on Antiretroviral Therapy. *Cell Rep*, 29(9), 2783-2795 e2785. doi:10.1016/j.celrep.2019.10.101
- Peluso, M. J., Bacchetti, P., Ritter, K. D., Beg, S., Lai, J., Martin, J. N., . . . Deeks, S. G. (2020). Differential decay of intact and defective proviral DNA in HIV-1-infected individuals on suppressive antiretroviral therapy. *JCI Insight*, 5(4). doi:10.1172/jci.insight.132997
- Perelson, A. S., A. U. Neumann, M. Markowitz, J. M. Leonard, et D. D. Ho. 1996. « HIV-1 Dynamics in Vivo: Virion Clearance Rate, Infected Cell Life-Span, and Viral Generation Time ». *Science* 271 (5255): 1582-86. <https://doi.org/10.1126/science.271.5255.1582>.

- Popper, S. J., Sarr, A. D., Gueye-Ndiaye, A., Mboup, S., Essex, M. E., & Kanki, P. J. (2000). Low plasma human immunodeficiency virus type 2 viral load is independent of proviral load: low virus production in vivo. *J Virol*, 74(3), 1554-1557. doi:10.1128/jvi.74.3.1554-1557.2000
- Prémaud A, Rousseau A, Johnson G, Canivet C, Gandia P, Muscari F, Peron JM, Rostaing L, Marquet P, Kamar N. Inhibition of T-cell activation and proliferation by mycophenolic acid in patients awaiting liver transplantation: PK/PD relationships. *Pharmacol Res*. 2011 May;63(5):432-8. doi: 10.1016/j.phrs.2011.01.005. Epub 2011 Jan 15. PMID: 21241803.
- Rao, A. S. ; Sundareshan, K. ; Prabhu, U. H. ; Sampath, S. R., 1984. Chemical composition and nutritive value of spent citronella grass and cottonseed hulls. *Indian J. Anim. Sci.*, 54 (11): 1064-1065
- Reeves DB, Duke ER, Wagner TA, Palmer SE, Spivak AM, Schiffer JT. A majority of HIV persistence during antiretroviral therapy is due to infected cell proliferation. *Nature communications*. 2018;9(1):4811.
- Rhee, Soo-Yon, Kris Sankaran, Vici Varghese, Mark A. Winters, Christopher B. Hurt, Joseph J. Eron, Neil Parkin, Susan P. Holmes, Mark Holodniy, et Robert W. Shafer. 2016. « HIV-1 Protease, Reverse Transcriptase, and Integrase Variation ». Édité par F. Kirchhoff. *Journal of Virology* 90 (13): 6058-70. <https://doi.org/10.1128/JVI.00495-16>.
- Richard, J., Veillette, M., Brassard, N., Iyer, S. S., Roger, M., Martin, L., . . . Finzi, A. (2015). CD4 mimetics sensitize HIV-1-infected cells to ADCC. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(20), E2687-2694. doi:10.1073/pnas.1506755112
- Richman, D. D., Huang, K., Lada, S. M., Sun, X., Jain, S., Massanella, M., & Menke, B. (2019). Replication competence of virions induced from CD4+ lymphocytes latently infected with HIV. *Retrovirology*, 16(1), 4. doi:10.1186/s12977-019-0466-1
- Riou C, Yassine-Diab B, Van grevenynghe J, Somogyi R, Greller LD, Gagnon D *et al*. Convergence of TCR and cytokine signaling leads to FOXO3a phosphorylation and drives the survival of CD4+ central memory T cells. *J Exp Med*. 2007;204(1):79-91.
- Rosenberg, E. S., Billingsley, J. M., Caliendo, A. M., Boswell, S. L., Sax, P. E., Kalams, S. A., & Walker, B. D. (1997). Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science*, 278(5342), 1447-1450. doi:10.1126/science.278.5342.1447
- Sayegh, M. H. and Carpenter, C. B. Transplantation 50 years later--progress,
- Seddon, B., Tomlinson, P., & Zamoyska, R. (2003). Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat Immunol*, 4(7), 680-686. doi:10.1038/ni946
- Segal-Maurer S, DeJesus E, Stellbrink H-J, *et al*. Capsid inhibition with lenacapavir in multidrug-resistant HIV-1 infection. *N Engl J Med* 2022;386:1793-1803.

- Shan L, Deng K, Gao H, Xing S, Capoferri AA, Durand CM, Rabi SA, Laird GM, Kim M, Hosmane NN, Yang HC, Zhang H, Margolick JB, Li L, Cai W, Ke R, Flavell RA, Siliciano JD, Siliciano RF. Transcriptional Reprogramming during Effector-to-Memory Transition Renders CD4+ T Cells Permissive for Latent HIV-1 Infection. *Immunity*. 2017 Oct 17;47(4):766-775.e3. doi: 10.1016/j.immuni.2017.09.014. PMID: 29045905; PMCID: PMC5948104.
- Shan, L., Deng, K., Shroff, N. S., Durand, C. M., Rabi, S. A., Yang, H. C., . . . Siliciano, R. F. (2012). Stimulation of HIV-1-specific cytolytic T lymphocytes facilitates elimination of latent viral reservoir after virus reactivation. *Immunity*, 36(3), 491-501. doi:10.1016/j.immuni.2012.01.014
- Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 1(1), a006841. doi:10.1101/cshperspect.a006841 Hirsch, Olmsted, Murphey-Corb, Purcell, & Johnson, 1989
- Shipkova M, Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clin Chim Acta*. 2012 Sep 8;413(17-18):1338-49. doi: 10.1016/j.cca.2011.11.006. Epub 2011 Nov 19. PMID: 22120733.
- Siliciano, J. D., Kajdas, J., Finzi, D., Quinn, T. C., Chadwick, K., Margolick, J. B., . . . Siliciano, R. F. (2003). Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med*, 9(6), 727-728. doi:10.1038/nm880
- Simonetti, F. R., Sobolewski, M. D., Fyne, E., Shao, W., Spindler, J., Hattori, J., . . . Maldarelli, F. (2016). Clonally expanded CD4+ T cells can produce infectious HIV-1 in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(7), 1883-1888. doi:10.1073/pnas.1522675113
- Soriano-Sarabia N, Bateson RE, Dahl NP, Crooks AM, Kuruc JD, Margolis DM *et al*. Quantitation of replication-competent HIV-1 in populations of resting CD4+ T cells. *J Virol*. 2014;88(24):14070-7.
- Stock PG, Barin B, Murphy B, Hanto D, Diego JM, Light J, Davis C, Blumberg E, Simon D, Subramanian A, Millis JM, Lyon GM, Brayman K, Slakey D, Shapiro R, Melancon J, Jacobson JM, Stosor V, Olson JL, Stablein DM, Roland ME. Outcomes of kidney transplantation in HIV-infected recipients. *N Engl J Med*. 2010 Nov 18;363(21):2004-14. doi: 10.1056/NEJMoa1001197. Erratum in: *N Engl J Med*. 2011 Mar 17;364(11):1082. PMID: 21083386; PMCID: PMC3028983.
- Sundquist, W. I., & Krausslich, H. G. (2012). HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(7), a006924. doi:10.1101/cshperspect.a006924
- Tabler CO, Lucera MB, Haqqani AA, McDonald DJ, Migueles SA, Connors M *et al*. CD4+ memory stem cells are infected by HIV-1 in a manner regulated in part by SAMHD1 expression. *J Virol*. 2014;88(9):4976-86.

- Trautmann, L., Janbazian, L., Chomont, N., Said, E. A., Gimmig, S., Bessette, B., . . . Sekaly, R. P. (2006). Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8⁺ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med*, 12(10), 1198-1202. doi:10.1038/nm1482
- Vandergeeten C, Fromentin R, DaFonseca S, Lawani MB, Sereti I, Lederman MM *et al.* Interleukin-7 promotes HIV persistence during antiretroviral therapy. *Blood*. 2013;121(21):4321-9.
- Vandergeeten, C., Fromentin, R., Merlini, E., Lawani, M. B., DaFonseca, S., Bakeman, W., . . . Chomont, N. (2014). Cross-clade ultrasensitive PCR-based assays to measure HIV
- Wagner TA, Huang HC, Salyer CE, Richardson KM, Weinberg A, Nachman S *et al.* H1N1 influenza vaccination in HIV-infected women on effective antiretroviral treatment did not induce measurable antigen-driven proliferation of the HIV-1 proviral reservoir. *AIDS Res Ther*. 2017;14(1):7.
- Wagner TA, McLaughlin S, Garg K, Cheung CY, Larsen BB, Styrchak S *et al.* HIV latency. Proliferation of cells with HIV integrated into cancer genes contributes to persistent infection. *Science*. 2014;345(6196):570-3.
- Walsh, P. T., Taylor, D. K. & Turka, L. A. Tregs and transplantation tolerance. *J. Clin. Investig.* 114, 1398–1403. <https://doi.org/10.1172/JCI23238> (2004).
- Wang, Z., Gurule, E. E., Brennan, T. P., Gerold, J. M., Kwon, K. J., Hosmane, N. N., . . . Siliciano, R. F. (2018). Expanded cellular clones carrying replication-competent HIV-1 persist, wax, and wane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(11), E2575-E2584. doi:10.1073/pnas.1720665115
- Wei, X., Decker, J. M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J. C., Wu, X., . . . Shaw, G. M. (2003). Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature*, 422(6929), 307-312. doi:10.1038/nature01470
- Williams, J. P., Hurst, J., Stohr, W., Robinson, N., Brown, H., Fisher, M., . . . Investigators, S. P. (2014). HIV-1 DNA predicts disease progression and post-treatment virological control. *Elife*, 3, e03821. doi:10.7554/eLife.03821
- Wong, J. K., Hezareh, M., Gunthard, H. F., Havlir, D. V., Ignacio, C. C., Spina, C. A., & Richman, D. D. (1997). Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science*, 278(5341), 1291-1295. doi:10.1126/science.278.5341.1291
- Wong, Michelle E., Anthony Jaworowski, et Anna C. Hearps. 2019. « The HIV Reservoir in Monocytes and Macrophages ». *Frontiers in Immunology* 10 (juin): 1435. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01435>.
- Wood, K. J. & Sakaguchi, S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 199–210. <https://doi.org/10.1038/nri1027> (2003).
- Wu G, Zuck P, Goh SL, Milush JM, Vohra P, Wong JK *et al.* Gag p24 is a Marker of HIV Expression in Tissues and Correlates with Immune Response. *J Infect Dis*. 2021.

- Wyatt CM. Kidney Disease and HIV Infection. *Top Antivir Med.* 2017 Feb/Mar;25(1):13-16. PMID: 28402929; PMCID: PMC5677039.
- Yek C, Gianella S, Plana M, Castro P, Scheffler K, Garcia F *et al.* Standard vaccines increase HIV-1 transcription during antiretroviral therapy. *AIDS.* 2016;30(15):2289-98.
- Zhang, Z., Schuler, T., Zupancic, M., Wietgreffe, S., Staskus, K. A., Reimann, K. A., . . . Haase, A. T. (1999). Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. *Science*, 286(5443), 1353-1357. doi:10.1126/science.286.5443.1353

Annexe

A

Dose Forte	Contrôle Prolifération			MMF (400nM)			Tacrolimus (5nM)			Dasatinib (50nM)		
Donneurs	% haut	% Med	% Bas	% haut	% Med	% Bas	% haut	% Med	% Bas	% haut	% Med	% Bas
HIV 38	38.00	23.20	37.00	63.70	32.80	0.72	70.20	24.40	4.62	92.30	0.41	0.01
HIV 32	84.6	8.4	6.1	90.5	7.38	1.4	94.8	4.02	0.65	98.1	0.64	0.00781
HIV 29	18.9	39.6	39.7	33.3	55	9.42	52.4	37.7	5.97	94	1.52	0.2
HIV 28	14	22.6	62.60	43.2	19.5	36.4	49.4	17.8	32.3	47.4	12.8	39.2
HIV 20	37.10	37.30	23.40	64.10	29.20	3.87	51.90	35.50	11.10	90.10	0.67	0.00

B

Dose Faible	Contrôle Prolifération			MMF (20nM)			Tacrolimus (0.12nM)			Dasatinib (1.25nM)		
Donneurs	% haut	% Med	% Bas	% haut	% Med	% Bas	% haut	% Med	% Bas	% haut	% Med	% Bas
HIV 38	38.00	23.20	37.00	36.30	26.40	35.60	35.20	26.50	37.10	46.90	23.30	28.00
HIV 32	84.6	8.4	6.1	82.5	10.4	6.4	90.4	5.22	3.59	85.8	7.34	5.94
HIV 29	18.9	39.6	39.7	48.6	37.8	10.9	49.6	36.2	11.3	61	28.8	7.09
HIV 28	14	22.6	62.60	42.9	17.9	38.30	38.1	21.3	39.7	39.6	18	41.7
HIV 20	37.10	37.30	23.40	44.50	32.30	21.20	45.90	34.70	17.70	46.30	28.50	22.80

Annexe 1. Pourcentage de prolifération des donneurs pour chaque dose d'immunosuppresseur