



Université de Montréal

**Étude des effets de l'initiation précoce du traitement sur la  
réactivité immunitaire chez l'enfant infecté par le VIH-1**

Par  
Hinatea Dieumegard

Département de microbiologie et immunologie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de M.Sc. en Microbiologie et Immunologie

Août, 2016

© Hinatea Dieumegard, 2016

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures  
Ce mémoire intitulé :

**Étude des effets de l'initiation précoce du traitement sur la  
réactivité immunitaire chez l'enfant infecté par le VIH-1**

Présenté par :  
Hinatea Dieumegard

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

**Dr. Nicolas Chomont**  
**Président – rapporteur**

**Dr. Hugo Soudeyns**  
**Directeur de recherche**

**Dre. Armelle Le Campion**  
**Co-directrice**

**Dre. Nicole Bernard**  
**Membre du jury**

## Résumé

**Mots-clés :** VIH, Lymphocytes T Cytotoxiques (LTC), traitement précoce, infection périnatale, suppression virale à long terme.

De nombreuses études ont montré que les enfants traités précocement ne sont pas capables de développer une réponse à médiation cellulaire contre le VIH [1]. Cependant, le rebond viral observé après la rémission prolongée du cas du « bébé du Mississippi » pose de nombreuses questions quant à la capacité de ces enfants à développer une réponse immunitaire VIH spécifique malgré une suppression virale à long terme [2, 3]. Nous avons étudié cinq cas ayant un profil similaire au « bébé du Mississippi » qui ont été identifiés précédemment [4].

L'objectif de ce projet était de déterminer si les enfants traités précocement développent une réponse immunitaire à médiation cellulaire contre le VIH qui est quantitativement et/ou qualitativement différente de celle retrouvée chez les enfants traités plus tard.

Cette étude a permis de montrer que l'amplitude et la diversité des réponses LTC des enfants traités précocement est plus faible que celle observée chez des enfants traités plus tard ou non traités.

## **Abstract**

Keywords: HIV, Cytotoxic T lymphocytes (CTL), Early treatment, perinatal infection, long term viral suppression.

Several studies have shown early treated children are not able to develop a cell-mediated response [1]. However, the viral rebound after prolonged remission in the case of the "Mississippi baby" raises many questions about the ability of these children to develop a specific immune response despite long term HIV viral suppression [2, 3]. We currently have five cases with a similar profile to the "Mississippi baby" that were identified previously [4].

The objective of this project is to determine whether early treated children develop an immune cell-mediated response against HIV that is quantitatively and/or qualitatively different from that found in children treated later.

This study showed that the magnitude and diversity of CTL responses of children treated early is lower than that observed in children treated later if possible.

# Table des matières

Résumé .....	i
Abstract.....	ii
Table des matières .....	iii
Liste des tableaux .....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations et des sigles .....	ix
Remerciements .....	xi
PREMIER CHAPITRE .....	1
INTRODUCTION .....	1
1.1.    Le virus de l’immunodéficience humaine (VIH).....	2
1.1.1.    Histoire de la découverte du VIH .....	2
1.1.2.    Origine du VIH et diversité génétique.....	3
1.1.3.    Structure du virus.....	5
1.1.4.    Génome viral.....	6
1.1.5.    Cycle de réplication .....	6
1.2.    Pathogenèse du VIH-1 .....	8
1.2.1.    Ampleur de la pandémie .....	8
1.2.2.    Modes de transmissions .....	9
1.2.3.    Évolution de la pathologie du VIH-1.....	9
1.3.    Thérapie antirétrovirale.....	13
1.3.1.    Classification des antirétroviraux .....	14
1.3.2.    Mécanisme d’action des antirétroviraux.....	14
1.3.3.    La ART chez les enfants.....	16
1.4.    Le VIH pédiatrique .....	17
1.4.1.    Dépistage du VIH chez les nourrissons nés de mères infectées .....	18

1.4.2.	Réponses immunitaires à médiation cellulaire au cours de l'infection par le VIH-1 .....	18
1.5.	Rationnel et hypothèse .....	20
DEUXIÈME CHAPITRE .....		22
MATÉRIEL ET MÉTHODES .....		22
2.1.	Cohorte EPIC <sup>4</sup> .....	23
2.2.	Isolation et conservation des cellules mononucléées du sang périphérique .....	24
2.3.	ELISpot IFN- $\gamma$ .....	25
2.3.1.	Matrice de peptides synthétiques VIH-1 .....	25
2.3.2.	Les sujets contrôles VIH-1 négatifs et positifs .....	27
2.3.3.	ELISpot .....	27
2.3.4.	Identification et confirmation des séquences peptidiques à l'origine de la sécrétion d'IFN- $\gamma$ .....	31
2.4.	Recherche de cytokines atypiques .....	32
2.4.1.	Préparation des surnageants .....	32
2.4.2.	Quantification multiplexe de cytokines en cytométrie en flux .....	32
2.5.	Graphiques et statistiques .....	33
TROISIÈME CHAPITRE .....		34
RÉSULTATS .....		34
3.1.	Réponses des lymphocytes T cytotoxiques observées chez les enfants du groupe A... ..	35
3.1.1.	Caractéristiques cliniques des cinq sujets du groupe A .....	35
3.1.2.	ELISpot IFN- $\gamma$ avec une stimulation par matrice de peptides .....	39
3.1.3.	ELISpot IFN- $\gamma$ avec une stimulation par peptides individuels .....	44
3.1.4.	Corrélation des réponses dans le temps .....	46
3.1.5.	Séquences peptidiques correspondant aux épitopes décrits dans la littérature ..	47
3.1.6.	Mesure de la taille des réservoirs .....	48
3.2.	Les réponses à médiation cellulaire chez le groupe B .....	49
3.2.1.	Le groupe B1 .....	49
3.2.2.	Le groupe B2 .....	51

3.2.3.    Le groupe B3.....	52
3.3.    Les réponses à médiation cellulaire chez le groupe C .....	57
3.4.    Les réponses des lymphocytes T chez des sujets n’ayant jamais commencé de thérapie antirétrovirale.....	59
3.5.    Le groupe E.....	62
3.6.    Correspondance entre des séquences peptidiques avec les épitopes LTC .....	66
3.7.    Recherche de cytokines chez les enfants .....	66
QUATRIÈME CHAPITRE .....	70
DISCUSSION.....	70
4.1.    Les réponses à médiation cellulaire .....	71
4.1.1.    Stratification des groupes.....	74
4.1.2.    Le groupe A .....	75
4.1.3.    Le groupe B.....	78
4.1.4.    Le groupe C.....	80
4.1.5.    Le groupe D .....	80
4.1.6.    Le groupe E.....	81
4.2.    Les effets du traitement précoce sur les réponses LTC .....	82
4.3.    Recherche de cytokines atypiques .....	84
CINQUIÈME CHAPITRE .....	86
CONCLUSION.....	86
BIBLIOGRAPHIE.....	87
Annexes 1. Liste des épitopes correspondants aux peptides ayant induit une production d’IFN- $\gamma$ .....	viii
Annexe 2 : Publications .....	ix

## Liste des tableaux

<i>Tableau I: Séquences peptidiques correspondant aux épitopes LTC/CD8+ les mieux définis .....</i>	<i>47</i>
<i>Tableau II: Taille des réservoirs viraux des 5 sujets du groupe A.....</i>	<i>48</i>

# Liste des figures

Figure 1: Distribution des sous-types et des formes recombinantes du VIH-1 à travers le monde de 2004 à 2007.	4
Figure 2: Schéma de la structure de la particule virale du VIH-1.....	5
Figure 3: Organisation du génome du VIH-1. ....	6
Figure 4: Représentation schématique du cycle de réplication du VIH.....	7
Figure 5: Évolution de l'infection à VIH-1 .....	10
Figure 6: Matrices de peptides synthétiques VIH-1 de la protéine Gag pour chacun des sous-types.....	26
Figure 7: Schéma récapitulatif des principales étapes de L'ELISpot IFN- $\gamma$ . ....	30
Figure 8: Exemple de déconvolution.....	31
Figure 9: Évolution de la charge virale après l'initiation du traitement et maintien de la suppression virale des 5 sujets. ....	36
Figure 10: Rebond viral du Sujet 5 à 3 ans d'âge.....	37
Figure 11: Évolution des comptes des lymphocytes T CD4+ et CD8+ au fil du temps chez les sujets du groupe A.	38
Figure 12: Les sujets du groupe A produisent de l'IFN- $\gamma$ en réponse à une stimulation par des pools de peptides composés de peptides synthétiques Gag VIH-1 correspondant au clade du virus infectant le sujet. ....	41
Figure 13: Réponses IFN- $\gamma$ après stimulation des cellules avec différentes matrices peptidiques chez des sujets contrôles adultes non infectés par le VIH-1. ....	42
Figure 14: Réponses IFN- $\gamma$ après stimulation des cellules avec différentes matrices peptidiques chez des sujets contrôles adultes infectés par le VIH-1. ....	43
Figure 15: Les cellules des sujets du groupe A engendrent de l'IFN- $\gamma$ en réponse à une stimulation par des de peptides synthétiques individuels Gag VIH-1 correspondant au clade du virus infectant le sujet en question. ....	45
Figure 16: Corrélation de la magnitude des réponses à médiation cellulaire à chaque pool en termes de SFU au cours du temps. ....	46
Figure 17: Production d'IFN- $\gamma$ chez un sujet infecté par le VIH-1 appartenant au groupe B1 en réponse à la matrice peptidique de clade C. ....	50
Figure 18: Charge virale et comptes des cellules CD4 et CD8 au fil du temps. ....	50
Figure 19: Production d'IFN- $\gamma$ par les cellules de sujets infectés par le VIH-1 et traités entre 1 mois et 1 an de vie en réponse à la stimulation par différentes matrices peptidiques. ....	51
Figure 20: Charges virale VIH et comptes CD4 et CD8 chez les sujets du groupe B2.....	52
Figure 21: Production d'IFN- $\gamma$ par les cellules de sujets traités après 1 an de vie en réponse à la stimulation par des pools de peptides concordant avec le sous-type de VIH-1 infectant le sujet.....	55
Figure 22: Évolution de la charge virale et des comptes CD4 et CD8 des sujets du groupe B3 au cours de l'infection à VIH. ....	56

<i>Figure 23: Production d'IFN-<math>\gamma</math> par les cellules de sujets sous cART, mais qui n'ont pas atteint un contrôle virologique parfait en réponse à la stimulation par des pools de peptides concordant avec le sous-type de VIH-1 infectant le sujet.</i>	57
<i>Figure 24: Évolution de la charge virale et des comptes CD4 et CD8 des sujets du groupe C au cours de l'infection à VIH.</i>	58
<i>Figure 25: Production d'IFN-<math>\gamma</math> par les cellules de sujets non traités en réponse à la stimulation par des pools de peptides concordant avec le sous-type de VIH-1 infectant le sujet.</i>	60
<i>Figure 26: Évolution de la charge virale et des taux de CD4 et CD8 chez les sujets infectés par le VIH et non traités.</i>	61
<i>Figure 27: Production d'IFN-<math>\gamma</math> par les cellules de sujets du groupe E présentant une puissante réponse à médiation cellulaire.</i>	63
<i>Figure 28: Production d'IFN-<math>\gamma</math> par les cellules de sujets du groupe E présentant une réponse à médiation cellulaire modérée pour au moins la moitié des pools de la matrice.</i>	63
<i>Figure 29: Production d'IFN-<math>\gamma</math> par les cellules de sujets du groupe E présentant une réponse à médiation cellulaire modérée pour une faible quantité de pools.</i>	64
<i>Figure 30: Figure récapitulative des fréquences de cellules produisant de l'IFN-<math>\gamma</math> en réponse à la stimulation par des pools de peptides concordant avec le sous-type de VIH-1 infectant le sujet.</i>	65
<i>Figure 31: Figure récapitulative des pourcentages de pools ayant induit la production d'IFN-<math>\gamma</math>.</i>	65
<i>Figure 32: Production de cytokines chez les sujets du groupe A en réponse à différentes stimulations. * « out of range ».</i>	68
<i>Figure 33: Exemple de cytogramme obtenu par le multiplex</i>	69
<i>Figure 34: Code QR de la liste des épitopes LTC.</i>	viii

## Liste des abréviations et des sigles

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
CA	Capside
cART	Thérapie antirétrovirale combinée
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CRF	Circulating recombinant form
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ELISpot	Enzyme linked immunospot assay
<i>Env</i>	Enveloppe
EPIC <sup>4</sup>	Early Pediatric Initiation: Canada Child Cure Cohort Study
Gag	Group-specific antigen
HAART	Thérapie antirétrovirale combinée ( <i>highly active antiretroviral therapy</i> )
IFN- $\gamma$	Interféron gamma
IL	Interleukine
IN	Intégrase
LAV	Lymphadenopathy-Associated Virus
LTC	Lymphocytes T Cytotoxiques
LTRs	Séquence terminale longue répétée ( <i>Long terminal repeat sequence</i> )

<b>MA</b>	Matrice
<b>mL</b>	Millilitre
<b>ONUSIDA</b>	Programme commun de Nations Unies sur le VIH/SIDA
<b>PBMC</b>	Cellules mononucléées du sang périphérique ( <i>peripheral-blood mononuclear cell</i> )
<b><i>Pol</i></b>	Polymérase
<b>PR</b>	Protéase
<b>PVDF</b>	Difluorure de polyvinylidène
<b>rpm</b>	Tour par minute (revolution per minute)
<b>RT</b>	Transcriptase inverse
<b>SFV</b>	Sérum foetal de veau
<b>SIDA</b>	Syndrome d'immunodéficience acquise
<b>URF</b>	Unique Recombinant Form
<b>VIH-1</b>	Virus de l'immunodéficience humaine de type 1

## Remerciements

Au terme de ma maîtrise, je tiens avant tout à remercier mon directeur de recherche, le Dr Hugo Soudeyns, pour l'opportunité qu'il m'a offerte d'apprendre à ses côtés en m'accueillant dans son laboratoire. Je le remercie également pour l'encadrement qu'il m'a apporté tout en long de ma maîtrise et pour le projet très captivant qu'il m'a confié. Merci à ma codirectrice Dr Armelle Le Champion, de m'avoir fait bénéficier de son expertise en cytométrie de flux.

Je voudrais également remercier Martine Caty, assistante de recherche du Dr Hugo Soudeyns, qui m'a été d'une grande aide au laboratoire, ainsi que tous les membres du laboratoire qui m'ont fait bénéficier de leurs expertises. Toute ma reconnaissance à Insaf Salem Fourati pour m'avoir formée aux différentes techniques que j'ai utilisées durant ma maîtrise ainsi que pour ses conseils avisés pour mener à bien ce projet.

Je remercie toutes les personnes qui ont contribué au bon déroulement de l'étude EPIC<sup>4</sup> en coordonnant le projet, en recrutant les participants, en collectant les données cliniques ou en prélevant les échantillons. Je souhaiterais remercier tous les participants du projet EPIC<sup>4</sup> ainsi que leurs parents sans qui ce projet n'existerait pas.

Enfin, je tiens à remercier mon conjoint Bertrand pour m'avoir suivi ici au Canada et m'avoir soutenue tout au long de ma maîtrise. Je remercie mes parents pour l'éducation qu'ils m'ont donnée ainsi que toute ma famille éparpillée à travers le monde pour m'avoir encouragée à poursuivre mes études et qui malgré la distance m'offre un soutien et un support inconditionnels.

# **PREMIER CHAPITRE**

## **INTRODUCTION**

## 1.1. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

### 1.1.1. Histoire de la découverte du VIH

En 1981, des médecins aux États-Unis rapportent un nombre grandissant de pneumonies à *Pneumocystis jirovecii* et de sarcomes de Kaposi chez des personnes en bonne santé de la communauté homosexuelle [5, 6]. L'incidence de ces maladies opportunistes rares avait la particularité d'être accompagnée d'un déficit de l'immunité à médiation cellulaire et d'une diminution significative du nombre de lymphocytes T CD4+ dans le sang périphérique [5, 7]. La maladie connue aujourd'hui sous le nom de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) a été nommée pour la première fois dans un rapport du centre pour le contrôle des maladies (CDC) [8]. Un an après la découverte du SIDA chez l'homme, les premiers cas de SIDA chez des enfants furent observés [9].

Au cours des deux années suivant le début de l'épidémie, l'agent causal du SIDA a été isolé à l'Institut Pasteur à Paris dans le laboratoire du docteur Montagnier, sous le nom de *lymphadenopathy-associated virus* (LAV) [10]. Cette découverte a valu le prix Nobel de médecine au Dr. Montagnier et à la Dre. Barré-Sinoussi en 2008. En 1984, l'équipe du Dr Gallo a décrit l'isolement d'un rétrovirus de patients atteints du SIDA, qu'elle a nommé HTLV-III [11]. Peu de temps après, le laboratoire du Dr Levy publie un article sur l'identification d'un rétrovirus similaire au LAV chez des sujets atteints du SIDA qu'il appela ARV pour AIDS-associated retrovirus [12]. En 1986, le comité international de la taxonomie des virus recommande finalement la dénomination de virus de l'immunodéficience humaine (VIH) pour l'agent étiologique du SIDA. La même année, un deuxième rétrovirus humain connexe, mais

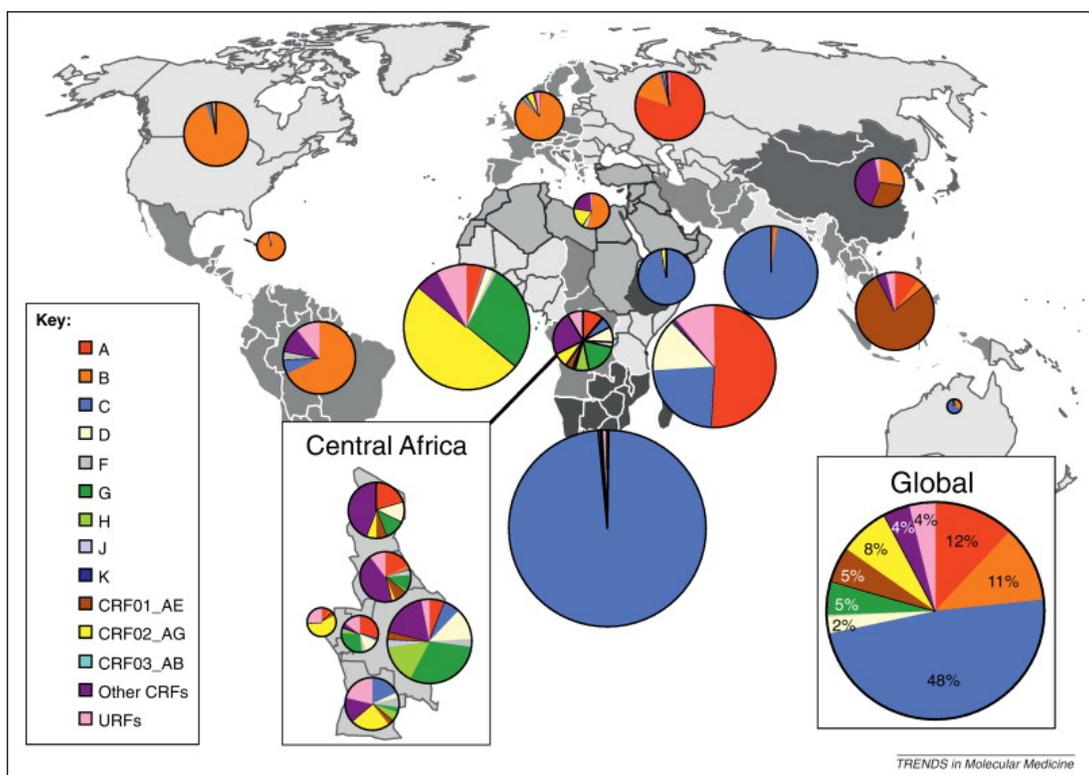
différent du VIH identifié en Amérique du Nord fut découvert en Afrique de l'Ouest [13]. On fait alors la différence entre le VIH-1 découvert en Amérique du Nord et le VIH-2 découvert plus tard en Afrique de l'Ouest.

### 1.1.2. Origine du VIH et diversité génétique

Le VIH-1 et le VIH-2 sont tous deux le résultat de multiples transferts zoonotiques des virus d'immunodéficience simienne (VIS) infectant les primates en Afrique [14]. En effet, des études ont montré que les parents simiens proches du VIH-1 et VIH-2 ont été retrouvés respectivement chez les chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* [15] et mangabey cendré *Cercocebus atys* [16]. Ces relations ont fourni la première preuve que le SIDA avait émergé chez les humains et les macaques à la suite d'infections inter espèces avec des lentivirus de différentes espèces de primates [17]. L'hypothèse la plus répandue quant à la manière dont le virus serait passé du primate à l'homme est celle du « chasseur de viande de brousse », soutenant que le virus aurait été transmis à l'homme par l'exposition directe au sang, aux sécrétions muqueuses et aux excréments des primates au cours de la chasse ou du dépeçage de l'animal, et la consommation de viande contaminée crue ou insuffisamment cuite.

Les multiples transferts zoonotiques ont permis de générer quatre groupes distincts de VIH-1 M (main), qui représente 90% des infections, O (outlier), N (non-O, non-M) et P. Au fur et à mesure que la pandémie progresse, on observe une expansion de diversité génétique résultant des multiples transferts interespèces, interhôtes, interpopulations ou encore intergénétiques. Le groupe M, qui est à l'origine de la pandémie, a été le premier à être découvert en 1981. Il se divise en 9 sous-types A, B, C, D, F, G, H, J et K qui sont parfois eux-mêmes subdivisés en

plusieurs sous-groupes (A1, A2, A3, A4, F1 et F2) [18]. Les différents sous-types sont répartis d'une façon inégale dans le monde (**figure 1**), alors que le sous-type C prédomine représentant 48% des infections. Il se concentre principalement en Afrique subsaharienne. Le sous-type B est plus répandu en Amérique, en Europe, au Japon et en Australie [18]. Il existe aussi des formes recombinantes circulantes (CRF; *circulating recombinant form*) et uniques (URF; *unique recombinant form*) du VIH-1. Les CRFs et les URFs sont le produit d'une recombinaison entre les différents sous-types, la nomenclature impose l'identification de trois séquences de virus différents sur la totalité du génome n'ayant pas de lien épidémiologique entre eux [18].



**Figure 1: Distribution des sous-types et des formes recombinantes du VIH-1 à travers le monde de 2004 à 2007.**

La taille du diagramme circulaire représente fidèlement le nombre de personnes étant infectées dans chacune des régions. Les couleurs présentent sur le diagramme la proportion de chaque sous-type ou forme recombinante [18].

### 1.1.3. Structure du virus

Le VIH est un rétrovirus appartenant à la famille des *Retroviridae* et au genre *Lentivirus* dont les particules virales mesurent environ 80 à 120 nm de diamètre (**figure 2**). Chaque virion est entouré d'une enveloppe constituée d'une bicouche phospholipidique externe qui est dérivée de la membrane de la cellule hôte. Cette enveloppe est obtenue lors du bourgeonnement du virus. L'enveloppe du virion est recouverte de spicules de protéines, composées de trimères de la glycoprotéine de surface gp120 et de la glycoprotéine transmembranaire gp41 liées de façon non covalente [19]. La surface interne de l'enveloppe est recouverte par la protéine de matrice p17 constituant la matrice (MA). La capside (CA) se trouvant à l'intérieur de la MA est composée de plusieurs copies de la protéine de capsid p24. Le génome viral, constitué de deux copies d'ARN simple brin ayant une polarité inverse est associé à la nucléocapside NC qui est composée de la protéine p7. Le virion renferme également les enzymes nécessaires à la réplication du virus, la protéase (PR) (p11), la transcriptase inverse (RT) (p66/p51) et l'intégrase (IN) (p31) (**figure 2**).

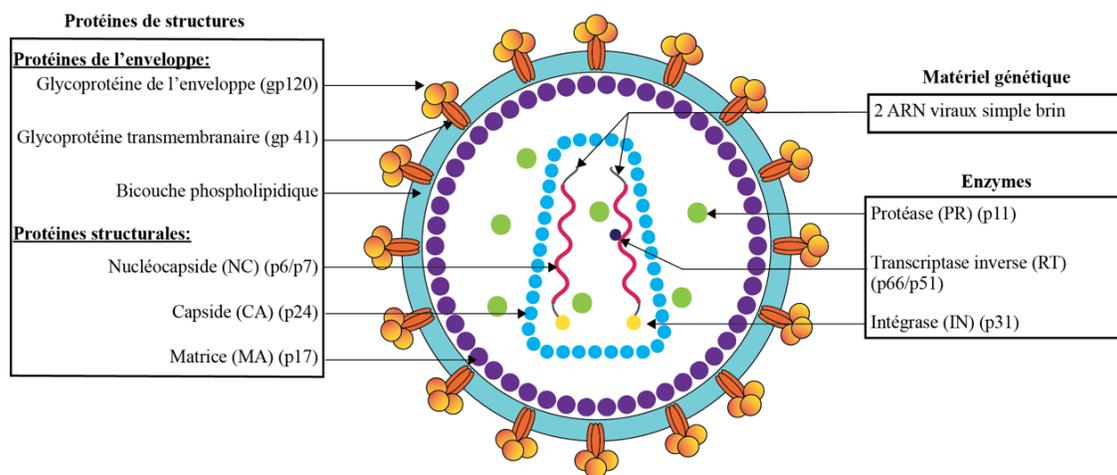
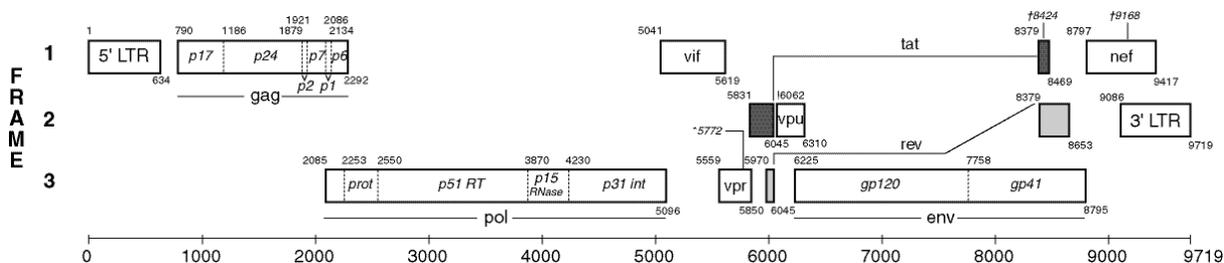


Figure 2: Schéma de la structure de la particule virale du VIH-1

### 1.1.4. Génome viral

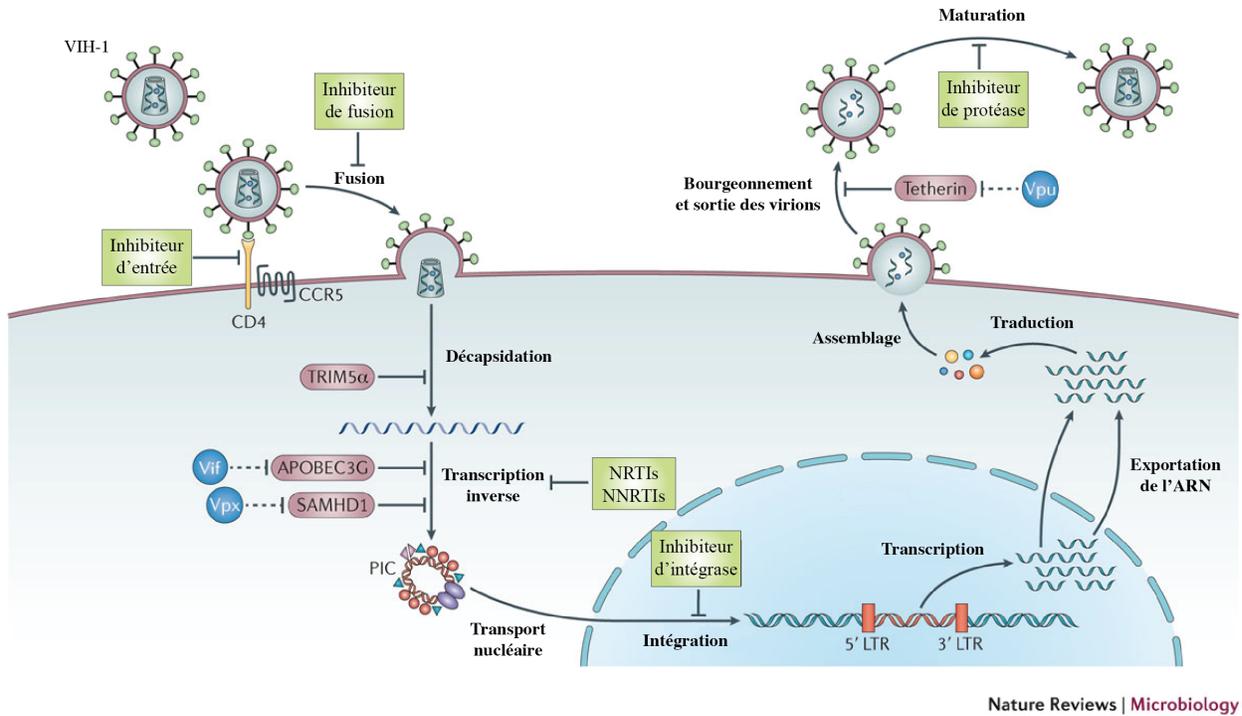
Le génome du VIH-1 est composé de deux copies d'acide ribonucléique (ARN) simple brin de polarité inverse ayant une longueur d'environ 9750 pb. Le génome viral est composé de trois gènes structuraux nommés *gag* (antigène de groupe), *pol* (polymérase) et *env* (enveloppe), des gènes accessoires : *vif*, *vpr*, *vpu* et *nef* et des gènes régulateurs : *tat* et *rev* (**figure 3**). Les régions LTR (long terminal repeat), représentent les deux extrémités du génome viral, délimitant ainsi l'acide ribonucléique (ARN) proviral. Il a été montré que les gènes structuraux avaient un rôle crucial dans la structure du virus, le gène *gag* code pour les protéines structurales de la MA (p17), la CA (p24) et la NC (p6/p7). Le gène *pol* code pour la PR, la RT, l'IN et la RNase H. enfin le gène *env* code pour les protéines de l'enveloppe à savoir la gp 120 et la gp41 [20].



**Figure 3: Organisation du génome du VIH-1.**  
Source [20].

### 1.1.5. Cycle de réplication

Le cycle de réplication du VIH-1 est composé de nombreuses étapes et peut être divisé en deux phases : la phase précoce, allant de l'attachement du virus à l'intégration de son ADN dans le génome de la cellule hôte, et la phase tardive, regroupant toutes les étapes suivantes, jusqu'à la maturation (**figure 4**).



Nature Reviews | Microbiology

Figure 4: Représentation schématique du cycle de réplication du VIH.

Adaptée de [21].

- **Phase précoce**

La première étape de la phase précoce est l'attachement du virus à la cellule hôte, aussi appelée adsorption. Le trimère de glycoprotéine gp120 va interagir avec le récepteur cellulaire CD4 de la cellule hôte [22-24], déclenchant un changement conformationnel exposant ainsi le site de fixation au corécepteur CCR5 ou CXCR4 [25, 26]. L'interaction entre la membrane et le corécepteur engendre un nouveau changement de conformation rendant la glycoprotéine gp41 accessible qui va permettre la fusion membranaire [27, 28]. Le repliement de la glycoprotéine gp41 va permettre l'attraction de l'enveloppe virale vers la membrane cytoplasmique induisant alors la fusion des deux membranes par le biais du peptide de fusion. Ces événements vont permettre le relâchement de la capsid dans le cytoplasme de la cellule cible.

La pénétration de la capsid dans la cellule est suivie de la décapsidation, qui permet la libération de l'ARN viral et des enzymes virales dans le cytoplasme de la cellule hôte. La RT va convertir l'ARN génomique rétroviral simple brin en ADN double brin flanqué à chaque extrémité de LTRs. L'association de l'ADN avec des protéines cellulaires et virales va permettre la création du complexe de préintégration (PIC) qui sera acheminé vers le noyau de la cellule par transport actif. Arrivé au noyau, l'ADN viral est intégré à l'ADN chromosomique de la cellule infectée par l'action de l'IN et devient un provirus.

- **Phase tardive**

La phase tardive commence avec la transcription des ARNm par l'ARN polymérase. Les transcrits sont ensuite épissés ou non, puis transportés hors du noyau pour être traduits [29]. Les protéines virales sont traduites et transportées à la membrane cellulaire où les virions sont assemblés et libérés de la cellule infectée par bourgeonnement. Durant le bourgeonnement, les virions emportent un fragment de membrane cellulaire recouvert par les protéines virales membranaires. La maturation des virions est réalisée grâce à l'action de la protéase virale.

## **1.2. Pathogenèse du VIH-1**

### **1.2.1. Ampleur de la pandémie**

À l'heure actuelle, le SIDA est considéré comme l'un des principaux problèmes de santé publique puisqu'il n'existe toujours pas de remède pour une guérison fonctionnelle. Selon le rapport mondial sur le SIDA, il a été estimé que depuis le début de la pandémie, 78 millions de personnes ont été infectées par le VIH et 35 millions de personnes sont décédées de maladies

liées au SIDA [30]. À la fin de l'année 2015, on comptait 36,7 millions de personnes vivant avec le VIH à travers le monde [30], dont seulement 17 millions ayant accès à la thérapie antirétrovirale (ART). En 2013, on dénombrait 3,2 millions d'enfants de moins de 15 ans étant infectés par le VIH-1 avec 260 000 nouvelles infections pédiatriques à travers le monde cette année-là [31].

### **1.2.2. Modes de transmissions**

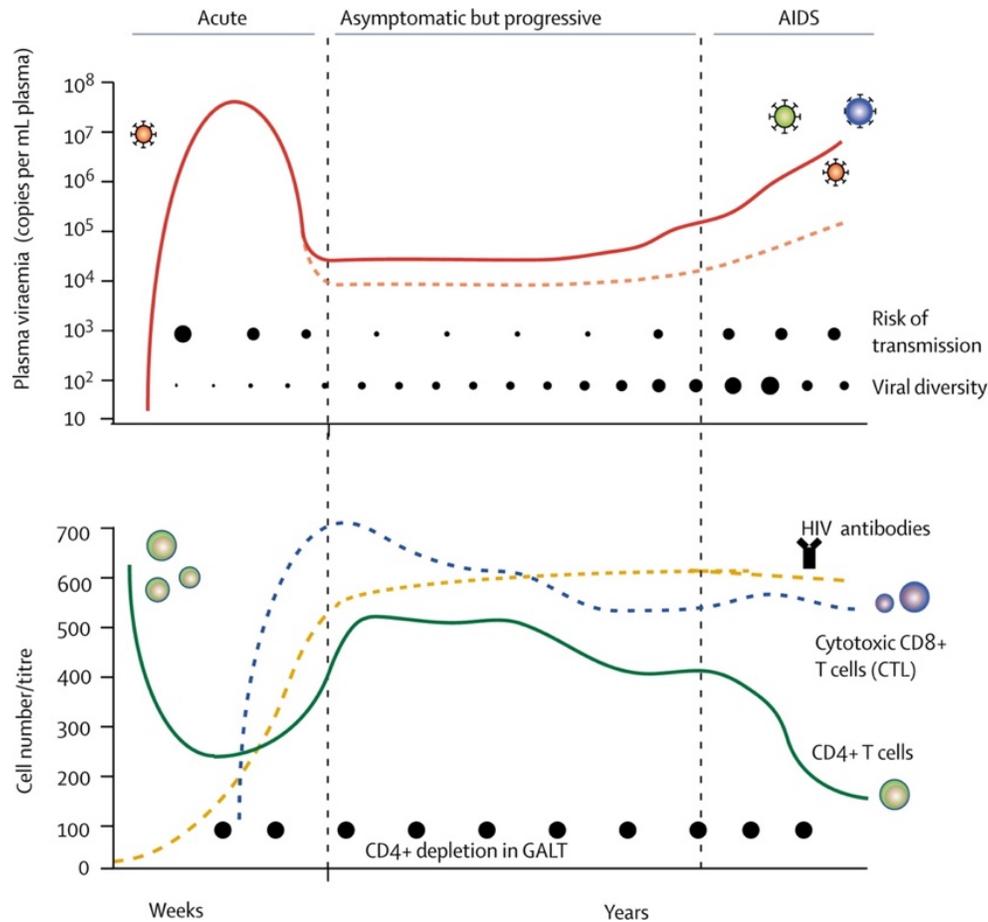
Le VIH peut se transmettre de nombreuses manières de façon horizontale, à l'occasion de rapports sexuels non protégés, d'une transfusion de sang contaminé, ou de l'échange de seringues contaminées. Il peut également se transmettre de façon verticale, c'est à dire de la mère à l'enfant durant la grossesse, l'accouchement ou bien l'allaitement. La grande majorité des enfants infectés par le VIH ont été contaminés par leurs mères séropositives.

Le risque de transmission entre deux individus existe à partir du stade précoce de l'infection et persiste tout au long de l'infection à VIH-1. Le risque peut devenir très faible si la charge virale de la personne infectée est contrôlée soit par le système immunitaire lui-même ou bien par la prise de la ART. La diminution de risque de transmission lors de la prise de ART est également valable en ce qui concerne la transmission verticale.

### **1.2.3. Évolution de la pathologie du VIH-1**

Le VIH-1 induit l'immunodéficience chez l'homme en diminuant lentement et progressivement le nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. En effet, l'agent étiologique du SIDA colonise les cellules portant à leurs surfaces un marqueur CD4, c'est à dire principalement les lymphocytes T CD4,

ce qui lui permet de se répliquer et ; de se diffuser dans l'organisme. L'infection à VIH-1 est une pathologie d'évolution lente et chronique. L'évolution de la pathologie du VIH-1 peut être découpée en 3 phases, la phase aigüe, la phase chronique et le stade SIDA (**figure 5**).



**Figure 5: Évolution de l'infection à VIH-1**

Source [32]. La virémie plasmatique est représentée dans le graphique du haut et les variations dynamiques des compartiments des lymphocytes T CD4 + dans celui du bas. La phase aigüe de l'infection à VIH est caractérisée par une charge virale plasmatique élevée (tracé rouge, en haut), une diminution des lymphocytes T CD4 + (tracé vert, en bas), et par l'absence d'anticorps VIH-1 spécifiques (tracé jaune, en bas). La virémie diminue rapidement lors de l'augmentation du nombre de lymphocyte T cytotoxique T CD8 + (tracé bleu, en bas) et d'anticorps VIH-1 spécifiques, pour atteindre un « set point » qui sera maintenu durant la phase chronique. Le graphique du haut montre également l'évolution du risque de transmission et l'évolution de la diversité virale au cours des différentes phases de l'infection.

- **La phase aigüe**

La phase éclipse marque le début de l'infection, dès l'entrée du virus dans l'organisme. Durant cette phase, le virus se réplique à bas bruit localement et dans les tissus lymphoïdes, ce qui explique que la charge virale demeure indétectable durant plus d'une dizaine de jours [33, 34].

La primo-infection représente la période durant laquelle le virus se réplique fortement jusqu'à l'obtention d'un pic de charge viral. À ce stade de l'infection, le virus est alors facilement détectable dans le sang. Durant la phase aigüe, le taux de cellules T cytotoxiques CD8+ augmente pour abaisser la charge virale plasmatique et le taux de cellules T CD4+ diminue rapidement au niveau des ganglions lymphatiques et dans les muqueuses [35]. La diminution drastique du taux de lymphocytes T CD4+ est induite par une augmentation de l'élimination de des lymphocytes T CD4+ durant la réplication virale avec une destruction en quelques semaine de plus de 80% des lymphocytes T CD4+ de l'organisme dans le compartiment muqueux [36, 37]. La réponse immunitaire induite au cours de cette phase permet l'établissement des réponses VIH spécifiques à médiation cellulaire qui entraînent une baisse de la réplication virale et un rétablissement partiel du taux de lymphocytes T CD4+ périphériques [38]. La virémie atteint alors un « set point » qui sera maintenu durant la phase chronique. Ces évènements marquent la fin de cette première phase [39] (**figure 5**).

- **La phase chronique**

La phase chronique est la phase la plus longue de la pathologie : elle s'étale sur une dizaine ou plusieurs dizaines d'années, sa durée varie selon l'individu [39]. Au cours de cette phase de la maladie, la réplication virale peut être ralentie par les réponses cellulaire et humorale [39]. Cette

phase est caractérisée par la diminution graduelle du taux de lymphocytes T CD4+. La déplétion des lymphocytes T CD4+ est la conséquence des dommages occasionnés par l'effet cytopathique du virus et l'activation immunitaire chronique entraînant l'apoptose des cellules non infectées. Ce sont ces deux mécanismes qui conduisent à l'immunodéficience et au stade SIDA [40-42].

- **Le stade SIDA**

Le stade SIDA est considéré comme étant la phase terminale de l'infection à VIH-1. Il est atteint lorsque le taux de lymphocytes T CD4+ dans le sang de l'individu infecté est inférieur à 200 cellules par mm<sup>3</sup> [43]. Durant cette phase, l'état du système immunitaire du patient facilite les infections par des pathogènes opportunistes d'origine virale, bactérienne, fongique ou parasitaire. Ce sont ces infections qui vont entraîner la mort de l'individu (**figure 5**).

- **Les réservoirs**

Les réservoirs viraux sont des cellules ou des tissus permettant au virus de persister dans l'organisme en échappant à la réponse immunitaire de son hôte et aux ART. Ils représentent un obstacle majeur à l'éradication du VIH, puisque le virus peut refaire surface lors de l'interruption de ART. Ces réservoirs s'établissent rapidement chez tous les individus infectés par le VIH-1 [44]. De nos jours, il a été établi que la prise de la ART précoce permettait de limiter la taille de ces réservoirs [3, 45] sans empêcher son établissement [44]. La majorité des cellules latentes infectées contiennent une copie de l'ADN du virus qui est intégrée sous forme de provirus dans leurs génomes sans toutefois être transcrite [46, 47]. Les cellules T CD4+, étant la cible de choix du VIH, constituent une grande partie du réservoir viral, cependant il a été

montré que de nombreux types cellulaires peuvent servir de réservoir à ce virus, comme les monocytes, les macrophages et les astrocytes. En effet, les réservoirs viraux sont présents dans les organes lymphoïdes, le tractus gastro-intestinal, le système nerveux central, le sang périphérique et les tissus tels que les poumons et la peau [48].

### 1.3. Thérapie antirétrovirale

À ce jour, il n'existe pas de cure pour guérir de l'infection à VIH. Cependant, il est possible de contrôler efficacement l'infection en ralentissant la réplication du virus en utilisant différentes combinaisons de médicaments. La ART est une méthode de traitement faisant appel à un mélange d'au moins trois agents antiviraux souvent appelé aussi cART pour "combined antiretroviral therapy" [49]. Cette méthode qui est aussi bien utilisée chez les adultes que chez les enfants, permet de contrôler la réplication du virus et permet un rétablissement partiel du nombre de cellules T CD4.

L'ART a pour but le ralentissement de progression de l'infection vers le stade SIDA et donc de prolonger la phase chronique (asymptomatique) de l'infection. Elle permet également de réduire le risque de transmission horizontale et verticale et de limiter la taille des réservoirs viraux [48]. Pour ce faire, les antirétroviraux bloquent certaines étapes fondamentales du cycle de la réplication du virus dans le but d'empêcher l'infection de la cellule en bloquant l'entrée virale, la réplication du virus en bloquant la transcription inverse et l'intégration du génome viral, et enfin la sortie du virus en empêchant la maturation des protéines virales (**figure 4**). Sous l'action des agents antirétroviraux, il est alors possible d'atteindre une virémie indétectable et de la maintenir. La virémie est dite indétectable lorsque le virus n'est pas détectable dans le plasma

en utilisant les tests de diagnostic standards et que le nombre de copies d'ARN viral circulant est inférieur à 40 copies/mL de plasma.

### **1.3.1. Classification des antirétroviraux**

Six catégories d'agents antirétroviraux peuvent être distinguées. Elles sont définies en fonction du mécanisme d'action de l'agent antirétroviral: les inhibiteurs de RT nucléotidiques (NRTIs), les inhibiteurs de RT non nucléotidiques (NNRTIs), les inhibiteurs de protéase (PIs), les inhibiteurs d'entrée (antagonistes du co-récepteur CCR5), les inhibiteurs de fusion (FIs) et les inhibiteurs d'intégrase (IIs) [50, 51] (**figure 4**).

### **1.3.2. Mécanisme d'action des antirétroviraux**

La cART est une méthode de traitement faisant appel à un mélange d'au moins trois agents antiviraux de deux catégories différentes. Cette méthode permet d'éviter l'apparition de résistance rapide. En effet, chaque agent antirétroviral composant la cART a un mode d'action différent et spécifique.

- **Les inhibiteurs de RT**

Les inhibiteurs de la RT regroupent deux catégories d'agents antirétroviraux, les NRTIs et les NNRTIs.

Les NRTIs ont été les premiers agents disponibles pour le traitement de l'infection à VIH-1 et VIH-2 [52]. Les NRTIs interrompent le cycle de réplication du VIH par l'inhibition compétitive de la RT du VIH et en tant que terminateur de la chaîne d'ADN [53].

À l'inverse de NRTIs, les NNRTIs inhibent de façon non compétitive la RT en se fixant à proximité du site catalytique de la RT. Cette liaison non compétitive induit un changement conformationnel de l'enzyme qui modifie le site actif et permet de limiter l'activité de la RT [54, 55].

- **Les inhibiteurs de protéase**

Les PIs du VIH fonctionnent comme des inhibiteurs compétitifs. Ils se lient directement à la protéase du VIH et empêchent le clivage ultérieur des précurseurs de polypeptides Gag, et Gag-Pol. Cette action empêche la maturation des particules virales entraînant ainsi la production de particules virales immatures incapables d'infecter de nouvelles cellules [56, 57].

- **Les inhibiteurs d'entrée**

L'entrée du VIH dans la cellule hôte est un processus complexe regroupant plusieurs étapes. L'inhibiteur d'entrée Maraviroc se lie de façon sélective au co-récepteur CCR5 empêchant ainsi son interaction avec la boucle V3 de la gp120. Maraviroc est actif contre les virus VIH-1 à tropisme CCR5 [58].

- **Les inhibiteurs de fusion**

Les FIs agissent de manière extracellulaire en empêchant la fusion du VIH au CD4 ou aux autres cibles cellulaires. L'inhibiteur de fusion Enfuvirtide par exemple, bloque la deuxième étape de la fusion ce qui empêche le changement de conformation de la gp41 nécessaire au processus de fusion [59].

- **Les inhibiteurs d'intégrase**

Les IIs est la catégorie d'agents antirétroviraux la plus récente. Les IIs inhibent de façon compétitive la réaction de transfert de brin en bloquant l'intégration de l'ADN proviral au génome de la cellule infectée. Ils se lient au site catalytique et empêchent ainsi le transfert du brin d'ADN [60, 61].

### **1.3.3. La ART chez les enfants**

Les enfants infectés verticalement par le VIH sont traités avec l'ART. La prise en charge des enfants infectés par le VIH-1 s'est grandement améliorée au fil des années. Les nouvelles méthodes de dépistages et les nouveaux antirétroviraux adaptés aux enfants sont les facteurs ayant contribué à une augmentation du nombre d'enfants étant présentement sous traitement [31, 62, 63].

Il a été montré à de nombreuses reprises que l'initiation d'une cART contribuait à limiter la persistance du VIH chez les enfants [64] et la taille des réservoirs [65, 66]. Le cas du « bébé du Mississippi » en est la preuve illustrée, après avoir commencé une thérapie antirétrovirale combinée puissante 30 heures après sa naissance, il a subi une interruption de traitement durant laquelle il a connu une rémission prolongée d'environ 27 mois [2, 3, 67]. L'initiation précoce de la cART chez les nourrissons permet donc de supprimer la virémie en limitant la réplication du VIH afin de ralentir l'évolution vers le SIDA et de limiter le développement de réservoirs viraux [1, 3, 66, 68]. De plus, l'initiation de la ART avant l'âge de 3 mois permet une suppression à long terme de la réplication virale [1]. Cependant, la suppression rapide de la

virémie du nouveau-né, limite ou empêche le développement de réponses immunitaires spécifiques dirigées contre le VIH [1, 3, 4, 65].

Les recommandations actuelles pour le traitement des nouveau-nés préconisent l'administration de zidovudine et nevirapine, l'utilisation des autres agents antirétroviraux existant n'est pas recommandée. Une cART composée de zidovudine et nevirapine est recommandée pour les enfants à haut risque d'infection, de préférence dans les 6 à 12 heures suivant l'accouchement. La lamivudine peut également être combiné à la cART, cependant d'autres études devront être mener afin de déterminer les effets de cet agent antirétroviral chez les enfants [69]. Le mode d'administration et les effets secondaires des différents agents antirétroviraux existant sont deux paramètres à prendre en compte lors du traitement des nouveau-nés, ce qui explique la liste restreinte des médicaments administrés.

#### **1.4. Le VIH pédiatrique**

Le SIDA a été décrit pour la première fois chez les enfants en 1982 [9]. En 2013, il a été estimé que 3,2 millions d'enfants ayant moins de 15 ans étaient infectés par le VIH-1 avec 260,000 nouvelles infections pédiatriques à travers le monde [31]. Malgré une baisse significative des infections à VIH-1 chez les enfants depuis les années 2000 (58%), il a été estimé qu'en 2030, le nombre d'enfants infectés sera de 5.9 millions [70]. Découverte au centre hospitalier universitaire de Sainte-Justine en 1985 [71, 72], la transmission verticale, de la mère à l'enfant (TME), est la première cause d'infection chez les enfants de moins de 10 ans [73]. La TME peut avoir lieu durant la grossesse, le travail, l'accouchement ou par l'allaitement naturel.

L'infection à VIH-1 observée chez les enfants est différente de celle observée chez les adultes. En l'absence de traitement, l'infection à VIH-1 progresse dix fois plus rapidement vers le stade SIDA ou la mort chez les enfants. Un adulte atteint le stade SIDA après une moyenne de dix années alors que 20 à 30 % des enfants meurent durant leurs premières années de vie [74, 75]. La difficulté à contrôler le virus chez les enfants est plus importante que chez les adultes, ce qui pourrait être expliqué par un plus grand nombre de cellules T CD4 + servant de cibles aux virus.

#### **1.4.1. Dépistage du VIH chez les nourrissons nés de mères infectées**

L'infection à VIH chez les nourrissons doit être diagnostiquée en utilisant des tests virologiques d'amplification d'acide nucléique du VIH, qui incluent l'ADN et la PCR d'ARN et les dosages associés. Les anticorps maternels dirigés contre le VIH traversent le placenta et seront détectable chez tous les nouveau-nés ayant été exposés au VIH. Les tests virologiques sont généralement effectués à 14-21 jours de vie et à 1 à 2 mois et 4 à 6 mois. Cependant il est qu'un test virologique soit effectué à la naissance, en particulier chez les femmes qui n'ont pas eu un bon contrôle virologique durant la grossesse ou qu'il n'y ait pas eu de suivi médical durant la grossesse. Le diagnostic de l'infection à VIH est déclaré positif lorsqu'un test VIH virologique positif a été confirmé par un deuxième test virologique VIH à partir d'un échantillon différent [69].

#### **1.4.2. Réponses immunitaires à médiation cellulaire au cours de l'infection par le VIH-1**

Les réponses à médiations cellulaires des lymphocytes T cytotoxiques (LTC) représentent un élément clé de la réponse immunitaire durant l'infection à VIH-1. Les LTC sont capables de reconnaître et d'éliminer les cellules infectées par un virus, mais aussi de produire des cytokines

comme l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ), l'interleukine 2 (IL-2) et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ). Les LTC peuvent éliminer les cellules infection par la production de perforines et de granzymes mais aussi en induisant une apoptose via l'interaction entre le ligand Fas (sur CTL) et le récepteur Fas (cellules infectées). Les LTC ont aussi la capacité de sécréter des cytokines telles que l'IFN- $\gamma$ , l'IL-2 et le TNF- $\alpha$  et des chimiokines ayant un effet antiviral. Il a été montré que ces cytokines jouaient aussi un rôle important durant l'activation et la différenciation des LTC en LTC mémoires et effecteurs [76].

Chez les adultes infectés par le VIH-1, de fortes réponses à médiation cellulaire permettent la suppression de la virémie [77-80]. En effet, durant la phase aiguë de l'infection, l'émergence des réponses LTC corrèle avec la régulation de la virémie [77, 78]. Ensuite, une persistance de ces réponses est observée durant la phase chronique de l'infection, permettant ainsi de réguler la virémie et la progression vers le SIDA [81]. Enfin, les réponses disparaissent à un stade avancé de l'infection à VIH-1, suggérant leur rôle dans le processus de suppression virale. De nombreuses études ont confirmé le rôle important que les réponses LTC jouaient dans la suppression virale chez les primates [82-84].

Les réponses LTC pédiatriques ne sont pas aussi bien décrites que chez adultes. Les premières études concernant les réponses à médiation cellulaire chez l'enfant ont montré que ce type de réponse était rarement détecté chez les enfants ayant moins de 6 mois et qu'ils ont une capacité limitée à développer des réponses LTC antivirales efficaces [85-87]. Cependant, une étude plus récente signale que les cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques au VIH ont été détectées dans 6 à 10 nourrissons âgés de quelques semaines verticalement infectés par le VIH [88]. De plus, les réponses LTC chez le nourrisson ciblent essentiellement les protéines Nef, Rev et Env alors que

chez leurs mères, les réponses LTC ciblent de manière équivalente les protéines accessoires et des protéines de structure [89-91]. Contrairement à la fréquence élevée de cellules T CD8+ spécifiques au VIH-1 détectée chez les adultes, seulement 5 des 15 nourrissons testés présentaient des réponses LTC spécifiques au VIH à 6 à 10 semaines d'âge. Ainsi, ces études suggèrent des différences potentielles dans les spécificités et les mécanismes de suppression des virus de cellules T CD8 + chez les adultes et les nourrissons.

## **1.5. Rationnel et hypothèse**

En 2013, un cas avait retenu l'attention de la communauté scientifique : « le bébé du Mississippi ». Ce bébé, né infecté par le VIH-1, avait commencé à être traité avec une combinaison puissante d'agents antirétroviraux 30 heures suivant sa naissance. Après 18 mois de traitement, l'enfant avait contrôlé sa réplication virale pendant plus de 10 mois en l'absence de ART [3]. Cependant, après 27 mois sans traitement, une charge virale de 16,750 copies/mL de plasma a été détectée chez l'enfant [2].

Cinq cas semblables au « bébé du Mississippi » ont été identifiés à Toronto et à Ottawa [4]. Ces enfants ont été infectés par leurs mères séropositives et ont été traités par une combinaison d'antirétroviraux durant leurs premières 24 heures de vie [4]. La suppression à long terme de la virémie a été maintenue pendant 5.1 à 9.5 années chez quatre d'entre eux, cependant l'un des sujets a subi un rebond de charge virale après à une interruption de traitement à 3 ans d'âge, qui a rapidement été abaissée après la réintroduction du traitement.

Malgré le rebond viral survenu après 27 mois d'arrêt de traitement [2], cette rémission à long terme pose de nombreuses questions, quant aux effets bénéfiques que pourrait avoir une initiation précoce du traitement chez l'enfant infecté, mais aussi sur la capacité de ces enfants à développer une réponse immunitaire pour contrôler la réplication du VIH malgré une suppression virale maintenue pendant la majorité de leurs vies.

**Hypothèse** : Les enfants traités précocement après la naissance développent une réponse immunitaire à médiation cellulaire contre le VIH qui est quantitativement et/ou qualitativement différente de celle retrouvée chez les enfants traités plus tardivement.

Notre objectif premier sera de caractériser la réponse immunitaire à médiation cellulaire anti-VIH-1 des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> chez l'enfant traité immédiatement après la naissance.

Notre deuxième objectif consistera à comparer les résultats obtenus à l'issue de notre premier objectif, aux réponses immunitaires à médiation cellulaire anti-VIH-1 des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> retrouvée chez des enfants traités plus tardivement et des enfants non traités.

Enfin, le troisième objectif sera de rechercher la production de cytokines atypiques qui montreraient que la réponse immunitaire pédiatrique est différente de celle observée chez les adultes.

**DEUXIÈME CHAPITRE**  
**MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## 2.1. Cohorte EPIC<sup>4</sup>

Les sujets ont tous été recrutés dans le cadre de l'étude Early Pediatric Initiation: Canada Child Cure Cohort Study (EPIC<sup>4</sup>), qui est une étude multicentrique à travers le Canada. Cette étude prospective observationnelle compte actuellement 187 sujets recrutés dans neuf institutions : The Hospital for Sick Children (SickKids; Toronto) (n = 73) ; CHU Sainte-Justine (Montréal) (n = 37) ; Children's Hospital of Eastern Ontario (CHEO; Ottawa) (n = 23) ; Stollery Children's Hospital (Edmonton) (n = 11) ; BC Women's Hospital and Health Center of British Columbia (Vancouver) (n = 20) ; McMaster Children's Hospital (Hamilton) (n = 3) ; Montreal Children's Hospital (Montréal) (n = 9) ; Royal University Hospital (Saskatoon) (n = 11). Les sujets recrutés ont acquis l'infection à VIH-1 de façon périnatale. Un consentement, à caractère libre et éclairé, a été fourni par tous les participants à l'étude ou par un parent/tuteur avec l'assentiment de l'enfant.

Les sujets ont été stratifiés en cinq groupes en fonction de leur suppression virale et de la période de temps s'étant écoulée entre leur naissance et l'initiation de leurs traitements.

Le groupe A (n = 5) : Enfants ayant initié une thérapie antirétrovirale combinée (cART) dans les 72 heures suivant leur naissance et ayant maintenu une charge virale indétectable.

Le groupe B (n = 73) : Enfants ayant initié une cART plus de 72 heures après leur naissance et ayant maintenu une charge virale indétectable. Ce groupe se subdivise en trois autres groupes B1 (initiation de cART après 72 heures, mais durant les 30 premiers jours de vie), B2 (initiation

de cART entre un mois et un an de vie) et B3 (initiation de cART après la première année de vie).

Le groupe C (n = 26) : Enfants étant sous cART ayant acquis un bon contrôle virologique, mais ayant quelques pics de charge virale  $\leq 500$  copies d'ARN de VIH/mL de plasma.

Le groupe D (n = 11) : Enfants n'ayant jamais reçu de traitement.

Le groupe E (n = 78) : Enfants ayant été sous cART, mais n'ayant jamais acquis de bon contrôle de la charge virale ou ayant eu un résultat de charge virale  $> 500$  d'ARN de VIH/mL de plasma. Ce groupe contient en outre tous les enfants n'ayant pas pu être classés dans une des catégories précédentes.

## **2.2. Isolation et conservation des cellules mononucléées du sang périphérique**

Chacun des échantillons a été traité durant les 24 heures suivant son prélèvement. En accord avec les différents comités d'éthique des institutions participantes, les quantités de sang prélevé correspondent au maximum à 5% du sang total du sujet en question. Le sang a été prélevé dans des tubes contenant du K<sub>2</sub>EDTA comme anticoagulant (Vacutainer®, Becton/Dickinson and Company Mississauga, ON). Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ont été isolées par gradient de Ficoll Hypaque dans des tubes LeucoSep™. Les PBMCs ont été lavées dans du milieu RPMI contenant 5% de sérum fœtal de veau (SFV) (Wisent, St-Jean-Baptiste, QC) ainsi que 0,05 µg/mL de gentamicine (Wisent). Les PBMCs ont été conservées dans du

milieu de congélation, composé de 90% de SVF et des 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO). Les PBMCs ont été congelées à -80°C à l'aide de Mr. Frosty puis gardées en azote liquide jusqu'à leur décongélation.

## **2.3. ELISpot IFN- $\gamma$**

L'ELISpot (enzyme-linked immunospot), est une technique immunoenzymatique permettant de mesurer les réponses à médiation cellulaire, en dénombrant le nombre de cellules sécrétant une molécule d'intérêt. Cette technique a été développée en 1983 par l'immunobiologiste Cecil Czerkinsky [92]. Le protocole utilisé durant ma maîtrise a été développé dans le laboratoire du Dr Hugo Soudeyns [93]. Cette technique comporte de nombreux avantages, en plus de nécessiter une faible quantité de cellules, elle est facilement reproductible et hautement sensible [94].

### **2.3.1. Matrice de peptides synthétiques VIH-1**

Les peptides synthétiques du VIH-1 correspondent aux séquences de la protéine Gag du VIH-1 des clades A, B, C et D et ont une pureté supérieure à 80% (numéros de catalogue 8116, 8117, 8118 et 3994, NIH AIDS Research and Reference Reagents Program, Germantown, MD). Les peptides synthétiques des clades A, B et C ont une longueur de 15 acides aminés et ont un chevauchement de 11 acides aminés, et ceux du clade D ont une longueur de 20 acides aminés avec un chevauchement de 10 acides aminés. Pour la création de matrices, les peptides synthétiques ont été dissous dans 50  $\mu$ L de DMSO puis dilués dans de l'eau afin d'obtenir une concentration de 2 mg/mL et ont été distribués dans 82 pools contenant chacun 7 à 14 peptides (0,001 $\mu$ g/mL/peptide). Quatre matrices ont été élaborées, pour chacun des différents clades.

Chacune de ces matrices a été élaborée de façon à avoir chaque peptide représenté dans deux pools différents et à réduire le nombre de pools au minimum (**figure 6**).

Matrice Clade A

	POOL 1	POOL 2	POOL 3	POOL 4	POOL 5	POOL 6	POOL 7	POOL 8	POOL 9	POOL 10	POOL 11	POOL 12
POOL 13	7840	7841	7842	7843	7844	7845	7846	7847	7848	7849	7830	7831
POOL 14	7832	7833	7834	7835	7836	7837	7838	7839	7820	7821	7822	7823
POOL 15	7824	7825	7826	7827	7828	7829	7810	7811	7812	7813	7814	7815
POOL 16	7816	7817	7818	7819	7800	7801	7802	7803	7804	7805	7806	7807
POOL 17	7808	7809	7790	7791	7792	7793	7794	7795	7796	7797	7798	7799
POOL 18	7780	7781	7782	7783	7784	7785	7786	7787	7788	7789	7770	7771
POOL 19	7772	7773	7774	7775	7776	7777	7778	7779	7760	7761	7762	7763
POOL 20	7764	7765	7766	7767	7768	7769	7750	7751	7752	7753	7754	7755
POOL 21	7756	7757	7758	7759	7850	7851	7852	7853	7854	7855	7856	7857
POOL 22	7858	7859	7860	7861	7862	7863	7864	7865	7866	7867	7868	7869
POOL 23	7870	7871										

Matrice Clade B

	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4	Pool 5	Pool 6	Pool 7	Pool 8	Pool 9	Pool 10	Pool 11	Pool 12	Pool 13	Pool 14
Pool 15	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Pool 16	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Pool 17	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
Pool 18	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
Pool 19	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
Pool 20	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
Pool 21	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98
Pool 22	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112
Pool 23	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123			

Matrice Clade C

	POOL 1	POOL 2	POOL 3	POOL 4	POOL 5	POOL 6	POOL 7	POOL 8	POOL 9	POOL 10	POOL 11
POOL 12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
POOL 13	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
POOL 14	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
POOL 15	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
POOL 16	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
POOL 17	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
POOL 18	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77
POOL 19	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
POOL 20	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99
POOL 21	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
POOL 22	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121

Matrice Clade D

	POOL 1	POOL 2	POOL 3	POOL 4	POOL 5	POOL 6	POOL 7
POOL 8	1	2	3	4	5	6	7
POOL 9	8	9	10	11	23	13	14
POOL 10	15	16	17	18	41	20	21
POOL 11	22	23	24	25	59	27	28
POOL 12	29	30	31	32	77	34	35
POOL 13	36	37	38	39	95	41	42
POOL 14	43	44	45	46	113	48	49

**Figure 6: Matrices de peptides synthétiques VIH-1 de la protéine Gag pour chacun des sous-types.**

### **2.3.2. Les sujets contrôles VIH-1 négatifs et positifs**

Chaque matrice a été testée avec un sujet contrôle VIH-1 négatif et un sujet contrôle VIH-1 positif. Les deux sujets contrôles VIH-1 négatif étaient des femmes adultes non infectées par le VIH-1. Les sujets contrôles VIH-1 positifs étaient des femmes adultes enceinte dont la charge virale était détectable. Quatre sujets contrôles VIH-1 positifs ont été sélectionnés en fonction du clade de la matrice à tester.

### **2.3.3. ELISpot**

Les PBMCs ont été décongelées dans du milieu RPMI contenant 10% de SFV ainsi que 0.05 µg/mL de gentamicine (R10). Les cellules ont été incubées dans du R10 toute la nuit à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>. Les plaques ELISpot (Millipore, Bedford, MA) de 96 puits avec membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF) ont été recouvertes avec 10 µg/ml d'anticorps monoclonal de souris anti-IFN-γ-humain (BD Biosciences, San Diego, CA) et conservées à +4°C pendant une nuit. Les plaques ont été lavées avec du tampon de phosphate salin 1X (PBS 1X) et bloquées avec du R10 pendant 2 heures à 37 ° C.

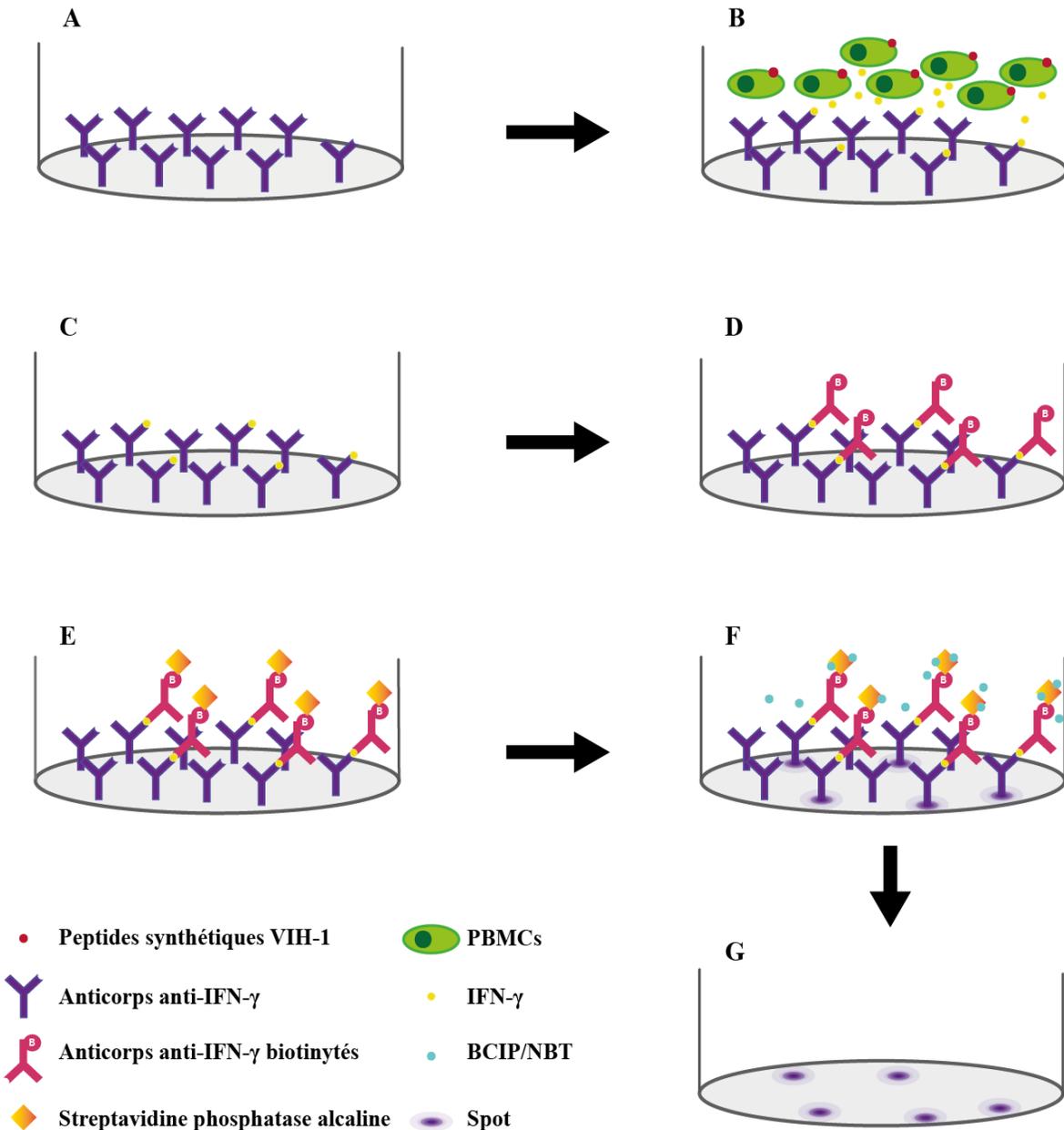
Les PBMCs ont été traitées avec 10 µL de nucléase benzonase (Novagen, San Diego, CA) et ont été resuspendues dans du milieu AIM-V (Gibco, Carlsbad, CA) supplémenté avec 2% de sérum humain inactivé (Wisent) afin d'obtenir une concentration de  $2 \times 10^6$  cellules/mL. Après cinq lavages, une suspension de 100 µL de chaque pool peptidique de VIH-1 de clade apparié (clade A [23 pools ; 122 peptides], clade B [23 pools ; 123 peptides], clade C [22 pools ; 121 peptides]), clade D [14 pools ; 49 peptides]) (0.01 µg/mL/peptide) a été mise dans les puits et combinée avec 100 000 à 200 000 cellules.

Trois contrôles positifs ont été faits pour chaque échantillon : a) 100 µl de l'antigène du Varicella Zoster virus (VZV) (Varivax III irradié à 100 000 Gy ; 1350 PFU / ml, Merck Frosst, Kirkland, QC) dilué 1/200 dans du AIM-V ; b) 1 µg d'un mélange équimolaire de 138 peptides (15-mer) basés sur la séquence d'acides aminés de la protéine pp65 du cytomégalovirus humain (CMV) (PepMix HCMVA pp65; JPT Peptide Technologies) ; c) l'anticorps monoclonal anti-CD3 de souris (OKT3; Sanquin, Amsterdam, Pays-Bas). Les contrôles positifs VZV et CMV sont des positifs contrôles additionnels à l'anti-CD3 dans le cas où l'anticorps monoclonal anti-CD3 de souris ne fonctionnerait pas. Le contrôle négatif est composé de 100 000 à 200 000 PBMCs incubés avec du milieu AIM-V supplémenté de 2% de sérum humain inactivé (Wisent) et a été fait en duplicata ou triplicata.

Les plaques ont été incubées 22 heures à 37 °C sous une atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été enlevées et les puits ont été lavés avec du PBST (PBS 1X supplémenté avec 0.05% de Tween 20 (Sigma, St-Louis, MO)). Les spots ont été développés par l'addition de 0.5 µg/ml d'anticorps monoclonal biotinylé anti-IFN-γ (BD Biosciences) ainsi que la phosphatase alcaline conjuguée à la streptavidine (Bio-Rad, Hercules, CA). Chacun des puits a été lavé trois fois avec du PBST suivi de trois autres lavages avec du PBS. Les plaques ont été finalement incubées durant cinq minutes avec une solution de substrat BCIP/ NBT (Bio-Rad, Hercules, CA) et lavées avec de l'eau. Après séchage des taches durant la nuit, celles-ci ont été comptées en utilisant un CTL ImmunoSpot® S5 UV Analyzer Motorized (Cellular Technology Ltd, OH) ainsi que le logiciel CTL ImmunoSpot® (Cellular Technology Ltd). Dans un premier temps, la plaque est scannée, puis les spots sont comptés automatiquement à l'aide de la fonction *Smart Count* du logiciel. Pour cette étape, le paramètre *spot separation* est mis au minimum afin d'obtenir une

bonne différenciation de chacun des spots. Enfin, un contrôle de qualité a été réalisé individuellement pour chacun des puits afin de confirmer les spots (**figure 7**).

Les spots considérés comme positifs sont caractérisés par un centre violet foncé entouré d'un halo de diffusion. Les puits ont été considérés comme positifs lorsque le nombre de spots formant une unité était  $\geq 50$  *spot forming units* (SFU)/ $10^6$  PBMC après la soustraction du bruit de fond (moyenne des 2 ou 3 contrôles négatifs) et supérieur ou égal à deux fois la déviation standard des deux ou trois contrôles négatifs.



**Figure 7: Schéma récapitulatif des principales étapes de L'ELISpot IFN- $\gamma$ .**

A. La membrane de PVDF a été activée et recouverte d'anticorps monoclonal de souris anti-IFN- $\gamma$ -humain. B. Les PBMCs ont été incubées avec l'antigène. C. Les molécules d'IFN- $\gamma$  sécrétées par les PBMCs sont captées par les anticorps primaires anti-IFN- $\gamma$ . D. Les anticorps secondaires anti-IFN- $\gamma$  biotinylés vont se lier aux molécules d'IFN- $\gamma$ . E. La streptavidine conjuguée à la phosphatase alcaline se lie à la biotine de l'anticorps secondaire. F. Le substrat chromogène BCIP/NBT réagit avec la streptavidine conjuguée à la phosphatase alcaline pour former un précipité coloré appelé spot. G. La membrane des puits est lavée et séchée afin de laisser apparaître les spots.

### 2.3.4. Identification et confirmation des séquences peptidiques à l'origine de la sécrétion d'IFN- $\gamma$

Une déconvolution a été réalisée pour déterminer le peptide à l'intérieur du pool de peptides qui est à l'origine de la sécrétion de cytokine en question. Par croisement, les peptides en question ont été identifiés (**figure 8**).

Matrice Clade A

	POOL 1	POOL 2	POOL 3	POOL 4	POOL 5	POOL 6	POOL 7	POOL 8	POOL 9	POOL 10	POOL 11	POOL 12
POOL 13	7840	7841	7842	7843	7844	7845	7846	7847	7848	7849	7830	7831
POOL 14	7832	7833	7834	7835	7836	7837	7838	7839	7820	7821	7822	7823
POOL 15	7824	7825	7826	7827	7828	7829	7810	7811	7812	7813	7814	7815
POOL 16	7816	7817	7818	7819	7800	7801	7802	7803	7804	7805	7806	7807
POOL 17	7808	7809	7790	7791	7792	7793	7794	7795	7796	7797	7798	7799
POOL 18	7780	7781	7782	7783	7784	7785	7786	7787	7788	7789	7770	7771
POOL 19	7772	7773	7774	7775	7776	7777	7778	7779	7760	7761	7762	7763
POOL 20	7764	7765	7766	7767	7768	7769	7750	7751	7752	7753	7754	7755
POOL 21	7756	7757	7758	7759	7850	7851	7852	7853	7854	7855	7856	7857
POOL 22	7858	7859	7860	7861	7862	7863	7864	7865	7866	7867	7868	7869
POOL 23	7870	7871										

**Figure 8: Exemple de déconvolution.**

Les pools 7, 8, 17, 19 et 21 ont présenté une sécrétion d'IFN- $\gamma$  supérieure au seuil de positivité ( $\geq 50$  SFU/ $10^6$  cellules après la soustraction du bruit de fond et  $\geq 2$ DS (contrôles)). Par croisement, il a été déterminé que les peptides 7794, 7795, 7778, 7779, 7852 et 7853 sont à l'origine de cette sécrétion.

Une confirmation de chacun des peptides a été effectuée en testant les peptides individuellement.

L'ELISpot a été réalisé tel qu'il a été décrit précédemment, cependant la suspension de 100  $\mu$ L de pool peptidique a été remplacée par 100  $\mu$ L de peptide individuel (0.01  $\mu$ g/mL) de VIH-1 de clade apparié.

## **2.4. Recherche de cytokines atypiques**

### **2.4.1. Préparation des surnageants**

Les PBMCs ont été décongelées, puis différentes techniques de stimulation ont été testées. Des cellules ont été activées avec des billes anti-CD3/anti-CD28 (BD Biosciences) afin de nous servir de contrôles positifs pour cette technique. D'autres cellules ont été stimulées avec des pools de peptides synthétiques Gag VIH-1 comprenant des épitopes potentiels des cellules T (PTE) et de consensus B (numéro de catalogue 12437, 12425; NIH AIDS Research and Reference Reagents Program, Germantown, MD) durant 24 heures. Pour chaque stimulation, 1 million de cellules ont été utilisées.

### **2.4.2. Quantification multiplexe de cytokines en cytométrie en flux**

Les cytokines sécrétées par le biais de différentes stimulations ont été mesurées dans le surnageant des PBMCs à l'aide du kit LEGENDplex™ Human Th Cytokine Panel (BioLegend, San Diego, CA). Cette technique est basée sur le principe des tests immunoenzymatiques en sandwich. Après un lavage de la plaque filtrante de 96 puits, les standards, les surnageants de cultures sont ajoutés au tampon préalablement déposé dans le puits. Les billes sont ensuite ajoutées dans chaque puits. Les billes se différencient par leurs tailles et l'intensité de leur fluorescence. La plaque recouverte de papier aluminium a ensuite été incubée sous agitation (500 rpm) pendant deux heures à température ambiante. Après l'ajout de la streptavidine couplée à la phycoérythrine (SA-PE) (marqueur fluorescent), la plaque a été incubée sous agitation (500 rpm) pendant une heure, à l'abri de la lumière. La SA-PE va se fixer aux immunocomplexes formés de manière à avoir une fluorescence proportionnelle à la quantité de cytokines présentes

dans le surnageant. Les billes ont été remises en suspension avant d'être transférées dans des tubes de 5 mL avec un tampon de lavage (fourni dans le kit) pour être analysées par cytométrie en flux (FACSCalibur).

La fluorescence émise, mesurée par cytométrie de flux, est proportionnelle à la quantité de cytokines présente dans les surnageants testés. De cette manière les cytokines peuvent être quantifiées.

## **2.5. Graphiques et statistiques**

Tous les graphiques et statistiques ont été effectués à l'aide du logiciel GraphPad *Prism 6* (GraphPad software, La Jolla, CA). Ils ont ensuite été agencés, légendés et mis en forme à l'aide d'Adobe Illustrator CC 2015 (19.0), un logiciel de création graphique vectorielle.

## TROISIÈME CHAPITRE

### RÉSULTATS

Notre hypothèse stipule que les enfants traités précocement après la naissance développent une réponse immunitaire à médiation cellulaire contre le VIH qui est quantitativement et/ou qualitativement différente de celle retrouvée chez les enfants traités plus tardivement. Notre premier objectif sera donc de caractériser les différentes réponses immunitaires à médiation cellulaire anti-VIH-1 des lymphocytes T chez l'enfant traité plus ou moins précocement.

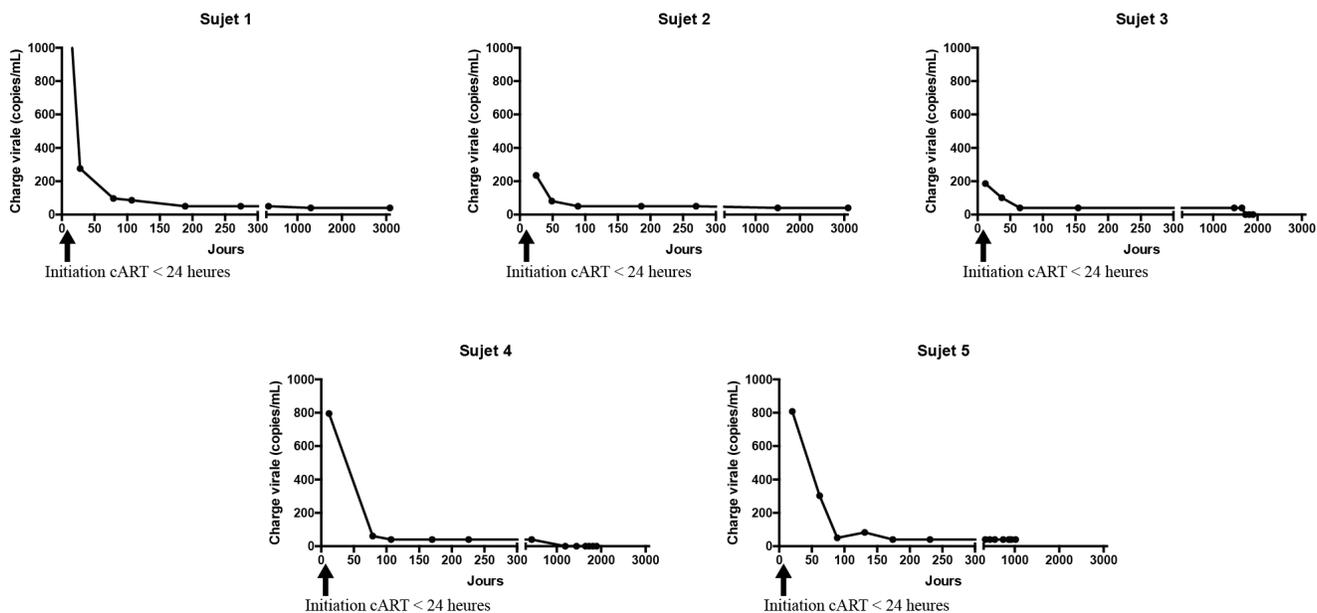
### **3.1. Réponses des lymphocytes T cytotoxiques observées chez les enfants du groupe A**

#### **3.1.1. Caractéristiques cliniques des cinq sujets du groupe A**

Les cinq sujets ont été regroupés dans le groupe A, puisqu'ils ont tous commencé leur ART durant leurs 72 premières heures de vie. En examinant de plus près les données cliniques, on constate que les 5 sujets ont commencé une cART durant les premières 24 heures. Les sujets 1 à 4 ont déjà été décrits dans un article publié par Bitnun et al. [4].

Après l'initiation de la ART, on a observé une chute vertigineuse du nombre de copies de VIH dans le sang des différents sujets. Selon la charge virale de départ, la suppression virale a été atteinte plus ou moins rapidement durant les 6 premiers mois. Par la suite, la suppression à long terme a été maintenue pendant 4.2 à 8.4 années au moment du prélèvement chez les sujets 1-4 (**figure 9**). Le sujet 5 avait maintenu une suppression virale à long terme pendant un peu plus de 3 années avant une interruption de traitement, qui a mené à un rebond rapide de la charge virale. Cette dernière a rapidement été abaissée après la réintroduction du traitement (**figure 10**). Au moment du prélèvement, la durée de suppression du sujet 5 était de 0.7 année. Les sujets du

groupe A présentaient une charge virale indétectable au moment du prélèvement de l'échantillon testé.

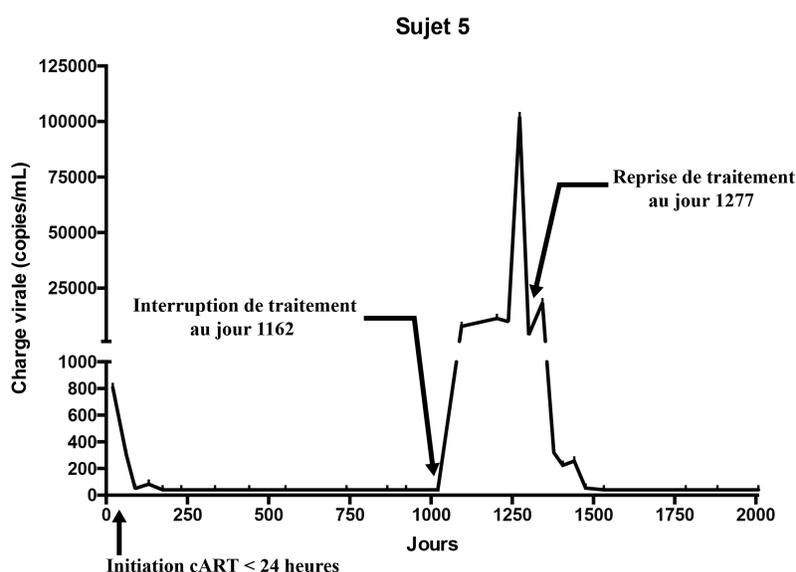


**Figure 9: Évolution de la charge virale après l'initiation du traitement et maintien de la suppression virale des 5 sujets.**

Après l'initiation de la cART, on a observé une chute drastique de la charge virale, jusqu'à atteindre une suppression virale complète durant les 6 premiers mois de vie.

Les informations dont nous disposons concernant les charges virales et la prise de cART par la mère durant la grossesse ne sont pas complètes. Les recommandations actuelles pour réduire le risque de transmission de la mère à l'enfant, préconise le mode de délivrance par césarienne élective [95]. Les données observées concernant l'évolution de la charge virale (**figure 9**) montrent que les sujets 1, 4 et 5, nés par césarienne élective présentent une charge virale plus importante que les sujets 2 et 3 nés par accouchement vaginal spontané. Il n'est pas possible de

conclure que le mode de délivrance a eu un impact sur les charges virales observées dû au manque d'informations dont nous disposons et au petit nombre de sujets à l'étude. D'après les données cliniques, les mères des sujets 1 et 5 étaient sous traitement antirétroviral durant la grossesse et avaient une charge virale respective de 97,701 et 3,066 copies/mL de plasma peu de temps avant l'accouchement.



**Figure 10: Rebond viral du Sujet 5 à 3 ans d'âge.**

Après l'interruption de la cART, on observe une hausse de la charge virale rapide allant jusqu'à 102,172 copies d'ARN VIH /mL de plasma qui a rapidement été abaissée après la réintroduction de la thérapie.

La **figure 11** présente les comptes de lymphocytes T CD4+ et CD8+ mesurés tout au long de la vie de sujets du groupe A. Le profil observé dans la majorité des cas ne correspond pas à ce qui est généralement décrit lors de l'infection à VIH (**figure 5**), ce qui pourrait être expliqué par le fait que ces enfants sont sous traitement ART. La chute drastique du taux de CD4 et l'augmentation du taux de CD8 n'est observée que pour le sujet 2. Les données dont nous

disposons montrent un compte CD4 et CD8 respectant les normes établies. Il a déjà été montré que la prise de cART et un contrôle virologique à long terme permet le maintien d'un compte CD4 et CD8 normal chez l'adulte infecté [96].

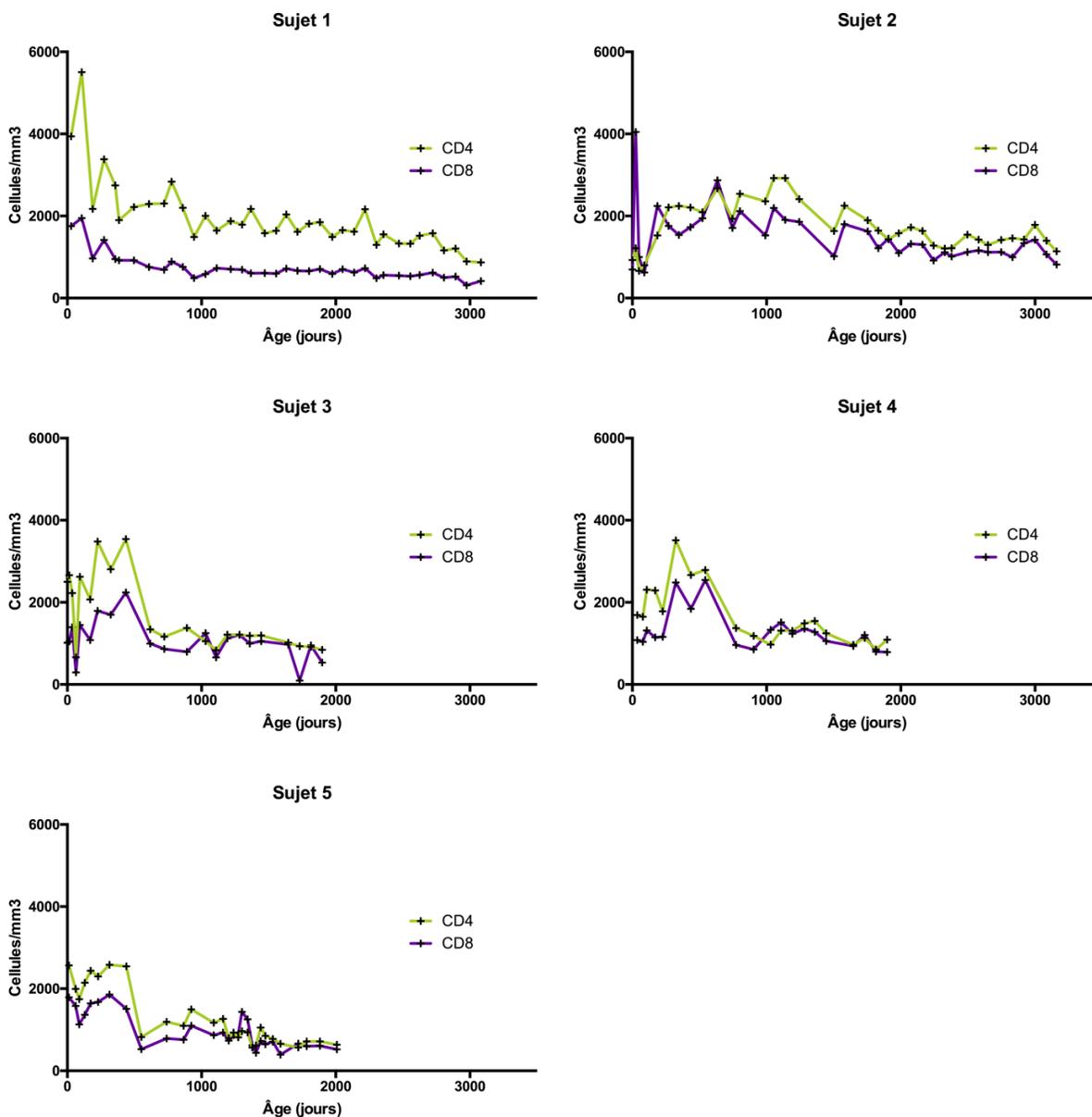


Figure 11: Évolution des comptes des lymphocytes T CD4+ et CD8+ au fil du temps chez les sujets du groupe A.

### 3.1.2. ELISpot IFN- $\gamma$ avec une stimulation par matrice de peptides

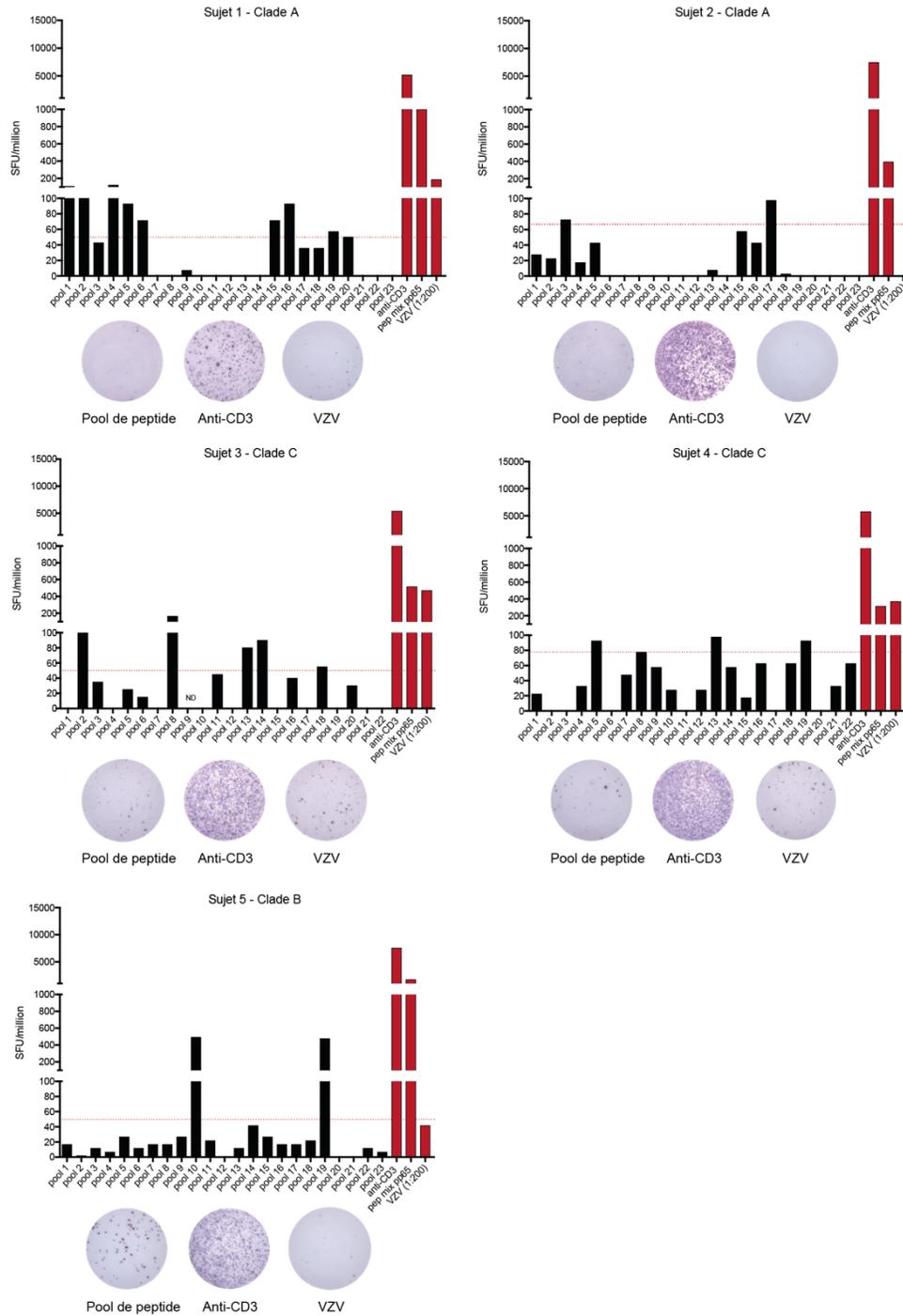
Les résultats obtenus à la suite des tests ELISpot IFN- $\gamma$  en matrice de pools de peptides montrent que les PBMCs des enfants ayant initié la cART dans les 24 heures suivant leur naissance produisent de l'IFN- $\gamma$  en réponse à une stimulation antigène spécifique.

Les réponses IFN- $\gamma$  dirigées contre l'anticorps monoclonal anti-CD3 de souris et la protéine pp65 du cytomégalovirus humain (CMV) sont numériquement significatives et supérieures aux réponses observées lors la stimulation avec des peptides synthétiques Gag VIH-1 chez les cinq sujets en question. Cependant les réponses IFN- $\gamma$  dirigées contre l'antigène VZV du virus de la varicelle sont très hétérogènes et sont numériquement significatives pour trois sujets sur cinq.

Les sécrétions de cytokines ont été mesurées en termes de SFU/10<sup>6</sup> PBMC. La stimulation par des pools de peptides composés de peptides synthétiques Gag VIH-1 correspondant au clade du virus infectant l'enfant a induit un nombre de cellules plus ou moins grand ayant sécrété de l'IFN- $\gamma$ . Les réponses observées varient fortement d'un sujet à l'autre et les pools de peptides stimulant les cellules. On fait état de deux pools au minimum par sujets ayant induit un nombre significatif de cellules T produisant de l'IFN- $\gamma$  est significatif. Dans ces puits positifs, le nombre de cellules produisant la cytokine d'intérêt dépasse le seuil de positivité, ce qui signifie que le nombre de spots compté est  $\geq 50$  SFU/10<sup>6</sup> PBMC après la soustraction du bruit de fond (moyenne des 2 ou 3 contrôles négatifs) et supérieur ou égal à deux fois la déviation standard des deux ou trois contrôles négatifs.

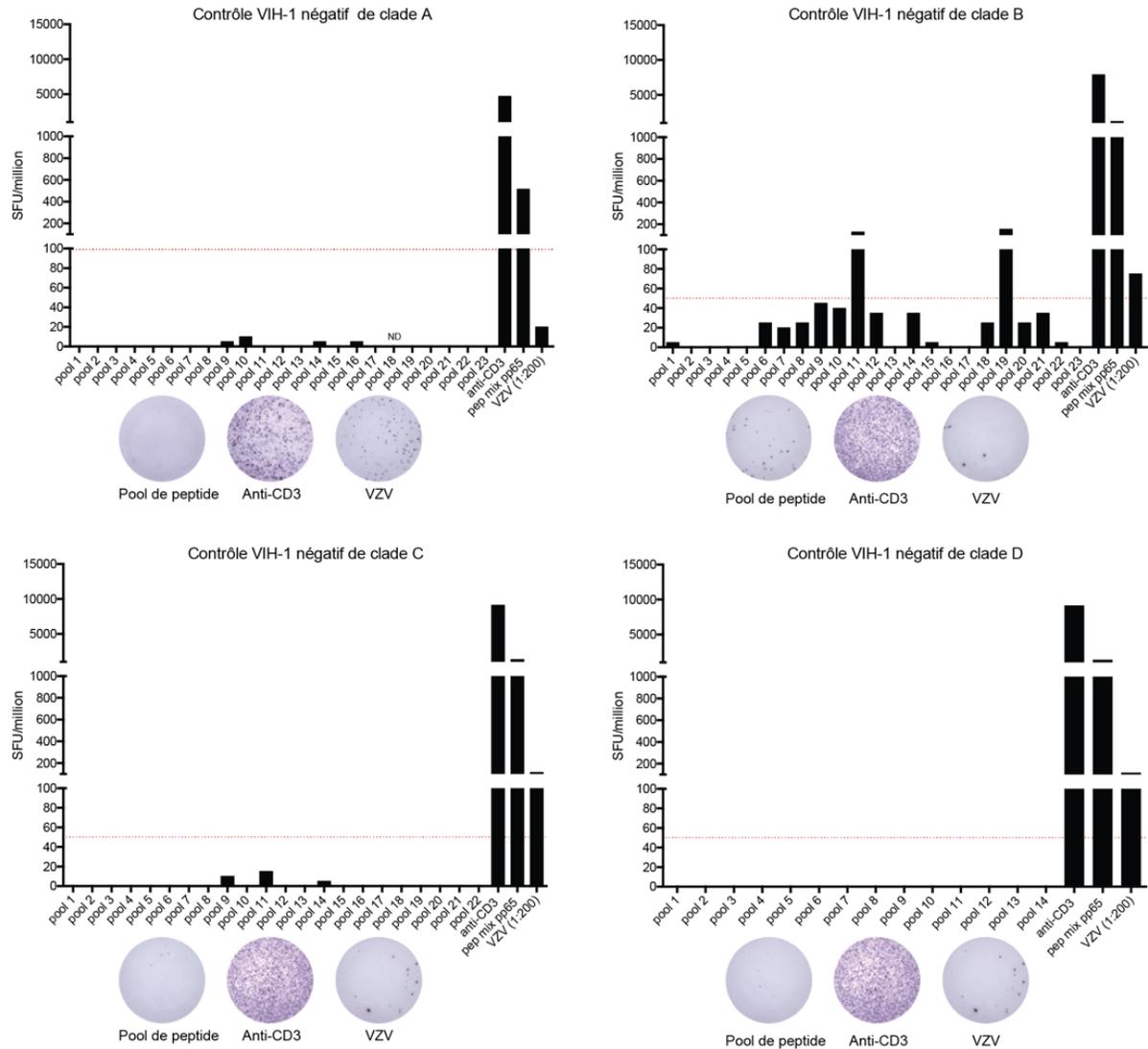
Le sujet 2 ne présente pas un grand nombre de pools induisant la sécrétion de cytokines (**figure 12**). Le sous-type du sujet 2 n'a jamais été clairement identifié puisque sa faible charge virale a rapidement été abaissée. D'après les dossiers cliniques, il serait fortement probable qu'il soit du sous-type A, compte tenu des clades de VIH circulant dans son pays d'origine. C'est pour cette raison que ses cellules ont été stimulées avec la matrice de clade A. Le sujet 5 présente des sécrétions d'IFN- $\gamma$  supérieures à celles observées chez les quatre autres sujets.

Parallèlement, la production d'IFN- $\gamma$  en réponse à une stimulation par les différentes matrices peptidiques a été mesurée chez deux femmes adultes saines non-infectées par le VIH-1 et des femmes adultes infectées par différents clades du VIH-1. Lorsque l'on a stimulé les cellules avec les matrices des clades A, C et D, la production d'IFN- $\gamma$  observées n'était pas significative chez les contrôles adultes sains (**figure 13**). En ce qui concerne la matrice de clade B, on fait état de deux pools positifs lors de la stimulation d'une des femmes adultes saines non-infectées par le VIH-1. On parle ici de réactivité croisée. Parmi les sujets infectés par le VIH-1 de clade B, on compte 12 sujets sur 18 pour lesquels ces pools sont positifs. Plus de la moitié (10/18) des sujets infectés par le VIH-1 de clade B présentent une grande diversité de réponse, et chez ces 10 sujets, les pools 11 et 19 étaient aussi positifs.



**Figure 12: Les sujets du groupe A produisent de l'IFN- $\gamma$  en réponse à une stimulation par des pools de peptides composés de peptides synthétiques Gag VIH-1 correspondant au clade du virus infectant le sujet.**

Les cinq sujets présentent une production d'IFN- $\gamma$  qui est plus ou moins élevée selon les sujets et le pool de peptide stimulant les PBMCs.

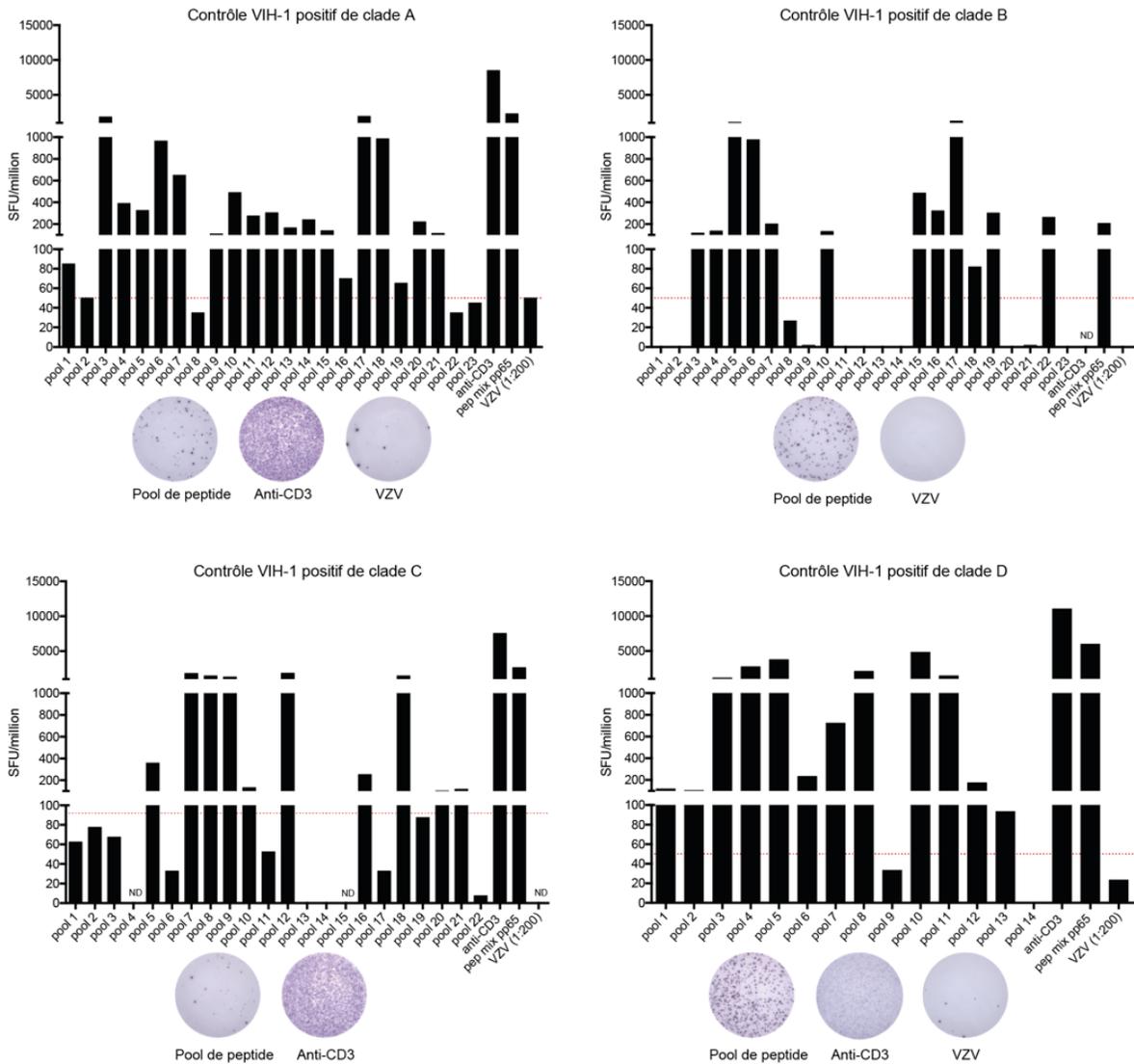


**Figure 13: Réponses IFN- $\gamma$  après stimulation des cellules avec différentes matrices peptidiques chez des sujets contrôles adultes non infectés par le VIH-1.**

Aucune production d'IFN- $\gamma$  significative n'est observée lorsque les cellules de sujets non infectés ont été stimulées avec les matrices A, C et D. Deux pools ont été considérés comme positif pour la matrice de sous-type B.

Malgré l'observation de sécrétion dépassant le seuil de positivité chez le contrôleur sain pour la matrice de clade B, on a remarqué que les PBMCs du sujet 5 (clade B) présentent une sécrétion

d'IFN- $\gamma$  numériquement supérieure à celle observée chez le contrôle. On remarque aussi que les pools considérés comme positifs ne sont pas exactement les mêmes.



**Figure 14: Réponses IFN- $\gamma$  après stimulation des cellules avec différentes matrices peptidiques chez des sujets contrôles adultes infectés par le VIH-1.**

La majorité des pools a induit une sécrétion d'IFN- $\gamma$  supérieure au seuil de positivité et qui s'approche parfois du niveau mesuré dans les contrôles positifs.

En comparant les sécrétions d'IFN- $\gamma$  de cellules appartenant à des adultes infectés (**figure 14**), on constate que les réponses à médiation cellulaire sont très différentes de celles observées chez les enfants traités précocement. Elles sont plus abondantes et le nombre de pools positifs est beaucoup plus élevé.

### 3.1.3. ELISpot IFN- $\gamma$ avec une stimulation par peptides individuels

À la suite de la déconvolution préalablement expliquée dans la section 2.3.3 du matériel et méthode, chacun des peptides identifiés a été confirmé à l'aide d'un second ELISpot où les PBMCs ont cette fois été stimulées avec des peptides individuels.

Plusieurs peptides ont été identifiés et confirmés par cette méthode chez les différents sujets. Le nombre de SFU par million de cellules observé semble être du même ordre de grandeur que celui observé lors de l'ELISpot en matrice (**figure 15**). Aucune sécrétion n'a été observée pour le sujet 2. Nous n'avons pas identifié la cause de cette différence, mais deux hypothèses peuvent être posées. Il est possible que ce soit dû au fait que les échantillons proviennent de deux prélèvements différents ayant 3 mois d'écart ou bien les deux pools précédemment considérés positifs chez le sujet 2 étaient en réalité des faux positifs et lorsque les peptides sont testés individuellement, aucune sécrétion d'IFN- $\gamma$  n'est observée. Les réponses observées lors de l'ELISpot en matrice pour le sujet 2 n'étaient pas très élevées, il est probable que plusieurs peptides à l'intérieur d'un pool aient pu avoir un effet synergique. En effet, la stimulation des PBMCs par plusieurs peptides a pu augmenter le taux de sécrétion d'IFN- $\gamma$  observé lors des ELISpot avec une stimulation par matrice. Les échantillons du sujet 1 provenaient eux aussi de différentes visites intercalées d'environ 3 mois.

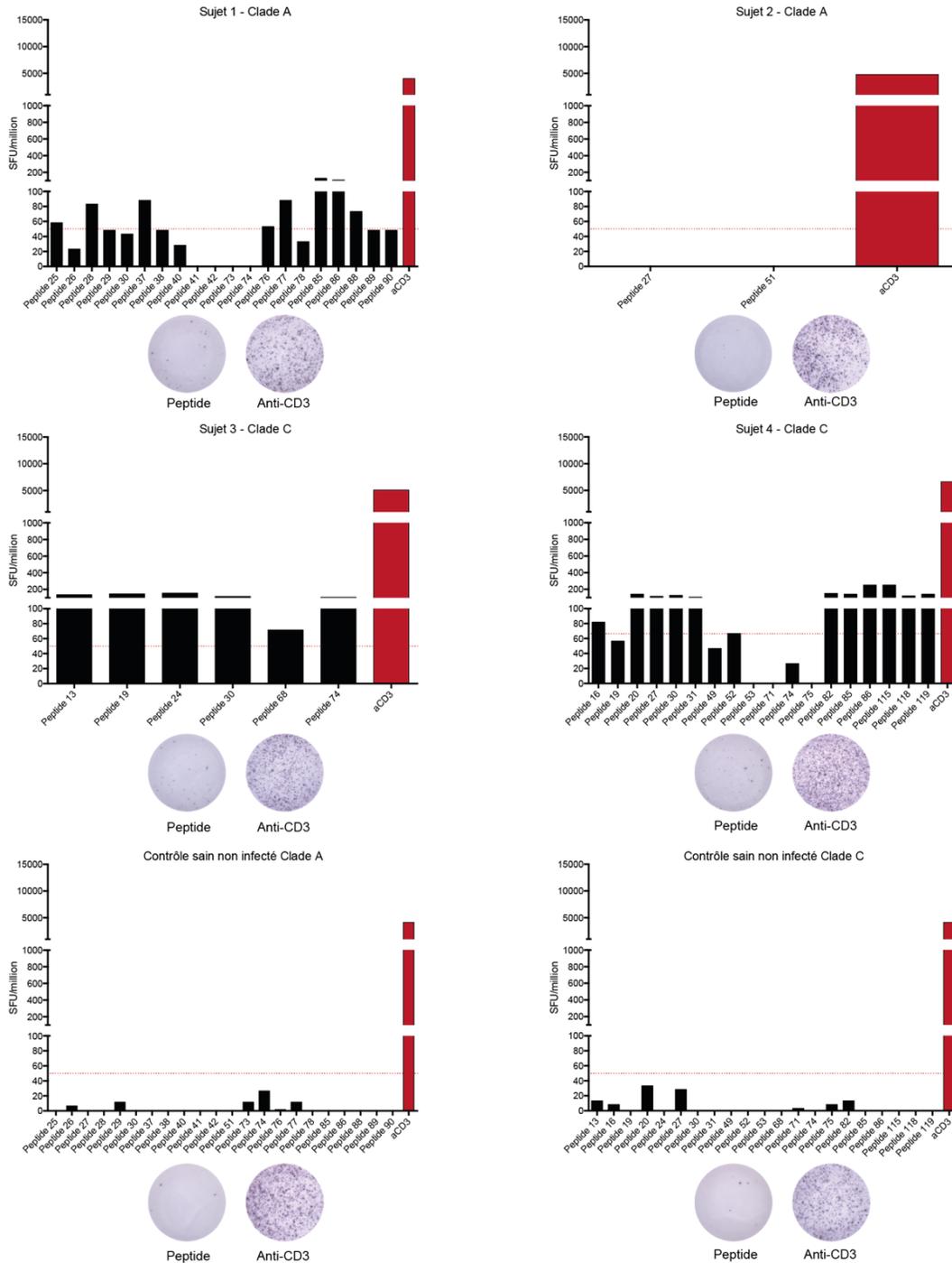


Figure 15: Les cellules des sujets du groupe A engendrent de l'IFN- $\gamma$  en réponse à une stimulation par des de peptides synthétiques individuels Gag VIH-1 correspondant au clade du virus infectant le sujet en question.

L'ELISpot par peptides individuels n'a pas pu être fait pour le sujet 5, dû à une faible quantité d'échantillons.

### 3.1.4. Corrélation des réponses dans le temps

Afin d'avoir la certitude que différents prélèvements ne signifiaient pas différentes réponses à médiation cellulaire, nous avons choisi le sujet 1 du groupe A pour lequel les échantillons étaient plus nombreux et nous avons réalisé un second test ELISpot en matrice avec des cellules provenant d'une visite différente. Les résultats ont montré que les réponses à médiation cellulaire étaient différentes avec un écart de 6 mois entre les deux visites. Cependant, un test de corrélation a apporté la preuve que les réponses observées étaient corrélées dans le temps avec un test de Pearson où la valeur de P était de 0.0131 et un test de Spearman avec  $P = 0.0238$  (figure 16).

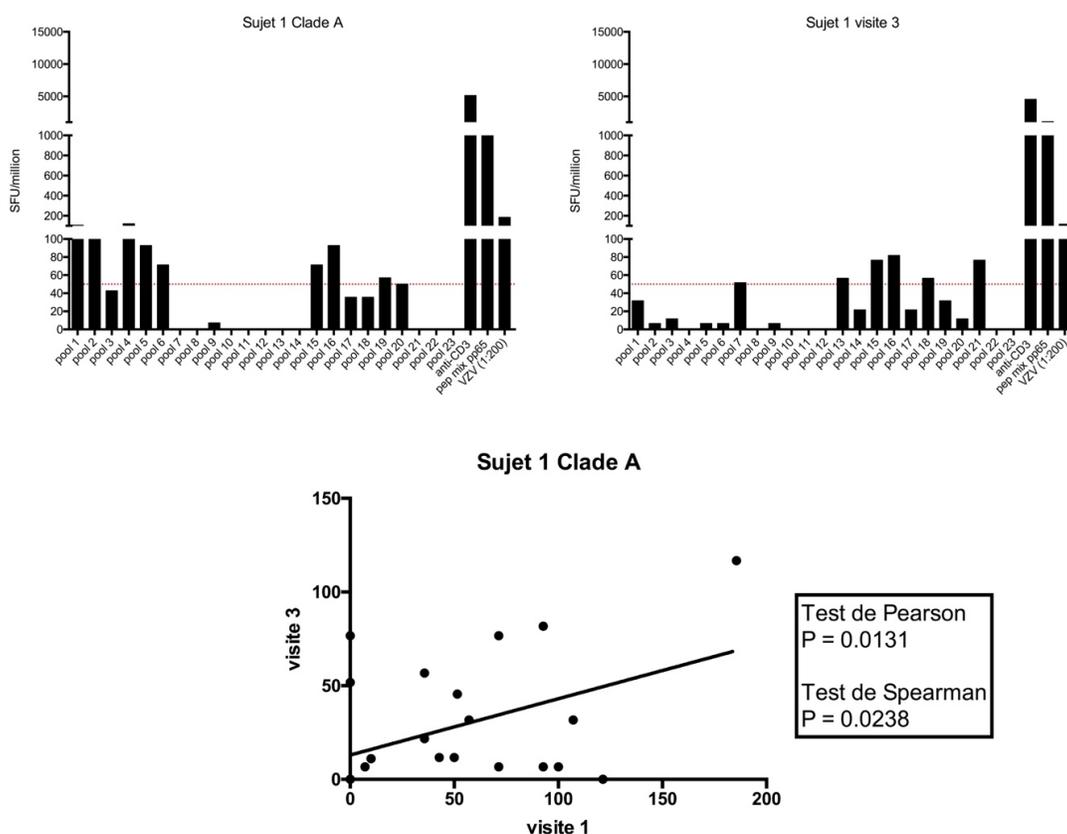


Figure 16: Corrélation de la magnitude des réponses à médiation cellulaire à chaque pool en termes de SFU au cours du temps.

### 3.1.5. Séquences peptidiques correspondant aux épitopes décrits dans la littérature

Parmi les séquences peptidiques identifiées et confirmées, de nombreuses correspondances ont été trouvées entre les séquences peptidiques et les épitopes LTC/CD8+ décrits précédemment dans la littérature. Dans un premier temps, les séquences ont été comparées avec la « A list », qui est une liste des épitopes LTC / CD8 + VIH les mieux définis selon un article de Brander et collègues [97] (**Tableau I**), puis à la liste des épitopes LTC/CD8+ décrits au moins une fois dans la littérature (**Annexe 1**). À l'heure actuelle, le HLA des patients n'est pas connu. La colonne HLA du tableau ci-dessous, correspond aux antigènes HLA qui peuvent restreindre ces épitopes.

Sujets	Clade	Séquence du peptide	Épitope	Protéine	HXB2 début	HXB2 fin	Sous-proteine	HXB2 DNA Contig	Sous type	HLA
Sujet 1	CRF06-epx	QSLSPRTLNAWVKVI	SPRTLNAWV	Gag	148	156	p24(16-24)	1231..1257		B*0702
		ACQGVGGPGHGKARVL	ACQGVGGPGHK	Gag	349	359	p24(217-227)	1834..1866		A*1101
		GPGHKARVL	GPGHKARVL	Gag	355	363	p24(223-231)	1852..1878	B	B*0702
Sujet 3	C	EELRSLYNTVATLYC	ELRSLYNTV	Gag	74	82	p17(74-82)	1009..1035		B*0801
			RSLYNTVATLY	Gag	76	86	p17(76-86)	1015..1047	B	A*3002, B58, B63
			SLYNTVATL	Gag	77	85	p17(77-85)	1018..1044	B	A*0201, A*0202, A*0205
			SLYNTVATLY	Gag	77	86	p17(77-86)	1018..1047	B	A*0201
			LYNTVATL	Gag	78	85	p17(78-85)	1021..1044		Cw14
			LYNTVATLY	Gag	78	86	p17(78-86)	1021..1047		A*2902, B*4403
		KIVRMYSPLSILDIK	VRMYSPLSILDIK	Gag	274	282	p24(142-150)	1609..1635		Cw18
			YSPVSILDI	Gag	277	285	p24(145-153)	1618..1644	CRF01_AE	Cw*0102
			YVDRFFKTLRAEQAT	YVDRFFKTL	Gag	296	304	p24(164-172)	1675..1701	
Sujet 4	C	SLYNTVATLYCVHEE	SLYNTVATL	Gag	77	85	p17(77-85)	1018..1044	B	A*0201, A*0202, A*0205
			SLYNTVATLY	Gag	77	86	p17(77-86)	1018..1047	B	A*0201
			LYNTVATL	Gag	78	85	p17(78-85)	1021..1044		Cw14
			LYNTVATLY	Gag	78	86	p17(78-86)	1021..1047		A*2902, B*4403
Sujet 5	B	IYKRWIIGLNKIVR	KRWIIGLNK	Gag	263	272	p24(131-140)	1576..1605	B	B*2705

Tableau I: Séquences peptidiques correspondant aux épitopes LTC/CD8+ les mieux définis.

### 3.1.6. Mesure de la taille des réservoirs

Les mesures de réservoirs viraux ont été effectuées par Amélie Pagliuzza du laboratoire du Dr. Nicolas Chomont en utilisant deux méthodes différentes. La première méthode est basée sur la PCR (polymerase chain reaction) dans le but de mesurer l'ADN VIH intégré et total. La seconde, nommée TILDA (Tat / rev Induced Limitation Dilution Assay), est une méthode qui permet la mesure de la fréquence de la production d'ARN suite à une stimulation cellulaire avec PMA/néomycine [98].

Les résultats obtenus montrent que la taille des réservoirs des sujets du groupe A était très petite pour tous les sujets. Les mesures de réservoir du sujet 5 étaient au-dessus de la limite de détection à la fois en ce qui concernait l'ADN viral intégré et l'ADN viral total (**tableau II**).

Patient	ADN VIH intégré (copies/10 <sup>6</sup> cellules T CD4)	ADN VIH total (copies/10 <sup>6</sup> cellules T CD4)	TILDA (Événements positifs par 10 <sup>6</sup> cellules)
Sujet 1	7	378	1,5
Sujet 2	13	11	1,5
Sujet 3	27	14	1,5
Sujet 4	11	10	1,4
Sujet 5	32	119	1,5

Limite de détection

Tableau II: Taille des réservoirs viraux des 5 sujets du groupe A

## 3.2. Les réponses à médiation cellulaire chez le groupe B

Pour répondre à notre hypothèse de départ, les réponses à médiations cellulaires chez des individus traités plus tard ont été également étudiées pour pouvoir les comparer à celles observées chez les individus du groupe A.

Le groupe B regroupe les enfants ayant initié une cART plus de 72 heures après leur naissance et ayant par la suite maintenu une charge virale indétectable. Il est subdivisé en trois groupes, B1 (initiation de cART après 72 heures, mais durant les 30 premiers jours de vie), B2 (initiation de cART entre un mois et un an de vie), et B3 (initiation de cART après la première année de vie).

### 3.2.1. Le groupe B1

Le groupe B1 ne contient actuellement pas assez de sujets ( $n = 1$ ) pour permettre une interprétation objective. Le sujet du groupe B1 montre une réponse à médiation cellulaire différente de celle observée chez les sujets traités plus précocement (**figure 17**). Les pools de peptides ayant induit une sécrétion de cytokine supérieure au seuil de positivité, sont plus nombreux et la fréquence de cellules produisant de l'IFN- $\gamma$  est beaucoup plus haute que celle observée chez les sujets du groupe A. Le sujet RXB est un adolescent de 18 ans d'âge au moment du prélèvement testé. De nombreuses données cliniques concernant la charge virale du sujet RXB sont manquantes, et les données dont nous disposons révèlent que sa virémie était indétectable depuis au moins les 6 derniers mois.

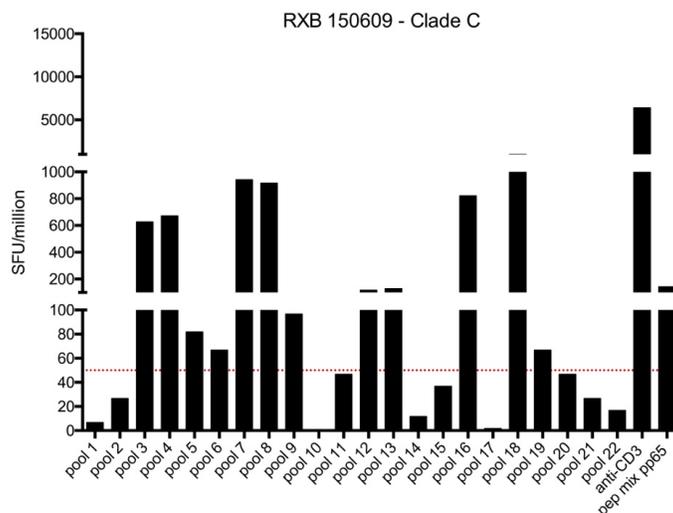


Figure 17: Production d'IFN- $\gamma$  chez un sujet infecté par le VIH-1 appartenant au groupe B1 en réponse à la matrice peptidique de clade C.

La figure 18 montre les données dont nous disposons pour le sujet RXB. Le graphique représentant la charge virale n'indique pas une augmentation, mais un changement dans la nomenclature. En réalité, la charge virale de l'individu est indétectable et la valeur de 40 copies/mL de plasma indique le seuil de détection des tests actuels. Les comptes CD4 et CD8 observés correspondent aux valeurs de références, c'est à dire entre 400 cellules/mm<sup>3</sup> et 2000 cellules/mm<sup>3</sup> pour les CD4 et entre 200 cellules/mm<sup>3</sup> et 1500 cellules/mm<sup>3</sup> pour les CD8 [99].

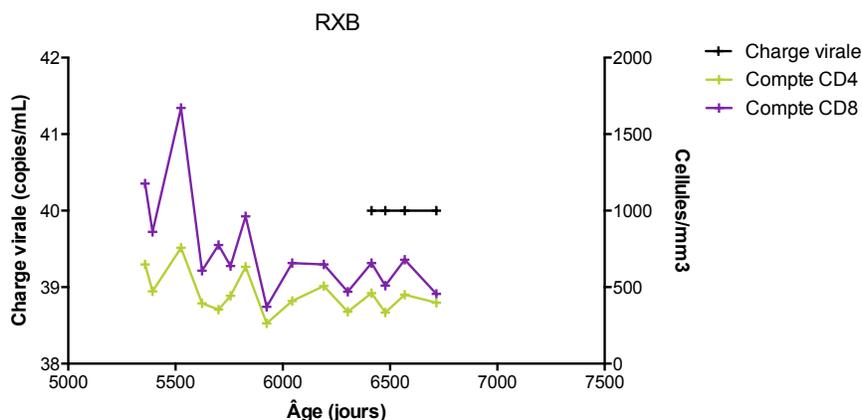
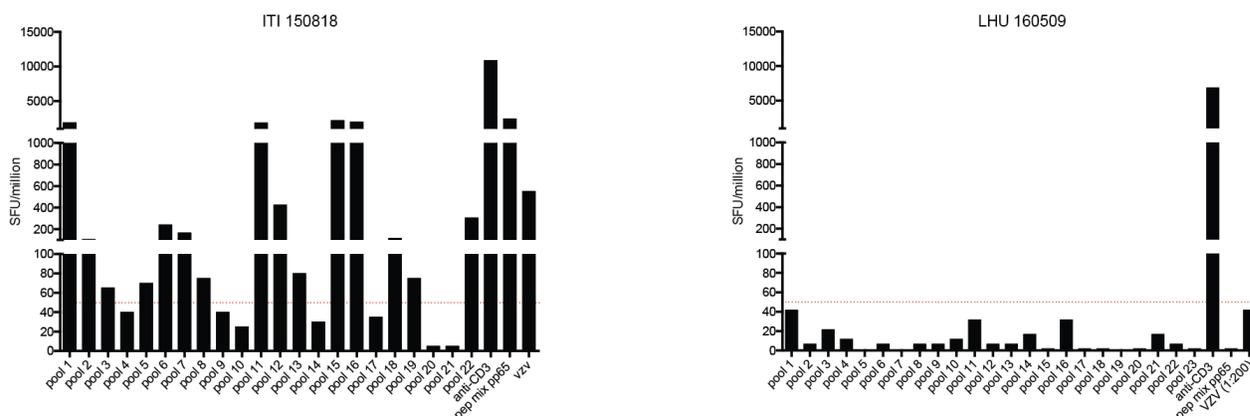


Figure 18: Charge virale et comptes des cellules CD4 et CD8 au fil du temps.

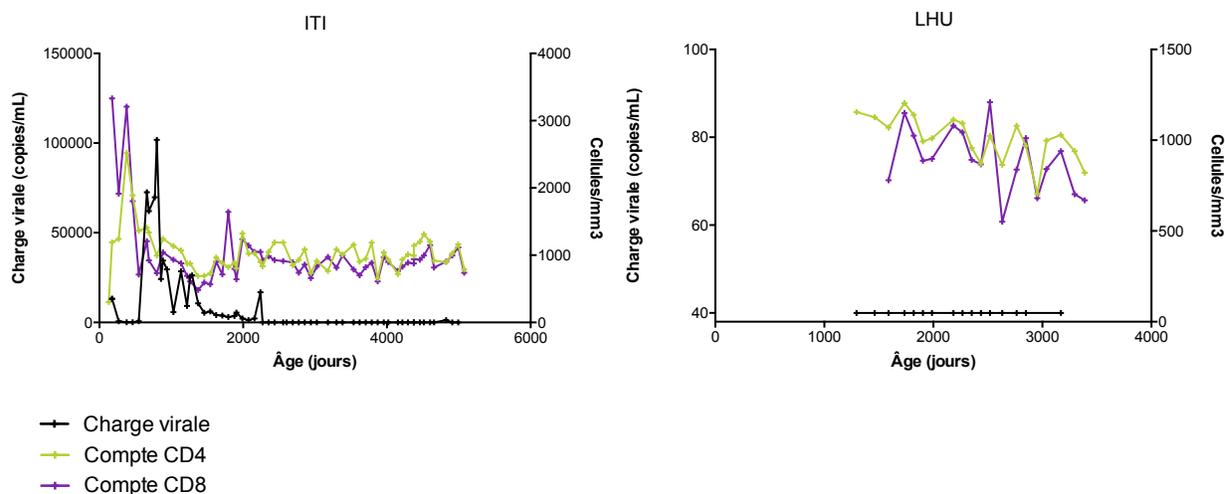
### 3.2.2. Le groupe B2

Le groupe B2 est composé des sujets dont la cART a été initiée entre un mois et un an de vie et dont la charge virale est maintenue indétectable (n = 2). Dans ce groupe, on distingue 2 catégories de réponses (**figure 19**). L'un des sujets a produit une puissante réponse à médiation cellulaire, alors que l'autre sujet n'a pas développé de réponses. Un grand nombre de pools ont induit une forte production d'IFN- $\gamma$  chez le sujet ITI. La quantité d'IFN- $\gamma$  sécrétée était supérieure à celle observée chez les enfants traités dans les 24 heures suivant leurs naissances. À l'inverse, aucun des pools de peptides testés chez le sujet LHU n'a induit de sécrétion d'IFN- $\gamma$  qui dépassait le seuil de positivité. D'après les données cliniques que nous possédons, on sait que ces deux sujets ont respectivement 13 et 8 ans, que le sujet ITI est né par césarienne élective, alors que le sujet LHU est né par accouchement vaginal spontané. De plus, aucune réponse n'a été observée lors de la stimulation par CMV et VZV chez le sujet LHU.



**Figure 19: Production d'IFN- $\gamma$  par les cellules de sujets infectés par le VIH-1 et traités entre 1 mois et 1 an de vie en réponse à la stimulation par différentes matrices peptidiques.**

L'analyse des données cliniques collectées montre que le sujet ITI a atteint une suppression virale au bout de 6.5 années alors que le sujet LHU a atteint une suppression virale à l'âge de 3.5 ans. La charge virale à la naissance de ces deux sujets est inconnue (**figure 20**), rendant impossible la caractérisation complète de la suppression virale chez ces deux sujets.



**Figure 20: Charges virale VIH et comptes CD4 et CD8 chez les sujets du groupe B2.**

Les comptes de lymphocytes T CD4+ et CD8+ observés ne correspondent pas tout à fait aux variations observées. Pour le sujet ITI, une augmentation rapide des taux de lymphocytes T CD4+ et CD8+ est observée durant la phase aiguë. La chute drastique du taux de CD4 observée dans la **figure 20** durant la phase aiguë correspond au pic de virémie observé dans la **figure 20**. Une augmentation du taux de CD8 est observée à chacun des pics de virémie, suggérant le développement d'une réponse LTC VIH-spécifique.

### 3.2.3. Le groupe B3

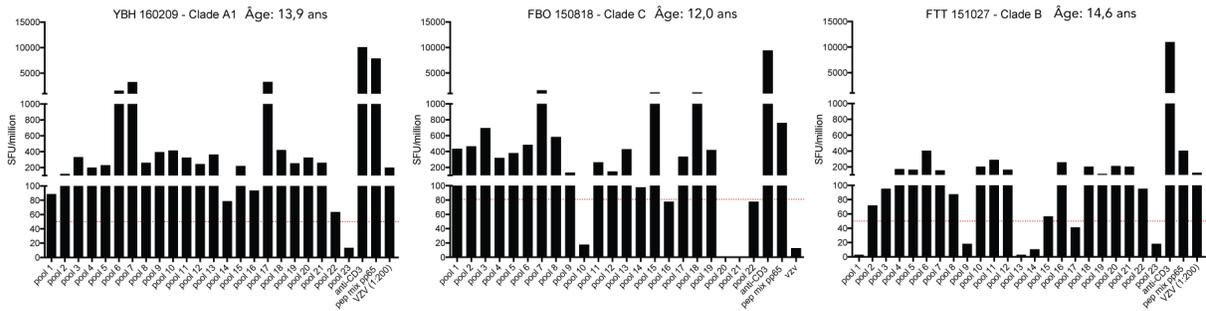
Le groupe B3 comporte de nombreux sujets âgés de 5 à 18 ans (n = 14) ce qui permet d'avoir un échantillon assez complet des réponses possibles selon l'âge du sujet. Cette catégorie a pu

être divisée en 3 groupes en fonction du nombre de pools ayant induit une production d'IFN- $\gamma$  pour une haute fréquence de ce PBMCs. Les résultats obtenus pour le groupe B3 sont très hétérogènes. Dans la **figure 21**, la partie A regroupe les sujets pour lesquels une haute fréquence de PBMCs ont produit une quantité élevée d'IFN- $\gamma$ , en réponse à la stimulation d'une grande diversité de pools de peptides. Dans la partie B, on trouve les sujets ayant une fréquence moyenne de PBMCs produisant de l'IFN- $\gamma$  en réponse à certains pools de peptides. Enfin dans la partie C, on trouve les sujets dont une faible fréquence de PBMCs ont produit de l'IFN- $\gamma$  ou n'en ont pas produit.

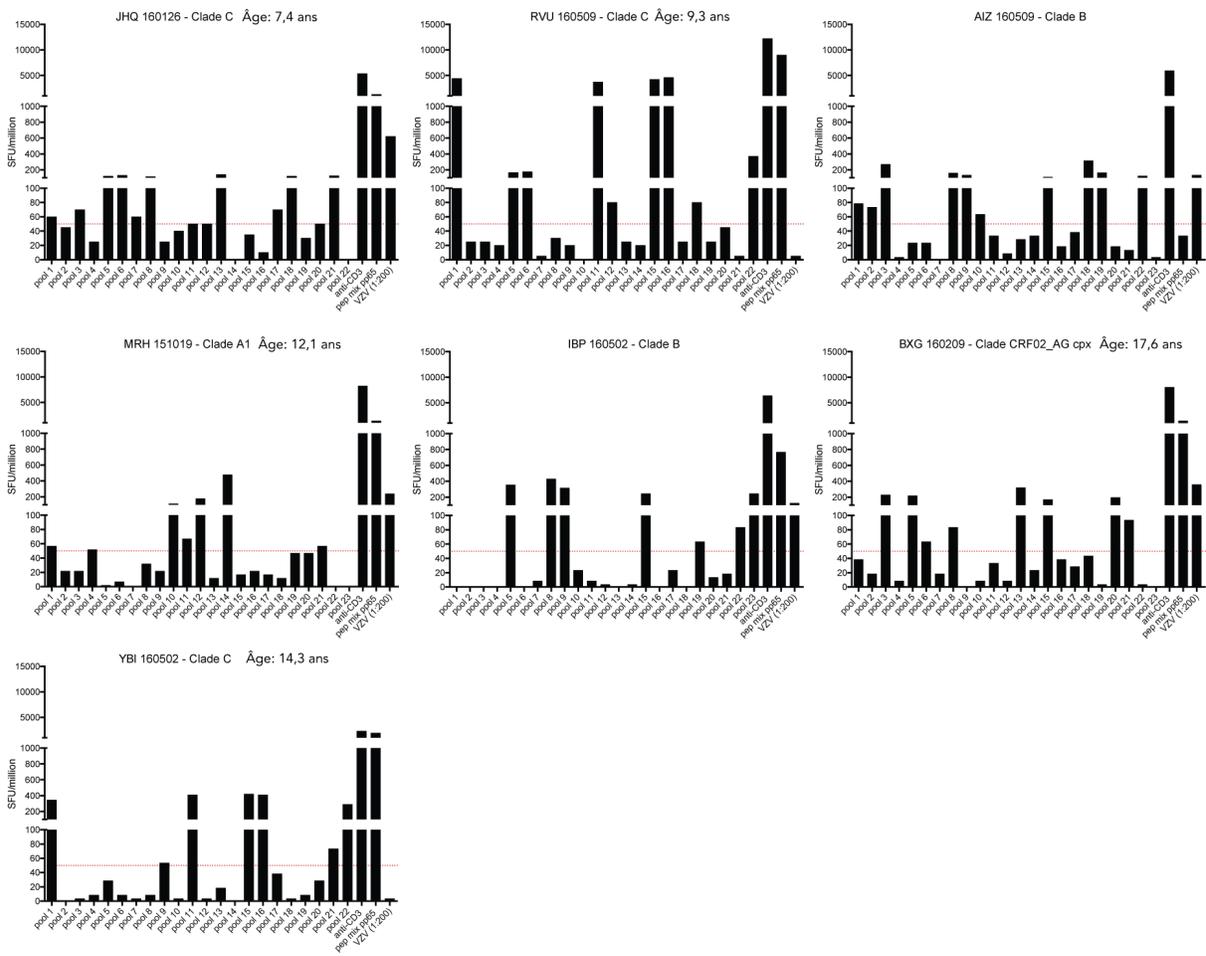
D'après les données cliniques incomplètes dont nous disposons, on sait que parmi les 14 sujets, 9 d'entre eux sont nés par accouchement vaginal. Cependant, à la vue de ces résultats, aucun de lien entre les réponses observées et le mode de délivrance ne peut être fait. Dans la partie C de la **figure 21**, 3 des sujets pour lesquels l'amplitude et la diversité des réponses observées sont plus faibles sont nés par voie vaginale. Pour le sujet FKX, le mode de délivrance n'est pas connu. Néanmoins, 2 des sujets étant dans la partie A de cette même figure sont également nés par voie vaginale, le mode de délivrance du dernier sujet n'est pas connu. L'âge des individus ne semble pas avoir eu d'influence au niveau des réponses observées.

D'après les résultats obtenus dans ce groupe, on constate que les réponses développées par des sujets ayant été traités un an après leur naissance sont différentes d'un sujet à l'autre même si ces sujets présentent de nombreuses similarités.

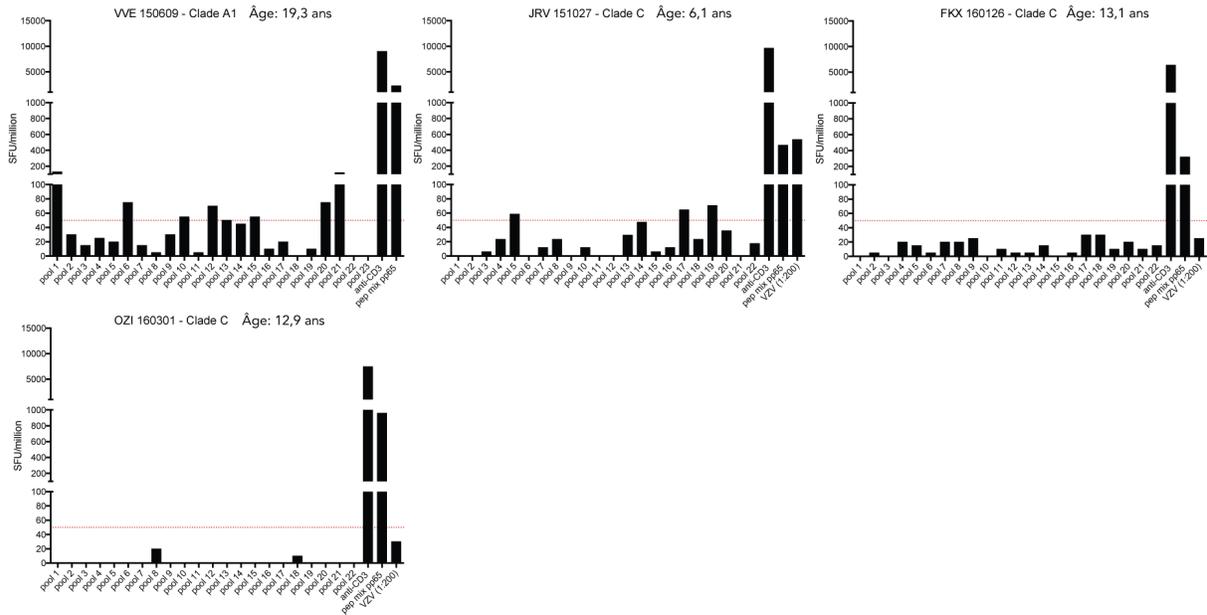
A



B



C



**Figure 21: Production d'IFN- $\gamma$  par les cellules de sujets traités après 1 an de vie en réponse à la stimulation par des pools de peptides concordant avec le sous-type de VIH-1 infectant le sujet.**

Les sujets ont été différenciés suivant le nombre de pools pour lesquels le nombre de SFU/million de cellules était considéré comme positif, mais aussi la quantité de cellules ayant produit de l'IFN- $\gamma$ . **A.** Sujets ayant une grande quantité de cellules ayant produit de l'IFN- $\gamma$  en réponse à la majorité de pools de peptides de la matrice. **B.** Sujets ayant une quantité modérée de cellules ayant produit de l'IFN- $\gamma$  en réponse à certains pools de peptides **C.** Sujets ayant un faible nombre de cellules produisant de l'IFN- $\gamma$ .

La **figure 22** montre l'évolution de la charge virale et des comptes CD4 et CD8 des sujets du groupe B3. Les données cliniques récoltées pour les sujets du groupe B3 ne remontent pas aux premiers jours de vie de ces sujets. De plus, les données sont manquantes pour deux des quatorze sujets. Aucun lien n'a pu être fait entre les données cliniques et la fréquence de cellules produisant de l'IFN- $\gamma$ .

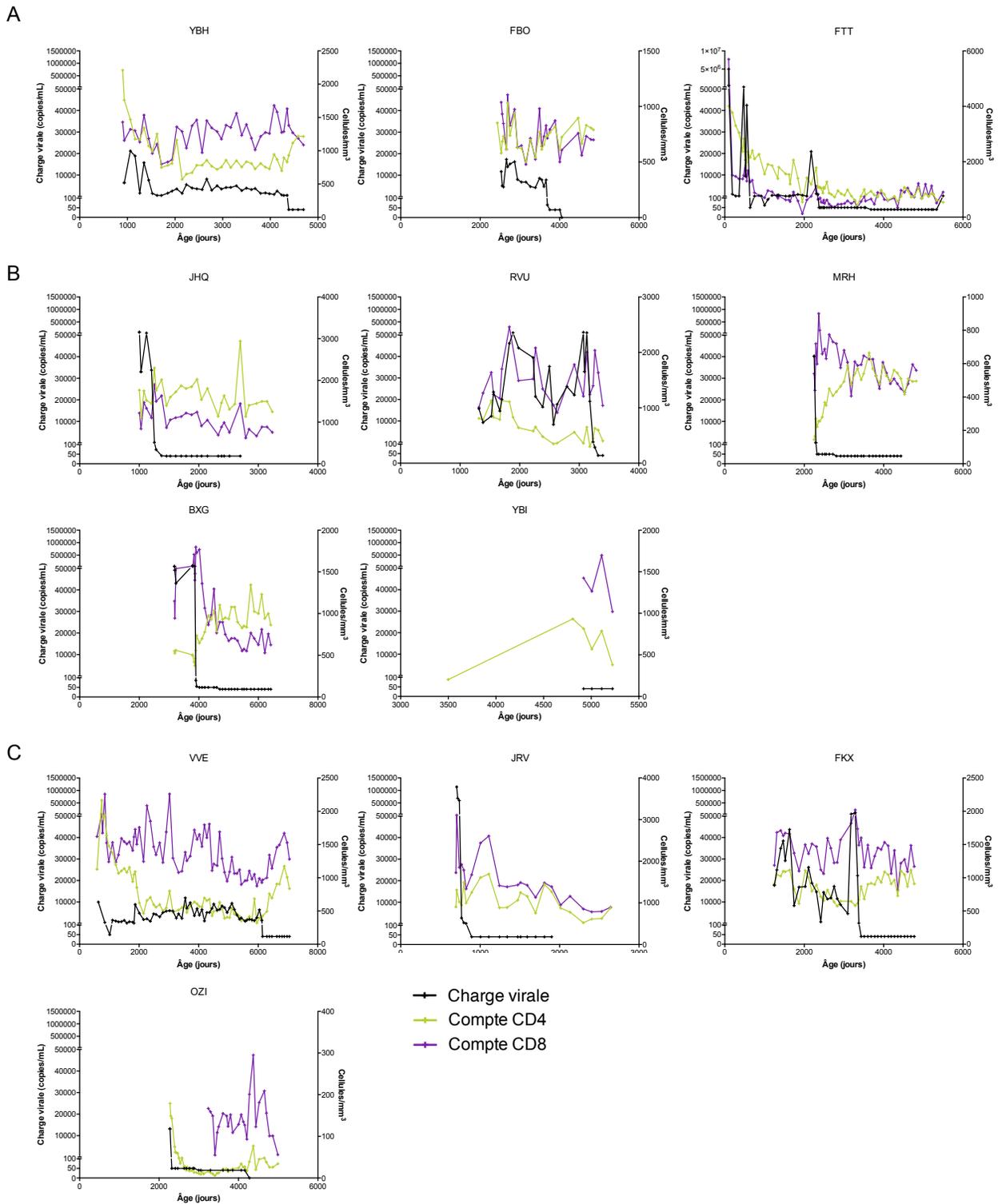
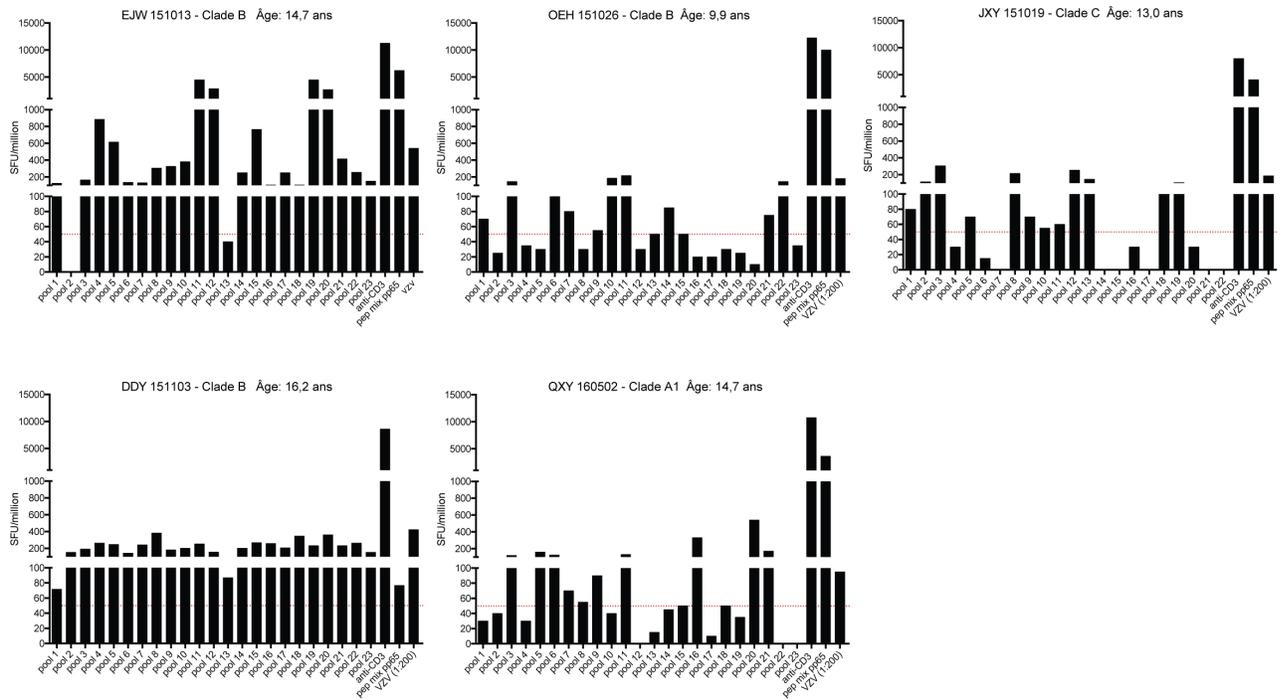


Figure 22: Évolution de la charge virale et des comptes CD4 et CD8 des sujets du groupe B3 au cours de l'infection à VIH.

### 3.3. Les réponses à médiation cellulaire chez le groupe C

Le groupe C regroupe les enfants étant ayant acquis un bon contrôle virologique sous cART, mais qui ont eu quelques pics de charge virale  $\leq 500$  copies/mL de plasma ( $n = 5$ ).



**Figure 23: Production d'IFN- $\gamma$  par les cellules de sujets sous cART, mais qui n'ont pas atteint un contrôle virologique parfait en réponse à la stimulation par des pools de peptides concordant avec le sous-type de VIH-1 infectant le sujet.**

Dans ce groupe, les résultats observés (**figure 23**) sont plus homogènes que ce qui a été observé dans les groupes précédents. Parmi les 5 sujets, on constate que la sécrétion d'IFN- $\gamma$  se situe aux alentours de 200-400 SFU/ million de cellules. Pour les sujets EJW et DDY, c'est presque la totalité des pools de la matrice qui induit une production d'IFN- $\gamma$ . De plus, les réponses observées chez le sujet EJW sont supérieures à celles observées chez les autres sujets. Les réponses observées sont logiques puisque malgré la cART et un bon contrôle virologique, ces 5

Les sujets ont tous subi des pics de charge virale à un moment de leur vie. Ils ont alors été capables de développer une réponse immunitaire à médiation cellulaire spécifique au VIH-1.

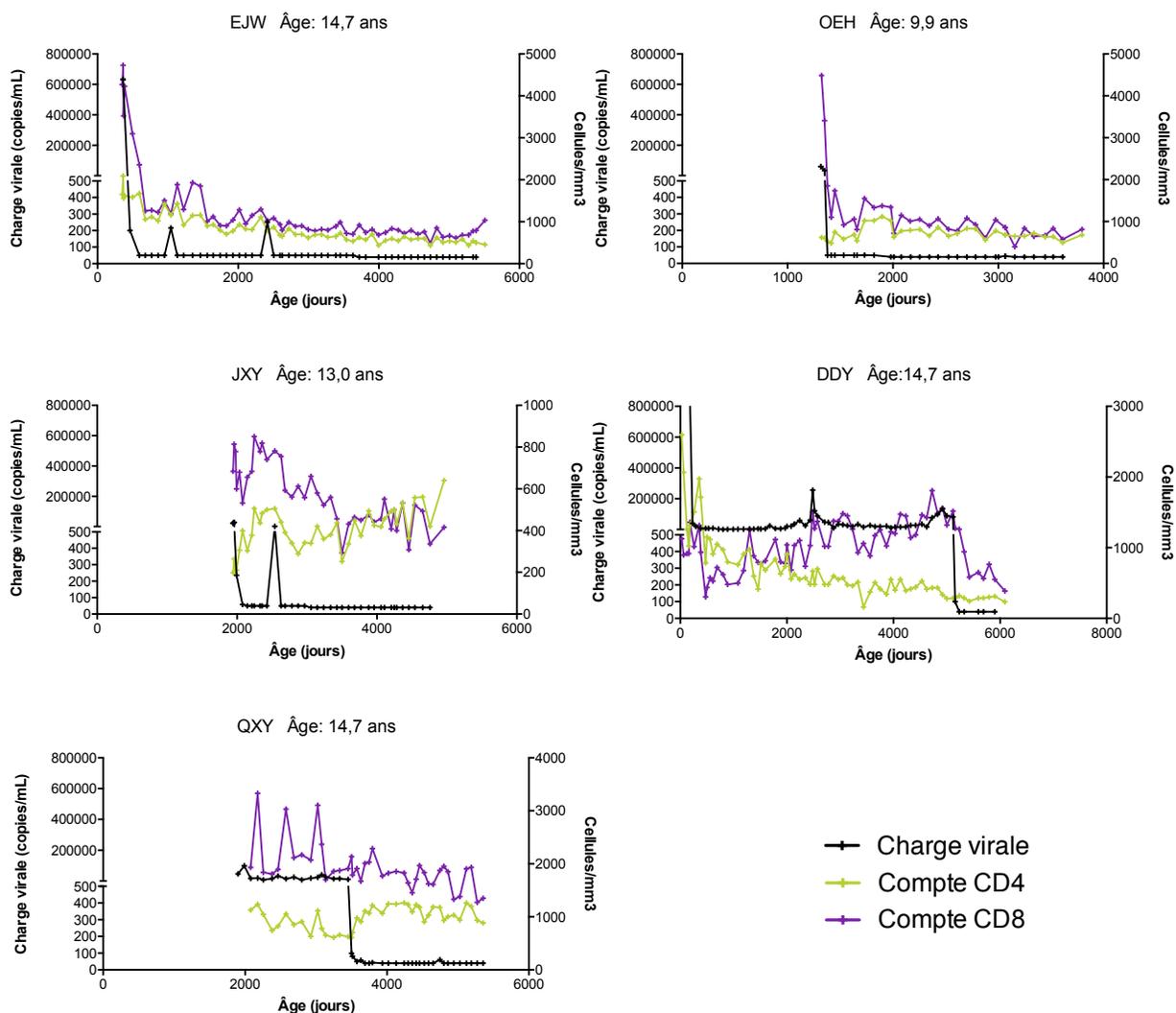


Figure 24: Évolution de la charge virale et des comptes CD4 et CD8 des sujets du groupe C au cours de l'infection à VIH.

Lorsque l'on compare les charges virales des sujets du groupe C avec la production d'IFN- $\gamma$  (figure 24), on constate que l'amplitude et la diversité de la réponse est plus grande lorsque les charges virales sont plus élevées. En effet, le sujet DDY présente la charge virale la plus élevée

observée dans cette étude, et tous les pools de peptides testés ont induit une sécrétion d'IFN- $\gamma$  supérieure au seuil de positivité. Cependant, aucune conclusion ne peut être faite puisque la déconvolution n'a pas pu être réalisée pour ce sujet. Les réponses LTC du sujet EJW sont d'une plus forte amplitude, mais d'une moins grande diversité que le sujet DDY. Ce sujet présente également une forte charge virale ponctuée de faibles pics viraux.

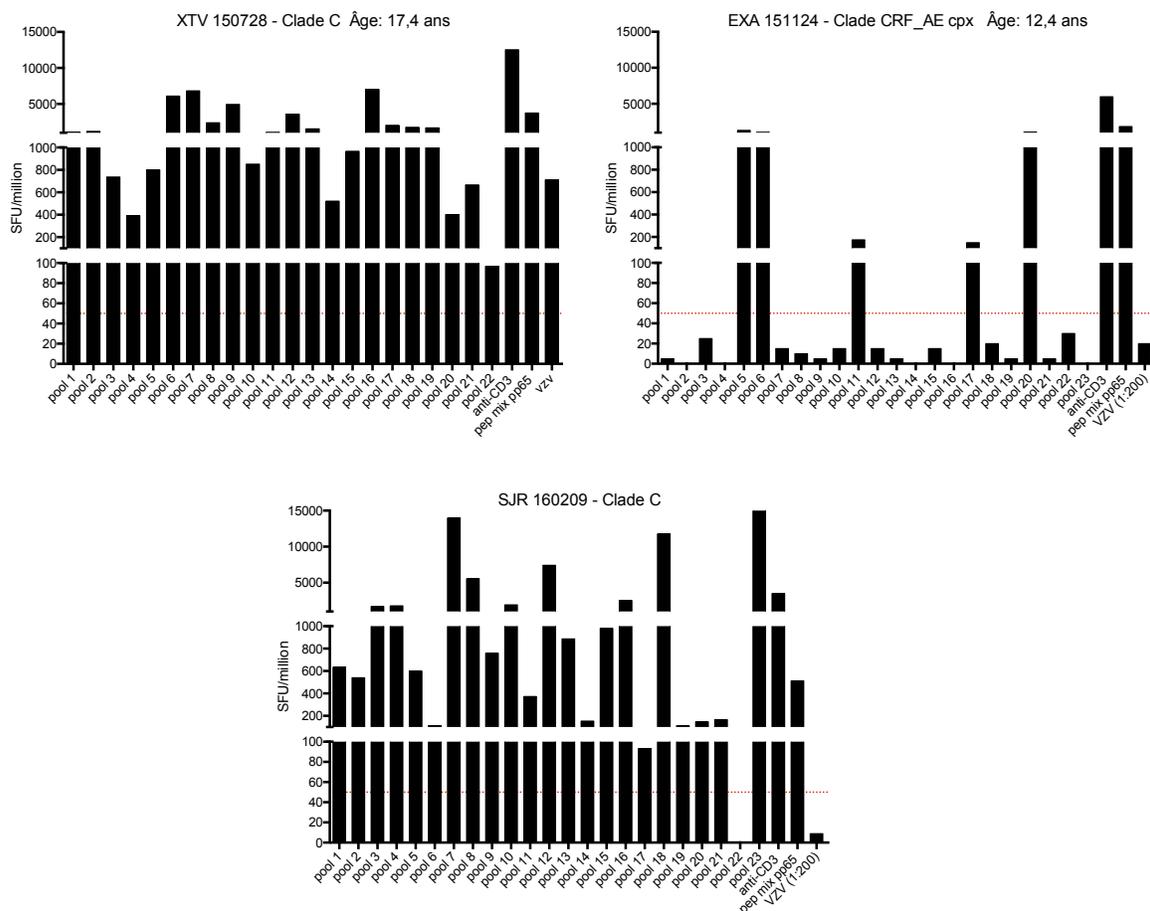
Il est intéressant de constater que chez les sujets EJW et OEH, une chute du taux de CD8 est observée. Le manque de données ne nous permet pas d'expliquer la raison de cette diminution rapide du taux de CD8. Seules les données concernant le sujet DDY sont inférieures aux valeurs de référence des comptes CD4 et CD8 (**figure 24**) [99].

### **3.4. Les réponses des lymphocytes T chez des sujets n'ayant jamais commencé de thérapie antirétrovirale.**

Dans le groupe D, qui est composé de sujets n'ayant jamais été traités, on observe un grand nombre de cellules produisant de l'IFN- $\gamma$  en réponse à une stimulation avec des peptides gag VIH-1. Les réponses à médiation cellulaire observées ressemblent de très près à celle observée chez les contrôles positifs adultes infectés (**figure 14 et figure 25**).

La **figure 25** montre que les sujets n'ayant pas suivi de cART ont tendance à avoir beaucoup de cellules produisant de l'IFN- $\gamma$  en réponse à la majorité des pools de peptides de la protéine Gag. Ce résultat était attendu, puisque ces sujets doivent développer une réponse à médiation cellulaire efficace pour maintenir une suppression virale. Néanmoins, ce scénario n'est pas toujours vrai. Les cellules du sujet EXA ne sont pas aussi nombreuses à produire de l'IFN- $\gamma$ , et

le nombre de pools de peptides induisant cette réponse est beaucoup plus faible chez ce sujet comparé aux deux autres sujets n'ayant pas été traités. En effet, seulement 5 pools de peptides ont induit la production d'IFN- $\gamma$ .



**Figure 25: Production d'IFN- $\gamma$  par les cellules de sujets non traités en réponse à la stimulation par des pools de peptides concordant avec le sous-type de VIH-1 infectant le sujet.**

D'après les données cliniques dont nous disposons, il s'avère que le sujet XTV, ayant une forte réponse à médiation cellulaire, contrôle de façon efficace sa virémie en l'absence de traitement antirétroviral. En effet, le suivi de sa charge virale au fil du temps nous montre qu'il maintient une suppression virale avec des « pics » n'ayant jamais dépassé les 71 copies/mL de plasma

(figure 26). Concernant le sujet EXA, pour qui les réponses observées étaient plus faibles, les données cliniques révèlent que la suppression virale n'a jamais été atteinte et que la virémie du sujet est comprise entre 717 et 15,913 copies/mL de plasma (figure 26). Ces résultats concordent avec ce qui déjà été montré dans la littérature sur les réponses immunitaires à médiation cellulaire (section 1.3.1 de l'introduction) i.e. les réponses LTC jouent un rôle important dans la suppression virale observée chez les primates et les adultes. Les sujets XTV et EXA sont respectivement âgés de 18 et 13 ans, ce qui expliquerait la similitude avec ce qui a déjà été observé chez les adultes.

À l'heure actuelle, nous ne disposons pas de données cliniques pour le sujet SJR. D'après les résultats obtenus à la suite de l'ELISpot, nous pensons que son profil de charge virale ressemble à celui du sujet XTV.

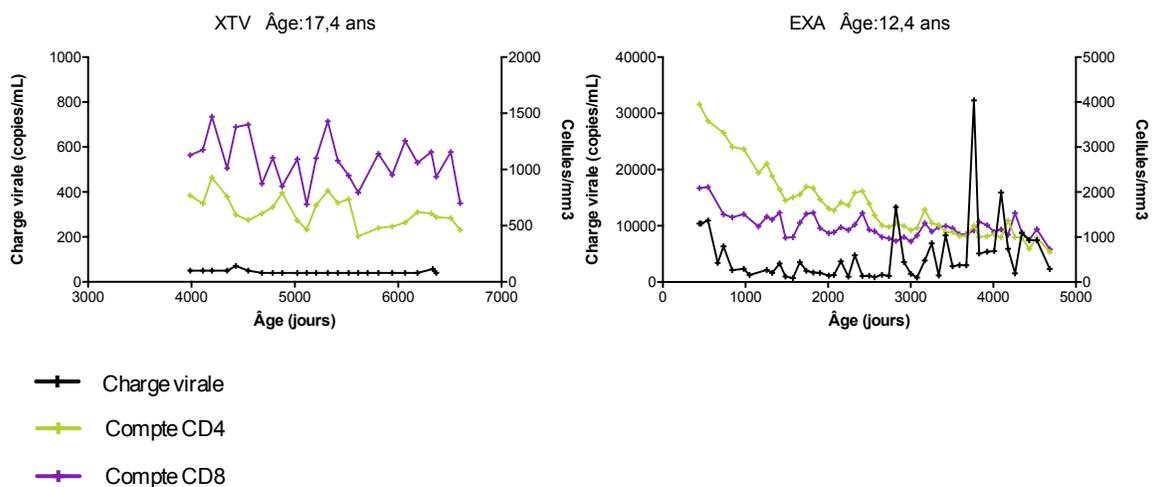


Figure 26: Évolution de la charge virale et des taux de CD4 et CD8 chez les sujets infectés par le VIH et non traités.

Les comptes CD4 et CD8 chez ces deux patients ont des valeurs correspondant aux valeurs de références (**figure 26**). La diminution des taux de CD4 et CD8 observée chez les sujet EXA est liée à l'âge du sujet. En effet, il a été montré que les enfants présentaient un taux supérieur à celui des adultes peu de temps après la naissance qui diminuera progressivement au fil du temps pour atteindre les valeurs de référence mesurées chez des adultes en bonne santé [99].

### 3.5. Le groupe E

Le groupe E regroupe tous les sujets n'ayant pas pu être classés dans les autres groupes, car ils ne correspondaient pas aux critères d'inclusion. Cette catégorie regroupe les résultats obtenus par ELISpot en matrice pour 21 sujets âgés de 5 à 19 ans.

Dans ce groupe, on observe de nouveau des réponses à médiations cellulaires très différentes les unes des autres qui sont indépendantes de l'âge des individus. On distingue trois types de réponses : A) les sujets pour lesquels la majorité des pools de peptides ont induit une haute fréquence de cellule sécrétant de l'IFN- $\gamma$  (**figure 27**) ; B) les sujets pour lesquels une partie des pools ont induit des sécrétions d'IFN- $\gamma$  numériquement significatives (**figure 28**) et C) les sujets pour lesquels peu de pools ont induit des sécrétions d'IFN- $\gamma$  (**figure 29**). Dans ce groupe, tous les sujets présentent une production d'IFN- $\gamma$  pour au moins 3 pools de peptides.

Les sujets présentés dans la **figure 30** sont infectés par des sous-types de VIH-1 différents. Leurs modes de délivrance diffèrent également d'un sujet à l'autre. L'examen des données cliniques n'a pas permis de révéler de points communs entre ces individus qui pourraient expliquer la similarité des réponses observées.

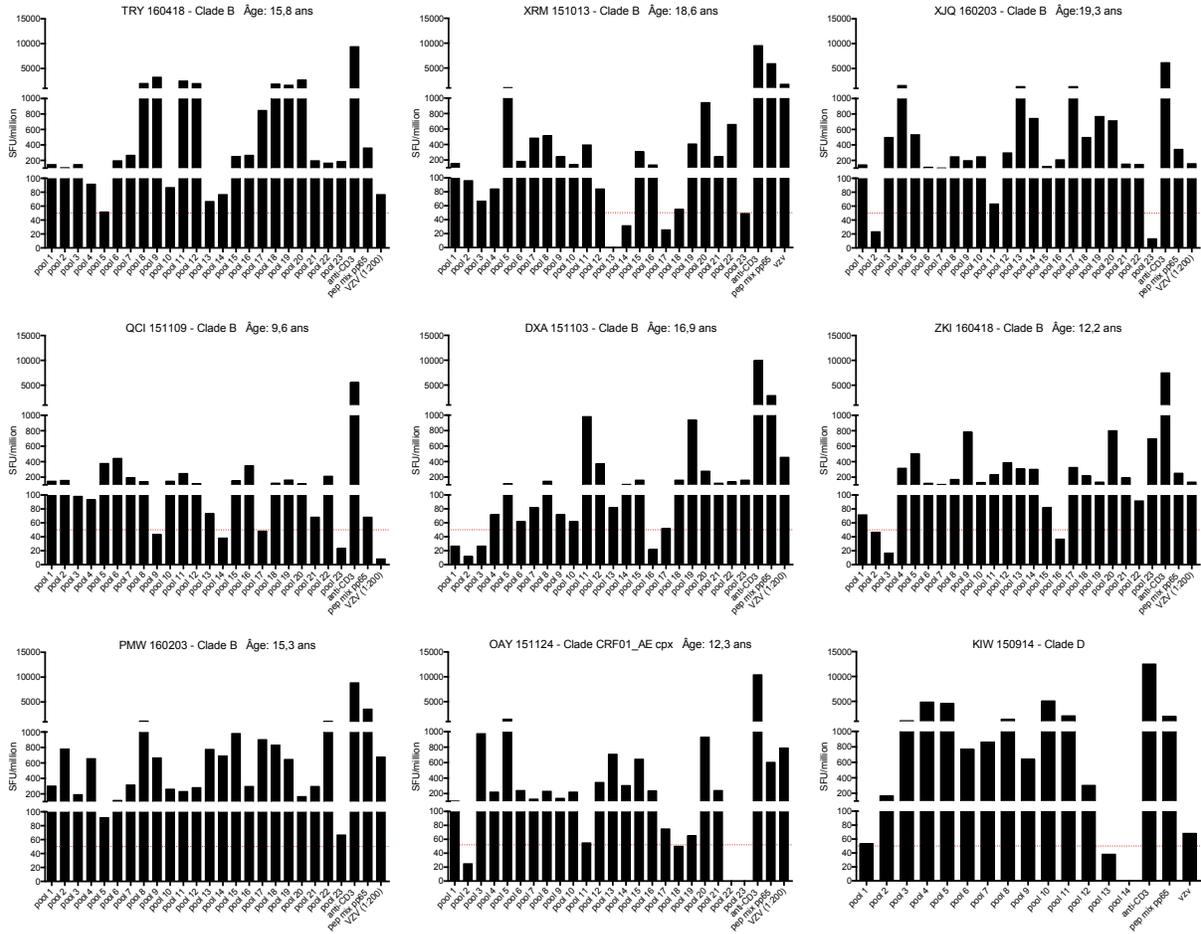


Figure 27: Production d'IFN- $\gamma$  par les cellules de sujets du groupe E présentant une puissante réponse à médiation cellulaire.

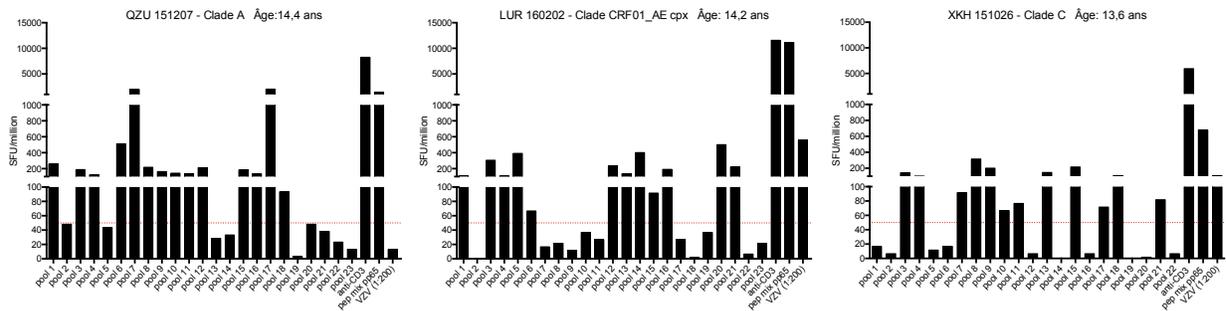
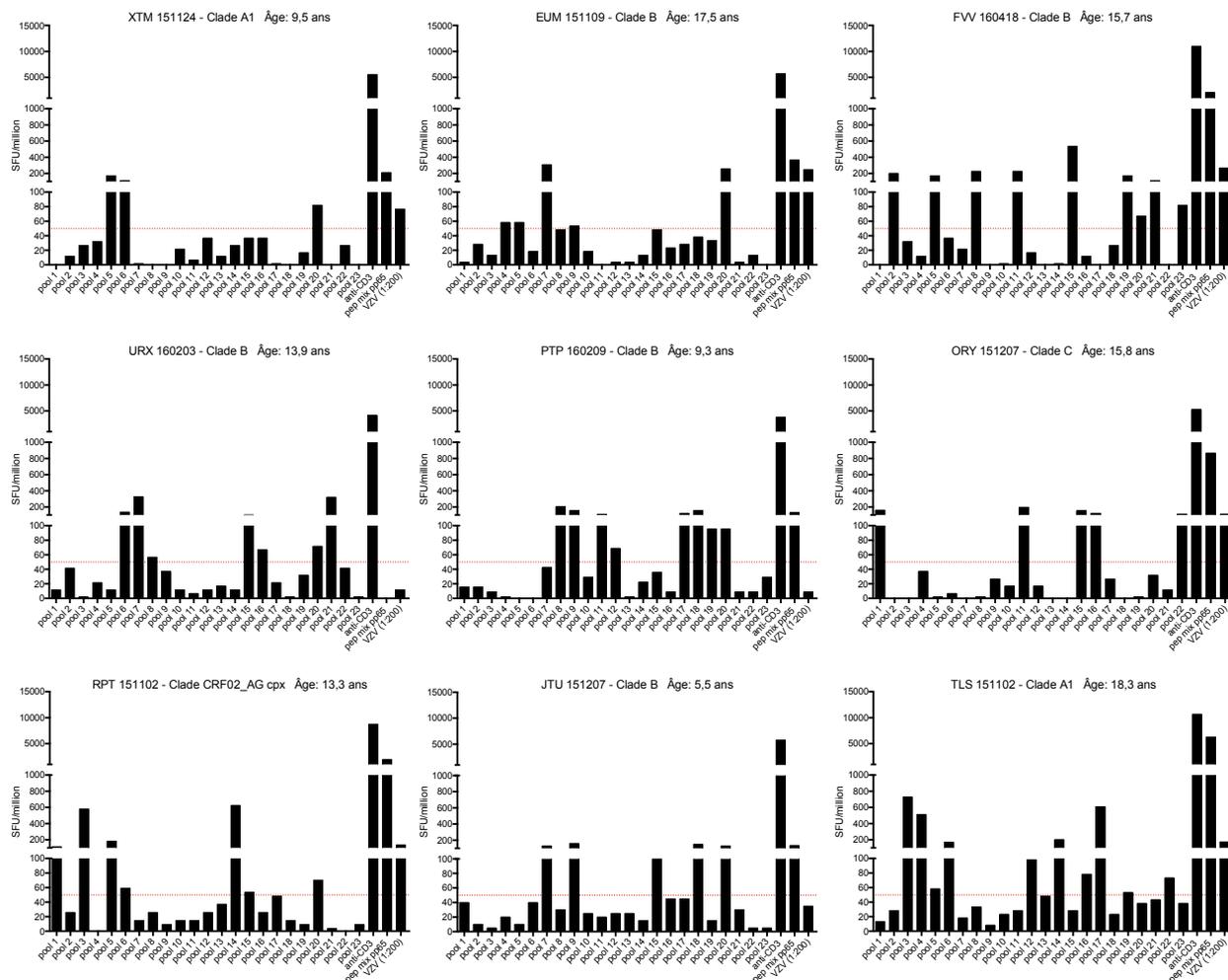


Figure 28: Production d'IFN- $\gamma$  par les cellules de sujets du groupe E présentant une réponse à médiation cellulaire modérée pour au moins la moitié des pools de la matrice.

Les sujets présentés dans la figure 29 présentent une production d'IFN- $\gamma$  pour plus de la moitié des pools testés.



**Figure 29: Production d'IFN- $\gamma$  par les cellules de sujets du groupe E présentant une réponse à médiation cellulaire modérée pour une faible quantité de pools.**

Les sujets présentés dans la **figure 30** ne présentent pas un grand nombre de pools ayant induit une production d'IFN- $\gamma$ . Toutefois, la quantité de cellules produisant de l'IFN- $\gamma$  en réponse à la stimulation peptidique est supérieure à celle qui a été observée chez les sujets du groupe A.

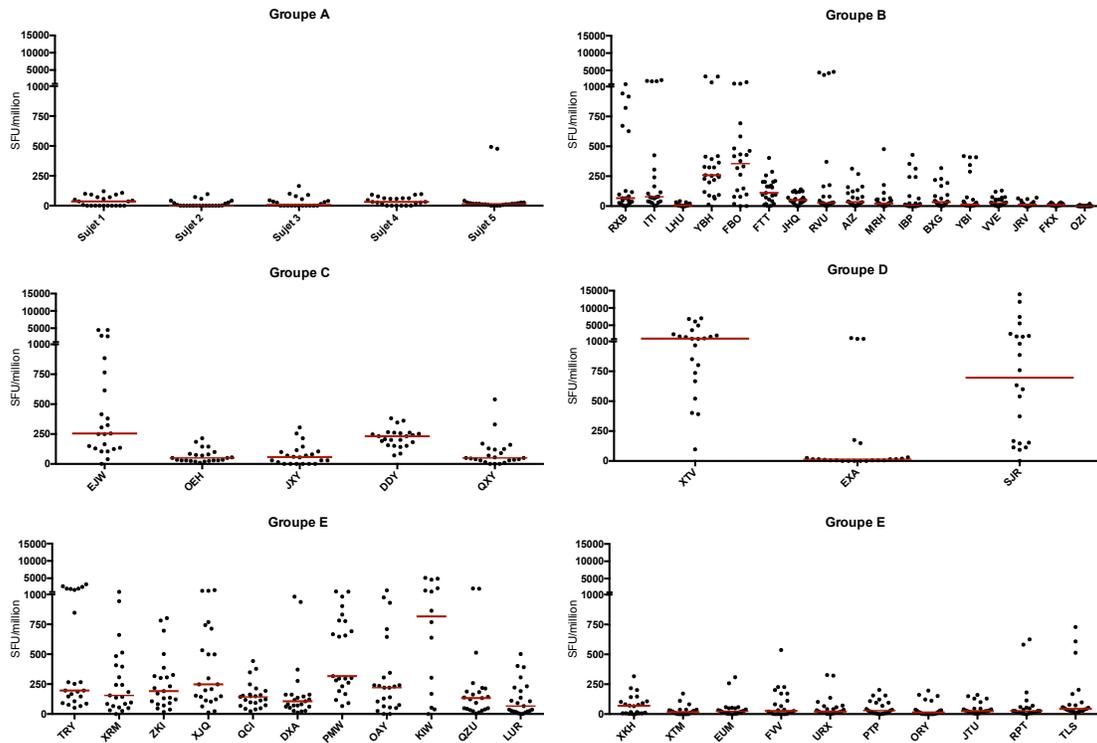


Figure 30: Figure récapitulative des fréquences de cellules produisant de l'IFN- $\gamma$  en réponse à la stimulation par des pools de peptides concordant avec le sous-type de VIH-1 infectant le sujet.

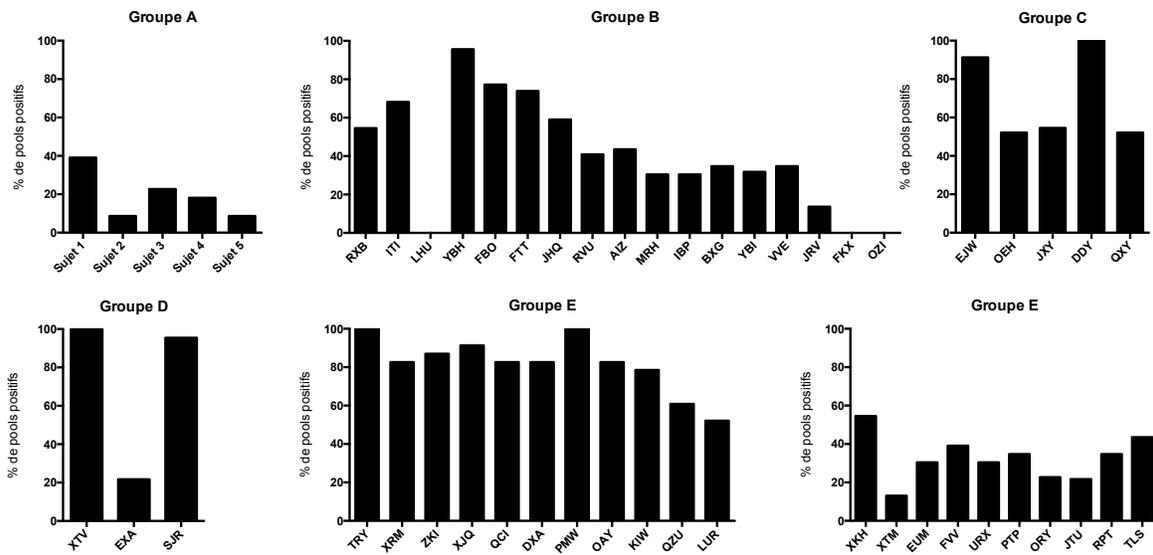


Figure 31: Figure récapitulative des pourcentages de pools ayant induit la production d'IFN- $\gamma$ .

### **3.6. Correspondance entre des séquences peptidiques avec les épitopes LTC**

Une déconvolution a été réalisée pour chaque ELISpot en matrice réalisé. Si l'ELISpot avec une stimulation par peptide individuel n'a pas pu être réalisé, l'identification de chaque peptide ayant potentiellement induit la production d'IFN- $\gamma$  observée a été réalisée. Chaque séquence peptidique a ensuite été comparée avec la base de donnée répertoriant les épitopes LTC et la A-list de cette base de données [100, 101]. De nombreuses correspondances ont été trouvées. La majorité des épitopes correspondant à des peptides ayant induit la sécrétion d'IFN- $\gamma$  se trouvent sur les protéines p17 et p24 de la protéine Gag (capside et matrice) (**annexe 1**).

### **3.7. Recherche de cytokines chez les enfants**

Dans la section 3.1 des résultats, nous avons constaté que les enfants traités précocement ne produisaient pas une grande quantité d'IFN- $\gamma$ . Nous avons alors réalisé une quantification multiplexe de cytokines en cytométrie en flux afin de rechercher si les cellules de ces enfants produisaient d'autres cytokines que l'IFN- $\gamma$ . L'avantage de quantifier les cytokines produites avec la technique multiplexe en cytométrie de flux est qu'elle permet la quantification de plusieurs cytokines dans un même échantillon, en même temps. Trois cytokines ont été recherchées, soit l'interleukine 2 (IL-2), l'interleukine 22 (IL-22) et facteur de nécrose tumorale alpha (TNF $\alpha$ ). L'IL-2 est une cytokine du système immunitaire, connue pour stimuler la prolifération lymphocytaire et la différenciation des réponses des lymphocytes T auxiliaire. Cette cytokine est produite par les lymphocytes T CD4 auxiliaire mais aussi par les lymphocytes T CD8 [102]. L'IL-22, est une cytokine exprimée par plusieurs types de lymphocytes du système

immunitaire inné et adaptatif, ce qui inclue les lymphocytes T CD4 [103]. Enfin, le TNF $\alpha$  qui est une cytokine impliquée dans l'inflammation et qui semblerait jouer un rôle important dans la persistance des réservoirs viraux durant l'infection à VIH-1 [104].

Les cellules de deux sujets du groupe A ont été utilisées pour la recherche de cytokines autres que l'IFN- $\gamma$  ainsi qu'un contrôle négatif, non infecté par le VIH. Plusieurs stimulations ont été testées, la stimulation 1 correspond à une co-stimulation avec des billes anti-CD3/CD28 durant 22 heures, la stimulation 2 était une stimulation-antigène spécifique avec un pool de peptides VIH de consensus B durant 22h, et la stimulation 3, une stimulation-antigène spécifique avec un pool de peptides PTE durant 22h (**figure 32**). Chacune des stimulations a été faite en duplicata. Cependant, en raison de la quantité limitée de cellules, aucun duplicata n'a été réalisé pour la mesure des niveaux de cytokine en l'absence de stimulation.

Lors de la co-stimulation avec des billes anti-CD3/CD28, des sécrétions de cytokines plus ou moins fortes ont été observées chez les trois sujets. Les niveaux d'IL-2 et d'IL-22 observés chez les cas FKU et COF étaient supérieurs à ceux du contrôle sain non infecté alors que les niveaux de TNF $\alpha$  étaient inférieurs. Les stimulations antigène spécifique ont également induit une production significative d'IL-2 pour FKU qui est supérieure à celle observée chez notre contrôle négatif. En ce qui concerne les autres cytokines investiguées, les concentrations de cytokines observées étaient très faibles. D'après les résultats observés, il semble que l'IL-22 et le TNF $\alpha$  ne jouent pas un rôle important dans un des mécanismes de contrôle de l'infection à VIH-1 chez les enfants traités précocement (Groupe A). Cependant des expériences supplémentaires sur un plus grand nombre d'échantillons seront nécessaires pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

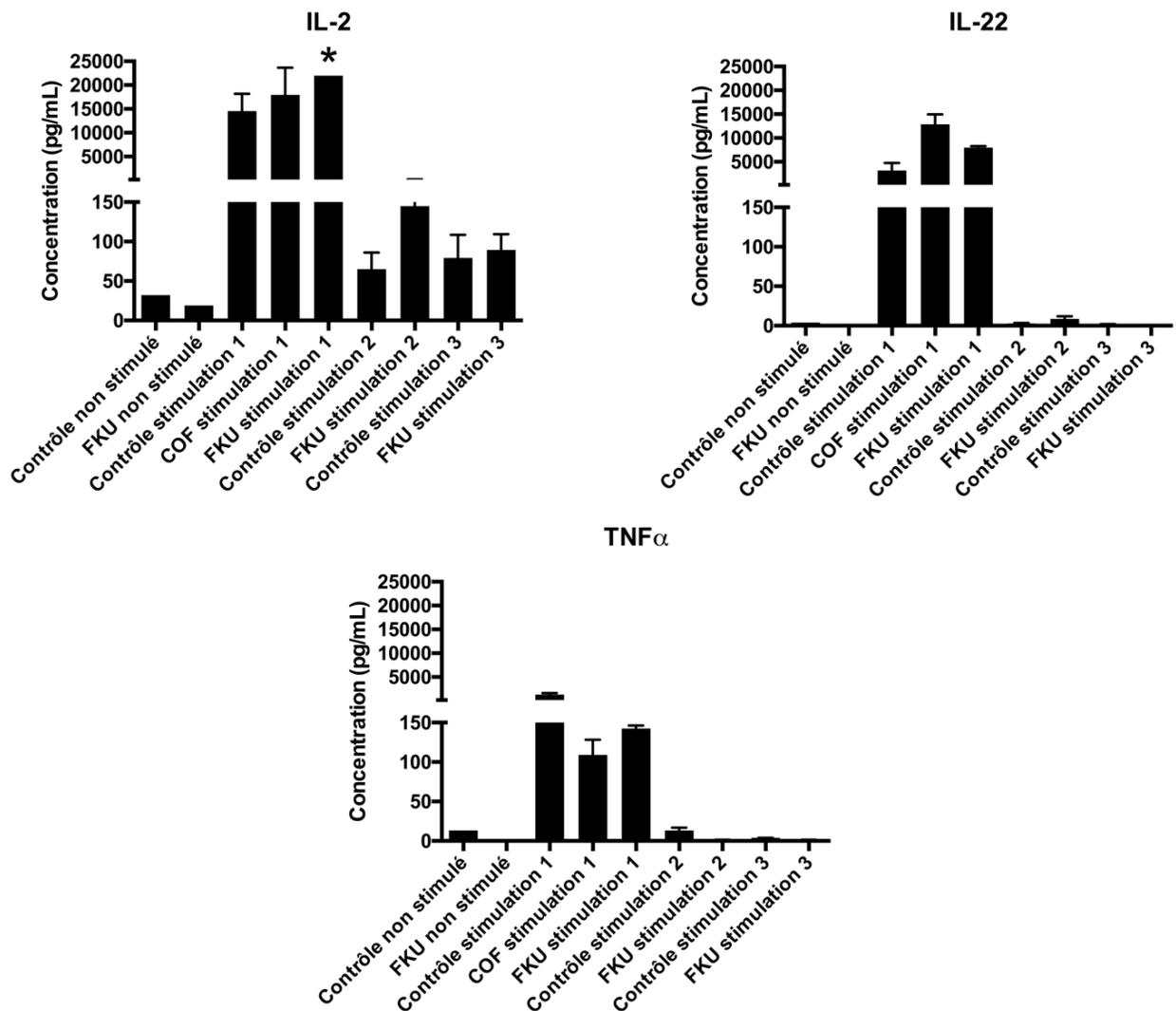
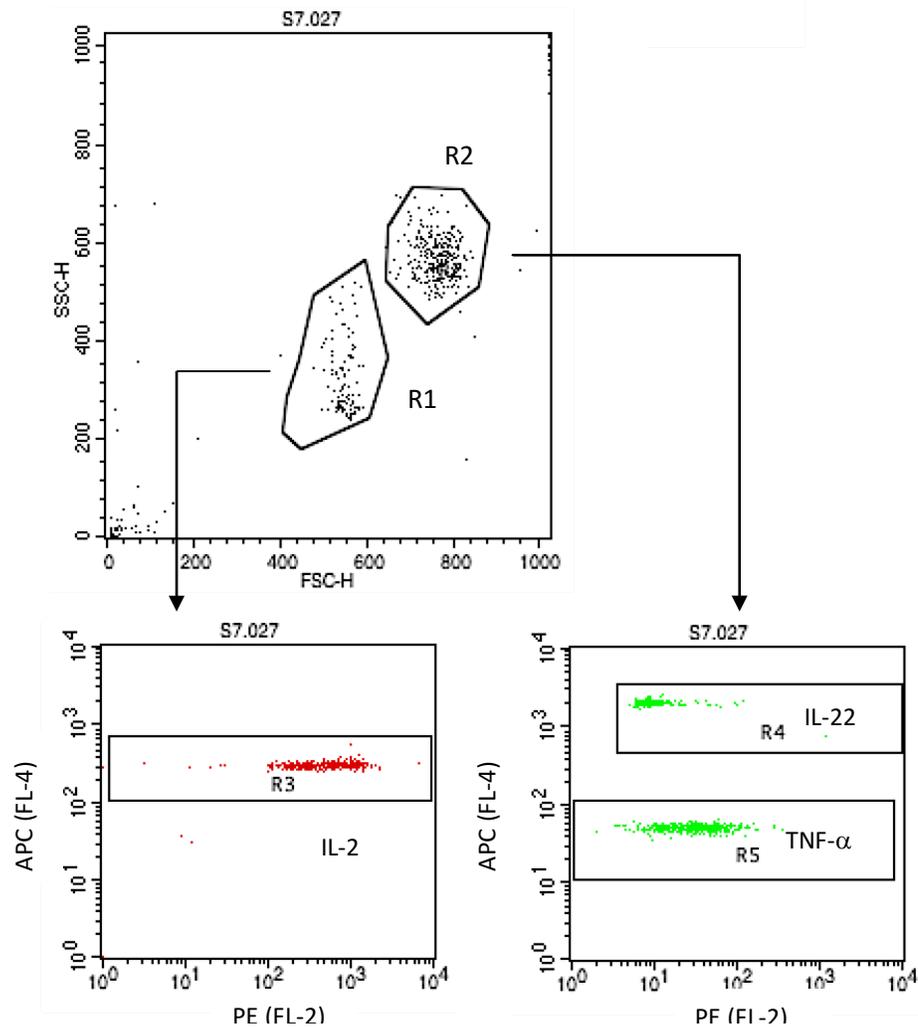


Figure 32: Production de cytokines chez les sujets du groupe A en réponse à différentes stimulations. \* « out of range ».

La concentration des cytokines a été mesurée lorsque les cellules n'avaient pas subi de stimulation et avec différentes stimulations. La stimulation 1 est une co-stimulation avec des billes anti-CD3/CD28, la stimulation 2 avec un pool de peptides de consensus B, et la stimulation 3 avec un pool de peptides PTE.

FKU stimulés avec un pool de peptide complet de la protéine gag de clade B



**Figure 33: Exemple de cytogramme obtenu par le multiplex**

La stratégie de sélection montrée dans le quadrant du haut, correspond à celle qui est indiquée dans le kit. IL-2 est représentée dans R1 avec une MFI de 588,21 (mean of the fluorescence intensity) et l'IL-22 avec une MFI de 31,62 et le TNF- $\alpha$  avec une MFI de 7,91 représentées dans R2. Les productions d'IL-2, d'IL-22 et de TNF- $\alpha$  sont représentées respectivement en R3, R4 et R5 ainsi que dans les quadrants du bas. Le cytogramme de droite montre les productions de cytokines obtenues pour FKU lors de la stimulation avec un pool de peptides de consensus B. Les billes utilisées pour détecter les différences cytokines se différencient par leur taille et leur intensité de fluorescence interne. Le set de bille A est constitué de petites billes permettant la détection de l'IL-2 alors que le set de bille B est constitué de plus grosses billes permettant la détection d'IL-22 et de TNF- $\alpha$ .

## QUATRIÈME CHAPITRE

### DISCUSSION

## 4.1. Les réponses à médiation cellulaire

Dans le but de fournir la preuve expérimentale que les réponses à médiation cellulaire observées chez des enfants traités précocement différaient de celles observées chez des enfants traités plus tard, nous avons eu pour premier objectif de caractériser les réponses de sujets infectés verticalement par le VIH-1 et ayant amorcé la cART après un intervalle de temps défini suivant leurs infections.

Ces sujets ont été classés dans des groupes allant de A à C pour les sujets dont la date d'initiation du traitement était connue et ayant une suppression virale plus ou moins bonne. Le groupe D était constitué de sujets n'ayant jamais été traités. Enfin, le groupe E était formé de sujets ne correspondant pas aux critères d'inclusion des autres groupes, par exemple à cause d'une mauvaise suppression virale ou en raison d'une prise de traitement irrégulière.

La faible quantité d'échantillons était un facteur limitant pour nos expériences. Les sujets étudiés étant atteints d'infection à VIH, la quantité de PBMCs que l'on peut obtenir est réduite. De plus, une partie des sujets à l'étude étant des enfants, la quantité de sang prélevée était éthiquement réglementée, en se référant au poids de l'enfant. De plus, sujets présentant une anémie au moment de la visite ne sont pas prélevés. Pour ce projet, le test d'ELISpot s'imposait comme étant la technique de choix puisqu'il requiert 200,000 cellules par puits testé. Cette méthode a été utilisée dans plusieurs études précédentes portant sur l'immunité à médiation cellulaire anti-VIH-1, notamment pour la recherche de vaccin [105], le contrôle virologique après un traitement

précoce durant la phase aigüe de l'infection [106] ou encore pour étudier les réponses LTC [81, 107].

Le protocole utilisé pour ce projet a été développé dans le laboratoire du Dr Hugo Soudeyns [93] pour étudier les réponses à médiation cellulaire anti-VZV. L'élaboration de matrice de peptides où les peptides sont regroupés dans des pools a permis de réduire la quantité de cellules nécessaires, tout en testant la totalité de la protéine Gag. La protéine Gag est une protéine virale hautement conservée et très immunogène. De plus, cette protéine a la particularité d'être fréquemment reconnue par les réponses LTC [108]. L'utilisation d'une stimulation Gag VIH-1 spécifique correspondant au sous-type de virus infectant l'enfant est un des points forts de cette étude puisqu'elle permet de détecter des réponses VIH-1 spécifiques. En effet, la stimulation avec des séquences correspondant au virus a de plus grandes probabilités de fonctionner puisque ces séquences ont probablement déjà été rencontrées par les cellules du sujet au cours de la différenciation des cellules T. Cependant, beaucoup de sujets n'ont pas pu être testés car le clade du VIH-1 infectant le sujet n'était pas connu. En effet, de nombreux sujets du groupe B étaient de clade inconnu dû à une trop faible charge virale rapidement supprimée avec la ART, ou bien la perte des données lors de l'immigration de certains sujets.

La plus grande faiblesse de l'étude a été de mesurer la fréquence de PBMCs totaux produisant de l'IFN- $\gamma$  et non la fréquence de cellules T CD8+. Il a été montré que, durant l'infection à VIH, les cellules NK sécrètent aussi de l'IFN- $\gamma$  [109, 110]. Cependant, la faible quantité d'échantillons dont nous disposons n'aurait probablement pas permis d'obtenir une quantité

suffisante de cellules T CD8<sup>+</sup> pour tester la totalité des pools de peptides pour la majorité des sujets de l'étude.

La déconvolution n'a pu être réalisée que pour les sujets du groupe A. Les autres sujets présentaient soit un trop grand nombre de pools de peptides positifs ou bien une quantité d'échantillons insuffisante. En effet, la déconvolution était importante pour identifier la séquence du peptide ayant induit la production d'IFN- $\gamma$  et donc de chercher des épitopes communs entre des sujets présentant le même type de réponses. La déconvolution a été efficace lorsqu'un faible nombre de pools était positif. Lorsqu'un grand nombre de pools ont induit la production d'IFN- $\gamma$ , celle-ci requière alors un trop grand nombre de cellule et elle devient impossible à réaliser. L'analyse de ces données devient alors plus difficile, puisque la caractérisation de la réponse LTC est trop superficielle. La diversité réelle de la réponse ne peut être mesurée et les fréquences de cellules produisant de l'IFN- $\gamma$  mesurées, correspondent à une stimulation multipéptidique. Lors de la déconvolution pour les sujets du groupe A, de nombreux peptides n'étaient pas positifs et les fréquences mesurées ne correspondaient pas parfaitement à ce qui avait été observé lors de l'ELISpot en matrice. À ce jour, les HLA des différents sujets ne sont pas encore connus. Lorsque les HLA seront identifiés, il sera possible de filtrer la liste d'épitopes potentiels de chaque sujet en se référant au HLA. Un nouvel ELISpot avec une stimulation par peptide individuel pourra confirmer ou éliminer les épitopes contribuant ou non à la production d'IFN- $\gamma$ .

Lors de l'infection à VIH, le système immunitaire déploie des mécanismes cellulaires de défense virale LTC induisant une plus grande expression des cytokines inflammatoires dont fait partie l'IFN- $\gamma$  [111].

#### **4.1.1. Stratification des groupes**

La stratification des groupes a été réalisée par les différents centres, en fonction des caractéristiques de chacun des groupes (section 2.1). L'examen des données cliniques a révélé un manque de précisions au niveau de la classification de certains sujets pour les groupes B et C qui pourrait être expliqué par une variation dans l'interprétation des critères d'inclusion. Ces données seront corrigées dans les mois à venir. En effet, la stratification des groupes A, B, C, D et E telle que définie pour les projet EPIC<sup>4</sup> n'est pas une mesure standardisée. Elle a été développée par les membres du « steering committee » au début du projet pour s'assurer d'avoir une représentativité suffisante dans les types de patients recrutés et ce, pour pouvoir vérifier certaines des hypothèses de recherche du projet EPIC<sup>4</sup>. Le groupe tel qu'il a été pris en compte pour la rédaction de ce mémoire et l'interprétation des résultats, a été déterminé par le personnel médical. À l'heure actuelle, certains groupes ne correspondent pas aux données cliniques recueillies et entrées dans la base de données. De nombreux critères devront être définis clairement en fonction de l'hypothèse à démontrer. Une nouvelle stratification des groupes sera faite selon, l'âge de l'enfant au moment de la première prise de traitement effective, c'est à dire la première prise de traitement qui a permis une diminution significative de la charge virale. Une définition claire de « pic de charge virale » (dépassant un nombre de copies de virus par mL de plasma, la durée) et de « suppression de la charge virale à long terme » (pourcentage de la durée de vie durant laquelle la charge virale a été maintenue indétectable) sera établie.

### 4.1.2. Le groupe A

Un article a déjà été publié sur 4 des 5 sujets de notre groupe A et correspondent aux identifiants de l'article [4]. Cette étude avait montré que l'initiation précoce de la cART avait empêché l'établissement des réponses à médiations cellulaires. Or, ce que nous avons observé dans le présent projet est différent de ce qui a été montré dans l'article. Deux raisons pourraient expliquer cette différence. La première raison étant que la stimulation réalisée durant le projet est une stimulation Gag VIH-1 spécifique correspondant au sous-type de virus infectant l'enfant. La seconde est l'évolution des réponses à médiation cellulaires, puisqu'il s'est écoulé plus de 1 an entre la parution de l'article et le début du projet EPIC<sup>4</sup>, et que les enfants ont vieilli. Pour le sujet 1 du groupe A, deux ELISpots ont été réalisés avec deux échantillons différents de deux visites différentes. Les résultats observés ont montré une évolution de la réponse à médiation cellulaire qui est corrélée dans le temps. Mais cette observation n'a été réalisée que pour un sujet en particulier (sujet 1 du groupe A), et si la corrélation est vraie pour ce sujet, elle ne l'est pas forcément pour les autres sujets. Il faudrait confirmer la corrélation des réponses à médiation cellulaires au cours du temps pour un plus grand nombre d'échantillon.

Les résultats observés ont montré que les enfants classés dans le groupe A avaient un faible nombre de cellules produisant de l'IFN- $\gamma$  en réponse à une stimulation Gag-spécifique. Mais ce nombre de cellules était supérieur au seuil de positivité et aux réponses mesurées chez un adulte non-infecté par le VIH. Cependant, les réponses observées sont très différentes de celles observées chez des adultes infectés n'ayant pas de suppression virale à long terme puisqu'elles sont beaucoup plus faibles.

Cela fait de nombreuses années qu'il a été établi que les réponses à médiation cellulaire jouaient un rôle fondamental dans la suppression virale [77-80]. Les données cliniques ont montré que les enfants traités précocement ont maintenu une bonne suppression virologique suite à l'introduction de la cART. Toutefois, nous ne pouvons pas affirmer que les réponses LTC mesurées aient également contribué à cette suppression virologique. L'étude de la charge virale de ces sujets a montré que lorsque la virémie de départ était élevée, l'obtention de la suppression virale était longue à atteindre. La comparaison entre productions d'IFN- $\gamma$  et l'évolution de la charge virale montrent que les sujets ayant de faibles charges virales à la naissance ont également de plus faibles productions d'IFN- $\gamma$ . Les résultats obtenus pour le sujet 5 corroborent ce qui a été observé pour les autres sujets. En effet, l'interruption de traitement pourrait être la cause de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  plus élevée observée chez ce sujet comparé aux autres individus du groupe A.

En dépit de l'initiation précoce du traitement, le sujet 5 n'a pas connu de rémission prolongée comme le cas du bébé du Mississippi [3] après son interruption de traitement à 3 ans d'âge. En effet, sa charge virale 1 mois après l'arrêt du traitement s'élevait déjà à 7,797 copies/mL de plasma. Ces données prouvent la rapidité de l'établissement des réservoirs durant les 6 mois qui ont précédé la suppression virale de l'enfant. Les différentes mesures montrent une faible taille des réservoirs viraux chez les sujets du groupe A qui pourrait être expliqué par l'initiation précoce de traitement chez ces enfants. Les résultats observés correspondent à ce qui a déjà été décrit sur l'impact de l'initiation très peu de temps après l'infection sur la taille des réservoirs [65].

La mesure de la taille des réservoirs permet également d'établir un lien entre la charge virale de départ et la détection de réservoir. Aucune corrélation n'a pu être établie entre la charge virale de départ et la taille des réservoirs.

Logiquement, une faible charge virale est plus rapide à contrôler qu'une charge virale plus élevée, ce qui permet donc d'atteindre le stade de suppression plus rapidement et donc de réduire la durée d'exposition du virus au système immunitaire. Ce raisonnement pourrait expliquer le peu de pools peptidiques ayant induit une production d'IFN- $\gamma$  chez ces sujets.

En ce qui concerne le sujet 2, il est celui présentant le moins de réponses à médiation cellulaire. Le sous-type VIH-1 du sujet 2 n'a pu être déterminé par des tests cliniques en raison de sa faible charge virale. En fonction d'informations apportées par des données démographiques, il a été présumé qu'il était infecté par le sous-type A et a donc été testé avec une matrice de clade A. Il est possible que la présomption du sous-type ne soit pas exacte. L'article publié sur 4 des sujets du groupe A n'avait pas détecté de réponses à médiation cellulaire avec une stimulation Gag VIH spécifique ne correspondant pas au sous-type de virus infectant l'enfant [4]. Il aurait été judicieux de stimuler les cellules du sujet 2 avec différentes matrices, mais, malheureusement, les échantillons dont nous disposons pour ce sujet étaient limités.

Le mode de délivrance semble avoir joué un rôle sur la charge virale, puisque les sujets 1,4 et 5 nés par césarienne élective présentaient une charge virale plus importante que les sujets 2 et 3 nés par accouchement vaginal spontané. Une étude récente a montré que l'accouchement par voie vaginale, chez des femmes infectées présentant un risque normal de transmission, était

associé à un transfert plus faible de cellules CD4+ comparées à la césarienne [112]. En effet, comme les cellules T CD4+ sont la cible préférentielle du VIH et constituent une grande partie du réservoir viral [113], cela pourrait expliquer le contrôle virologique plus difficile chez ces enfants [114]. Si le mode de délivrance par césarienne réduit les risques de transmission verticale [95, 115], il semble que lorsque la transmission a lieu, la charge virale soit plus élevée chez les enfants étant nés de cette manière et que les réponses à médiation cellulaire sont plus fortes. Conclure que le mode de délivrance a eu un impact n'est pas possible puisque de nombreuses données sont manquantes et que le nombre de sujets (n = 5) est faible. Mais les résultats observés sont compatibles avec ce qui a déjà été observé [112]. De plus amples données sur les mères des différents sujets seraient nécessaires pour aboutir à une conclusion.

#### **4.1.3. Le groupe B**

Le groupe B regroupe les enfants ayant initié une cART de 72 heures à 1 an après leur naissance et ayant un bon contrôle virologique. Ce groupe est subdivisé en 3 sous-groupes selon l'âge auquel les sujets ont initié leur thérapie.

Le sujet RXB du groupe B1 avait des réponses à médiation cellulaires élevées en réponse à une stimulation Gag-spécifique. La moitié des pools de peptides testés ont induit une sécrétion d'IFN- $\gamma$ . Les données cliniques concernant la charge virale sont incomplètes en ce qui concerne les premières années de vie, mais indiquent que ce sujet a maintenu une suppression virale pendant au moins 6 mois sous cART. Une interprétation objective de ce groupe ne peut être réalisée compte tenu du faible nombre de sujets et de la faible quantité d'informations dont nous disposons pour ce sujet. Le sujet RXB est né par accouchement vaginal spontané.

Le groupe B2 est constitué de 2 sujets ayant amorcé la cART après un mois de vie, mais avant un an. Dans ce groupe-ci, deux types de réponses ont été distinguées, une puissante réponse à médiation cellulaire chez le sujet ITI, alors qu'aucune réponse n'a été détectée chez le sujet LHU. Le mode de délivrance du sujet ITI est la césarienne électorale et celui du sujet LHU est l'accouchement vaginal spontané. Les comptes CD4 et CD8 étaient similaires chez les deux sujets. La raison qui pourrait expliquer la variation des réponses observées est l'âge auquel les sujets ITI et LHU ont atteint une suppression virale, soit 6.5 et 3.5 ans respectivement. En effet, le contrôle de la virémie étant plus long, le système immunitaire a été en contact avec le virus plus longtemps. La troisième, étant le mode de délivrance, tel que mentionné pour les sujets du groupe A [112].

En ce qui concerne le groupe B3, 3 types de réponses se distinguent chez ces sujets ayant été traités un an après leurs naissances et ayant un bon contrôle virologique. Les données cliniques dont nous disposons ne permettent pas de comprendre les différents types de réponses observés. Le lien entre les réponses à médiation cellulaire et le mode de délivrance n'a pas pu être observé aussi clairement que dans les groupes précédents. En effet, 3 sujets ayant eu de faibles réponses LTC étaient nés par voie vaginale, mais aussi 2 sujets ayant manifesté de puissantes réponses LTC. Le groupe B3 est celui ayant un large spectre d'âge, la comparaison des résultats obtenus par ELISpot avec l'âge des sujets n'a pas révélé de liens entre ces deux paramètres (test de Pearson  $P = 0.3294$  et test de Spearman  $P = 0.4602$ ). La mesure régulière de la charge virale pour ces sujets n'était pas disponible pour certains d'entre eux.

#### **4.1.4. Le groupe C**

Ce groupe regroupait des sujets étant sous cART avec un bon contrôle virologique, mais ayant quelques pics de charge virale supérieure ou égale à 500 copies/mL de plasma. Dans ce groupe, tous les sujets présentaient des réponses à médiation cellulaire plus ou moins fortes suite à la majorité des stimulations Gag-spécifique. Pour certains sujets, certains pools de peptides n'ont pas induit de sécrétion d'IFN- $\gamma$ . Il a été observé que la moyenne de la fréquence de cellules ayant produit de l'IFN- $\gamma$  est d'environ 264.3 SFU/10<sup>6</sup> cellules avec une moyenne de 70% de pools ayant induits une production d'IFN- $\gamma$  dépassant le seuil de positivité.

Les charges virales mesurées dans ce groupe étaient élevées, et le contrôle de la réplication virale n'était pas aussi bien établi que chez les autres groupes. Lorsque le mode de délivrance et la charge virale sont comparés, les sujets EJW, OEH et JXY, qui ont atteint une suppression virale sont nés par voie vaginale, alors que le sujet DDY, qui avait la charge virale la plus élevée, était né par césarienne.

#### **4.1.5. Le groupe D**

Les individus du groupe D sont des individus n'ayant jamais été traités. Dans ce groupe, le lien entre le contrôle de la charge virale et la sécrétion d'IFN- $\gamma$  en réponse à la stimulation par des pools de peptides a été montré comme pour ce qui a été observé pour le groupe B2 et le groupe A. Le lien entre le contrôle de la réplication virale et les réponses a déjà été décrit dans la littérature [78]. En effet, une haute fréquence de PBMCs a sécrété de grandes quantités d'IFN- $\gamma$  ont été observées chez le sujet XTV, qui avait atteint une suppression virale en l'absence de

traitement. À l'inverse, seulement 5 pools ont induit la production d'IFN- $\gamma$  chez le sujet EXA, qui n'a jamais atteint la suppression virale. Nous avons également constaté que le compte des cellules CD4 et CD8 du sujet EXA n'a pas été influencé par la charge virale, mais a progressivement décliné jusqu'à atteindre les valeurs de références mesurées chez un adulte non-infecté [99]. Il serait intéressant d'obtenir plus de sujets pour ce groupe afin de pouvoir faire une corrélation entre les réponses observées et les données cliniques. Il a été observé que la moyenne de la fréquence de cellules ayant produit de l'IFN- $\gamma$  est d'environ 1558 SFU/10<sup>6</sup> cellules avec une moyenne de 72.4 % de pools ayant induits une production d'IFN- $\gamma$  dépassant le seuil de positivité.

#### **4.1.6. Le groupe E**

Ce groupe regroupe tous les sujets de 5 à 19 ans n'ayant pas pu être classés dans les autres groupes. Dans le groupe E, tous les sujets ont développé une réponse à médiation cellulaire Gag-spécifique. Chez chaque sujet, au moins 3 pools de peptides ont été capables d'induire une production d'IFN- $\gamma$  numériquement significative. Chez 9 des 21 sujets de ce groupe, la quasi-totalité des pools de peptides Gag ont induit de la production d'IFN- $\gamma$ . Il a été observé que la moyenne de la fréquence de cellules ayant produit de l'IFN- $\gamma$  est d'environ 270.2 SFU/10<sup>6</sup> cellules avec une moyenne de 58.4 % de pools ayant induits une production d'IFN- $\gamma$  dépassant le seuil de positivité. Les réponses observées étaient différentes les unes des autres indépendamment de l'âge des individus. Encore une fois, beaucoup de données cliniques sont manquantes et la charge virale de la majorité des sujets était inconnue.

## 4.2. Les effets du traitement précoce sur les réponses LTC

Dans le but de répondre à notre second objectif, qui était de montrer que les sujets traités plus tard avaient une réponse différente de celles observées chez les sujets traités précocement, nous avons comparé les résultats des autres groupes (B-E) aux résultats obtenus pour le groupe A.

Les données cliniques concernant la charge virale ne sont pas complètes pour beaucoup de sujets, et cela empêche une interprétation plus avancée en ce qui concerne les autres groupes. Certains centres participant à l'étude EPIC<sup>4</sup> n'ont pas encore commencé à transmettre au central les informations dont ils disposent sur les sujets à l'étude. La base de données de l'étude EPIC<sup>4</sup> est en cours de construction. Elle devrait être complétée et mise à jour dans les mois à venir.

Le groupe D semble montrer un lien entre le maintien de la charge virale et les réponses observées, cependant le faible nombre de sujets dans le groupe et le manque de données pour l'un des sujets, empêche de faire des analyses statistiques afin de voir une corrélation. L'augmentation du nombre de sujets de ce groupe permettrait de montrer l'impact de la cART sur les réponses immunitaires. En effet, aucun lien n'a été observé entre la charge virale et les réponses à médiation cellulaire chez les autres groupes dont les sujets sont traités.

Après avoir caractérisé les réponses à médiation cellulaire pour des sujets ayant été traités plus ou moins précocement, il est évident qu'il existe des différences entre les enfants ayant commencé une cART durant leurs premières 24 heures de vie et les enfants ayant été traités plus tardivement. En effet, plus le temps entre l'initiation du traitement et la naissance est long, et plus l'amplitude et la diversité de la réponse LTC Gag-spécifique est grande. Lorsque l'on

calculer la moyenne des fréquences de cellules produisant de l'IFN- $\gamma$  chez le groupe A, on obtient une fréquence d'environ 36.3 SFU/10<sup>6</sup> cellules, alors que pour le groupe B dans sa totalité on obtient 185.7 SFU/10<sup>6</sup> cellules. La fréquence moyenne des sujets du groupe A ne dépasse pas le seuil de positivité de l'ELISpot. Il en est de même lorsque l'on s'intéresse à la diversité de la réponse, on observe une moyenne de 19.5% de pools ayant induits une production d'IFN- $\gamma$  dépassant le seuil de positivité pour le groupe A contre 40.5% pour le groupe B dans sa totalité. Cependant, les moyennes n'ont pas pu être calculées pour chaque sous-groupe de B en raison du faible nombre de sujets dans les B1 et B2.

Il a été montré que la diversité et l'amplitude des réponses LTC est plus grande chez les sujets dont la virémie n'est pas parfaitement supprimée comme les sujets du groupe C comparée aux réponses observées pour les groupes A et B.

Pour cet objectif la stratification des groupes était importante. Le nombre de sujets composant certains de ces groupes n'était pas suffisant pour avoir une vue globale des réponses en fonction de l'âge des sujets et réaliser des tests de corrélation.

Plusieurs paramètres influent sur la réponse Gag-spécifique. Nous avons remarqué qu'une forte charge virale de départ induisait une réponse d'une plus grande diversité.

### 4.3. Recherche de cytokines atypiques

Pour la recherche de cytokines autres que l'IFN- $\gamma$ , une quantification multiplexe de cytokines a été réalisée. Ce test nous a permis de rechercher la présence de sécrétion d'IL-2, d'IL-22 et de TNF $\alpha$ , mais aussi de tester différentes méthodes de stimulation.

Compte tenu des faibles niveaux de sécrétions d'IFN- $\gamma$  dans le groupe A, composé d'enfants âgés de 4.2 à 8.4 ans, nous avons pensé que ces enfants contrôlaient leurs virémies par des mécanismes différents impliquant d'autres cytokines.

La faible quantité d'échantillons dont nous disposons pour ces jeunes sujets a été un facteur limitant majeur dans cette étude. C'est pour cela que seul le sujet FKU a été testé. Il correspond au sujet 5 du groupe A.

D'après les résultats obtenus, il a été constaté que les cellules de l'enfant infecté testé produisaient plus d'IL-2 que les cellules de l'adulte non-infecté testé en réponse à une co-stimulation avec des billes anti-CD3/CD28 et à des stimulations Gag-spécifiques. L'IL-2 est connue pour induire une augmentation du nombre des lymphocytes TCD4, permettant parfois le rétablissement partiel du taux de CD4. L'IL-2 a été utilisée dans le traitement du VIH pour réduire l'apoptose des cellules infectées [116, 117].

Cependant, d'autres tests seraient nécessaires pour confirmer que les niveaux d'IL-2 observés sont liés dans le cas présent à une augmentation du nombre de lymphocytes TCD4, et d'autres cytokines devront être testées. Après l'identification de cytokines, les réponses à la stimulation

Gag VIH spécifiques pourraient être mesurées avec un ELISpot optimisé pour l'IL-2 [118]. En effet, il serait possible de faire d'autres quantifications multiplexe de cytokines, en utilisant un plus grand panel de cytokines sur un plus grand nombre d'échantillons présentant des profils différents. Les marqueurs d'épuisement tel que PD-1 pourront aussi être étudié afin d'en apprendre plus sur ces cellules sécrétant des cytokines en réponse à des stimulations VIH-1 gag-spécifiques. Des tests ELISA pourront aussi être réalisés sur la totalité des échantillons lorsque des cytokines particulières seront identifiées.

## **CINQUIÈME CHAPITRE**

### **CONCLUSION**

Cette étude avait pour but de montrer que les enfants traités précocement après la naissance développaient une réponse immunitaire à médiation cellulaire contre le VIH, qui était quantitativement et/ou qualitativement différente de celles observées chez des enfants traités plus tard.

L'ensemble de nos résultats ont montré que les réponses observées chez des enfants traités dans les 24 heures suivant leur naissance étaient effectivement quantitativement et qualitativement différentes. L'amplitude et la diversité des réponses chez des enfants traités très peu de temps après la naissance sont beaucoup plus faibles que celle observée chez les enfants traités plus tard. La comparaison des sujets des différents groupes présentant de fortes réponses LTC a montré une augmentation de la diversité de la spécificité antigénique des réponses.

Cependant, dans chacun des groupes étudiés, certains sujets présentaient de faibles réponses à médiation cellulaire ou des réponses modérées. Les variations de réponses observées pourraient provenir du mode de délivrance ou bien de la charge virale de chacun des individus.

Les résultats observés ne peuvent être confirmés pour toutes les catégories de patients puisque certains groupes étaient constitués d'un faible nombre de sujets. L'inclusion de sujets supplémentaires dans les différents groupes serait nécessaire pour apporter la preuve scientifique que l'initiation précoce de la thérapie antirétrovirale a un impact sur l'amplitude et la diversité des réponses LTC développées chez les enfants infectés de manière verticale par le VIH-1.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Luzuriaga, K., et al., *Early therapy of vertical human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection: control of viral replication and absence of persistent HIV-1-specific immune responses*. J Virol, 2000. **74**(15): p. 6984-91.
2. Luzuriaga, K., et al., *Viremic Relapse after HIV-1 Remission in a Perinatally Infected Child*. New England Journal of Medicine, 2015. **372**(8): p. 786-788.
3. Persaud, D., et al., *Absence of detectable HIV-1 viremia after treatment cessation in an infant*. N Engl J Med, 2013. **369**(19): p. 1828-35.
4. Bitnun, A., et al., *Early initiation of combination antiretroviral therapy in HIV-1-infected newborns can achieve sustained virologic suppression with low frequency of CD4+ T cells carrying HIV in peripheral blood*. Clin Infect Dis, 2014. **59**(7): p. 1012-9.
5. Gottlieb , M.S., et al., *Pneumocystis carinii Pneumonia and Mucosal Candidiasis in Previously Healthy Homosexual Men*. New England Journal of Medicine, 1981. **305**(24): p. 1425-1431.
6. Siega , F.P., et al., *Severe Acquired Immunodeficiency in Male Homosexuals, Manifested by Chronic Perianal Ulcerative Herpes Simplex Lesions*. New England Journal of Medicine, 1981. **305**(24): p. 1439-1444.
7. Masur, H., et al., *An Outbreak of Community-Acquired Pneumocystis carinii Pneumonia*. New England Journal of Medicine, 1981. **305**(24): p. 1431-1438.
8. Control, C.f.D., *Current Trends Update on Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) - United States' 1982*(MMWR 31(37):507-508).
9. Control, C.f.D., *Unexplained immunodeficiency and opportunistic infections in infants--New York, New Jersey, California*. MMWR. Morbidity and mortality weekly report, 1982. **31**(49): p. 665.
10. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 868-871.
11. Gallo, R.C., et al., *Frequent Detection and Isolation of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and at Risk for AIDS*. Science, 1984. **224**(4648): p. 500-503.
12. Levy, J., et al., *Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS*. Science, 1984. **225**(4664): p. 840-842.
13. Clavel, F., et al., *Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS*. Science, 1986. **233**(4761): p. 343-346.
14. Hahn, B.H., et al., *AIDS as a Zoonosis: Scientific and Public Health Implications*. Science, 2000. **287**(5453): p. 607-614.
15. Huet, T., et al., *Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1*. Nature, 1990. **345**: p. 356-359.
16. Hirsch, V.M., et al., *An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2*. Nature, 1989. **339**: p. 389-392.
17. Sharp, P.M., et al., *Origins and diversity of human immunodeficiency viruses*. AIDS, 1994. **8**: p. S42.
18. Hemelaar, J., *The origin and diversity of the HIV-1 pandemic*. Trends in Molecular Medicine, 2012. **18**(3): p. 182-192.
19. Zhu, P., et al., *Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes*. Nature, 2006. **441**(7095): p. 847-852.

20. Brian, F., et al., *HIV Sequence Compendium 2015*. Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos, New Mexico. LA-UR-15-27742., 2015.
21. Barre-Sinoussi, F., A.L. Ross, and J.F. Delfraissy, *Past, present and future: 30 years of HIV research*. Nat Rev Micro, 2013. 11(12): p. 877-883.
22. Dalgleish, A.G., et al., *The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus*. Nature, 1984. 312(5996): p. 763-7.
23. Klatzmann, D., et al., *T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV*. Nature, 1984. 312(5996): p. 767-8.
24. Maddon, P.J., et al., *The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain*. Cell, 1986. 47.
25. Wilen, C.B., J.C. Tilton, and R.W. Doms, *Molecular mechanisms of HIV entry*. Adv Exp Med Biol, 2012. 726.
26. Klatzmann, D., et al., *Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes*. Science, 1984. 225.
27. Dragic, T., et al., *HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5*. Nature, 1996. 381(6584): p. 667-73.
28. Feng, Y., et al., *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor*. Science, 1996. 272(5263): p. 872-7.
29. Purcell, D.F. and M.A. Martin, *Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity*. J Virol, 1993. 67(11): p. 6365-78.
30. ONUSIDA, *Fiche d'information 2016* <http://www.unaids.org/fr/resources/fact-sheet>. 2016.
31. ONUSIDA, *Rapport Mondial 2013*. 2013.
32. Simon, V., D.D. Ho, and Q. Abdool Karim, *HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment*. The Lancet, 2006. 368(9534): p. 489-504.
33. McMichael, A.J., et al., *The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development*. Nat Rev Immunol, 2010. 10(1): p. 11-23.
34. Haase, A.T., *Early events in sexual transmission of HIV and SIV and opportunities for interventions*. Annu Rev Med, 2011. 62: p. 127-39.
35. Fauci, A.S., et al., *Immunopathogenic mechanisms of HIV infection*. Ann Intern Med, 1996. 124(7): p. 654-63.
36. Cummins, N.W. and A.D. Badley, *Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis: 2010*. Cell Death & Disease, 2010. 1(11): p. e99.
37. Cooper, A., et al., *HIV-1 causes CD4 cell death through DNA-dependent protein kinase during viral integration*. Nature, 2013. 498(7454): p. 376-379.
38. Grossman, Z., et al., *Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys*. Nat Med, 2006. 12(3): p. 289-95.
39. Derdeyn, C.A. and G. Silvestri, *Viral and host factors in the pathogenesis of HIV infection*. Curr Opin Immunol, 2005. 17(4): p. 366-73.
40. Stevenson, M., *HIV-1 pathogenesis*. Nat Med, 2003. 9(7): p. 853-60.
41. Letvin, N.L. and B.D. Walker, *Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections*. Nat Med, 2003. 9(7): p. 861-6.

42. Coffin, J. and R. Swanstrom, *HIV Pathogenesis: Dynamics and Genetics of Viral Populations and Infected Cells*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2013. **3**(1).
43. Bofill, M., et al., *Laboratory control values for CD4 and CD8 T lymphocytes. Implications for HIV-1 diagnosis*. Clin Exp Immunol, 1992. **88**(2): p. 243-52.
44. Chun, T.W., et al., *Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4+ T cells during primary HIV-1 infection*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(15): p. 8869-8873.
45. Josefsson, L., et al., *The HIV-1 reservoir in eight patients on long-term suppressive antiretroviral therapy is stable with few genetic changes over time*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(51): p. E4987-E4996.
46. Josefsson, L., et al., *Single cell analysis of lymph node tissue from HIV-1 infected patients reveals that the majority of CD4+ T-cells contain one HIV-1 DNA molecule*. PLoS Pathog, 2013. **9**(6): p. e1003432.
47. Josefsson, L., et al., *Majority of CD4+ T cells from peripheral blood of HIV-1-infected individuals contain only one HIV DNA molecule*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(27): p. 11199-11204.
48. Barton, K., A. Winckelmann, and S. Palmer, *HIV-1 Reservoirs During Suppressive Therapy*. Trends in Microbiology, 2016. **24**(5): p. 345-355.
49. WHO, *Antiretroviral therapie*. [http://www.who.int/topics/antiretroviral\\_therapy/en/](http://www.who.int/topics/antiretroviral_therapy/en/), 2015.
50. FDA. *Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection*. 2016 08/09/2016 Available from: <http://www.fda.gov/ForPatients/Illness/HIVAIDS/Treatment/ucm118915.htm>.
51. De Clercq, E. and G. Li, *Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years*. Clin Microbiol Rev, 2016. **29**(3): p. 695-747.
52. Cooper, R.D., et al., *Systematic review and meta-analysis: renal safety of tenofovir disoproxil fumarate in HIV-infected patients*. Clin Infect Dis, 2010. **51**(5): p. 496-505.
53. Weller, I.V. and I.G. Williams, *ABC of AIDS. Antiretroviral drugs*. Bmj, 2001. **322**(7299): p. 1410-2.
54. Sluis-Cremer, N., N.A. Temiz, and I. Bahar, *Conformational changes in HIV-1 reverse transcriptase induced by nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor binding*. Curr HIV Res, 2004. **2**(4): p. 323-32.
55. de Bethune, M.P., *Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), their discovery, development, and use in the treatment of HIV-1 infection: a review of the last 20 years (1989-2009)*. Antiviral Res, 2010. **85**(1): p. 75-90.
56. Flexner, C., *HIV-protease inhibitors*. N Engl J Med, 1998. **338**(18): p. 1281-92.
57. Ghosh, A.K., H.L. Osswald, and G. Prato, *Recent Progress in the Development of HIV-1 Protease Inhibitors for the Treatment of HIV/AIDS*. J Med Chem, 2016. **59**(11): p. 5172-208.
58. Lieberman-Blum, S.S., H.B. Fung, and J.C. Bandres, *Maraviroc: a CCR5-receptor antagonist for the treatment of HIV-1 infection*. Clin Ther, 2008. **30**(7): p. 1228-50.
59. Kuritzkes, D.R., *HIV-1 entry inhibitors: an overview*. Curr Opin HIV AIDS, 2009. **4**(2): p. 82-7.

60. Park, T.E., et al., *Review of integrase strand transfer inhibitors for the treatment of human immunodeficiency virus infection*. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2015. **13**(10): p. 1195-212.
61. Krishnan, L. and A. Engelman, *Retroviral integrase proteins and HIV-1 DNA integration*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(49): p. 40858-66.
62. UNAIDS, *The GAP report 2014*. 2014.
63. FDA. *Approved antiretroviral drugs for pediatric treatment of HIV infection*. 2015 09/25/2015 Available from: <http://www.fda.gov/ForPatients/Illness/HIVAIDS/Treatment/ucm118951.htm>.
64. Luzuriaga, K., *Early Combination Antiretroviral Therapy Limits HIV-1 Persistence in Children*. *Annu Rev Med*, 2016. **67**: p. 201-13.
65. Ananworanich, J., K. Dube, and N. Chomont, *How does the timing of antiretroviral therapy initiation in acute infection affect HIV reservoirs?* *Curr Opin HIV AIDS*, 2015. **10**(1): p. 18-28.
66. Luzuriaga, K., et al., *HIV type 1 (HIV-1) proviral reservoirs decay continuously under sustained virologic control in HIV-1-infected children who received early treatment*. *J Infect Dis*, 2014. **210**(10): p. 1529-38.
67. Ananworanich, J. and M.L. Robb, *The transient HIV remission in the Mississippi baby: why is this good news?* *J Int AIDS Soc*, 2014. **17**: p. 19859.
68. Persaud, D., et al., *Influence of age at virologic control on peripheral blood human immunodeficiency virus reservoir size and serostatus in perinatally infected adolescents*. *JAMA Pediatr*, 2014. **168**(12): p. 1138-46.
69. *Panel on Antiretroviral Therapy and Medical Management of HIV-Infected Children. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Pediatric HIV Infection*. Available at <http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/pediatricguidelines.pdf>.
70. UNAIDS, *AIDS by the numbers 2015*. 2015.
71. Lapointe, N., et al., *Transplacental transmission of HTLV-III virus*. *N Engl J Med*, 1985. **312**(20): p. 1325-6.
72. Joncas, J.H., et al., *Acquired (or congenital) immunodeficiency syndrome in infants born of Haitian mothers*. *N Engl J Med*, 1983. **308**(14): p. 842.
73. Garcia, P.M., et al., *Maternal levels of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA and the risk of perinatal transmission. Women and Infants Transmission Study Group*. *N Engl J Med*, 1999. **341**(6): p. 394-402.
74. Spira, R., et al., *Natural history of human immunodeficiency virus type 1 infection in children: a five-year prospective study in Rwanda. Mother-to-Child HIV-1 Transmission Study Group*. *Pediatrics*, 1999. **104**(5): p. e56.
75. Mbori-Ngacha, D., et al., *Morbidity and mortality in breastfed and formula-fed infants of HIV-1-infected women: A randomized clinical trial*. *Jama*, 2001. **286**(19): p. 2413-20.
76. McMichael, A.J. and S.L. Rowland-Jones, *Cellular immune responses to HIV*. *Nature*, 2001. **410**(6831): p. 980-7.
77. Koup, R.A., et al., *Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome*. *Journal of Virology*, 1994. **68**(7): p. 4650-4655.

78. Borrow, P., et al., *Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection*. Journal of Virology, 1994. **68**(9): p. 6103-6110.
79. Goonetilleke, N., et al., *The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection*. The Journal of Experimental Medicine, 2009. **206**(6): p. 1253-1272.
80. Musey, L., et al., *Cytotoxic-T-cell responses, viral load, and disease progression in early human immunodeficiency virus type 1 infection*. N Engl J Med, 1997. **337**(18): p. 1267-74.
81. Ogg, G.S., et al., *Quantitation of HIV-1-Specific Cytotoxic T Lymphocytes and Plasma Load of Viral RNA*. Science, 1998. **279**(5359): p. 2103-2106.
82. Jin, X., et al., *Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques*. J Exp Med, 1999. **189**(6): p. 991-8.
83. Matano, T., et al., *Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of chimeric simian/human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques*. J Virol, 1998. **72**(1): p. 164-9.
84. Schmitz, J.E., et al., *Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes*. Science, 1999. **283**(5403): p. 857-60.
85. Buseyne, F., et al., *Detection of HIV-specific cell-mediated cytotoxicity in the peripheral blood from infected children*. The Journal of Immunology, 1993. **150**(8): p. 3569-81.
86. Luzuriaga, K., et al., *Deficient human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T cell responses in vertically infected children*. J Pediatr, 1991. **119**(2): p. 230-6.
87. Pikora, C.A., et al., *Early HIV-1 envelope-specific cytotoxic T lymphocyte responses in vertically infected infants*. J Exp Med, 1997. **185**(7): p. 1153-61.
88. Shalekoff, S., et al., *Identification of human immunodeficiency virus-1 specific CD8+ and CD4+ T cell responses in perinatally-infected infants and their mothers*. Aids, 2009. **23**(7): p. 789-98.
89. Garcia-Knight, M.A., et al., *Viral Evolution and Cytotoxic T Cell Restricted Selection in Acute Infant HIV-1 Infection*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 29536.
90. Gijssbers, E.F., et al., *Low level of HIV-1 evolution after transmission from mother to child*. Scientific Reports, 2014. **4**: p. 5079.
91. Huang, S., et al., *Deficiency of HIV-Gag-Specific T Cells in Early Childhood Correlates with Poor Viral Containment*. The Journal of Immunology, 2008. **181**(11): p. 8103-8111.
92. Czerkinsky, C.C., et al., *A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells*. Journal of Immunological Methods, 1983. **65**(1): p. 109-121.
93. Salem Fourati, I., et al., *Development of an IFN-gamma ELISpot assay to assess varicella-zoster virus-specific cell-mediated immunity following umbilical cord blood transplantation*. J Vis Exp, 2014(89).
94. Karlsson, A.C., et al., *Comparison of the ELISPOT and cytokine flow cytometry assays for the enumeration of antigen-specific T cells*. Journal of Immunological Methods, 2003. **283**(1-2): p. 141-153.

95. The European Mode of Delivery, C., *Elective caesarean-section versus vaginal delivery in prevention of vertical HIV-1 transmission: a randomised clinical trial*. The Lancet, 1999. **353**(9158): p. 1035-1039.
96. Garcia, F., et al., *Long-term CD4+ T-cell response to highly active antiretroviral therapy according to baseline CD4+ T-cell count*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2004. **36**(2): p. 702-13.
97. Llano, A., et al., *Best-Characterized HIV-1 CTL Epitopes: The 2013 Update*. pp. 3-19 in *HIV Molecular Immunology 2013*. Yusim, K, Korber B, Brander, C, Barouch, D, de Boer, R, Haynes, BF, Koup, R, Moore, JP, Walker, BD, Eds. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM. LA-UR 13-27758, 2013.
98. Procopio, F.A., et al., *A Novel Assay to Measure the Magnitude of the Inducible Viral Reservoir in HIV-infected Individuals*. EBioMedicine, 2015. **2**(8): p. 874-883.
99. CHUM, *Valeurs de référence pour marqueurs cellulaires*. 2015.
100. *CTL/CD8+ Epitope Summary*. 2016-04-21; Available from: [http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/tables/ctl\\_summary.html](http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/tables/ctl_summary.html).
101. *Best-defined CTL/CD8+ Epitope Summary*. 2013-10-03; Available from: [http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/tables/optimal\\_ctl\\_summary.html](http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/tables/optimal_ctl_summary.html).
102. Gaffen, S.L. and K.D. Liu, *Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications*. Cytokine, 2004. **28**(3): p. 109-23.
103. Zenewicz, L.A. and R.A. Flavell, *Recent advances in IL-22 biology*. International Immunology, 2011. **23**(3): p. 159-163.
104. Kumar, A., L. Coquard, and G. Herbein, *Targeting TNF-Alpha in HIV-1 Infection*. Curr Drug Targets, 2016. **17**(1): p. 15-22.
105. Streeck, H., N. Frahm, and B.D. Walker, *The role of IFN-[gamma] Elispot assay in HIV vaccine research*. Nat. Protocols, 2009. **4**(4): p. 461-469.
106. Rosenberg, E.S., et al., *Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection*. Nature, 2000. **407**(6803): p. 523-526.
107. Kang, W., et al., *Analysis of HIV-1c-Specific CTL Responses with HIV-1 Reservoir Size and Forms*. Viral Immunol, 2016. **29**(3): p. 184-91.
108. Yu, X.G., et al., *Consistent Patterns in the Development and Immunodominance of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Specific CD8+ T-Cell Responses following Acute HIV-1 Infection*. Journal of Virology, 2002. **76**(17): p. 8690-8701.
109. Nagler, A., et al., *Comparative studies of human FcR3-positive and negative natural killer cells*. J Immunol, 1989. **143**(10): p. 3183-91.
110. Cooper, M.A., et al., *Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset*. Blood, 2001. **97**(10): p. 3146-51.
111. Thakar, M.R., et al., *Cytolytic T Lymphocytes (CTLs) from HIV-1 Subtype C-Infected Indian Patients Recognize CTL Epitopes from a Conserved Immunodominant Region of HIV-1 Gag and Nef*. Journal of Infectious Diseases, 2005. **192**(5): p. 749-759.
112. Buxmann, H., et al., *Maternal CD4+ microchimerism in HIV-exposed newborns after spontaneous vaginal delivery or caesarean section*. Early Hum Dev, 2016. **98**: p. 49-55.
113. Pierson, T., J. McArthur, and R.F. Siliciano, *Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 665-708.

114. Muenchhoff, M., A.J. Prendergast, and P.J. Goulder, *Immunity to HIV in Early Life*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 391.
115. Briand, N., et al., *Cesarean section for HIV-infected women in the combination antiretroviral therapies era, 2000–2010*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2013. **209**(4): p. 335.e1-335.e12.
116. Mitsuyasu, R.T., *The potential role of interleukin-2 in HIV*. Aids, 2001. **15 Suppl 2**: p. S22-7.
117. Tincati, C., A. d'Arminio Monforte, and G. Marchetti, *Immunological mechanisms of interleukin-2 (IL-2) treatment in HIV/AIDS disease*. Curr Mol Pharmacol, 2009. **2**(1): p. 40-5.
118. Fujihashi, K., et al., *Cytokine-specific ELISPOT assay. Single cell analysis of IL-2, IL-4 and IL-6 producing cells*. J Immunol Methods, 1993. **160**(2): p. 181-9.

## **Annexes 1. Liste des épitopes correspondants aux peptides ayant induit une production d'IFN- $\gamma$ .**

La liste étant trop longue j'ai généré un code QR qui vous redirige vers un fichier Excel contenant la liste peptides correspondant à la « A-list » étant la liste des épitopes LTC les mieux définis dans la littérature et la liste de tous les épitopes LTC. Ce code peut être scanner avec n'importe quel lecteur de code QR. La liste est également disponible à travers ce lien <https://goo.gl/9N3r9C>.



**Figure 34:** Code QR de la liste des épitopes LTC.

# Annexe 2 : Publications

**Titre : Étude des effets de l'initiation précoce du traitement sur la réactivité immunitaire chez l'enfant infecté par le VIH-1.**

Affiche présentée le 27 mai 2015 lors du 30<sup>e</sup> congrès de recherche des étudiants des cycles supérieurs et des postdoctorants en recherche au CHU de Sainte-Justine.

## Étude des effets de l'initiation précoce du traitement sur la réactivité immunitaire chez l'enfant infecté par le VIH-1.

**INTRODUCTION**

L'infection à VIH ne peut être guérie car ce virus s'intègre à l'ADN de nos cellules. Le traitement par les antirétroviraux permet de ralentir la progression de la maladie. Cette thérapie sert aussi à prévenir la transmission du VIH de la mère à l'enfant. Malgré cela, plus de 3,3 millions d'enfants vivent avec le VIH dans le monde et la majorité ont été infectés par transmission verticale. En 2013, des chercheurs américains ont rapporté qu'une mère et son enfant ont été infectés par le VIH. En 2013, une étude (Engl J Med 369: 1826-1835, 2013), qui avait constaté le VIH de sa mère et avait été traitée rapidement après sa naissance avec une combinaison d'agents antirétroviraux, avait réussi à se débarrasser du VIH (viémie indétectable sans traitement). Quatre cas potentiellement similaires ont été ultérieurement identifiés à Toronto et à Ottawa (Luzariga et al., N Engl J Med 372: 786-788, 2015), cette rémission (Luzariga et al., N Engl J Med 372: 786-788, 2015), cette rémission pose nombre de questions quant aux effets bénéfiques d'une initiation précoce du traitement chez l'enfant infecté.

**PRINCIPE DE L'ELISPOT**

**CONCLUSION**

Nos résultats préliminaires indiquent que ces 4 enfants, qui ont été traités peu après la naissance et chez qui la charge virale est indétectable, ont des réponses immunitaires à médiation cellulaire dirigées contre le VIH-1. Ces réponses, faibles mais détectables par l'utilisation de panels de peptides adaptés à la souche de virus infectante, pourraient avoir contribué au contrôle de la viémie chez ces quatre patients.

**OBJECTIF**

Déterminer si les enfants traités précocement développent une réponse immunitaire à médiation cellulaire contre le VIH qui est différente de celle retrouvée chez les enfants traités plus tard.

**REMERCIEMENTS**

**CHU SAINTE-JUSTINE**

- Hugo Soudryns
- Marie-Claire Gagnon
- Marine Côté
- Inaaf Salem Fournil
- Audrée-Janelle-Montcalm
- Normand Lapointe
- Valérie Lamare
- Paloma Kalkar

**CHILDREN'S HOSPITAL OF EASTERN ONTARIO**

- Arif Bitnun
- Lindy Samson

**HOSPITAL FOR SICK CHILDREN**

- Arif Bitnun
- Stanley Read

**RÉSULTATS**

**GROUPES À L'ÉTUDE**

Groupes	Age	Charge virale	CD4	CD8	CD4/CD8	CD4	CD8	CD4/CD8	Total
A	7	5	3	5	5	5	5	5	5
B	10	3	7	5	5	5	5	5	5
C	10	18	14	14	14	14	14	14	14
D	10	17	7	9	3	4	7	5	5
E	11	10	11	11	11	11	11	11	11
Total	7	11	11	26	26	26	26	26	26

A. Ont débuté le traitement avant 3 jours de vie et ont contrôlé le virus.  
 B. Ont débuté le traitement dans la 1<sup>re</sup> année de vie et ont contrôlé le virus.  
 C. Ont débuté le traitement après la 1<sup>re</sup> année de vie et ont contrôlé le virus.  
 D. Pas de traitement.  
 E. Traités mais n'ont pas réussi à contrôler le virus.

# Titre : Low but detectable IFN- $\gamma$ responses against clade-matched HIV-1 peptides in early-treated vertically-infected children with long-term sustained viral suppression.

Affiche présentée du 18 au 19 juillet 2015 lors du « Towards in HIV cure Symposium » et le 10 mars 2016 lors de la Journée de la Recherche du Département de microbiologie, infectiologie et immunologie.

## Low but detectable IFN- $\gamma$ responses against clade-matched HIV-1 peptides in early-treated vertically-infected children with long-term sustained viral suppression.

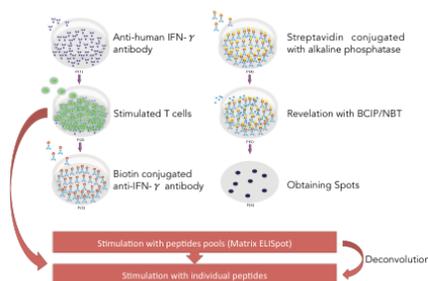
Hinatea Dieumegard<sup>1,2</sup>, Insaï Salem Fourati<sup>1,2</sup>, Armelle Le Campion<sup>1,2</sup>, Fatima Kakkar<sup>3,4,5</sup>, Jason Brophy<sup>6</sup>, Lindy Samson<sup>6</sup>, Michael Hawkes<sup>7</sup>, Stanley Read<sup>8</sup>, Ari Bitnun<sup>9</sup>, Hugo Soudeyns<sup>1,2,3</sup> and the EPIC4 Study Group.

<sup>1</sup>Unité d'immunopathologie virale, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, Montréal, QC, Canada; <sup>2</sup>Department of Microbiology, Infectiology & Immunology, Université de Montréal, QC, Canada; <sup>3</sup>Division of Infectious Diseases, CHU Sainte-Justine, Montréal, QC, Canada; <sup>4</sup>Centre maternel et infantile sur le SIDA (CMS), Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, Montréal, QC, Canada; <sup>5</sup>Department of Pediatrics, Université de Montréal, QC, Canada; <sup>6</sup>Children's Hospital of Eastern Ontario, University of Ottawa, Ottawa, ON, Canada; <sup>7</sup>University of Alberta, Edmonton, AL, Canada; <sup>8</sup>Hospital for Sick Children, University of Toronto, Toronto, ON, Canada.

### ABSTRACT

Absence of detectable cell-mediated immune responses to HIV-1 is a recurring finding in early-treated HIV-1 vertically-infected children in whom sustained viral suppression is achieved and maintained for an extended period. It has been assumed that levels of viral antigens were too low to trigger or maintain HIV-1-specific immune responses. However, reemergence of these responses following viral rebound is well documented. Here, IFN- $\gamma$  responses were measured in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 4 early-treated vertically-infected children with long-term sustained viral suppression (Bitnun et al., Clin Infect Dis 59: 1012-1019, 2014). PBMC were obtained from 4 children whose treatment on combination antiretroviral therapy (cART) was initiated within 72 hours of birth and sustained virologic suppression (HIV-1 viral load < 50 copies/mL) achieved. At the time of blood sampling, virologic suppression had been maintained for 3.9 to 8.1 years. IFN- $\gamma$  production in response to HIV-1 clade-matched peptide pools (clade A [23 pools; 122 peptides] and clade C [22 pools; 121 peptides] consensus peptides) were measured using ELISpot. PBMC from HIV-uninfected subjects and a 29 year old HIV clade C-infected adult without sustained viral suppression (140,573 copies/mL) were used as controls. ELISpot positivity was defined according to standard criteria (>50 spot-forming units [SFU] per 10<sup>6</sup> cells and >2 SD over negative controls). Results: Low-level HIV-specific IFN- $\gamma$  responses were detected in all 4 children but not in HIV uninfected controls. Responses ranged from 0 SFU to 121 SFU/10<sup>6</sup> PBMC in Case 1, 0 to 98 SFU/10<sup>6</sup> PBMC in Case 2, 0 to 165 SFU/10<sup>6</sup> PBMC in Case 3, and 0 to 98 SFU/10<sup>6</sup> PBMC in Case 4, substantially lower than clade-matched IFN- $\gamma$  responses measured in the control subject without long-term viral suppression (0-1858 SFU/10<sup>6</sup> PBMC) and significantly lower than anti-CD3, CMV-specific and VZV-specific responses. Low but significant frequencies of cells producing IFN- $\gamma$  in response to stimulation with HIV-1 clade-matched peptides were detected in early cART-treated children with sustained viral suppression under cART thereafter. These responses may be contributing to long-term control of HIV replication in vertically-infected children, and these dynamics of host-pathogen interaction may qualitatively or quantitatively differ from those observed in HIV-infected adults.

### METHOD: ELISPOT PRINCIPLE



### CONCLUSION

Our results indicate that four children who acquired HIV-1 infection by mother-to-child transmission, who were treated soon after birth with potent combination antiretroviral therapy, and in whom HIV-1 viral load remained undetectable in the long term actually developed cell-mediated immune responses directed against HIV. These IFN- $\gamma$  responses were of comparatively low magnitude but were clearly detectable (i.e. above background) when HIV-1 clade-matched peptide panels were used in IFN- $\gamma$  ELISpot. Further studies will be required to determine whether these responses contribute to the long-term control of HIV-1 replication, and whether the dynamics of host-pathogen interaction quantitatively and/or qualitatively differs in these children from responses observed in HIV-infected adults.

### ACKNOWLEDGMENT

#### CHU SAINTE-JUSTINE

- Martine Caty
- Audrey Janelle-Montcalm
- Normand Lapointe
- Valérie Lamarre
- Doris G. Ransy
- Sylvie Valois

#### CHILDREN'S HOSPITAL OF EASTERN ONTARIO

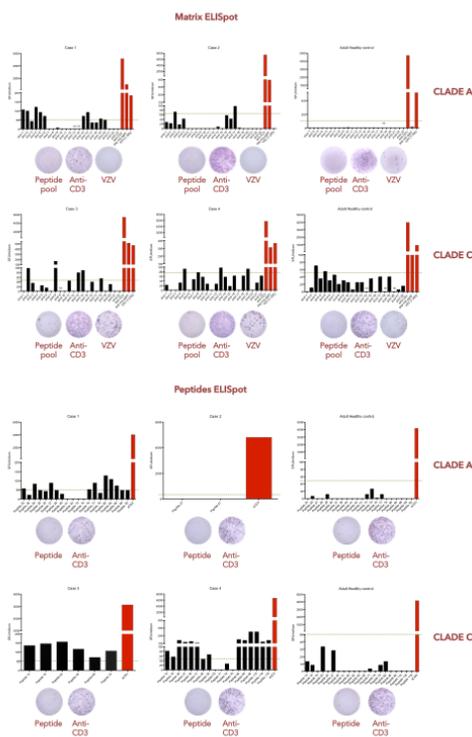
- Jennifer Bowes

#### HOSPITAL FOR SICK CHILDREN

- Cheryl Arneson



### RESULTS



# Titre : IFN-gamma Responses against HIV-1 Gag in Children with Long-Term Viral Suppression.

Affiche présentée du 12 au 15 mai 2016 lors du 25<sup>e</sup> congrès annuel canadien de recherche sur le VIH/sida.

## IFN-gamma Responses against HIV-1 Gag in Children with Long-Term Viral Suppression

Hineta Dieumegard<sup>1,3</sup>, Amélie Pagliuza<sup>2</sup>, Fatima Kakkar<sup>4,5</sup>, Jason Brophy<sup>6,7</sup>, Lindy Samson<sup>6,7</sup>, Stanley Read<sup>8,9</sup>, Michael Hawkes<sup>10</sup>, Nicolas Chomont<sup>2,3</sup>, Ari Bitnun<sup>8,9</sup>, Hugo Soudeyns<sup>1,3,5</sup>

1. Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, Montréal, QC, 2. Centre de recherche du CHUM, Montréal, QC, 3. Department of Microbiology, Infectiology & Immunology, Université de Montréal, Montréal, QC, 4. Infectious Diseases Service, CHU Sainte-Justine, Montréal, QC, 5. Department of Pediatrics, Université de Montréal, Montréal, QC, 6. Children's Hospital of Eastern Ontario, Ottawa, ON, 7. Department of Pediatrics, University of Ottawa, Ottawa, ON, 8. Hospital for Sick Children, Toronto, ON, 9. Department of Pediatrics, University of Toronto, Toronto, ON, 10. Department of Pediatrics, University of Alberta, Edmonton, AB

### BACKGROUND

Children with vertical HIV infection treated soon after birth with combination antiretroviral therapy who maintained long-term sustained viral suppression (SVS) have been reported to not develop HIV-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses. We evaluated CTL responses in relation to HIV reservoir size in 5 early-treated children.

Children who started cART within 24h of birth	Gender	Age at visit (years)	Clade	Duration of suppression (years)	Viral load
CASE 1	Female	8,4	CRF06_cpx	7,9	TND
CASE 2	Female	8,4	UNK (A)	8,2	TND
CASE 3	Female	4,2	C	3,8	TND
CASE 4	Male	4,2	C	3,7	TND
CASE 5*	Male	4,9	B	0,7	TND

\*Case 5 had rapid viral rebound after treatment interruption at 3 years with sustained suppression following treatment re-initiation (re-suppressed for 10 months at sampling).

### METHOD

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from 5 HIV-infected children presented below. IFN-γ production in response to HIV-1 Gag clade-matched peptide pools was measured using ELISpot. HIV reservoir size was estimated using qRT-PCR for total and integrated HIV DNA and TILDA.

### RESULTS

#### MATRIX ELISPOT

Scan QR code to see known epitopes related to these peptide sequences.

#### PEPTIDES ELISPOT

#### HIV RESERVOIR SIZE

Patient ID	Integrated HIV DNA (copies/10 <sup>6</sup> CD4 T cells)	Total HIV DNA (copies/10 <sup>6</sup> CD4 T cells)	TILDA (Positive events per 10 <sup>6</sup> cells)
Case 1	7	378	1,5
Case 2	13	11	1,5
Case 3	27	14	1,5
Case 4	11	10	1,4
Case 5	32	119	1,5

Limit of detection

### CONCLUSION AND DISCUSSION

Our results indicate that children who acquired HIV-1 infection by mother-to-child transmission, who were treated soon after birth with potent combination antiretroviral therapy, and in whom HIV-1 viral load remained undetectable in the long term actually developed cell-mediated immune responses directed against HIV. Low frequencies of IFN-γ-producing cells were detected in early-treated children with SVS upon stimulation with HIV-1 peptides. Case 5 (treatment interruption) exhibited intermediate responses relative to subjects with SVS and controls. HIV-1 reservoir was very small in all early-treated children. The potential role of CTL responses in long-term control of HIV in vertically-infected children requires further study. Further studies will be required to determine whether these responses contribute to the long-term control of HIV-1 replication, and whether the dynamics of host-pathogen interaction quantitatively and/or qualitatively differs in these children from responses observed in HIV-infected adults.

### ACKNOWLEDGMENT

**CHU SAINTE-JUSTINE**

- Martine Caty
- Audrey Janelle-Montcalm
- Normand Lapointe
- Valérie Lamarre
- Doris G. Ransy
- Silvie Valois
- Suzanne S. Taillefer

**CHILDREN'S HOSPITAL OF EASTERN ONTARIO**

- Jennifer Bowes

**HOSPITAL FOR SICK CHILDREN**

- Cheryl Arneson

**Titre : Réponses à médiation cellulaire contre le VIH-1 chez des enfants dont la virémie a été contrôlée à long terme.** Présentations lors du 31<sup>e</sup> congrès de recherche des étudiants des cycles supérieurs et des postdoctorants en recherche au CHU de Sainte-Justine, le 26 mai 2016

Hinatea Dieumegard, Amélie Pagliuzza, Fatima Kakkar, Jason Brophy, Lindy Samson, Stanley Read, Michael Hawkes, Nicolas Chomont, Ari Bitnun, Hugo Soudeyins

**Introduction :** Il a été rapporté que des enfants infectés par le VIH-1 ayant été traités peu après la naissance avec une thérapie antirétrovirale combinée (TAC) et chez qui une suppression à long terme (SLT) du VIH a été maintenue ne développaient pas de réponse à médiation cellulaire (RMC) dirigée contre ce virus. Cette réponse et la taille du réservoir viral ont été mesurées chez 5 enfants infectés et traités précocement.

**Méthodes :** Des échantillons sanguins ont été obtenus de 5 enfants infectés par le VIH avec SLT (<50 copies/mL) traités avec une TAC avant 24h de vie. La SLT a été maintenue pendant 3.7-8.4 années chez les sujets 1-4, mais le sujet 5 a subi un rebond de charge virale suite à une interruption de traitement à 3 ans d'âge, puis une résomption de SLT suite à la réintroduction de la TAC. La production d'IFN- $\gamma$  en réponse à des peptides du VIH-1 appariés pour le clade a été mesurée par ELISpot. La taille du réservoir viral a été estimée par qRT-PCR (ADN VIH total et intégré) et TILDA.

**Résultats :** Des réponses en IFN- $\gamma$  ont été détectées chez les sujets 1-5, mais très inférieures à celles observées chez des contrôles sans SLT. Chez 2 sujets, la taille du réservoir était moindre que la limite de détection (LDD) de la qRT-PCR et du TILDA. Un sujet avait 378 copies de VIH/10<sup>6</sup> cellules CD4 (ADN intégré et TILDA <LDD) et un autre avait 1.4 cellules infectées/10<sup>6</sup> cellules CD4 par TILDA (ADN total et intégré <LDD). Le sujet 5 avait 32 copies d'ADN VIH intégré/10<sup>6</sup> cellules CD4 et 119 copies d'ADN VIH total/10<sup>6</sup> cellules (TILDA <LDD).

**Conclusion :** De faibles fréquences de cellules VIH-spécifiques productrices d'IFN- $\gamma$  ont été détectées chez des enfants en SLT traités précocement. Le sujet 5 a montré des réponses intermédiaires comparé aux sujets avec SLT et aux contrôles. Le réservoir du VIH était très petit chez tous les sujets. Le rôle potentiel de la RMC dans le maintien de la SLT chez les enfants infectés verticalement par le VIH doit être examiné plus à fond.

